

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 700**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/076952**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13818637 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2935326**

54 Título: **Anticuerpos anti-tau humanos**

30 Prioridad:  
**21.12.2012 US 201261745410 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.04.2021**

73 Titular/es:  
**BIOGEN MA INC. (50.0%)  
225 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US y  
BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE  
GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**WEINREB, PAUL, H.;  
CHEN, FENG;  
GARBER, ELLEN, A.;  
GRIMM, JAN y  
MONTRASIO, FABIO**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

**ES 2 816 700 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 humanos

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a moléculas de unión específica a tau novedosas, particularmente anticuerpos humanos así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos que reconocen la proteína tau, incluyendo tau fosforilada patológicamente y formas agregadas de tau. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden dichas moléculas de unión, anticuerpos e imitadores de los mismos, ambos valiosos como una herramienta de diagnóstico para identificar especies de tau y tau tóxica en plasma y LCR, y también en estrategias de vacunación pasiva para tratar tauopatías neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia (ELA-CPD), demencia argirofílica granulosa (DAG), angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NP-C), enfermedad de motoneuronas no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (EPi), parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico.

25

Antecedentes de la técnica

La acumulación, modificaciones y agregación de proteínas son aspectos patológicos de numerosas enfermedades neurodegenerativas. La tau agregada y modificada patológicamente, incluyendo conformeros de tau hiperfosforilada, son una característica invariante de las tauopatías y se correlacionan con la gravedad de las enfermedades.

30

Tau es una proteína asociada a microtúbulos expresada en el sistema nervioso central con una función principal de estabilizar los microtúbulos. Existen seis isoformas principales de tau expresadas principalmente en el cerebro humano adulto, que se derivan de un único gen mediante corte y empalme alternativo. En condiciones patológicas, la proteína tau se hiperfosforila, dando como resultado una pérdida de unión a tubulina y desestabilización de microtúbulos seguido de la agregación y deposición de tau en ovillos neurofibrilares patogénicos. Los trastornos relacionados con tau - colectivamente denominados tauopatías neurodegenerativas - forman parte de un grupo de trastornos del plegamiento inadecuado de proteínas, incluyendo enfermedad de Alzheimer (EA), parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal, FTDP-17, entre otros. Se ha notificado que más de 40 mutaciones en el gen tau están asociadas con la demencia frontotemporal hereditaria lo que demuestra que las mutaciones del gen tau son suficientes para activar la neurodegeneración (Cairns y col., *Am. J. Pathol.* 171 (2007), 227-40). Los estudios en ratones transgénicos y el cultivo celular indican que, en EA, la patología de tau puede ser causada por una cascada patológica en la que A $\beta$  se encuentra aguas arriba de tau (Götz y col., *Science* 293 (2001), 1491-1495). Sin embargo, otro hallazgo apunta a un modelo de doble ruta donde ambas cascadas funcionan independientemente entre sí (van de Nes y col., *Acta Neuropathol.* 111 (2006), 126-138). Las inmunoterapias que se dirigen al péptido beta-amiloide en EA produjeron resultados alentadores en modelos animales y muestran resultados prometedores en ensayos clínicos. Datos más recientes de autopsias de una pequeña cantidad de sujetos sugieren que la depuración de placas beta-amiloides en pacientes con EA avanzado puede no ser suficiente para detener el deterioro cognitivo, enfatizando la necesidad de estrategias terapéuticas adicionales para la EA (Holmes y col., *Lancet* 372 (2008), 216-223; Boche y col., *Acta Neuropathol.* 120 (2010), 13-20). Tras el éxito de la terapia de inmunización basada en Abeta en modelos animales transgénicos, el concepto de la inmunoterapia activa se expandió a la proteína tau. Sin embargo, se descubrió que la vacunación activa de ratones de tipo silvestre usando la proteína tau induce la formación de ovillos neurofibrilares, daño axonal e infiltrados mononucleares en el sistema nervioso central, acompañado por déficits neurológicos (Rosenmann y col., *Arch Neurol.* 63 (2006), 1459-1467). Estudios posteriores en líneas de ratones transgénicos usando vacunación activa con péptidos de tau fosforilada revelaron una reducción en los niveles cerebrales de agregados tau en el cerebro y una evolución más lenta de los deterioros conductuales (Sigurdsson, J. *Alzheimers. Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel y col., *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Estos hallazgos destacan el potencial beneficio, pero también los enormes riesgos asociados con las estrategias de inmunoterapia activa dirigidas a tau. Se necesitan urgentemente estrategias terapéuticas novedosas que aborden las proteínas tau patológicas con una terapia eficaz y segura.

60

La inmunización pasiva con anticuerpos humanos derivados de sujetos humanos sanos optimizados evolutivamente

y madurados por afinidad por el sistema inmunitario humano proporcionaría una nueva vía terapéutica prometedora con una alta probabilidad de excelente eficacia y seguridad.

Se describen anticuerpos específicos de tau humanos, así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos, así como también procedimientos relacionados con estos en el documento US 2012/0087861 A1.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención usa la respuesta inmunitaria específica de tau de sujetos humanos sanos para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos específicos anti-tau naturales. En particular, los experimentos realizados según la presente invención tuvieron éxito en el aislamiento de anticuerpos monoclonales específicos de tau de un grupo de sujetos humanos sanos sin signos de tauopatía neurodegenerativa.

Por lo tanto, la presente invención se dirige a anticuerpos humanos, fragmentos de unión a antígeno y moléculas de unión a antígeno similares que son capaces de reconocer específicamente tau. Por "reconocer específicamente tau", "anticuerpo específico de/para tau" y "anticuerpo anti-tau" se entiende específica, general y colectivamente, anticuerpos contra la forma nativa de tau o isoformas de tau agregada o modificada patológicamente. En esta invención se proporcionan anticuerpos humanos selectivos para las formas de longitud completa, patológicamente fosforiladas y agregadas.

En esta invención se describe un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo que demuestra las características de unión inmunológicas de un anticuerpo caracterizado por las regiones variables V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> tal como se expone en la figura 7.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo, donde:

- (a) la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 48 y la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49, o
- (b) la V<sub>H</sub> comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 47 y la V<sub>L</sub> comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento F<sub>v</sub> de cadena sencilla, un fragmento F(ab)', un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno. En una realización específica, más adelante, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo de isotipo IgG humano. De manera alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico humano-murino o murinizado, siendo el último particularmente útil para procedimientos de diagnóstico y estudios en animales.

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la presente invención o fragmentos activos del mismo, o agonistas y moléculas cognadas o, alternativamente, antagonistas del mismo y a procedimientos inmunoterapéuticos y de inmunodiagnóstico que usan tales composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una tauopatía, donde una cantidad efectiva de la composición se administra a un paciente que la necesita.

En esta invención se describen el linfocito B de memoria humano inmortalizado y la célula B, respectivamente, que produce el anticuerpo que tiene las características distintas y únicas que se definen a continuación.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican el anticuerpo de la invención.

Por consiguiente, la presente invención también abarca vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con los mismos, así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para tau. En la técnica se conocen medios y procedimientos para la producción recombinante de anticuerpos e imitadores de los mismos, así como procedimientos de detección de moléculas de unión competidoras, por ejemplo, anticuerpos. Sin embargo, como se describe en esta invención, en particular con respecto a las aplicaciones terapéuticas en humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta inmunitaria dirigida contra dicho anticuerpo observado de otra manera para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados

Además, se describen en esta invención composiciones y procedimientos que pueden usarse para identificar tau en muestras. Los anticuerpos anti-tau descritos pueden usarse para detectar sangre, LCR y orina humanos por la presencia de tau en muestras, por ejemplo, usando un ensayo basado en ELISA o adaptado a la superficie. Los procedimientos y composiciones descritos en esta invención pueden ayudar en tauopatías neurodegenerativas tales

como el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y pueden usarse para controlar el avance de la enfermedad y la eficacia terapéutica.

Por ende, es un objetivo particular de la presente invención proporcionar anticuerpos para su uso en procedimientos para el tratamiento, diagnóstico o prevención de una tauopatía neurodegenerativa tal como enfermedad de Alzheimer, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, demencia argirofílica granulosa, angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de motoneuronas no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico. Los procedimientos comprenden administrar una concentración efectiva de un anticuerpo humano o derivado de anticuerpo al sujeto donde el anticuerpo se dirige a tau.

Realizaciones adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y los Ejemplos a continuación.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

Figura 1. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la región variable, es decir, cadena pesada y cadena ligera lambda de anticuerpos humanos NI-105.4E4 (A), NI-105.24B2 (B) y NI-105.4A3 (C). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y estructura (FR) se indican con las CDR subrayadas. Debido a la estrategia de clonación, la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera puede contener potencialmente alteraciones inducidas por cebadores en FR1 que, sin embargo, no afectan sustancialmente a la actividad biológica del anticuerpo. Para poder proporcionar un anticuerpo humano consenso, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del clon original se alinearon y se ajustaron según las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; véase, *por ejemplo*, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Estos aminoácidos, que se considera que se desvían potencialmente de la secuencia de línea germinal consenso debido al cebador de PCR y, por lo tanto, podrían haberse reemplazado en la secuencia de aminoácidos, se indican en negrita.

Figura 2. NI-105.4E4 se une a ovillos neurofibrilares (ONF), neuritas distróficas e hilos del neurópilo en un cerebro con EA y ratones que expresan TauP301L humana. La tinción de NI-105.4E4 identifica ONF e hilos del neurópilo en un cerebro con EA (A), sin unión significativa a tau en el cerebro de un sujeto de control sano (B). En un ratón transgénico con TauP301L (E-I), NI-105.4E4 se une fuertemente a la tau patológica similar a ONF (E, F y H), hilos del neurópilo (E y G) y neuritas distróficas (E y H). Además, NI-105.4E4 también identifica agregados de tau en la etapa pre-ovillo (I). NI-105.4E4 se une a ONF, neuritas distróficas e hilos del neurópilo en ratones transgénicos que expresan APP humana con la mutación sueca y ártica y TauP301L; la flecha indica una placa beta-amiloide, rodeada por neuritas distróficas reconocidas por NI-105.4E4 (J). El anticuerpo secundario no solo da señales tanto a EA humana (C) como a un control sano (D).

Figura 3. Ensayo de inmunoreactividad sobre el amiloide de placas tisulares (TAPIR). Los ovillos neurofibrilares se tiñeron con el anticuerpo anti-fosfo-tau AT100 o se aislaron con suero de sujetos ancianos sanos.

Figura 4. Representación esquemática de los epítomos NI-105.4E4 y NI-105.4A3 y los epítomos de anticuerpos tau monoclonales de ratón usados comúnmente y disponibles en el mercado. El anticuerpo humano NI-105.4E4 se dirige a un único epítomo que comprende dos polipéptidos lineales, uno de los cuales se ubica en el dominio de unión a microtúbulos (R4) de tau que se enmascara en tau fisiológica asociada a microtúbulos. Tau-12 (Covance, California, Estados Unidos), HT7, AT8, AT180 (Thermo Scientific, Estados Unidos); PHF1 (Lewis y col., Science 293 (2001), 1487-1491).

Figura 5. Niveles de IgG humana en el plasma de ratones tras la administración intraperitoneal de 30 mg/kg de anticuerpo anti-tau humano NI-105.4E4 o NI-105.4A3.

Figura 6. Niveles de IgG humana en homogeneizado de cerebro de ratones tras la administración intraperitoneal de 30 mg/kg de anticuerpo anti-tau humano NI-105.4E4 o NI-105.4A3.

Figura 7. Secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de

anticuerpos anti-tau humanos (A) NI-105.17C1, (B) NI-105.6C5, (C) NI-105.29G10, (D) NI-105.6L9, (E) NI-105.40E8, (F) NI-105.48E5, (G) NI-105.6E3, (H) NI-105.22E1, (I) NI-105.26B12, (J) NI-105.12E12, (K) NI-105.60E7, (L) NI-105.14E2, (M) NI-105.39E2, (N) NI-105.19C6, y (O) NI-105.9C4. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se encuentran subrayadas.

5

Figura 8.: (A) Unión de ch17C1, ch17C1(N31Q) mlgG2a y ch17C1(N31Q) mlgG1 Agli a tau recombinante en un ensayo ELISA. (B) Comparación de la unión de tau recombinante mediante ch17C1(N31Q) mlgG2a y ch17C1(N31Q, I48V) mlgG2a en un ensayo ELISA.

10

Figura 9. Comparación de la unión de tau recombinante mediante NI-105.40E8 hlgG1 y NI-105.40E8(R104W) hlgG1 en un ensayo ELISA.

15

Figura 10. Unión de anticuerpos anti-tau humanos NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6C5 y NI-105.17C1(I48V) con tau agregada patológicamente en cerebro con EA y en el cerebro del modelo de ratón transgénico de tauopatía. Imágenes representativas de anticuerpo anti-tau humano que se une a agregados de tau patológica en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer (EA) y en el cerebro de ratón transgénico de tauopatía (Tg). Las muestras de tejido de control se obtuvieron de sujetos mentalmente sanos (Ctr) o de cerebros de ratones de tipo silvestre (ts).

20

Figura 11. Penetración cerebral de anticuerpos anti-tau humanos NI-105.6C5 o NI-105.6E3 en ratones TauP301L. "Tg" indica secciones representativas de animales transgénicos tratados o no tratados y "ts" indica un animal no transgénico no tratado. Barra de escala: 50 µm.

25

Figura 12. Efectos de tratamiento crónico de ratones TauP301L con ch4E4(N30Q) y ch17C1(N31Q). Los niveles de tau humana total (A), tau pS199 humana (B), tau pT231 humana (C) y tau pT181 humana (D) en la fracción insoluble y soluble de extractos de proteínas cerebrales se cuantificaron con ELISA comercial.

30

Figura 13. La tau humana soluble e insoluble en ratones TauP301L tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) se detectó por inmunoelectrotransferencia.

35

Figura 14. Concentraciones de fármacos en plasma promedio para animales tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) 24 h después de la administración i.p. de la última dosis. Las concentraciones de fármacos en plasma promedio para ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) fueron de 145 y 200 µg/ml, respectivamente.

40

Figura 15. La memoria de trabajo espacial en ratones TauP301L tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) se evaluó con un laberinto en Y de dos ensayos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### I. Definiciones

40

Las tauopatías neurodegenerativas son un grupo diverso de trastornos neurodegenerativos que comparten una lesión patológica común que consiste en agregados intracelulares de filamentos anormales que se componen principalmente de tau patológicamente hiperfosforilada en neuronas y/o células gliales. Los rasgos clínicos de las tauopatías son heterogéneos y se caracterizan por demencia y/o síndromes motores. La acumulación progresiva de inclusiones de tau filamentosas puede causar degeneración neuronal y glial en combinación con otros depósitos como, *por ejemplo*, beta-amiloide en enfermedad de Alzheimer o como una única entidad patogénica como se ilustra por las mutaciones del gen tau que están asociadas con formas familiares de demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17). Debido a la heterogeneidad de sus manifestaciones clínicas, se puede proporcionar una lista potencialmente no exhaustiva de enfermedades tauopáticas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, demencia argirofíllica granulosa, angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de motoneuronas no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico; véase, para una revisión, *por ejemplo*, Lee y col., Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001), 1121-1159 en cuya Tabla 1 catalogan los únicos miembros de tauopatías o Sergeant y col., Bioch. Biophys. Acta 1739 (2005), 179-97, con una lista en la Figura 2 en la misma.

60

En esta memoria descriptiva, el término "tau" se usa de manera intercambiable para referirse específicamente a la

forma monomérica nativa de tau. El término "tau" se usa también para identificar generalmente otros conformeros de tau, por ejemplo, oligómeros o agregados de tau. El término "tau" también se usa para referirse de forma colectiva a todos los tipos y formas de tau. Debido al corte y empalme 6 alternativo, las isoformas de tau están presentes en el cerebro humano. Las secuencias de proteínas para estas isoformas son:

5

Isoforma de Fetal-tau de 352aa

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGD  
 TPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK  
 GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTR  
  
 EPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV  
 QIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNIT  
 HVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV VSGDTS PRHLSNV SSTGS  
 IDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL (SEQ ID NO:1)

Isoforma de Tau-B de 381aa

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT  
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTG  
 SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSG  
 GDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV  
 PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHPG  
 GGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHV PGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTD  
 HGAEIVYKSPV VSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL  
 (SEQ ID NO:2)

Isoforma de Tau-C de 410aa

MAEPRQEFVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT  
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAE EAGI  
 GDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPG  
 QK GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP  
 PTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG  
 KVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLD  
 NITHV PGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV VSGDTS PRHLSNVSS  
 TGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL (SEQ ID NO:3)

Isoforma de Tau-D de 383aa

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLK AEEAGIGD  
TPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK  
GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTR  
EPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKV  
QIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHH  
KPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKA  
KTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSDMV DSPQLATLADEV SASLAKQ  
GL (SEQ ID NO:4)

Isoforma de Tau-E de 412aa

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT  
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTG  
SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSG  
DRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV  
PMPDLKKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPG  
GGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSL  
DNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVS  
STGSDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL (SEQ ID NO:5)

Isoforma de Tau-E de 441aa

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT  
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIP EGTTAEEAGI  
GDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPG  
QK GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP  
PTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKKNVSKKIGSTENLKHQPGGG  
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNI  
HHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENA  
KAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSSTGSDMV DSPQLATLADEV SASLA  
KQGL (SEQ ID NO:6)

5 La secuencia de aminoácidos de tau de "tipo silvestre" se representa por la isoforma Tau-F de 441aa (SEQ ID NO:6) también denominada "hTau40", "TauF", "Tau-4" o "tau de longitud completa". La secuencia de aminoácidos de tau puede recuperarse de la bibliografía y bases de datos pertinentes; véase Goedert y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 4051-4055, Goedert y col., EMBO J. 8(1989), 393-399, Goedert y col., EMBO J. 9 (1990), 4225-4230 y GenBank UniProtKB/swissprot: locus TAU\_HUMAN, números de acceso P10636-2 (Fetal-tau) y P10636-4 a -8

(Isoformas B a F).

Otro rasgo sorprendente de la proteína tau es la fosforilación, que ocurre a alrededor de 30 de 79 sitios potenciales de fosforilación de serina (Ser) y treonina (Thr). Tau es altamente fosforilada durante el desarrollo cerebral. El grado de fosforilación disminuye en la edad adulta. Algunos de los sitios de fosforilación se ubican dentro de los dominios de unión a microtúbulos de tau, y se ha demostrado que un aumento de la fosforilación de tau regula negativamente la unión de los microtúbulos. Por ejemplo, Ser262 y Ser396, que están ubicadas en o adyacentes a motivos de unión a microtúbulos, se hiperfosforilan en las proteínas tau de los filamentos helicoidales apareados (FHA) anormales, un componente principal de los ovillos neurofibrilares (ONF) en el cerebro de pacientes con EA. Los FHA son agregados filamentosos de proteínas tau que están anormalmente hiperfosforilados y pueden teñirse con anticuerpos anti-tau específicos y detectarse por microscopía óptica. Esto es válido para los llamados filamentos de tau rectos. Los FHA forman cintas enrolladas que consisten en dos filamentos enrollados entre sí con una periodicidad de alrededor de 80 nm. Estas características patológicas se denominan comúnmente "patología de tau", "tauopatología" o "patología relacionada con tau". Para una descripción más detallada de rasgos neuropatológicos de tauopatías remitirse a Lee y col., *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001), 1121-1159 y Götz, *Brain. Res. Rev.* 35 (2001), 266-286. La proteína tau fisiológica estabiliza los microtúbulos en las neuronas. La fosforilación patológica provoca localización y agregación anormal de tau, que causa una desestabilización de los microtúbulos y deterioro del transporte celular. La tau agregada es neurotóxica *in vitro* (Khlistunova y col., *J. Biol. Chem.* 281 (2006), 1205-1214). Las especies neurotóxicas exactas permanecen poco claras, sin embargo, al igual que el mecanismo o mecanismos mediante los cuales provocan la muerte celular. Los agregados de tau pueden observarse como el componente principal de ovillos neurofibrilares (ONF) en varias tauopatías, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), demencias frontotemporales, parálisis supranuclear, enfermedad de Pick, enfermedad argirofílica granular (EAG), degeneración corticobasal, FTDP-17, enfermedad de Parkinson, demencia pugilística (Revisado en Gendron y Petrucelli, *Mol. Neurodegener.* 4:13 (2009)). Aparte de estas observaciones, surgen pruebas de que la muerte neuronal mediada por tau puede ocurrir incluso en ausencia de formación de ovillos. Las especies fosfo-tau solubles están presentes en el LCR (Aluise y col., *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 (2008), 549-558). Los agregados de tau pueden transmitir un estado de plegamiento inadecuado desde fuera hacia dentro de una célula y transferirse entre células co-cultivadas (Frost y col., *J. Biol. Chem.* 284 (2009), 12845-12852).

Además de la implicación en las tauopatías neurodegenerativas, las alteraciones observadas en la fosforilación de tau durante y después de la isquemia/reperfusión sugieren que tau desempeña una función crucial en el daño neuronal y patofisiología clínica de trastornos neurovasculares, tal como ictus isquémico (Zheng y col., *J. Cell. Biochem.* 109 (2010), 26-29).

Los anticuerpos anti-tau humanos descritos en esta invención se unen específicamente a tau y epítomos de la misma y a diversas conformaciones de tau y epítomos de la misma. Por ejemplo, en esta invención se describen anticuerpos que se unen específicamente a tau, tau en su longitud completa, isoformas de tau modificada patológicamente y agregados de tau. Como se usa en esta invención, la referencia a un anticuerpo que "se une específicamente", "se une selectivamente" o "se une preferiblemente" a tau se refiere a un anticuerpo que no se une a otras proteínas no relacionadas. En un ejemplo, un anticuerpo tau descrito en esta invención puede unirse a tau o a un epítomo de la misma y no mostrar ninguna unión por encima de aproximadamente 1,5 veces de antecedente para otras proteínas. Un anticuerpo que "se une específicamente" o "se une selectivamente" a un conformero de tau se refiere a un anticuerpo que no se une a ninguna de las conformaciones de tau, *es decir*, no se une al menos a otro conformero de tau. Por ejemplo, en esta invención se describen anticuerpos que pueden unirse preferiblemente a formas agregadas de tau en tejido de EA. Debido a que los anticuerpos anti-tau humanos de la presente invención se aislaron de un conjunto de sujetos humanos sanos que exhibían una respuesta inmunitaria específica de tau, los anticuerpos tau de la presente invención también pueden llamarse "autoanticuerpos humanos" para enfatizar que aquellos anticuerpos eran realmente expresados por los sujetos y no se han aislado de, por ejemplo, una biblioteca de expresión en fagos que expresa inmunoglobulina humana, lo que hasta ahora representaba un procedimiento común para intentar proporcionar anticuerpos similares a humanos.

Cabe señalar que el término "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un anticuerpo" representa uno o más anticuerpos. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno(a) o más" y "al menos uno(a)" se pueden usar de manera indistinta en esta invención.

Como se usa en esta invención, el término "polipéptido" pretende abarcar un único "polipéptido", así como varios "polipéptidos" en plural, y se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos de manera lineal por enlaces de amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Por tanto, los péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácidos" o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" se puede usar en vez de, o de manera indistinta con, cualquiera de estos términos.

El término "polipéptido" también pretende hacer referencia a los productos de modificaciones postexpresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural. Un polipéptido puede derivarse de una fuente biológica natural o producirse mediante tecnología de recombinación, pero no es necesariamente traducido a partir de una secuencia de ácido nucleico designada. Puede generarse de cualquier forma, incluyendo síntesis química.

Un polipéptido descrito en esta invención puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1000 o más, 2000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tengan necesariamente dicha estructura. Los polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y los polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que adoptan una gran cantidad de diferentes conformaciones, se denominan no plegados. Como se usa en esta invención, el término glicoproteína se refiere a una proteína acoplada al menos a un resto de carbohidrato que está unido a la proteína a través de una cadena lateral que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno de un residuo de aminoácido, *por ejemplo*, un residuo de serina o un residuo de asparagina.

Por polipéptido "aislado" o un fragmento, variante, o derivado del mismo se entiende un polipéptido que no está en su medio natural. No se requiere ningún nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede retirarse de su entorno original o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a efectos de la invención, al igual que los polipéptidos naturales o recombinantes que han sido separados, fraccionados, o parcial o sustancialmente purificados por cualquier técnica adecuada.

También se describen en esta invención como polipéptidos fragmentos, derivados, análogos o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", cuando se refieren a anticuerpos o polipéptidos de anticuerpos de la presente invención incluyen cualquier polipéptido que retenga al menos algunas de las propiedades de unión a antígeno de la molécula de unión, anticuerpo o polipéptido nativos correspondientes. Los fragmentos de anticuerpos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como también fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpo específicos comentados en otro punto en esta invención. Las variantes de anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden ser de origen natural o no natural. Las variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Las variantes de polipéptidos pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones conservativas o no conservativas de aminoácidos. Los derivados de moléculas de unión específicas de tau, por ejemplo, anticuerpos y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención, son polipéptidos que se han alterado para presentar características adicionales que no se encuentran en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Las variantes de polipéptidos también pueden denominarse en esta invención "análogos de polipéptidos". Como se usa en esta invención un "derivado" de una molécula de unión o fragmento de la misma, un anticuerpo o un polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido objeto que tiene uno o más residuos químicamente derivados por reacción de un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, 4-hidroxiprolina se puede sustituir con prolina, 5-hidroxilisina se puede sustituir con lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir con histidina; homoserina se puede sustituir con serina; y ornitina se puede sustituir con lisina.

El término "polinucleótido" pretende abarcar un único ácido nucleico, así como varios ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, *por ejemplo*, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace de fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (*por ejemplo*, un enlace de amida, tal como el encontrado en ácidos nucleicos peptídicos (ANP)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, *por ejemplo*, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se eliminó de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado a los efectos de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento de regulación, tal como un promotor, sitio de unión a ribosomas, o un terminador de la transcripción.

Como se usa en esta invención, una "región codificante" es una porción del ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido,

puede considerarse parte de una región codificante, pero cualesquiera secuencias flanqueantes, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores de transcripción, intrones y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones codificantes de la presente invención pueden estar presentes en una construcción de un solo polinucleótido, *por ejemplo*, en un vector individual, o en construcciones de polinucleótido  
5 separadas, *por ejemplo*, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, *por ejemplo*, un vector individual puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, un polinucleótido o un ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo,  
10 fragmento, variante, o derivado del mismo. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos  
15 de control de transcripción o traducción asociados operativamente con una o más regiones codificantes. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, *por ejemplo*, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras de tal forma como para poner la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tal como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están "asociados de forma operativa" o "unidos de  
20 forma operativa" si la inducción de la función promotora da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfiere con la capacidad de la plantilla de ADN de transcribirse. Por tanto, una región promotora estaría asociada de forma operativa con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico.  
25 El promotor puede ser un promotor específico de células que dirige la transcripción sustancial del ADN únicamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción además del promotor, por ejemplo, potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar asociados de forma operativa con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de células. En esta invención se describen promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción.

30 Una variedad de regiones de control de transcripción resulta conocida para los expertos en la materia. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de transcripción que funcionan en células vertebradas, tales como, pero no se limitan a, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con el intrón-A), virus simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tales como virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control  
35 de transcripción incluyen las derivadas de genes vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y  $\beta$ -globina de conejo, así como otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Las regiones de control de transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, así como promotores inducibles por linfocina (*por ejemplo*, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

40 De manera similar, una variedad de elementos de control de traducción resulta conocida para los expertos en la materia. Estos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión a ribosomas, codones de iniciación y terminación de traducción y elementos que provienen de picornavirus (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno, o IRES, también llamado secuencia CITE).

45 En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

Las regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar asociadas con  
50 regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Según la hipótesis de las señales, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez que se inició la exportación de la cadena de proteínas de crecimiento a lo largo del retículo endoplasmático rugoso. Los expertos en la materia son conscientes de que los polipéptidos secretados por células vertebradas  
55 generalmente tienen un péptido señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o "de longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertas realizaciones, se usa el péptido señal nativo, *por ejemplo*, un péptido señal de cadena pesada o de cadena ligera de inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la secreción del polipéptido que se asocia de forma operativa con el mismo. Como alternativa, se puede usar un péptido señal  
60 heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede estar sustituida con la secuencia líder de activador de plasminógeno de tejido humano (APT) o  $\beta$ -glucuronidasa de ratón.

A menos que se especifique otra cosa, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable en esta invención.

5 Una "molécula de unión" como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere principalmente a anticuerpos, y fragmentos de los mismos, pero también puede referirse a otras moléculas diferentes de anticuerpo que se unen a tau incluyendo, pero no se limitan a, hormonas, receptores, ligandos, moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), chaperonas tales como proteínas de choque térmico (PCT), así como moléculas de adhesión célula-célula tales como membranas de la cadherina, integrina, lectina tipo C y superfamilias de  
 10 inmunoglobulina (Ig). Por tanto, en aras de la claridad, se analizan las siguientes realizaciones con respecto a los anticuerpos.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se pueden usar de manera indistinta en esta invención. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a tau que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada,  
 15 y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados se comprenden relativamente bien; véase, *por ejemplo*, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

Como se analizará en más detalle a continuación, el término "inmunoglobulina" comprende varias clases amplias de  
 20 polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la materia reconocerán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) con algunas subclases entre las mismas (*por ejemplo*,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que otorgan una especialización funcional. Las versiones modificadas de  
 25 cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles para el experto en la materia habida cuenta de la presente descripción y, por consiguiente, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulina se encuentran claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente descripción se referirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula estándar de inmunoglobulina comprende dos polipéptidos idénticos de cadena ligera de peso molecular de aproximadamente  
 30 23.000 Daltons, y dos polipéptidos idénticos de cadena pesada de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están normalmente unidas por enlaces de disulfuro en una configuración "Y", donde las cadenas ligeras agrupan las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con  
 35 una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces covalentes de disulfuro o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos transcurren desde el extremo N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración Y al extremo C-terminal al final de cada cadena.

40 Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este aspecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena ligera ( $V_L$ ) y pesada ( $V_H$ ) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera ( $C_L$ ) y la cadena pesada ( $CH_1$ ,  $CH_2$  o  $CH_3$ ) confieren  
 45 propiedades biológicas importantes, tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento, y similares. Como convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se alejan más del sitio de unión al antígeno o del extremo amino-terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios  $CH_3$  y  $C_L$  en realidad comprenden el extremo carboxi-terminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

50 Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unir específicamente epítopos en antígenos. Es decir, el dominio  $V_L$  y el dominio  $V_H$ , o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno  
 55 presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDR en cada una de las cadenas  $V_H$  y  $V_L$ . Cualquier fragmento de inmunoglobulina o anticuerpo que contenga suficiente estructura como para unirse específicamente a tau se representa en esta invención de manera intercambiable como "fragmento de anticuerpo" o "fragmento inmunoespecífico".

60 En anticuerpos de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, a veces denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR", presentes en cada dominio de unión al antígeno, que son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que se colocan específicamente para formar el dominio de unión al

antígeno a medida que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las "CDR" están flanqueadas por cuatro regiones "de estructura" o "FR" relativamente conservadas que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones de estructura adoptan en gran medida una conformación  $\beta$ -lámina y las CDR forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura  $\beta$ -lámina. Por tanto, las regiones de estructura actúan para formar un armazón que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones de estructura, respectivamente, se pueden identificar fácilmente por un experto en la materia para determinar cualquier región variable de la cadena pesada o ligera dada, debido a que se han definido con precisión; véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., y col., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917.

En el caso en que se utilicen y/o acepten en la técnica dos o más definiciones de un término, la definición del término como se usa en esta invención pretende incluir todos estos significados, a menos que se indique explícitamente otra cosa. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de tanto los polipéptidos de cadenas pesadas como ligeras. Esta región particular ha sido descrita por Kabat y col., Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de la definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o las variantes del mismo pretende estar dentro del alcance del término, como se define y se usa en esta invención. Los residuos de aminoácidos adecuados que incluyen las CDR, como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente, se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación. Las cantidades exactas de residuos que abarcan una CDR en particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de manera rutinaria qué residuos comprenden una región hipervariable o CDR particular del subtipo de anticuerpo IgG humano dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

30

Tabla 1: Definiciones de CDR<sup>1</sup>

	Kabat	Chothia
CDR1 de VH	31-35	26-32
CDR2 de VH	50-65	52-58
CDR3 de VH	95-102	95-102
CDR1 de VL	24-34	26-32
CDR2 de VL	50-56	50-52
CDR3 de VL	89-97	91-96

<sup>1</sup>La numeración de las definiciones de todas las CDR de la Tabla 1 es según las convenciones de numeración expuestas en Kabat y col. (véase a continuación).

Kabat y col. también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que se aplica a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedad este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en esta invención, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat y col., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique otra cosa, las referencias a la numeración de posiciones de residuos de aminoácidos específicas en un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo de la presente invención son según el sistema de numeración de Kabat, que sin embargo es teórico y puede no aplicar de la misma forma cada anticuerpo de la presente invención. En una realización, dependiendo de la posición de la primera CDR, las siguientes CDR pueden cambiar de dirección.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, fragmentos inmunoespecíficos, variantes, o derivados de los mismos incluyen en esta invención, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión al epítipo, *por ejemplo*, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fvs, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs enlazados a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio V<sub>L</sub> o V<sub>H</sub>, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, *por ejemplo*, anticuerpos anti-

Id a anticuerpos descritos en esta invención). Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, *por ejemplo*, en la patente estadounidense 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, e IgY), clase (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

5

En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado de la misma con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes, ya que las IgM, debido a su estructura pentavalente y falta de maduración de la afinidad, a menudo muestran reactividades cruzadas no específicas y muy baja afinidad.

10

El anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, *es decir* consiste sustancialmente en una especie de anticuerpo particular en vez de ser una mezcla obtenida de una muestra de inmunoglobulina en plasma.

15 Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención los fragmentos de unión a tau que comprenden cualquier combinación de una región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos o fragmentos inmuno-específicos de los mismos de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y  
20 mamíferos. En una realización, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos, de burro, conejo, cabra, cobaya, camello, llama, caballo o pollo. En otra realización, la región variable puede tener un origen condrictioide (*por ejemplo*, de tiburones).

En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado de un ser humano.

25 Opcionalmente, la región de estructura del anticuerpo humano se alinea y se adopta según las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes de la base de datos; véase, *por ejemplo*, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Por ejemplo, los aminoácidos que se considera que se desvían potencialmente de la verdadera secuencia de línea germinal podrían deberse a las secuencias de cebadores de PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con  
30 anticuerpos de tipo humano generados artificialmente tales como fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) de una biblioteca de anticuerpos de expresión en fagos o ratones xenogénicos, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se caracteriza por (i) obtenerse usando la respuesta inmunitaria humana en lugar de la de sustitutos de animal, *es decir* el anticuerpo se ha generado en respuesta a tau natural en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) haber protegido al individuo o es al menos significativo por la presencia de tau, y (iii) dado  
35 que el anticuerpo es de origen humano, los riesgos de reactividad cruzada en comparación con autoantígenos se minimizan. Por tanto, según la presente invención los términos "anticuerpo monoclonal humano", "autoanticuerpo monoclonal humano", "anticuerpo humano" y similares, se usan para representar una molécula de unión a tau que es de origen humano, *es decir*, que se ha aislado de una célula humana tal como una célula B o hibridoma de la misma, o el ADNc del que se ha clonado directamente de ARNm de una célula humana, por ejemplo, una célula B de memoria  
40 humana. Un anticuerpo humano es aún "humano" incluso si las sustituciones de aminoácidos se hacen en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de unión.

Los anticuerpos que derivan de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe *infra* y, por ejemplo,  
45 en la patente de Estados Unidos n.º 5.939.598 por Kucherlapati y col., se denominan anticuerpos de tipo humano para distinguirlos de los anticuerpos verdaderamente humanos de la presente invención.

Por ejemplo, la equiparación de las cadenas ligera y pesada de anticuerpos de tipo humano tales como anticuerpos sintéticos y semisintéticos normalmente aislados de expresión en fagos no reflejan necesariamente la equiparación original como ocurrió en la célula B humana original. Por consiguiente, los fragmentos Fab y scFv obtenidos de bibliotecas de expresión recombinante como se usa normalmente en la técnica anterior pueden considerarse artificiales con todos los posibles efectos asociados en inmunogenicidad y estabilidad.

Por el contrario, la presente invención proporciona anticuerpos aislados y madurados por afinidad de sujetos humanos  
55 seleccionados, que se caracterizan por su utilidad terapéutica y su tolerancia en el hombre.

Como se usa en esta invención, el término "anticuerpo murinizado" o "inmunoglobulina murinizada" se refiere a un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo humano de la presente invención; y una región de estructura humana que contiene sustituciones y/o deleciones y/o inserciones de aminoácidos que están basadas en  
60 una secuencia de anticuerpo de ratón. La inmunoglobulina humana que proporciona las CDR se denomina "parental" o "aceptora", y el anticuerpo de ratón que proporciona los cambios de estructura se denomina "donante". Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, generalmente son sustancialmente idénticas a las regiones

constantes de anticuerpos de ratón, es decir, al menos aproximadamente 85-90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o más idénticas. Por ende, en algunas realizaciones, una inmunoglobulina de cadena pesada o ligera humana murinizada de longitud completa contiene una región constante de ratón, CDR humanas y una estructura sustancialmente humana que tiene

5 una serie de sustituciones de aminoácidos "murinizantes". Normalmente, un "anticuerpo murinizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico, *por ejemplo*, debido a que la región variable entera de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que se ha "murinizado" mediante el proceso de "murinización" se une al mismo antígeno que el anticuerpo parental que proporciona las CDR y es normalmente menos

10 inmunógeno en ratones, en comparación con el anticuerpo parental.

Como se usa en esta invención, el término "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: dominio CH1, un dominio bisagra (*por ejemplo*, región bisagra superior, media y/o inferior), un

15 dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH3 o una cadena de

20 polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (*por ejemplo*, la totalidad o parte de un dominio CH2). Como se ha expuesto anteriormente, un experto en la materia entenderá que estos dominios (*por ejemplo*, las porciones de cadena pesada)

25 se pueden modificar de tal forma que varíen en la secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En determinados anticuerpos, los fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en esta invención, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un multímero son idénticas a las

30 de una segunda cadena de polipéptidos del multímero. De manera alternativa, los monómeros que contienen porciones de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, por lo que forma, por ejemplo, un anticuerpo o diacuerpo biespecífico.

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en esta invención están compuestos por una cadena de polipéptidos sencilla tal como scFv y deben expresarse de modo intracelular (intracuerpos) para potenciales aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*.

35

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido de unión para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en esta invención pueden derivarse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo,

40 una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

45

Como se usa en esta invención, el término "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. En una realización, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Se considera que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo debe ser de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos de péptido o polipéptido pueden contener al menos siete, al menos nueve o entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, pueden incluso no estar en la misma cadena de péptidos. En

50 la presente invención, un epítipo de péptido o polipéptido reconocido por anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 5 a aproximadamente 30, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de tau.

55

Por "unir específicamente" o "reconocer específicamente", usados de manera intercambiable en esta invención, se entiende generalmente que una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo, se une a un epítipo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica algo de complementariedad entre el dominio de unión al antígeno

60

y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio, no relacionado. Un experto en la materia entiende que un anticuerpo puede unirse específicamente a o reconocer específicamente un polipéptido aislado que comprende, o consiste en, residuos de aminoácidos correspondientes a una porción lineal de un epítipo no contiguo. El término "especificidad" se usa en esta invención para calificar la afinidad relativa mediante la cual un determinado anticuerpo se une un epítipo. Se puede considerar, por ejemplo, que el anticuerpo "A" tiene una mayor especificidad para un epítipo dado que el anticuerpo "B", o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una mayor especificidad que la que tiene por el epítipo "D" relacionado.

10 Siempre que esté presente, el término "características de unión inmunológicas" u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

Por "unir preferiblemente" se entiende que la molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Por tanto, un anticuerpo que "se une preferiblemente" a un epítipo dado tendría más probabilidades de unirse a ese epítipo que a un epítipo relacionado, incluso aunque tal anticuerpo pueda tener una reacción cruzada con el epítipo relacionado.

A modo de ejemplo no limitante, se puede considerar que una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo, se une a un primer epítipo preferiblemente si une dicho primer epítipo con una constante de disociación ( $K_D$ ) que es menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferiblemente si une el primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferiblemente si une el primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $K_D$  del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferiblemente si une al primer epítipo con una tasa de disociación ( $k(\text{dis})$ ) que es menor que la  $k(\text{dis})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferiblemente si une el primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la  $k(\text{dis})$  del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferiblemente si une el primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la  $k(\text{dis})$  del anticuerpo para el segundo epítipo.

35 Se puede decir que una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado descrito en esta invención se une a tau o a un fragmento o variante de la misma con una tasa de disociación ( $k(\text{dis})$ ) menor o igual a  $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . En una realización, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a tau o a un fragmento o variante de la misma con una tasa de disociación ( $k(\text{dis})$ ) menor o igual a  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , o  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$  o  $10^{-7} \text{ s}^{-1}$ .

Se puede decir que una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado descrito en esta invención se une a tau o a un fragmento o variante de la misma con una tasa de asociación ( $k(\text{as})$ ) mayor o igual a  $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . En una realización, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a tau o a un fragmento o variante de la misma con una tasa de asociación ( $k(\text{as})$ ) mayor o igual a  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  o  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Se dice que una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo, inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferiblemente al del epítipo al punto que bloquea, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia con el epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo de referencia con un epítipo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %. Un experto en la materia entiende que la unión de un anticuerpo a su epítipo puede también inhibirse de forma competitiva mediante una molécula de unión que no sea un anticuerpo. Por ejemplo, la unión específica de un anticuerpo descrito en esta invención a tau, por ejemplo, hTau40, puede inhibirse de forma competitiva mediante microtúbulos.

Tal como se usa en esta invención, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión a un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, *por ejemplo*, una molécula de inmunoglobulina; véase, *por ejemplo*, Harlow y col., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) en las páginas 27-28. Como se usa en esta invención, el término "avidez" se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno; véase, *por ejemplo*, Harlow en las páginas 29-34. La avidez se refiere tanto a la

afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítomos específicos, como también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítomo de alta repetición, tal como un polímero, sería una de alta avidéz. La afinidad o avidéz de un anticuerpo para un antígeno puede determinarse de forma experimental usando cualquier  
 5 procedimiento adecuado; véase, por ejemplo, Berzpfsky y col., "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W, E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company Nueva York, N Y (1992), y procedimientos descritos en esta invención. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo para un antígeno incluyen ELISA, RIA y resonancia de plasmón superficial. La afinidad calculada de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones, *por*  
 10 *ejemplo*, concentración de sal, pH. Por tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, *por ejemplo*,  $K_D$ ,  $Cl_{50}$ , se realizan preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Las moléculas de unión, *por ejemplo*, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los  
 15 mismos de la invención, también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en esta invención, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medición de la relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por tanto, un anticuerpo tiene reactividad cruzada si se une a un epítomo distinto del que indujo su formación. El epítomo con reactividad cruzada generalmente contiene muchas de las características estructurales de  
 20 complementariedad como el epítomo inductor, y en algunos casos, puede ajustarse realmente mejor que el original.

Por ejemplo, determinados anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, porque se unen a epítomos relacionados pero no idénticos, *por ejemplo*, epítomos con al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 65 %, al menos 60 %, al menos 55 % y al menos 50 % de identidad  
 25 (según se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en esta invención) para un epítomo de referencia. Se puede decir que un anticuerpo tiene una reactividad cruzada escasa o nula si no se une a epítomos con menos de 95 %, menos de 90 %, menos de 85 %, menos de 80 %, menos de 75 %, menos de 70 %, menos de 65 %, menos de 60 %, menos de 55 % y menos de 50 % de identidad (según se calcula usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en esta invención) con un epítomo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente  
 30 específico" para un determinado epítomo si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítomo.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a tau. En una realización, las afinidades de unión incluyen aquellas con una constante de disociación o  $K_d$  menor de  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M, o  $10^{-15}$  M.  
 35

Como se indicó antes, se conocen bien las estructuras de subconjuntos y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las varias clases de inmunoglobulina. Como se usa en esta invención, el término "dominio  $V_H$ "  
 40 " incluye el dominio variable de extremo amino-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio CH1" incluye el primer (extremo más amino-terminal) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio  $V_H$  y es extremo amino-terminal a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en esta invención, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA y col. *op. cit.*). El dominio CH2 es único en el sentido que no está íntimamente emparejado con otro dominio. En cambio, dos cadenas de carbohidratos ramificados unidas por N se interponen entre  
 50 los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al extremo C-terminal de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Como se usa en esta invención, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible,  
 55 permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno del extremo N-terminal se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden subdividirse en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior; véase Roux y col., J. Immunol. 161 (1998), 4083.

Como se usa en esta invención, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos  
 60 de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace o puente disulfuro con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL se unen por un enlace de disulfuro y las dos cadenas pesadas se unen por dos enlaces de disulfuro en las posiciones

correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la UE).

Como se usa en esta invención, los términos "unido", "fusionado" o "fusión" se usan de manera intercambiable. Estos 5 términos se refieren a la unión de dos elementos o componentes adicionales, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión dentro del marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abierta (MLA) de polinucleótido para formar un MLA más largo continuo, de manera que se mantenga el marco de lectura traduccional correcto de los MLA originales. Por tanto, una proteína de fusión recombinante es una 10 única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los MLA originales (cuyos segmentos no se unen normalmente en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace de este modo continuo a través de los segmentos fusionados, los segmentos se pueden separar física o espacialmente, por ejemplo, mediante una secuencia de enlace dentro del marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina pueden fusionarse, dentro del marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región de estructura de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR 15 "fusionadas" se cotraduzcan como parte de un polipéptido continuo.

El término "expresión", como se usa en esta invención, se refiere a un proceso por el cual un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula incluyendo, sin limitación, la atenuación génica, así como también la expresión transitoria 20 y la expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla corto (ARNhc), ARN de interferencia pequeño (siRNA) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en un polipéptido o polipéptidos. Si el producto final deseado es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese producto bioquímico y de cualquier precursor. La expresión de un gen produce un "producto génico". Como se usa en esta invención, un producto génico puede ser un ácido nucleico, 25 *por ejemplo*, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen o un polipéptido que se traduce de un transcrito. Los productos génicos descritos en esta invención incluyen, además, ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, *por ejemplo*, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, *por ejemplo*, metilación, glicosilación, adición de lípidos, asociación con otros subconjuntos de proteína, escisión proteolítica y similares.

Como se usa en esta invención, el término "muestra" se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, líquido cefalorraquídeo ("LCR"), u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre entera, plasma, células B enriquecidas de muestras de sangre, y células cultivadas (*por ejemplo*, células B de un sujeto). Una muestra puede también incluir una biopsia o muestra 35 tisular que incluye tejido neural. En aún otros aspectos, una muestra puede comprender células enteras y/o un lisado de las células. Las muestras de sangre se pueden recoger mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En un aspecto, el sedimento puede volver a suspenderse al agitarse en un vórtex a 4 °C en 200 µl de tampón (Tris 20 mM, pH 7,5, Nonidet al 0,5 %, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 0,1 M, inhibidor de proteasa Sigma IX e inhibidores de fosfatasa Sigma IX 1 y 2). La suspensión puede mantenerse en hielo durante 20 minutos con agitación en vórtex 40 intermitente. Después de girar a 15.000 xg durante 5 minutos a aproximadamente 4 °C, las alícuotas de sobrenadante pueden almacenarse a aproximadamente -70 °C.

Como se usa en esta invención, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas preventivas o profilácticas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico o 45 trastorno no deseado, tal como el desarrollo del Parkinsonismo. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, reducción del alcance de la enfermedad, estabilización del estado de la enfermedad (*es decir*, que no empeora), demora o ralentización del avance de la enfermedad, mejora o mitigación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en caso de no 50 recibir tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la afección o el trastorno o aquellos en los que se quiere evitar la manifestación de la afección o trastorno.

Por "sujeto", "individuo", "animal", "paciente" o "mamífero" se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto 55 mamífero, *por ejemplo*, un paciente humano, para el cual se desea el pronóstico, la prevención o la terapia.

## II. Anticuerpos

La presente invención generalmente se refiere a anticuerpos anti-tau humanos y fragmentos de unión al antígeno de 60 los mismos como se define en las reivindicaciones. En una realización, un anticuerpo de la presente invención demuestra las características de unión inmunológica y/o propiedades biológicas como se describe para los anticuerpos ilustrados en los Ejemplos. Según la presente invención, los anticuerpos monoclonales humanos específicos para tau

se clonaron de un conjunto de sujetos humanos sanos.

En el transcurso de los experimentos realizados según la presente invención, los intentos iniciales no lograron clonar anticuerpos específicos de tau, pero casi siempre dieron como resultado clones de falso positivo. Para evitar este  
5 problema, los anticuerpos en medio acondicionado de cultivos de células B de memoria humanos se identificaron selectivamente en paralelo para determinar la unión a la proteína tau recombinante, PHFTau extraída de un cerebro con EA, extractos de cerebro de control sano y albúmina sérica bovina (ASB). Solo los cultivos de células B que fueron positivos para PHFTau y/o tau recombinante, pero sin extracto de cerebro de control o ASB se sometieron a la clonación de anticuerpos.

10 Los intentos iniciales de aislamiento en anticuerpos específicos se centraron en grupos de sujetos humanos sanos con elevada actividad de unión en plasma a tau, lo que sugiere niveles elevados de plasma de anticuerpos tau circulantes. Inesperadamente, estos intentos no lograron producir células B de memoria humanas específicas de tau y los anticuerpos descritos en la presente invención se aislaron de grupos de sujetos humanos sanos que no se  
15 preseleccionaron para la alta reactividad en plasma de tau o tuvieron baja reactividad en plasma de tau.

Debido a esta medición, pudieron aislarse diversos anticuerpos. Los anticuerpos seleccionados se analizaron adicionalmente para determinar la clase y subclase de cadena ligera. Los mensajes de anticuerpos relevantes seleccionados de cultivos de células B de memoria se transcriben entonces por RT-PCR, se clonan y se combinan en  
20 vectores de expresión para la producción recombinante; véanse los Ejemplos adjuntos. La expresión recombinante de los anticuerpos humanos en células HEK293 o CHO y la posterior caracterización de sus especificidades de unión hacia tau de longitud completa, formas modificadas patológicamente de la misma en inmunoelectrotransferencia y su unión distintiva a tau agregada patológicamente confirmó que se habían clonado por primera vez los anticuerpos humanos que son altamente específicos para tau y reconocen de forma diferente las formas modificadas  
25 patológicamente de la proteína tau.

Por tanto, la presente invención se refiere generalmente a un anticuerpo anti-tau monoclonal humano de origen natural aislado y fragmentos de unión, derivados y variantes del mismo como se define en las reivindicaciones. En una realización de la invención, el anticuerpo es capaz de unirse específicamente a tau recombinante de longitud completa  
30 y/o a la forma agregada patológicamente y/o fosforilada (PHFTau) aislada del cerebro con EA en condiciones de desnaturalización en inmunoelectrotransferencia.

También se describe en esta invención un anticuerpo anti-tau, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de tau como un anticuerpo de  
35 referencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, o NI-105.9C4.

Se describen anticuerpos anti-tau humanos adicionales en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos  
40 n.º 2012/0087861.

En una realización, un anticuerpo descrito en esta invención se une específicamente a tau en un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en: residuos correspondientes a los residuos 125-131 de hTau40 (SEQ ID NO:6). Un anticuerpo descrito en esta invención se une  
45 específicamente a tau en un epítipo que comprende los residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos 37-55 y 387-406 de hTau40 (SEQ ID NO:6). En una realización específica, tau es hTau40 (SEQ ID NO:6).

Un anticuerpo descrito en esta invención se une a tau en un epítipo que comprende el dominio de unión a microtúbulos de tau. Un anticuerpo descrito en esta invención se une a tau en un epítipo que comprende los residuos de  
50 aminoácidos de la región R4 de tau tal como se representa en la Figura 4. Un anticuerpo descrito en esta invención compite con microtúbulos por la unión específica a tau. En otra realización, un anticuerpo descrito en esta invención redujo la afinidad de unión a tau asociada a microtúbulos en comparación con la afinidad de unión a anticuerpos a tau no asociada a microtúbulos. En una realización adicional, un anticuerpo descrito en esta invención no se une o no se une sustancialmente a tau asociada a microtúbulos. En realizaciones específicas, la proteína tau puede ser una  
55 proteína tau nativa o proteína tau recombinante. En una realización específica, tau es hTau40.

En una realización, un anticuerpo anti-tau humano de la presente invención puede unirse específicamente a tau agregada patológicamente y no unirse sustancialmente a tau en la forma fisiológica en el tejido cerebral. Además, un anticuerpo anti-tau humano de la presente invención puede caracterizarse además por su capacidad de reconocer tau  
60 en la etapa pre-ovillo definida, en ovillos neurofibrilares (ONF), hilos del neurópilo y/o neuritas distróficas en el cerebro. Por ende, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos tau humanos como se define en las reivindicaciones con especificidades de unión, que son, por tanto, particularmente útiles con fines de diagnóstico y

terapéuticos.

Además, o como alternativa, un anticuerpo anti-tau de la presente invención reconoce preferiblemente tau agregada patológicamente en lugar de formas fisiológicas, en particular al analizarse según los Ejemplos 4 y 18. Además, o

5 alternativamente, un anticuerpo anti-tau de la presente invención se une a mutantes de tau humana que causan enfermedades, en particular las descritas en el Ejemplo 4. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar en el intervalo de tener concentraciones efectivas media máxima (CE50) de aproximadamente 100 pM a 100 nM, o una CE50 de aproximadamente 100 pM a 10nM para tau de tipo silvestre.

10 Por ende, un anticuerpo anti-tau de la presente invención se une preferiblemente a formas patológicas modificadas de tau en el cerebro, *por ejemplo*, agregados patológicos de tau como se ejemplifica por tinción inmunohistoquímica descrita en los Ejemplos 4 y 18. También se describe en esta invención un anticuerpo anti-tau que se une preferiblemente tanto a tau recombinante como formas modificadas patológicamente de tau como se ejemplifica en el

15 Ejemplo 2 por inmunoelectrotransferencia.

15 También se describe en esta invención un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno idéntico al de un anticuerpo que se selecciona de entre el grupo que consiste en NI-105.17C1, NI-105.17C1(N31Q), NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-20 105.19C6, y NI-105.9C4. El anticuerpo NT-105.6C5 es un anticuerpo de la invención.

También se describe en esta invención moléculas de unión, *por ejemplo*, anticuerpos y fragmentos de unión del mismo, que pueden caracterizarse por comprender en su región variable, *por ejemplo*, dominio de unión, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la región variable  $V_H$  y/o  $V_L$  que comprende cualquiera de las

25 secuencias de aminoácidos representadas en la figura 7. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se exponen en la Tabla 4 a continuación. Un conjunto ejemplar de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región  $V_H$  y/o  $V_L$  se representa en la figura 7. Sin embargo, como se analiza a continuación, el experto en la materia es consciente del hecho de que pueden usarse CDR además o como alternativa, que difieren en su secuencia de aminoácidos de las expuestas en la figura 7 por uno,

30 dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de la región de  $V_H$ , CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$ , región de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  de anticuerpos específicos de tau.

Anticuerpo	$V_H/V_L$	CDR1	CDR2	CDR3	
NI-105.17C1	$V_H$	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81
	$V_L$	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:82	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84
NI-105.6C5	$V_H$	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87
	$V_L$	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:90
NI-105.29G10	$V_H$	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:93
	$V_L$	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:94	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:96
NI-105.6L9	$V_H$	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:99
	$V_L$	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:102
NI-105.40E8	$V_H$	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:104	SEQ ID NO:105
	$V_L$	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:108
NI-105.48E5	$V_H$	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:109	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:111
	$V_L$	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:112	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:114
NI-105.6E3	$V_H$	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:116	SEQ ID NO:117
	$V_L$	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:120
NI-105.22E1	$V_H$	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:122	SEQ ID NO:123
	$V_L$	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:124	SEQ ID NO:125	SEQ ID NO:126
NI-105.26B12	$V_H$	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO:128	SEQ ID NO:129
	$V_L$	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:130	SEQ ID NO:131	SEQ ID NO:132
NI-105.12E12	$V_H$	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:133	SEQ ID NO:134	SEQ ID NO:135

## ES 2 816 700 T3

Anticuerpo		V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub>	CDR1	CDR2	CDR3
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:136	SEQ ID NO:137	SEQ ID NO:138
NI-105.60E7	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:139	SEQ ID NO:140	SEQ ID NO:141
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:142	SEQ ID NO:143	SEQ ID NO:144
NI-105.14E2	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:146	SEQ ID NO:147
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:148	SEQ ID NO:149	SEQ ID NO:150
NI-105.39E2	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:151	SEQ ID NO:152	SEQ ID NO:153
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:154	SEQ ID NO:155	SEQ ID NO:156
NI-105.19C6	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:157	SEQ ID NO:158	SEQ ID NO:159
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:160	SEQ ID NO:161	SEQ ID NO:162
NI-105.9C4	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:163	SEQ ID NO:164	SEQ ID NO:165
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:166	SEQ ID NO:167	SEQ ID NO:168
NI-105.17C1 (N31Q)	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81
	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO:221	SEQ ID NO:224	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende al menos una CDR que comprende, o que consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 79-168 y 224.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR que comprenden, o que consisten en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 79-168 y 224

10 También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub>, CDR3 de V<sub>H</sub>, CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> y CDR3 de V<sub>L</sub> que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente SEQ ID NO: 79-84, 85-90, 91-96, 97-102, 103-108, 109-114, 115-120, 121-126, 127-132, 133-138, 139-144, 145-150, 151-156, 157-162, o 163-168. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una CDR1 de V<sub>H</sub>,  
15 CDR2 de V<sub>H</sub>, CDR3 de V<sub>H</sub>, CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> y CDR3 de V<sub>L</sub> que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente SEQ ID NO: 79, 80, 81, 224, 83, y 84.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una, dos o tres CDR de V<sub>H</sub> que comprenden, o que consisten en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 79-81, 85-87, 91-93, 97-99, 103-105, 109-111, 115-117, 121-123, 127-129, 133-135, 139-141, 145-147, 151-153, 157-159, y 163-165.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub> y CDR3 de V<sub>H</sub> que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, SEQ ID NO: 79-81, 85-87, 91-93, 97-99, 103-105,  
25 109-111, 115-117, 121-123, 127-129, 133-135, 139-141, 145-147, 151-153, 157-159, o 163-165.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una, dos o tres CDR de V<sub>H</sub> que comprenden, o que consisten en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 82-84, 88-90, 94-96, 100-102, 106-108, 112-114, 118-120, 124-126, 130-132, 136-138, 142-144, 148-150, 154-156, 160-162, 166-168, y 224.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub> y CDR3 de V<sub>H</sub> que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, SEQ ID NO: 82-84, 88-90, 94-96, 100-102, 106-108, 112-114, 118-120, 124-126, 130-132, 136-138, 142-144, 148-150, 154-156, 160-162, o 166-168. También se describe en esta invención una CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> y CDR3 de V<sub>L</sub> que comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, SEQ ID NO: 83, 84, y 224.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, o 163;  
40 una CDR2 de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, o 164; o una CDR3 de V<sub>H</sub> de SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, o 165. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de

VL de SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 o 224; una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, o 167; o una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, o 168. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, o 163; una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, o 164; o una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, o 165, y además comprende una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 o 224; una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; o una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, o 163; una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, o 164; y una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, o 165. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, o 224; una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161, o 167; y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162, o 168. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, o 163; una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 o 164; y una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 o 165, y además comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 o 224; una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 79, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 80, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 81, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 82, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 83, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 84.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 79, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 80, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 81, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 224, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 83, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 84.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 85, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 86, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 87, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 88, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 89, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 90.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 91, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 92, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 93, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 94, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 95, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 96.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 97, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 98, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 99, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 100, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 101, y CDR3 de VL de SEQ ID NO: 102.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 103, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 104, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 105, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 106, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 107, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 108.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 109, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 110, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 111, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 112, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 113, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 114.

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 115, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 116, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 117, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 118, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 119, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 120.

5

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 121, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 122, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 123, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 124, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 125, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 126.

10

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 127, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 128, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 129, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 130, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 131, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 132.

15

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 133, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 134, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 135, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 136, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 137, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 138.

20

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 139, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 140, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 141, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 142, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 143, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 144.

25

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 145, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 146, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 147, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 148, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 149, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 150.

30

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 151, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 152, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 153, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 154, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 155, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 156.

35

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 157, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 158, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 159, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 160, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 161, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 162.

40

También se describe en esta invención un anticuerpo que puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 163, una CDR2 de VH de SEQ ID NO: 164, y CDR3 de VH de SEQ ID NO: 165, y puede comprender además un región variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de VL de SEQ ID NO: 166, una CDR2 de VL de SEQ ID NO: 167, y una CDR3 de VL de SEQ ID NO: 168.

45

También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> como se representa en la figura 7 y en la Tabla 3 en una realización, el anticuerpo de la presente invención se caracteriza por la conservación del emparejamiento cognado de la cadena pesada y ligera tal como se encontraba presente en la célula B humana. El anticuerpo NI-105.6C5 es un anticuerpo de la presente invención.

50

**Tabla 3:** Secuencias de aminoácidos de la región de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpos específicos de tau. AMLG - antes de la modificación de la línea germinal

Anticuerpo	Secuencias de aminoácidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL)	
NI-105.17C1	V <sub>H</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:44
	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:45
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:46
	N31Q V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:221
	N31Q, I48V V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:222
NI-105.6C5	V <sub>H</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:47

ES 2 816 700 T3

Anticuerpo	Secuencias de aminoácidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL)	
	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:48
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:49
NI-105.29G10	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:50
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:51
NI-105.6L9	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:52
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:53
NI-105.40E8	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:54
	R104W V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:220
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:55
NI-105.48E5	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:56
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:57
NI-105.6E3	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:58
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:59
NI-105.22E1	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:60
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:61
NI-105.26B12	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:62
	V <sub>L</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:63
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:64
NI-105.12E12	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:65
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:66
NI-105.60E7	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:67
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:68
NI-105.14E2	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:69
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:70
NI-105.39E2	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:71
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:72
NI-105.19C6	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:73
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:74
NI-105.9C4	V <sub>H</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:75
	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:76
	V <sub>L</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:77
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:78

El anticuerpo de la presente invención comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende, o que consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ IDNO: 47 y 5 48. El anticuerpo de la presente invención comprende una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende, o que consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 49. El anticuerpo de la presente invención comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que comprende, o que consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 47 10 y 48, y comprende además una región variable de la cadena ligera (VL) que comprende, o que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende una VH de SEQ ID NO: 45 y una VL de SEQ ID NO: 46; o una VH de SEQ ID NO: 45 y una VL de SEQ ID NO: 221; o una VH de SEQ ID NO: 45 y una VL de SEQ ID NO: 222; o una VH de SEQ ID NO: 50 y una VL de SEQ ID NO: 51; o una VH de SEQ ID NO: 52 y una VL de SEQ ID NO: 53; o una VH de SEQ ID NO: 54 y una VL de SEQ ID NO: 55; o una VH de SEQ ID NO: 220 y una VL de SEQ ID NO: 55; o una VH de SEQ ID NO: 56 y una VL de SEQ ID NO: 57; o una VH de

SEQ ID NO: 58 y una VL de SEQ ID NO: 59; o una VH de SEQ ID NO: 60 y una VL de SEQ ID NO: 61; o una VH de SEQ ID NO: 62 y una VL de SEQ ID NO: 64; o una VH de SEQ ID NO: 65 y una VL de SEQ ID NO: 66; o una VH de SEQ ID NO: 67 y una VL de SEQ ID NO: 68; o una VH de SEQ ID NO: 69 y una VL de SEQ ID NO: 70; o una VH de SEQ ID NO: 71 y una VL de SEQ ID NO: 72; o una VH de SEQ ID NO: 73 y una VL de SEQ ID NO: 74; o una VH de SEQ ID NO: 76 y una VL de SEQ ID NO: 78; o una VH de SEQ ID NO: 44 y una VL de SEQ ID NO: 46; o una VH de SEQ ID NO: 62 y una VL de SEQ ID NO: 63; o una VH de SEQ ID NO: 75 y una VL de SEQ ID NO: 77.

También se describe en esta invención un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, derivado o variante del mismo, que compite por la unión a tau, tal como, por ejemplo, hTau40, con al menos uno de los anticuerpos que tiene la región de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> como se representa en la figura 7 y en la Tabla 3. También se describe en esta invención un anticuerpo que compite por la unión específica a hTau40 con NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, o NI-105.9C4. Estos anticuerpos pueden ser humanos también, en particular para aplicaciones terapéuticas. De manera alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo murino, murinizado y humano murino quimérico, que es particularmente útil para procedimientos de diagnóstico y estudios en animales.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención se proporciona mediante cultivos de células B individuales u oligoclonales que se cultivan y el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por las células B, se identifica selectivamente para determinar la presencia y afinidad de los anticuerpos anti-tau en las mismas. El proceso de identificación selectiva comprende las etapas de un ensayo de inmunoreactividad sobre el amiloide de placas tisulares (TAPIR) sensible como se describe en la solicitud internacional WO2004/095031; identificación selectiva en secciones del cerebro para unión al PHFTau; identificación selectiva para determinar la unión de un péptido derivado de tau de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:6 con grupos fosfato en los aminoácidos Ser-202 y Thr-205; en el aminoácido Thr-231; y/o en los aminoácidos Ser-396 y Ser-404 de dicha secuencia; una identificación selectiva para determinar la unión de tau humana recombinante de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:6, y aislamiento del anticuerpo para el cual se detecta la unión o la célula que produce dicho anticuerpo.

Como se ha mencionado anteriormente, debido a su generación tras una respuesta inmunitaria humana, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención reconocerá epítomos que son de importancia patológica particular y que pueden no ser accesibles o menos inmunógenos en el caso de procesos de inmunización para la generación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón e identificación selectiva *in vitro* de bibliotecas de expresión en fagos, respectivamente. Por consiguiente, es prudente estipular que el epítomo del anticuerpo anti-tau humano de la presente invención es único y no existe ningún otro anticuerpo que sea capaz de unirse al epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. Por lo tanto, en esta invención se describen anticuerpos anti-tau y moléculas de unión a tau que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención por la unión específica a tau. También se describe en esta invención un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítomo de tau como un anticuerpo de referencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, y NI-105.9C4.

La competencia entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina que se está sometiendo a ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como tau. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competición sándwich; véase Stahli y col., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA de biotina-avidina directo en fase sólida; véase Kirkland y col., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung y col., *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo etiquetado directo en fase sólida, ensayo sándwich etiquetado directo en fase sólida; véase Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA etiquetado directo en fase sólida usando una etiqueta <sup>125</sup>I; véase Morel y col., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer y col., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Normalmente, tal ensayo implica el uso de tau purificada o agregados de la misma unidos a una superficie sólida o a células portadoras de cualquiera de estos, una inmunoglobulina de ensayo no etiquetada y una inmunoglobulina de referencia etiquetada, es decir, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide mediante la determinación de la cantidad de etiqueta unida a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. En una realización, el ensayo de unión competitiva se realiza en condiciones como se describe para el ensayo ELISA en los Ejemplos adjuntos. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competencia (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítomo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítomo adyacente lo suficientemente cercano al epítomo unido por el anticuerpo de referencia para que tenga lugar el impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo de competición está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos el 50 % o el 75 %. También se describe en esta invención un anticuerpo,

o un fragmento de unión al antígeno, variante o derivados del mismo, donde el anticuerpo inhibe de manera competitiva un anticuerpo de referencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, o NI-105.9C4 de la unión a tau.

5

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ), donde al menos una de las CDR de  $V_H$  de la región variable de la cadena pesada o al menos dos de las CDR de  $V_H$  de la región variable de la cadena pesada son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_H$  o CDR3 de  $V_H$  de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. De manera alternativa, las regiones CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  de la  $V_H$  son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. Por tanto, una región variable de la cadena pesada descrita en esta invención tiene secuencias de polipéptido CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  relacionadas con los grupos mostrados en la figura 7. También se describe en esta invención una secuencia de aminoácidos de la referencia CDR1 de  $V_H$  que es SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, o 163; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_H$  de referencia es SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 o 164; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_H$  de referencia es SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 o 165.

20

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) en la que las regiones CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  que se muestran en la figura 7. La secuencia de aminoácidos de CDR1 de  $V_H$  puede ser SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 o 163; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de  $V_H$  es SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 o 164; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de  $V_H$  es SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 o 165.

25

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) en la que las regiones CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  que se muestran en la figura 7, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en cualquiera de las CDR de  $V_H$ . Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras. La secuencia de aminoácidos de CDR1 de  $V_H$  puede ser SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 o 163; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de  $V_H$  es SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 o 164; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de  $V_H$  es SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 o 165.

30

35

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ), donde al menos una de las CDR de  $V_L$  de la región variable de la cadena ligera o al menos dos de las CDR de  $V_L$  de la región variable de la cadena ligera son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  o CDR3 de  $V_L$  de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. De manera alternativa, las regiones CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  de la  $V_L$  son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. Por tanto, una región variable de la cadena ligera puede tener secuencias de polipéptido CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  relacionadas con los polipéptidos que se muestran en la figura 7. También se describe en esta invención una secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_L$  de referencia que es SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, o 224; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_L$  de referencia es SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_L$  de referencia es SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

40

45

50

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) en la que las regiones CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  que se muestran en la figura 7. La secuencia de aminoácidos de CDR1 de  $V_L$  puede ser SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 o 224; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de  $V_L$  es SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de  $V_L$  puede ser SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

55

60

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que

- consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) en la que las regiones CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  que se muestran en la figura 7, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en cualquiera de CDR de  $V_L$ . Las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_L$  es la SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, o 224; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de  $V_L$  es SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de  $V_L$  puede ser SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.
- 10 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de inmunoglobulina que es idéntica a una región variable de la cadena pesada de referencia que se muestra en la figura 7 y en la Tabla 3. La secuencia de aminoácidos la región variable de la cadena pesada de referencia puede comprender la SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 o 220.
- 15 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que tiene una secuencia de polipéptido que es idéntica a una región variable de la cadena pesada de referencia ( $V_H$ ) que se muestra en la figura 7 y en la Tabla 3, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada de referencia puede comprender la SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 o 220.
- 20 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de región variable de la cadena ligera de referencia ( $V_L$ ) de los anticuerpos descritos en esta invención. Por tanto, una región variable de la cadena ligera tiene una secuencia de polipéptido relacionada con las regiones variables de la cadena ligera que se muestran en la figura 7 y en la Tabla 3. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de referencia ( $V_L$ ) comprende la SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 o 222.
- 25 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que es idéntica a una región variable de cadena ligera de referencia que se muestra en la figura 7 y en la Tabla 3. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de referencia comprende SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 o 222.
- 30 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que tiene una secuencia de polipéptido que es idéntica a la región variable de la cadena ligera de referencia ( $V_L$ ) que se muestra en la Figura 7 y en la Tabla 3, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de referencia puede comprender la SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 o 222.
- 35 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que tiene una secuencia de polipéptido que es idéntica a la región variable de la cadena ligera de referencia ( $V_L$ ) que se muestra en la Figura 7 y en la Tabla 3, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de referencia puede comprender la SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 o 222.
- 40 Una inmunoglobulina o su ADNc codificante se puede modificar adicionalmente. Por tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende cualquiera de la (s) etapa (s) de producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo etiquetado o un análogo de cualquiera de estos. Los procedimientos correspondientes son conocidos por los expertos en la materia y se describen, *por ejemplo*, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen mediante la técnica de expresión en fagos, se puede usar la resonancia de plasmón superficial, como se emplea en el sistema BIAcore, para aumentar la eficacia de los anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítipo que el de uno cualquiera de los anticuerpos descritos en esta invención (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO89/09622. Los procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, *por ejemplo*, en la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y en la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos a utilizar según la presente invención son los anticuerpos denominados xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos de tipo humano en ratones, se describe, *por ejemplo*, en las solicitudes internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO 96/33735. Como se ha analizado anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una diversidad de formas además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>, así como en cadenas sencillas; véase, *por ejemplo*,
- 45
- 50
- 55
- 60

la solicitud internacional WO88/09344.

Los anticuerpos de la presente invención o su cadena o cadenas de inmunoglobulina correspondientes se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delección o 5 delecciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones y/o recombinación o recombinaciones de aminoácidos, y/o cualesquiera otras modificaciones conocidas en la técnica en solitario o en combinación. Los procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son conocidos por un experto en la materia; véase, *por ejemplo*, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, 10 Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constitutivos, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones de cadena principal, y modificaciones en el extremo N- y C-terminal, incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la unión de restos carbohidrato o lípido, cofactores, y similares. Asimismo, la presente invención abarca la producción de 15 proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino-terminal fusionado a la molécula heteróloga, tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo-terminal; véase, *por ejemplo*, la solicitud internacional WO00/30680 para detalles técnicos correspondientes.

Adicionalmente, se describen en esta invención péptidos que incluyen los que contienen una molécula de unión como se describe anteriormente, por ejemplo, que contienen la región CDR3 de la región variable de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados, en particular la CDR3 de la cadena pesada, dado que se ha observado con frecuencia que la CDR3 de la cadena pesada (HCDR3) es la región que tiene un mayor grado de variabilidad y una participación predominante en la interacción antígeno-anticuerpo. Dichos péptidos pueden sintetizarse o producirse fácilmente mediante medios recombinantes para producir un agente de unión útil según la invención. Dichos procedimientos son 25 bien conocidos por los expertos en la materia. Los péptidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando sintetizadores automáticos de péptidos que están disponibles comercialmente. Los péptidos también se pueden producir mediante técnicas recombinantes incorporando el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando las células con el vector de expresión para producir el péptido.

Por ende, se describe en esta invención una molécula de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que está orientado hacia los anticuerpos anti-tau humanos de la presente invención y exhiben las propiedades mencionadas, *es decir*, que reconocen específicamente tau. Dichos anticuerpos y moléculas de unión se pueden someter a ensayo para determinar su especificidad y afinidad de unión mediante ELISA, inmunoelectrotransferencia e inmunohistoquímica, como se describe en esta invención, véase, *por ejemplo*, los Ejemplos. Además, los resultados 35 preliminares de experimentos posteriores realizados según la presente invención revelaron que, en una realización, el anticuerpo anti-tau humano de la presente invención se une principalmente a ovillos neurofibrilares (ONF) similares a tau agregada patológicamente, hilos del neuropilo presentes en secciones del cerebro humano de pacientes que padecieron además enfermedad de Alzheimer (EA). Por tanto, en una realización preferida particular de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión, derivado o variante del mismo, reconoce tau en secciones del 40 cerebro humano con EA.

Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas directamente del cultivo de células B inmortalizadas o células B de memoria, las células inmortalizadas se pueden usar como una fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizadas para la expresión posterior y/o la manipulación genética. Los genes de anticuerpo reorganizados se 45 pueden transcribir de manea inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. Si se desea, la región constante de la cadena pesada se puede intercambiar por la de un isotipo diferente o se puede eliminar en su totalidad. Las regiones variables se pueden unir para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Se pueden unir múltiples regiones Fv para conferir capacidad de unión a más de una diana o se pueden emplear combinaciones de cadena pesada y ligera quiméricas. Una vez que se encuentra disponible el material genético, el diseño de análogos como se ha descrito 50 anteriormente que conserva tanto su capacidad para unir la diana deseada es sencillo. Los procedimientos para la clonación de regiones variables de anticuerpo y para la creación de anticuerpos recombinantes son conocidos por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Gilliland y col., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke y col., Leukemia 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que se obtiene el material genético apropiado, y si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias codificantes, incluidas las que codifican, en un mínimo, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se pueden insertar en sistemas de expresión contenidos en vectores que se pueden transfectar en células huésped recombinantes estándar. Se puede usar una diversidad de las células huésped; sin embargo, para un procesamiento eficiente, se pueden considerar también células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero típicas útiles para este 60 fin incluyen, pero no se limitan a, células CHO, células HEK 293 o células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo se asume entonces mediante el cultivo del huésped recombinante modificado

en condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células huésped y la expresión de las secuencias codificantes. A continuación, se recuperan los anticuerpos mediante su aislamiento del cultivo. Los sistemas de expresión se diseñan para incluir péptidos señal de manera que los anticuerpos resultantes se secretan en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

5 Según lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención. También se describe en esta invención un polinucleótido que codifica al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Normalmente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la  $V_H$  y/o  $V_L$  de la  
10 región variable de dicho anticuerpo.

El experto en la materia apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable mencionado anteriormente se puede usar para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseadas. Por tanto, también se describen en esta invención polipéptidos y anticuerpos  
15 contienen al menos una CDR del dominio variable mencionado anteriormente y que tiene de forma ventajosa sustancialmente las mismas propiedades de unión o similares a las del anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. El experto en la materia sabe que la afinidad de unión se puede potenciar haciendo sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que se superponen parcialmente con las CDR tal como lo define Kabat; véase, *por ejemplo*, Riechmann, y col., Nature 332  
20 (1988), 323-327. Por tanto, también se describen en esta invención anticuerpos donde una o más de las CDR mencionadas comprenden una o más, o no más de dos sustituciones de aminoácidos. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende en una o las dos de sus cadenas de inmunoglobulina, dos o las tres CDR de las regiones variables tal como se expone en la figura 1.

25 Las moléculas de unión, *por ejemplo*, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención, como se conoce por los expertos en la materia, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento estimula también la respuesta  
30 inflamatoria y puede estar implicada también en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células mediante la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une al receptor Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc sobre las superficies celulares desencadena una  
35 cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la inmersión y destrucción de partículas recubiertas por anticuerpos, depuración de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas por anticuerpos mediante linfocitos citolíticos (denominada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o CCDA), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia de placenta y control de producción de inmunoglobulina.

40 Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, en el que al menos una fracción de uno o más dominios de regiones constantes se ha eliminado o alterado de otro modo para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizar de forma no covalente, la capacidad aumentada de ubicar en el sitio de agregación y deposición de tau, una semivida sérica reducida, o una semivida sérica aumentada  
45 en comparación con un anticuerpo sin alteración completo de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, determinados anticuerpos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en esta invención son anticuerpos con dominio deleciónado que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que le falta al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se delecionará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado,  
50 por ejemplo, se delecionará todo o parte del dominio CH2. En otras realizaciones, determinados anticuerpos para su uso en procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en esta invención tienen una región constante, *por ejemplo*, una región constante de la cadena pesada de IgG, que se altera para eliminar la glicosilación, denominados en esta invención como anticuerpos aglicosilados o "agli". Dichos anticuerpos "agli" se pueden preparar enzimáticamente, así como mediante el diseño de un sitio o sitios de glicosilación de consenso en la región constante.  
55 Sin desear quedar limitado por teoría alguna, se cree que los anticuerpos "agli" pueden tener una seguridad mejorada y un perfil de estabilidad *in vivo*. Los procedimientos para producir anticuerpos aglicosilados, que tienen la función efectora deseada se encuentran, por ejemplo, en la solicitud internacional WO2005/018572.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en esta  
60 invención, la porción Fc puede mutarse para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la deleción o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización

- de tau. En otros casos, se puede dar que las modificaciones de región constante son coherentes con la unión al complemento moderada de la presente invención y, por lo tanto, reducen la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún otras modificaciones de la región constante se pueden usar para modificar enlaces de disulfuro o restos oligosacáridos que permiten la localización potenciada debido al aumento de la especificidad del antígeno o la flexibilidad de anticuerpo. El perfil fisiológico, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tales como localización de tau, biodistribución y semivida sérica, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin demasiada experimentación.
- 10 En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en esta invención, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por secuencias de proteína alternativas para aumentar la absorción celular de anticuerpos a modo de ejemplo potenciando la endocitosis mediada por el receptor de anticuerpos a través de los receptores Fcγ, LRP, o receptores Thy1 o mediante "Tecnología de SuperAnticuerpos", que se dice que permite que los anticuerpos se trasladen a células vivas sin dañarlas (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241).
- 15 Por ejemplo, la generación de las proteínas de fusión de la región de unión al anticuerpo y los ligandos de proteínas cognados de los receptores de superficie celular o anticuerpos bi- o multiespecíficos con una unión a secuencias específicas que se unen a tau, así como un receptor de superficie celular se puede diseñar usando técnicas conocidas en la técnica.
- 20 En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos descritos en esta invención, la porción Fc se puede mutar o intercambiar por las secuencias de proteína alternativas o el anticuerpo se puede modificar químicamente para aumentar su penetración en la barrera hematoencefálica.
- Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención, se pueden realizar a partir de anticuerpos precursores o parentales completos usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares se analizan con más detalle en esta invención. Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden realizarse o fabricarse usando técnicas que se conocen en la técnica. En ciertas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de las mismas se "producen de forma recombinante", es decir, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas ejemplares para realizar moléculas de anticuerpo o fragmentos de las mismas se analizan con más detalle en otra parte en esta invención.
- 25 Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal forma que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo cognado. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de bloqueo/protección conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de una cantidad de modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.
- 30 En realizaciones particulares, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención no provocarán una respuesta inmunitaria perjudicial en el animal a tratar, *por ejemplo*, en un ser humano. En ciertas realizaciones, las moléculas de unión, *por ejemplo*, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, se derivan de un paciente, *por ejemplo*, un paciente humano, y se usan posteriormente en las mismas especies de las que se derivan, *por ejemplo*, seres humanos, aliviando o minimizando la aparición de respuestas inmunitarias perjudiciales.
- 35 La desinmunización se puede utilizar también para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en esta invención, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítopos de células T; véase, *por ejemplo*, las solicitudes internacionales WO98/52976 y WO00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo de partida y un "mapa" del epítipo de células T humanas de cada región V que muestra la ubicación de los epítopos en relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítopos de células T individuales del mapa del epítipo de células T para identificar las sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseñó una variedad de secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> alternativas, que comprende combinaciones de sustituciones de aminoácidos y posteriormente estas secuencias se incorporaron en un intervalo de polipéptidos de unión, *por ejemplo*, anticuerpos específicos de tau o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en esta invención, que a continuación se prueban para su función. Normalmente, se generan y se ensayan entre 12 y 24 anticuerpos de variantes. A continuación, se clonan genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones modificadas V y humanas C, en vectores de
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos totales. A continuación, los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

- 5 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinantes, y de expresión en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando técnicas de hibridoma, incluidas las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en esta invención, no se limita a los anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de fagos y no el procedimiento por el cual se produce. Por tanto, el término "anticuerpo monoclonal" no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se derivan de células B humanas que se han inmortalizado a través de transformación con virus Epstein-Barr, como se describe en esta invención.

En el proceso de hibridoma bien conocido (Kohler y col., *Nature* 256 (1975), 495), los linfocitos de vida relativamente corta o mortales de un mamífero, *por ejemplo*, células B derivadas de un sujeto humano como se describe en esta invención, se fusionan con una línea celular de tumor inmortal (*por ejemplo*, una línea celular de mieloma), produciendo de este modo células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas sencillas por selección, dilución y recrecimiento con cada cepa individual que comprende genes específicos para la formación de un anticuerpo individual. Producen anticuerpos que son homogéneos contra el antígeno deseado y, con referencia a su parentesco genético puro, se denominan "monoclonales".

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Los expertos en la materia apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medios para la formación, selección y el crecimiento de hibridomas están disponibles comercialmente a partir de una cantidad de fuentes y se establecen protocolos estandarizados. Generalmente, el medio de cultivo en el que están creciendo las células de hibridoma se ensaya para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por ensayos *in vitro*, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) como se describe en esta invención. Después de que se identifiquen las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar por procedimientos de limitación de dilución y se pueden cultivar por procedimientos estándares; véase, *por ejemplo*, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, págs. 59-103 (1986). Adicionalmente se apreciará que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otra realización, los linfocitos se pueden seleccionar por micromanipulación y los genes variables se aíslan. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica se pueden aislar a partir de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, *por ejemplo*, un ser humano, y cultivar durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden identificarse selectivamente para detectar IgG específicas que cumplan con los criterios de identificación selectiva. Las células de pocillos positivos se pueden aislar. Las células B productoras de Ig individuales se pueden aislar por FACS o identificándolas en un ensayo de placa hemolítica mediada por complemento. Las células B que producen Ig se pueden micromanipular en un tubo y los genes de  $V_H$  y  $V_L$  se pueden amplificar utilizando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de  $V_H$  y  $V_L$  pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse en células (*por ejemplo*, células eucariotas o procariotas) para su expresión.

Como alternativa, las líneas celulares que producen anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Dichas técnicas se describen en una diversidad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la invención como se describe a continuación se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan y col., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítopos específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y  $F(ab')_2$  se pueden producir de forma recombinante o mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas, tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos  $F(ab')_2$ ). Los fragmentos  $F(ab')_2$  contienen la región variable, la región constante de la

cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Dichos fragmentos son suficientes para su uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican acoplar las porciones inmunoespecíficas de inmunoglobulinas para detectar reactivos tales como radioisótopos.

5 Los anticuerpos humanos, tales como se describen en esta invención, se desean particularmente para su uso terapéutico en pacientes humanos. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo, de sujetos humanos sanos quienes, dada su edad, se sospecha que corren el riesgo de desarrollar un trastorno tauopático, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, o un paciente con el trastorno, pero con un transcurso de la enfermedad inusualmente estable. Sin embargo, aunque es prudente esperar que los sujetos de edad avanzada, sanos y sin

10 síntomas, respectivamente, hayan desarrollado más regularmente anticuerpos anti-tau protectores más regularmente que los sujetos más jóvenes, estos últimos se pueden usar como fuente para obtener un anticuerpo humano de la presente invención. Esto es particularmente cierto para los pacientes más jóvenes que están predispuestos a desarrollar una forma familiar de una tauopatía, pero que permanecen sin síntomas dado que su sistema inmunitario funciona más eficientemente que en los adultos mayores.

15 También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende al menos dos CDR de una o más moléculas de anticuerpo. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende al menos tres CDR de una o más moléculas de anticuerpo. También se describe en esta invención un anticuerpo que

20 comprende al menos cuatro CDR de una o más moléculas de anticuerpo. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende al menos cinco CDR de una o más moléculas de anticuerpo. También se describe en esta invención un anticuerpo que comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo ejemplares que comprenden al menos una CDR que puede incluirse en los anticuerpos objeto se describen en esta invención.

25 Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante como se describe en esta invención.

30 En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética donde uno o más dominios se delecionan parcial o completamente ("anticuerpos delecionados del dominio"). En determinadas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones de dominios delecionados o variantes donde se eliminó todo el dominio de CH2 (construcciones de  $\Delta$ CH2). Para otras realizaciones, un péptido conector corto se puede sustituir por el dominio

35 delecionado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Los expertos en la materia apreciarán que dichas construcciones se prefieren particularmente debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en el índice catabólico del anticuerpo. Las construcciones del dominio delecionado pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG<sub>1</sub>, véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO02/060955 y WO02/096948A2. Este vector está modificado para delecionar el dominio CH2 y para proporcionar

40 un vector sintético que exprese un dominio delecionado de la región constante de IgG<sub>1</sub>.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Se pueden realizar minicuerpos usando procedimientos descritos en la técnica, véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.837.821 o la solicitud internacional WO 94/09817.

45 En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene delección o sustitución de algunos o incluso un único aminoácido siempre y cuando permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente como para reducir sustancialmente

50 la unión de Fc y aumentar de este modo la localización de tau. De manera similar, puede ser deseable delecionar simplemente esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión de complemento) a modular. Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida sérica) mientras se dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante del sujeto. Además, como se ha mencionado anteriormente, las

55 regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, lo que mejora el perfil de la construcción resultante. A este respecto, la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión a Fc) se puede interrumpir en tanto se mantenga sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Aún otras realizaciones comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables, tales como la función efectora,

60 o proporcionar una unión de más citotoxinas o carbohidratos. En dichas realizaciones, puede ser deseable la inserción o replicación de secuencias específicas derivadas de los dominios de región constante seleccionados.

La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpos de la invención, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen de manera inmunoespecífica a tau. Las técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia pueden utilizarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que resultan en sustituciones de aminoácidos. En una realización, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con relación a la región de V<sub>H</sub>, CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub>, CDR3 de V<sub>H</sub>, región de V<sub>L</sub>, CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> o CDR3 de V<sub>L</sub> de referencia. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la cual el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se definen las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

De manera alternativa, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación y los mutantes resultantes se pueden identificar selectivamente para determinar la actividad biológica con el fin de identificar mutantes que retienen actividad (*por ejemplo*, la capacidad de unirse a tau).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solamente en regiones de estructura o solo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones sin sentido silenciosas o neutras, *por ejemplo*, no tienen efecto o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno, de hecho, algunas de estas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos de ninguna forma. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican anticuerpos de la presente invención se describen en otra parte en esta invención. De forma alternativa, las mutaciones sin sentido no neutras pueden alterar la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones sin sentido silenciosas y neutras sea en las regiones de estructura, mientras que es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones sin sentido no neutras sea en CDR, pese a que no es un requisito absoluto. Un experto en la materia será capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tal como actividad de unión al antígeno sin alteración, o alteración en la actividad de unión (*por ejemplo*, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (*por ejemplo*, capacidad de unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de tau) se puede determinar usando técnicas descritas en esta invención o por técnicas de modificación rutinaria conocidas en la técnica.

Los agentes de unión a tau, por ejemplo, pero no se limitan a, anticuerpos de unión a tau de la presente invención se pueden caracterizar usando cualquier modelo in vivo o in vitro de tauopatías neurodegenerativas. Un experto en la materia entiende fácilmente que un agente de unión a tau de la invención puede estar caracterizado en un modelo de ratón para tauopatías neurodegenerativas, por ejemplo, pero no se limita a, uno cualquiera de los siguientes tres modelos animales diferentes para tauopatías se puede usar para caracterizar y validar los anticuerpos tau (y las moléculas con las especificidades de unión de los mismos) de la presente invención.

1. Ratones TauP301L transgénicos (línea 183): expresan Tau40 humana con la mutación P301L bajo el promotor Thyl.2 murino (la creación de estos animales transgénicos se describe en Götz y col., J. Biol. Chem. 276 (2001), 529-534 y en la solicitud internacional WO 2003/017918)
2. Ratones JNPL3 que expresan la isoforma de tau humana 4R más corta con la mutación P301L bajo el promotor PrP murino (disponible en Taconic, Hudson, NY, EE. UU.).
3. Ratones P301STau (línea PS19) que expresan tau humana con la mutación P301S bajo el promotor PrP humano (disponible en Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EE. UU.).

Un experto en la materia entiende que un modelo experimental de tauopatías neurodegenerativas se puede usar en un entorno preventivo o se puede usar en un entorno terapéutico. En un entorno preventivo, la dosificación de animales empieza antes del inicio de las tauopatías neurodegenerativas o de los síntomas de las mismas. En entornos preventivos, se evalúa un agente de unión a tau de la invención por su capacidad de prevenir, reducir o retrasar el inicio de tauopatías neurodegenerativas o los síntomas de las mismas. En un entorno terapéutico, la dosificación de animales empieza después del comienzo de las tauopatías neurodegenerativas o de un síntoma de las mismas. En

un entorno terapéutico, se evalúa un agente de unión a tau de la invención por su capacidad de tratar, reducir o aliviar las tauopatías neurodegenerativas o un síntoma de las mismas. Los síntomas de las tauopatías neurodegenerativas incluyen, pero no se limitan a, la acumulación de depósitos de tau patológica, ovillos neurofibrilares (ONF), polipéptido de tau hiperfosforilada, fracciones tau insolubles en las neuronas, cerebro, médula espinal, líquido cefalorraquídeo o suero del objeto experimental. Un experto en la materia entiende que un resultado terapéutico o preventivo positivo en cualquier modelo animal de tauopatías neurodegenerativas indica que el agente de unión a tau particular (por ejemplo, anticuerpo) se puede usar con fines preventivos o terapéuticos en un sujeto distinto de un organismo de modelo experimental, por ejemplo, se puede usar para tratar tauopatías neurodegenerativas en un sujeto humano que lo necesite.

10

En una realización, un anticuerpo de unión a tau de la invención se puede administrar a un modelo de ratón con tauopatía y ratones de tipo silvestre de control correspondiente. El anticuerpo administrado puede ser un anticuerpo murinizado de la presente invención o una quimera murina humana de un anticuerpo de la presente invención. El agente de unión a tau (por ejemplo, un anticuerpo) se puede administrar mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, mediante administración intraperitoneal, intracraneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, oral y en aerosol. A los animales experimentales se les puede administrar una, dos, tres, cuatro, cinco o más dosis de agente de unión a tau (por ejemplo, un anticuerpo) o una composición de control, tal como PBS. En una realización, a los animales experimentales se les puede administrar una o dos dosis de agente de unión a tau (por ejemplo, un anticuerpo). Véase, por ejemplo, el Ejemplo 9. En otra realización, a los animales se les dosifica crónicamente el agente de unión a tau (por ejemplo, un anticuerpo) durante varias semanas o meses. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 10. Un experto en la materia puede diseñar rápidamente un régimen de dosificación que se ajuste al fin experimental, por ejemplo, régimen de dosificación para estudios agudos, régimen de dosificación para estudios crónicos, régimen de dosificación para estudios de toxicidad, régimen de dosificación para estudios preventivos o terapéuticos. La presencia del agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) en un componente tisular particular de los animales experimentales, por ejemplo, pero no se limita a, suero, sangre, líquido cefalorraquídeo, tejido cerebral, se puede establecer usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 9 y 10. En una realización, un anticuerpo de unión a tau de la invención es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica. Un experto en la materia entiende que por medio del ajuste de la dosis del agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) y la frecuencia de dosificación, se puede mantener una concentración deseada de agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) en animales experimentales. Cualquier efecto de un anticuerpo de unión a tau de la presente invención en los modelos de tauopatía se puede evaluar comparando el nivel, las características bioquímicas o la distribución de tau en los animales tratados y de control. En un ejemplo, los ovillos neurofibrilares (ONF) se examinan usando la técnica de impregnación de plata de Gallyas o mediante inmunotinción con anticuerpo de ratón monoclonal AT100 y AT180, que reconocen tau fosforilada patológicamente en ONF. La cantidad o frecuencia de neuronas positivas a Gallyas y/o neuronas etiquetadas AT100, AT180 en el cerebro y en la médula espinal en ratones tratados con el anticuerpo y animales de control, se puede determinar para evaluar el efecto del tratamiento con anticuerpos. En una realización, un anticuerpo de la presente invención es capaz de reducir el nivel, la cantidad o concentración de ovillos neurofibrilares en el cerebro o en la médula espinal en un modelo animal. El anticuerpo puede reducir el nivel, la cantidad o la concentración de ovillos neurofibrilares en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención es capaz de reducir la cantidad o frecuencia de neuronas positivas a Gallyas en el cerebro o en la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. En una realización adicional, un anticuerpo de la presente invención es capaz de reducir la cantidad o frecuencia de neuronas positivas a anticuerpo AT100 o AT180 en el cerebro o en la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. El efecto de un anticuerpo de la presente invención también se puede evaluar examinando la distribución y las propiedades bioquímicas de tau que siguen a la administración del anticuerpo. En una realización, un anticuerpo de la presente invención es capaz de reducir la cantidad o concentración de la proteína tau en el cerebro o en la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención es capaz de reducir la cantidad o concentración de la proteína tau insoluble en el cerebro o en la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. La fracción de tau insoluble se puede preparar como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 10 o en Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Neuron 8, 159 (1992). La cantidad de proteína tau en una muestra biológica se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido por un experto, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 10. En una realización adicional, un anticuerpo de la presente invención puede reducir la cantidad o concentración de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro o en la médula espinal en un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. La tau hiperfosforilada se puede detectar usando anticuerpos específicos para formas patológicamente hiperfosforiladas de tau, tales como AT100 o AT180. Un anticuerpo de la presente invención puede también alterar, por ejemplo, reducir o aumentar, la concentración de tau en la sangre, suero o líquido cefalorraquídeo o un modelo animal, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 % o más. En una realización, el % de reducción o aumento es relativo en comparación con el nivel, número, frecuencia, cantidad o concentración que existía antes del tratamiento,

o con el nivel, número, frecuencia, cantidad o concentración que existe en un sujeto sin tratar/tratado con control.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención puede prevenir o retrasar el comienzo de al menos un síntoma de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto. En una realización, un anticuerpo de la presente invención  
5 puede reducir o eliminar al menos un síntoma de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto. El síntoma puede ser la formación de depósitos de tau patológica, depósitos de tau hiperfosforilada, depósitos de tau insoluble, fibras neurofibrilares, agregados de tau de fósforo preovillos, ovillos neurofibrilares intraneuronales u ovillos neurofibrilares extraneuronales en el cerebro o en la médula espinal de un sujeto. Véase, por ejemplo, Augustinack y col., Acta Neuropathol 103:26-35 (2002). El síntoma puede ser también la presencia, o concentración o cantidad elevada de tau  
10 en el suero, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo, donde la cantidad o concentración elevada se compara con un sujeto sano. El síntoma puede ser un síntoma neurológico, por ejemplo, aversión alterada condicionada al sabor, condicionamiento alterado contextual del miedo, deterioro de la memoria, pérdida de la función motora. En una realización, el deterioro de la memoria se evalúa usando una tarea de laberinto en Y en dos ensayos. En una realización específica, la tarea de laberinto en Y en dos ensayos se realiza sustancialmente como se describe en el  
15 Ejemplo 10. En una realización, el al menos un síntoma se reduce en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 % o 90 %. En otra realización, la relación de la tarea de laberinto en Y en dos ensayos es considerablemente mayor en un sujeto tratado con el anticuerpo que en un sujeto de control. En una realización específica, la relación de la tarea de laberinto en Y en dos ensayos se aumenta en al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 %. En otra realización, la relación de la tarea de laberinto en  
20 Y en dos ensayos es al menos aproximadamente dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, diez veces o veinte veces mayor. La presente invención también proporciona los anticuerpos de la presente invención para su uso en un procedimiento para prevenir o retrasar la aparición de al menos un síntoma de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo tau descrito en esta invención. La presente invención proporciona además los anticuerpos de la presente invención para  
25 su uso en un procedimiento para reducir o eliminar al menos un síntoma de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo tau descrito en esta invención. En una realización, el sujeto es un organismo experimental, tal como, pero no se limita a, ratón transgénico. En una realización, el sujeto es un ser humano.

### 30 III. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de  
35 unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede estar compuesto por un ADN monocatenario o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias o bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más normalmente, bicatenario, o una mezcla de regiones monocatenarias o bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del  
40 mismo, puede estar compuesto por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, también puede contener una o más bases modificadas o cadenas principales de ADN o ARN modificadas para determinar la estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se puede hacer una diversidad de modificaciones a ADN y ARN; por tanto, "polinucleótido" incluye  
45 formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (*por ejemplo*, una porción de cadena pesada o una porción de cadena ligera de inmunoglobulina) se puede crear por la introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la  
50 inmunoglobulina de tal forma que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. En una realización, las sustituciones de aminoácido conservativas se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

55 Como es bien sabido, el ARN se puede aislar de las células B originales, células de hibridoma o de otras células transfectadas por técnicas estándar, tales como extracción de isotiocianato de guanidina y precipitación seguida de centrifugación o cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm se puede aislar del ARN total por técnicas estándar tal como cromatografía en celulosa oligo dT. Técnicas adecuadas son familiares en la técnica. En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo se pueden realizar, de modo simultáneo o separado,  
60 utilizando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según procedimientos bien conocidos. La PCR se puede iniciar por cebadores de región constante de consenso o por cebadores más específicos basados en el ADN de cadena pesada y ligera y en las secuencias de aminoácidos publicadas. Como se ha analizado anteriormente, la PCR también se

puede usar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpos. En este caso se pueden identificar selectivamente las bibliotecas por cebadores de consenso o sondas homologas más grandes tales como sondas de región constante humana.

5 El ADN, normalmente ADN plasmídico, se puede aislar de las células usando técnicas conocidas en la técnica, restricción mapeada y secuenciada según técnicas estándar, bien conocidas, expuestas en detalle, *por ejemplo*, en las referencias anteriores con respecto a las técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético según la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o el posterior análisis.

10 También se describe en esta invención un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ), donde al menos una de las CDR de la región variable de la cadena pesada o al menos dos de las CDR de  $V_H$  de la región variable de la cadena pesada son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  o CDR3 de  $V_H$  de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. De manera alternativa, las regiones CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  de la  $V_H$  son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  de la cadena pesada de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. Por tanto, una región variable de la cadena pesada de la invención puede tener secuencias de polipéptido CDR2 de  $V_H$  o CDR3 de  $V_H$  relacionadas con las secuencias de polipéptido que se muestran en la figura 7. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_H$  de referencia puede ser SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157, o 163; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_H$  de referencia puede ser SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158, o 164; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_H$  de referencia puede ser SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159, o 165.

25 También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ), en la que las regiones CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de  $V_H$ , CDR2 de  $V_H$  y CDR3 de  $V_H$  que se muestran en la figura 7, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en cualquiera de las CDR de  $V_H$ . Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras. La secuencia de aminoácidos de CDR1 de  $V_H$  puede ser SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 o 163; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de  $V_H$  puede ser SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 o 164; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de  $V_H$  puede ser SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 o 165.

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ), donde al menos una de las CDR de  $V_L$  de la región variable de la cadena ligera o al menos dos de las CDR de  $V_L$  de la región variable de la cadena ligera son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  o CDR3 de  $V_L$  de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. De manera alternativa, las regiones CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  o CDR3 de  $V_L$  de la  $V_L$  son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácido de CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  de la cadena ligera de referencia de los anticuerpos descritos en esta invención. Por tanto, una región variable de la cadena ligera puede tener secuencias de polipéptido CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  relacionadas con las secuencias de polipéptido que se muestran en la figura 7. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_L$  de referencia puede ser SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166, o 224; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_L$  de referencia puede ser SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_L$  de referencia puede ser SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) en la que las regiones CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de  $V_L$ , CDR2 de  $V_L$  y CDR3 de  $V_L$  que se muestran en la figura 7, salvo por una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos en cualquiera de CDR de  $V_L$ . Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras. Como se describe en esta invención, la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de  $V_L$  puede ser SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 o 224; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de  $V_L$  puede ser SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de  $V_L$  puede ser SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) en la que las regiones CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub> y CDR3 de V<sub>H</sub> tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de V<sub>H</sub>, CDR2 de V<sub>H</sub> y CDR3 de V<sub>H</sub> que se muestran en la figura 7. Como se describe en esta invención, la

- 5 la secuencia de aminoácidos de CDR1 de V<sub>H</sub> puede ser SEQ ID NO: 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 139, 145, 151, 157 o 163; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de V<sub>H</sub> puede ser SEQ ID NO: 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134, 140, 146, 152, 158 o 164; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de V<sub>H</sub> puede ser SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 135, 141, 147, 153, 159 o 165.
- 10 En otra realización, también se describe en esta invención que la presente invención proporcionó un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (V<sub>L</sub>) en la que las regiones CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> y CDR3 de V<sub>L</sub> tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos CDR1 de V<sub>L</sub>, CDR2 de V<sub>L</sub> y CDR3 de V<sub>L</sub> que se muestran en la figura 7. Como se describe en esta invención, la secuencia de aminoácidos de CDR1 de V<sub>L</sub> puede ser SEQ ID
- 15 NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 136, 142, 148, 154, 160, 166 o 224; la secuencia de aminoácidos de CDR2 de V<sub>L</sub> puede ser SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 137, 143, 149, 155, 161 o 167; y la secuencia de aminoácidos de CDR3 de V<sub>L</sub> puede ser SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 138, 144, 150, 156, 162 o 168.

- 20 Como es sabido en la técnica, "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos o dos polinucleótidos se determina por la comparación de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de un polipéptido o polinucleótido con la secuencia de un segundo polipéptido o polinucleótido. Cuando se analiza en esta invención, si un polipéptido en particular es al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntico a otro polipéptido puede determinarse usando procedimientos y programas informáticos/software conocidos en la técnica,
- 25 tales como, pero no se limitan a, programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, un 95 % idéntica a una
- 30 secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros se ajustan, por supuesto, de tal forma que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de polipéptido de referencia y se permiten los huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Un polinucleótido descrito en esta invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la región V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> de un anticuerpo anti-tau como se representa en la

35 Tabla 4. A este respecto, el experto en la materia apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada puede codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo una. Los polinucleótidos que codifican la V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo NI-105.6C5 son polinucleótidos de la presente invención.

40

**Tabla 4:** Secuencias de nucleótidos de la región V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de anticuerpos específicos de tau. AMLG - antes de la modificación de la línea germinal

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesadas variables (V <sub>H</sub> ) y ligeras variables (V <sub>L</sub> )	
NI-105.17C1	V <sub>H</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:169
	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:170
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:171
NI-105.6C5	V <sub>H</sub> AMLG	SEQ. ID. NO:172
	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:173
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:174
NI-105.29G10	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:175
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:176
NI-105.6L9	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:177
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:178
NI-105.40E8	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:179
	V <sub>L</sub>	SEQ. ID. NO:180
NI-105.48E5	V <sub>H</sub>	SEQ. ID. NO:181

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL)	
	VL	SEQ ID. NO:182
NI-105.6E3	VH	SEQ. ID. NO:183
	VL	SEQ. ID. NO: 184
NI-105.22E1	VH	SEQ. ID. NO:185
	VL	SEQ. ID. NO:186
NI-105.26B12	VH	SEQ. ID. NO:187
	VL AMLG	SEQ. ID. NO:188
	VL	SEQ. ID. NO:223
NI-105.12E12	VH	SEQ. ID. NO:189
	VL	SEQ. ID. NO:190
NI-105.60E7	VH	SEQ. ID. NO:191
	VL	SEQ. ID. NO:192
NI-105.14E2	VH	SEQ. ID. NO: 193
	VL	SEQ. ID. NO:194
NI-105.39E2	VH	SEQ. ID. NO:195
	VL	SEQ. ID. NO:196
NI-105.19C6	VH	SEQ. ID. NO: 197
	VL	SEQ. ID. NO:198
NI-105.9C4	VH AMLG	SEQ. ID.NO:199
	VH	SEQ. ID. NO:200
	VL AMLG	SEQ. ID. NO:201
	VL	SEQ. ID. NO:202

También se describe en esta invención un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina al menos 5 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o 95 % idéntica a la VH de la cadena pesada de referencia. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de referencia comprende la SEQ ID NO: 44, 45, 47, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 76 o 220.

También se describe en esta invención un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o 10 que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o 95 % idéntica con la VL de cadena ligera de referencia. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de referencia comprende SEQ ID NO: 46, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 77, 78, 221 o 222.

15 También se describen en esta invención fragmentos de los polinucleótidos de la invención, tal como se describe en otra parte. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en esta invención, también se contemplan por la invención.

Los polinucleótidos se pueden producir o fabricar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, si 20 la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados, *por ejemplo*, como se describe en Kutmeier y col., BioTechniques 17 (1994), 242, que brevemente implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligación de esos oligonucleótidos y a continuación amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

25 De forma alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo se puede generar de ácido nucleico a partir de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula del anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente

adecuada (*por ejemplo*, una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente poliA<sup>+</sup> ARN, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo específico de tau, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que pueden hibridarse en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda

- 5 de oligonucleótido específica para la secuencia génica particular para identificar, *por ejemplo*, un clon de ADNc a partir de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden a continuación clonarse en vectores de clonación replicables utilizando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.
- 10 Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos se puede manipular usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la manipulación de las secuencias de nucleótidos, *por ejemplo*, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel y col., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), para generar anticuerpos que tienen diferentes secuencias de aminoácidos, por ejemplo, para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácido.

#### IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

- 20 Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan normalmente en un vector de expresión para la introducción en células huésped que se pueden usar para producir la cantidad deseada de anticuerpo. La expresión recombinante de un anticuerpo o fragmento, derivado o
- 25 análogo del mismo, *por ejemplo*, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana se describe en esta invención. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo (que contiene preferiblemente el dominio variable de la cadena pesada o ligera) de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por tanto, los
- 30 procedimientos para preparar una proteína por la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica una secuencia de nucleótido se describen en esta invención. Los procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional adecuadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Por tanto, la invención
- 35 proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, unidos operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (*véanse, por ejemplo*, las solicitudes internacionales WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos n.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en
- 40 uno de estos vectores para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en esta invención para hacer referencia a vectores usados según la presente invención como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como se conoce por los expertos en la materia, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente a partir del grupo que consiste

45 en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas. A los efectos de esta invención, se pueden emplear numerosos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus de papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus,

50 retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos. Adicionalmente, las células que tienen el ADN integrado en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (*por ejemplo*, antibióticos) o resistencia a metales pesados, tales como cobre. El gen marcador seleccionable puede estar unido directamente a

55 las secuencias de ADN a expresar, o introducirse en la misma célula por co-transformación. Los elementos adicionales también se pueden necesitar para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de splicing, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación.

- En realizaciones particulares, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con
- 60 los genes de región constante de la cadena pesada y ligera (por ejemplo, genes de región constante de la cadena pesada y ligera humanos) como se ha analizado anteriormente. En una realización, esto se realiza usando un vector de expresión patentado de Biogen IDEC, Inc., denominado NEOSPLA, descrito en la patente de Estados Unidos n.º

6.159.730.. Este vector contiene el promotor/potenciador de citomegalovirus, el promotor principal de beta globina de ratón, el origen SV40 de replicación, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, exón 1 y exón 2 de fosfotransferasa de neomicina, el gen dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Se ha encontrado que este vector da como resultado un nivel muy alto de expresión de anticuerpos tras la incorporación de genes de región variable y constante, la transfección en células CHO, seguido de la selección en medio que contiene G418 y amplificación de metotrexato. Por supuesto, en la presente invención se puede usar cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar una expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA), y plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, la identificación selectiva de grandes números de células transformadas para aquellas que expresan niveles adecuadamente superiores si se pueden realizar las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina es experimentación de rutina, por ejemplo, por sistemas robóticos. Los sistemas de vector también se enseñan en las patentes estadounidenses n.º 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, *por ejemplo*, >30 pg/célula/día. Otros sistemas de vector ejemplares se describen, *por ejemplo*, en la patente de Estados Unidos n.º 6.413.777..

En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden expresar usando construcciones policistrónicas tales como las descritas en la solicitud de publicación de patente estadounidense n.º 2003-0157641 A1 y se incorporan en esta invención en su totalidad. En estos sistemas de expresión, los productos génicos múltiples de interés tales como las cadenas pesada y ligera de anticuerpos se pueden producir a partir de una construcción policistrónica sencilla. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente estadounidense n.º 6.193.980 que también se incorpora en esta invención. Los expertos en la materia apreciarán que dichos sistemas de expresión se pueden usar para producir eficazmente el intervalo completo de anticuerpos descritos en la presente solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión se puede introducir en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped se puede lograr mediante varias técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección incluyendo lipotransfección usando, *por ejemplo*, Fugene® o lipofectamina, fusión protoplástica, precipitación de fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Normalmente, la introducción del plásmido en el huésped es por medio de un procedimiento estándar de co-precipitación de fosfato de calcio. Las células huésped que alojan la construcción de expresión se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se ensayan para la síntesis de proteína de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan a continuación por técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en esta invención. Por tanto, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, unido operativamente a un promotor heterólogo. En realizaciones particulares para la expresión de anticuerpos bicatenarios, los vectores que codifican tanto la cadena pesada como la ligera se pueden co-expressar en la célula huésped para la expresión de molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla a continuación.

La célula huésped se puede co-transfectar con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un único vector que codifique polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se pone ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica; véase Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Como se usa en esta invención, "célula huésped" se refiere a células que alojan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y codificando al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de anticuerpos de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan de manera intercambiable para representar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique claramente otra cosa. En otras palabras, la recuperación de polipéptidos de las "células" puede significar desde células enteras centrifugadas, o desde el cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

- Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión de huéspedes para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en esta invención. Tales sistemas de expresión de huéspedes representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representan células que pueden, cuando se las transforma o transfecta con las secuencias de
- 5 codificación de nucleótido adecuadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estas incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (*por ejemplo*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN de cósmido que contiene secuencias de codificación de anticuerpos; levadura (*por ejemplo*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con
- 10 vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de codificación de anticuerpos, sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ejemplo*, baculovirus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (*por ejemplo*, virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (*por ejemplo*, plásmido Ti) que contienen
- 15 secuencias de codificación de anticuerpo o sistemas celulares de mamíferos (*por ejemplo*, células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*por ejemplo*, promotor de matalotioneina) o de virus de mamífero (*por ejemplo*, el promotor tardío del adenovirus, el promotor 7.5K del virus vaccinia). En una realización, las células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante entera se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo,
- 20 las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento del promotor génico temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para los anticuerpos; véase, *por ejemplo*, Foecking y col., Gene 45 (1986), 101; Cockett y col., Bio/Technology 8 (1990), 2.
- 25 La línea celular huésped usada para la expresión de proteína es a menudo de origen mamífero; los expertos en la materia tienen la capacidad de determinar líneas celulares huésped particulares que son más adecuadas para el producto génico deseado a expresar en el mismo. Las líneas celulares huésped incluyen, pero no se limitan a, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), VERY, BHK (riñón de hámster bebé), MDCK, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). En una realización específica, las líneas celulares huésped son células CHO o 293. Las líneas celulares huésped normalmente se encuentran disponibles en servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos Tipo o en la bibliografía publicada.
- 30
- 35 Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (*por ejemplo*, glicosilación) y procesamiento (*por ejemplo*, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos, para el procesado post-traduccional y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesado correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesado adecuado del transcrito primario, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico.
- 40
- 45 Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, generalmente se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden genomanipular líneas celulares que expresan de forma estable la molécula del anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (*por ejemplo*, promotor, secuencias potenciadoras, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, se puede dejar que células genomanipuladas crezcan durante
- 50 entre 1 y 2 días en unos medios enriquecidos, y a continuación se cambian a unos medios selectivos. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento puede usarse de manera ventajosa para genomanipular líneas
- 55 celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo.
- Se pueden usar varios sistemas de selección, incluyendo, pero no se limitan a, la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., Cell 11 (1977), 223), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 48 (1992), 202), y pueden emplearse genes de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22 (1980), 817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia antimetabolito puede usarse como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 78 (1981), 1527); gpt, que confiere

resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 78 (1981), 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 Goldspiel y col., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; e higo, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., Gene 30 (1984), 147. Los procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Hijos, Nueva York (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en Capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)

10

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar por amplificación de vectores, para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de célula huésped hará que aumente el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo; véase Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

15

*La producción in vitro* permite que el aumento de grandes cantidades proporcione los polipéptidos deseados. En la técnica se conocen técnicas de cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejidos, e incluyen el cultivo de suspensiones homogéneas, *por ejemplo* en un reactor aerotransportado o en un reactor de agitación continua, o el cultivo celular inmovilizado o atrapado, *por ejemplo*, en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si se necesita y/o desea, las soluciones de los polipéptidos se pueden purificar mediante los procedimientos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre celulosa DEAE o cromatografía por (inmuno)afinidad, *por ejemplo*, antes de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintética o antes o después de la etapa de la cromatografía HIC descrita en esta invención.

20

25

Los genes que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención también se pueden expresar en células no de mamíferos tales como células de bacterias, insectos, levaduras o vegetales. Las bacterias que absorben fácilmente los ácidos nucleicos incluyen miembros de enterobacteriaceae, tal como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. También se comprenderá que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos normalmente se vuelven parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos se deben aislar, purificar y después ensamblar en moléculas funcionales. Cuando se deseen formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalentes, véase, *por ejemplo*, la solicitud internacional WO02/096948.

30

35

En los sistemas bacterianos, varios vectores de expresión se pueden seleccionar ventajosamente dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se debe producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, se pueden desear vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2 (1983), 1791), en el cual la secuencia codificante del anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en marco con la región codificante lacZ de forma tal que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también se pueden usar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de microesferas de glutatión agarosa seguida de una elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión por la trombina o la proteasa factor Xa de manera que el producto génico diana clonado se pueda liberar del resto de GST.

40

45

50

Además de los procariontes, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común es la más comúnmente usada entre microorganismos eucariotas pese a que un número de otras cepas están comúnmente disponibles, *por ejemplo*, *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, comúnmente se usa el YRp7 plasmídico, por ejemplo, (Stinchcomb y col., Nature 282 (1979), 39; Kingsman y col., Gene 7 (1979), 141; Tschemper y col., Gene 10 (1980), 157) Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecimiento en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). La presencia de la lesión trp1 como una característica del genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

60

En un sistema de insecto, el virus polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa normalmente como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y se puede situar bajo control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

5

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas pesada y ligera individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, se pueden purificar según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo, por ejemplo, por cromatografía (*por ejemplo*, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad a un antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, *por ejemplo*, precipitación de sulfato de amonio, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, *por ejemplo*, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). De manera alternativa, se describe otro procedimiento para aumentar la afinidad de anticuerpos de la invención en la publicación de patente estadounidense 2002-0123057 A1.

#### 15 V. Proteínas de fusión y conjugados

En algunas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o uno o más restos normalmente no asociados con un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen en más detalle a continuación. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla de la invención puede comprender una secuencia enlazadora flexible, o se puede modificar para añadir un resto funcional (*por ejemplo*, PEG, un fármaco, una toxina o una etiqueta tal como una fluorescente, radioactiva, enzima, magnética nuclear, metal pesado y similares).

Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a tau de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión diana, y al menos una porción heteróloga, *es decir*, una porción con la cual no está naturalmente enlazado en la naturaleza. Las secuencias de aminoácido pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína, pero están situadas en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden crear, por ejemplo, mediante síntesis química, o mediante la creación y traducción de un polinucleótido en el que se codifican las regiones del péptido en la relación deseada.

El término "heterólogo" como se aplica a un polinucleótido o a un polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad distinta de aquella del resto de la entidad a la que se compara. Por ejemplo, como se usa en esta invención, un "polipéptido heterólogo" a fusionar a un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, variante, o análogo del mismo se deriva de un polipéptido diferente de inmunoglobulina de la misma especie, o un polipéptido de inmunoglobulina o diferente de inmunoglobulina de una especie diferente.

Como se analiza en más detalle en otra parte en esta invención, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse adicionalmente de manera recombinante a un polipéptido heterólogo en el extremo N- o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes o no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden fusionar de manera recombinante o conjugarse a moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionucleótidos o toxinas; véanse, *por ejemplo*, las solicitudes internacionales WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; la patente estadounidense n.º 5.314.995; y la solicitud de patente europea EP 0 396 387.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, *es decir*, , isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por gen. Los anticuerpos pueden modificarse mediante procesos naturales, como el procesamiento postraduccion, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones se han descrito suficientemente en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier lugar del anticuerpo, incluyendo la cadena principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo-terminales, o en restos tales como carbohidratos. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en igual grado o distintos grados en diversos sitios de un anticuerpo dado. Asimismo, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos se pueden ramificar, por ejemplo, como un resultado de ubiquitinación, y a continuación pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden producirse como resultado de procesos naturales de postraduccion o pueden obtenerse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación

- de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación
- 5 y ubiquitinación; véase, *por ejemplo*, Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York 2ª Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter y col., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan y col., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62).
- 10 La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera o más de las regiones V<sub>L</sub> de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes
- 15 del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. En otra realización, una proteína de fusión para su uso en procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en esta invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos o tres cualesquiera de las CDR de V<sub>H</sub> de un anticuerpo o fragmentos, variantes, o derivados del mismo, o la secuencia de aminoácidos de una, dos o tres cualesquiera de las CDR de V<sub>L</sub> de un anticuerpo o fragmentos, variantes, o derivados del mismo, y una secuencia de
- 20 polipéptidos heterólogos. También se describe en esta invención una proteína de fusión que comprende un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la presente invención, o fragmento, derivado, o variante del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos, cuya proteína de fusión se une específicamente a tau. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región V<sub>H</sub> de un anticuerpo de la invención, y la secuencia de aminoácidos de al
- 25 menos una región V<sub>L</sub> de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. En una realización, las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de la proteína de fusión corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a tau. También se describe en esta invención una proteína de fusión para su uso en procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en esta invención que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos o tres cualesquiera de las CDR de V<sub>H</sub>
- 30 de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una, dos o tres cualesquiera de las CDR de V<sub>L</sub> de un anticuerpo o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. Como se describe en esta invención, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las CDR de V<sub>H</sub> o CDR de V<sub>L</sub> corresponden a un anticuerpo de una única fuente (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también se describen en esta invención.
- 35 Las proteínas de fusión ejemplares notificadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon y col., Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker y col., Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. USA 9 (1990), 347-353; y Byrn y col., Nature 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de retorno) (Watson y col., J. Cell. Biol. 110 (1990), 2221-2229; and
- 40 Watson y col., Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo y col., Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley y col., J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic y col., Cell 66 (1991), 1133-1144); receptor TNF (Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer y col., Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; y Peppel y col., J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor IgE a (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 115 (1991), Resumen n.º 1448).
- 45 Tal como se discute en otra parte en esta invención, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden fusionar a polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida in vivo de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar a los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida in vivo; véase,
- 50 *por ejemplo*, Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.
- Además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden fusionar a secuencias de marcadores, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En
- 55 realizaciones particulares, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina (HIS), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que
- 60 corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson y col., Cell 37 (1984), 767) y la etiqueta "flag".

Las proteínas de fusión se pueden preparar usando procedimientos que son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, las patentes n.º 5.116.964 y 5.225.538. El sitio preciso en el que se realiza la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de unión o secreción de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta a continuación a una célula huésped para su expresión.

5

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una variedad de moléculas, *por ejemplo*, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección diana, o para formar imágenes o para la terapia del paciente. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden etiquetar o conjugar antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

Los conjugados que son inmunotoxinas incluyendo anticuerpos convencionales han sido ampliamente descritos en la técnica. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales o se pueden producir inmunotoxinas que contienen porciones de toxinas de proteínas como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar de manera correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Es ilustrativo de dichas inmunotoxinas lo descrito por Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 y por Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

20

Los expertos en la materia apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado a conjugar. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a tau con un éster de biotina activado tal como el éster de biotina N-hidroxisuccinimida. De manera similar, los conjugados con un marcador fluorescente se pueden preparar en presencia de un agente de acoplamiento, *por ejemplo*, los enumerados en esta invención, o mediante la reacción con un isotiocianato, o isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención se preparan de manera análoga.

25

La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención conjugados con un agente terapéutico o de diagnóstico. Los anticuerpos se pueden usar como diagnóstico para, por ejemplo, demostrar la presencia de una enfermedad neurológica, para indicar el riesgo de contraer una enfermedad neurológica, para controlar el desarrollo o evolución de una enfermedad neurológica, *es decir*, enfermedad tauopática como parte de un procedimiento de prueba clínica para, *por ejemplo*, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o prevención dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radioactivos; véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 4.741.900 para iones de metales que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnóstico según la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{99}\text{Tc}$ .

30

35

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo también se puede etiquetar de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo etiquetado quimioluminiscente se determina a continuación mediante la detección de la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos con etiqueta quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

50

Una de las maneras en las que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo se puede etiquetar de manera detectable mediante el enlace de este a una enzima y el uso del producto enlazado en un inmunoensayo de enzima (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" *Microbiological Associates Quarterly Publication*, Walkersville, Md., *Diagnostic Horizons* 2 (1978), 1-7); Voller y col., *J. Clin. Pathol.* 31 (1978), 507-520; Butler, *Meth. Enzymol.* 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. y col., (eds.), *Enzyme Immunoassay*, Kigaku Shoin, Tokyo (1981). La enzima, que se une al anticuerpo reaccionará con un sustrato adecuado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produzca un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que se pueden usar para etiquetar de manera detectable el anticuerpo incluyen,

60

pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, levadura alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolihesterasa. Adicionalmente, la detección se puede lograr por  
5 procedimientos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede lograr mediante comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados de manera similar.

La detección también se puede lograr usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo,  
10 etiquetando de manera radioactiva el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (marzo, 1986)). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios que incluyen, pero sin limitación, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

15 Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo también se puede etiquetar de manera detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como <sup>152</sup>Eu u otros de la serie lantánida. Estos metales se pueden unir al anticuerpo usando dichos grupos quelantes de metales como ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

20 Las técnicas para conjugar diversos restos a un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, son bien conocidos, véase, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson y  
25 col. (eds.), Marcel Dekker, Inc., págs. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col. (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col. (eds.), Academic Press págs. 303-16 (1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",  
30 Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Tal como se menciona, en ciertas realizaciones, se puede conjugar un resto que mejora la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, *por ejemplo*, un polipéptido de unión, *por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento  
inmuno-específico del mismo. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar a las moléculas de unión de la  
35 invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong y col., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

#### VI. Composiciones y procedimientos de uso

40 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo tau mencionado anteriormente o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención o derivado o variante del mismo o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender además un excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además agentes tales como interleucinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición  
45 farmacéutica. Para su uso en el tratamiento de una enfermedad tauopática, *por ejemplo*, de la enfermedad de Alzheimer, el agente adicional se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-tau y combinaciones de los mismos. Por ende, en una realización particular, la presente invención se refiere al uso del anticuerpo tau o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico  
50 para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad tauopática, control de la evolución de una enfermedad tauopática, o una respuesta a un tratamiento de una enfermedad tauopática en un sujeto, o para determinar el riesgo de un sujeto a desarrollar una enfermedad tauopática.

Por ende, en una realización, la presente invención se refiere a anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células de la  
55 invención para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno neurológico caracterizado por la acumulación anormal y/o deposición de tau en el cerebro y sistema nervioso central, respectivamente, cuyo procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de uno cualquiera de los anticuerpos de unión a tau, polinucleótidos, vectores o células descritos anteriormente de la presente invención. El término "trastorno neurológico" incluye, pero no se limita a, enfermedades tauopáticas tales como enfermedad de  
60 Alzheimer, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, demencia argirofílica granulosa, angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia

- frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de motoneuronas no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico. A menos que se especifique otra cosa, los términos neurodegenerativo, neurológico o neuropsiquiátrico se usan de manera intercambiable en esta invención.
- 5
- 10 Una ventaja particular de la estrategia terapéutica de la presente invención reside en que los anticuerpos de la presente invención se derivan de células B o células B de memoria de sujetos humanos sanos sin signos de una enfermedad tauopática y, por tanto, son, con cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad tauopática clínicamente manifiesta, o de disminuir el riesgo de la aparición de la enfermedad clínicamente manifiesta, o de retrasar el inicio o evolución de la enfermedad clínicamente manifiesta. Normalmente, los anticuerpos de la presente invención también
- 15 han pasado por maduración somática con éxito, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y eficacia en la unión de alta afinidad a la molécula de tau diana por medio de la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

- El hecho de saber que dichas células *in vivo*, por ejemplo, en un ser humano, no se han activado por medio de proteínas fisiológicas o estructuras celulares diferentes o relacionadas en el sentido de que una reacción alérgica o autoinmunitaria es también de gran importancia médica ya que implica una posibilidad considerablemente aumentada de vivir satisfactoriamente a través de las fases de prueba clínica. Por así decirlo, ya se han demostrado la eficiencia, aceptabilidad y tolerabilidad antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Por lo tanto, se puede esperar que los anticuerpos anti-tau humanos de la
- 20 presente invención, tanto su eficiencia específica de la estructura diana como agente terapéutico y su probabilidad disminuida de efectos secundarios aumenten significativamente su probabilidad clínica de éxito.
- 25

- La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo, un
- 30 anticuerpo anti-tau, fragmento de unión, derivado o variante del mismo polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Puede haber un aviso asociado a dicho recipiente o recipientes de la forma prescrita por un organismo gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleje la aprobación por el organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración en seres humanos. Además, o como alternativa, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico adecuados. La
- 35 composición, por ejemplo, un kit de la presente invención es, por supuesto, particularmente adecuado para la evaluación del riesgo, diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que está acompañado por la presencia de tau, y en particular es aplicable al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA), complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia (ELA-CPD), demencia argirofílica granulosa (DAG), angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ),
- 40 demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NP-C), enfermedad de motoneuronas no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick (EPi), parkinsonismo postencefálico,
- 45 angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva (PSP), panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico.

- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse según procedimientos bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) por la Universidad de Ciencias en Filadelfia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de excipientes farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales excipientes pueden formularse mediante procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones
- 50 farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar de diferentes maneras, por ejemplo, por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o administración espinal o cerebral. Las formulaciones en aerosol tales como formulaciones nasales en pulverizador incluyen soluciones acuosas purificadas u otras del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan a un pH y estado isotónico
- 55 compatible con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un excipiente adecuado.
- 60

Además, considerando que la presente invención incluye el procedimiento estándar actual (aunque afortunadamente no frecuente) de perforar un pequeño agujero en el cráneo para administrar un fármaco de la presente invención, en un aspecto, el anticuerpo o fármaco basado en el anticuerpo de la presente invención puede atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite la administración intravenosa o por vía oral.

5 El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y los factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos administrados simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000  $\mu\text{g}$  (o de ácido nucleico para expresión o para inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Generalmente, la dosificación puede variar, *por ejemplo*, de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg (*por ejemplo*, 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, o al menos 1 mg/kg. Se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores también estén dentro del alcance de la invención. Tales dosis se pueden administrar a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otra pauta determinada por análisis empírico. Cualquier tratamiento ejemplar comprende la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento 20 ejemplares adicionales implican una administración de una vez cada dos semanas o una vez por mes o una vez cada 3 a 6 meses. Las pautas de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternativos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. La evolución se puede controlar por 25 evaluación periódica. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. El propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo son ejemplos de disolventes no acuosos. Los excipientes acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, lo que incluye medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además agentes tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos dependiendo del uso pretendido 35 de la composición farmacéutica.

Además, en una realización particular de la presente invención, la composición farmacéutica se puede formular como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-tau o fragmento de unión, derivado o variante del mismo para inmunización pasiva. Como se menciona en la sección de antecedentes, 40 las especies fósforo-tau se han indicado de forma extracelular en plasma y LCR (Aluise y col., Biochim. Biophys. Acta. 1782 (2008), 549-558) y estudios en líneas de ratones transgénicos usando vacunación activa con péptidos de tau fosforilada revelaron una reducción en los niveles cerebrales de agregados de tau en el cerebro y un avance más lento del deterioro de la conducta (Sigurdsson, J. Alzheimers Dis. 15 (2008), 157-168; Boimel y col., Exp Neurol. 224 (2010), 472-485). Por consiguiente, es prudente esperar que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-tau humanos y las 45 moléculas de unión a tau equivalentes de la presente invención ayudarían a evitar diversos efectos adversos de los conceptos de terapia de inmunización activa como ya se ha analizado en la sección de antecedentes. Por lo tanto, los presentes anticuerpos anti-tau y sus equivalentes de la presente invención serán particularmente útiles como una vacuna para la prevención o mejora de enfermedades tauopáticas tales como EA, ELA-CPD, DAG, DCB, ECJ, DFT, FTDP-17, NP-C, EPi, PSP u otras tauopatías como se ha mencionado anteriormente.

50 En una realización, puede ser beneficioso usar construcciones biespecíficas o multiespecíficas recombinantes del anticuerpo de la presente invención. Para una referencia, véase Fischer y Léger, Pathobiology 74 (2007), 3-14. Dicha molécula biespecífica se puede diseñar para dirigirse a tau con un brazo de unión y otra entidad patológica tal como A $\beta$  o alfa-sinucleína o una conformación patológica diferente de tau con un segundo brazo de unión. Como alternativa, 55 el segundo brazo de unión se puede diseñar para dirigirse a una proteína presente en la barrera hematoencefálica para facilitarle al anticuerpo la penetración en el cerebro.

En una realización, puede ser beneficioso usar Fab recombinante (rFab) y fragmentos de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo de la presente invención, que podría penetrar más fácilmente una membrana celular. Por ejemplo, Robert 60 y col., Protein Eng. Des. (2008) 16 de octubre; S1741-0134,, publicado antes en línea, describen el uso de Fab recombinante quimérico (rFab) y fragmentos de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítipo en la región N-terminal de A $\beta$ . Los fragmentos modificados podían (i) impedir la fibrilización de tipo amiloide,

- (ii) desagregar las fibrillas A $\beta$ 1-42 preformadas, e (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por el oligómero A $\beta$ 1-42 *in vitro* de manera tan eficiente como la molécula IgG entera. Las ventajas percibidas de usar formatos de anticuerpos Fab y scFv pequeños modificados que carecen de la función efectora incluyen un pase más eficiente a través de la barrera hematoencefálica y minimizar el riesgo de desencadenar reacciones secundarias inflamatorias. Además, aparte de
- 5 que los anticuerpos de dominio único y scFv conservan la especificidad de unión de los anticuerpos de longitud completa, pueden expresarse como genes individuales e intracelularmente en células de mamíferos como intracuerpos, con el potencial de alteración del plegamiento, interacciones, modificaciones o localización subcelular de sus dianas; véase para revisión, *por ejemplo*, Miller y Messer, *Molecular Therapy* 12 (2005), 394-401.
- 10 En una estrategia diferente Muller y col., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241, describen una plataforma de tecnología, conocida como "Tecnología de Superanticuerpo", que se dice que permite que los anticuerpos se trasladen a células vivas sin dañarse. Dichos anticuerpos que penetran en las células abren nuevas ventanas terapéuticas y de diagnóstico. El término "TransMabs" ha sido acuñado para estos anticuerpos.
- 15 En una realización adicional, puede desearse la co-administración o administración secuencial de otros anticuerpos útiles para tratar una tauopatía. En una realización, el anticuerpo adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos que se pueden usar para tratar un sujeto incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se dirigen a beta-amiloide, alfa-sinucleína, TDP-43 y SOD-1.
- 20 En una realización adicional, puede desearse la co-administración o administración secuencial de otros agentes neuroprotectores útiles para tratar una enfermedad tauopática. En una realización, el agente adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de agentes neuroprotectores que se pueden usar para tratar un sujeto incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor de acetilcolinesterasa, un antagonista del receptor glutamatérgico, inhibidores de quinasa, inhibidores de HDAC, agentes antiinflamatorios, sodio de
- 25 divalproex o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de otros agentes neuroprotectores que se pueden usar concomitantemente con la composición farmacéutica de la presente invención se describen en la técnica, véase, *por ejemplo*, la solicitud internacional WO2007/011907. En una realización, el agente adicional es dopamina o un agonista del receptor de dopamina.
- 30 Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del principio activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia y toxicidad terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, *por ejemplo*, DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>.
- 35 En una realización, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar o conservar el comportamiento normal y/o las propiedades cognitivas en caso de EA, ELA-CPD, DAG, DCB, ECJ, EFT, FTDP-17, NP-C, EPI, PSP u otras enfermedades tauopáticas como se ha mencionado anteriormente.
- De lo anterior, resulta evidente que en esta invención se describe cualquier uso de una molécula de unión a tau que
- 40 comprende al menos una CDR del anticuerpo descrito anteriormente, en particular para diagnosticar y/o tratar una enfermedad tauopática tal como se menciona anteriormente, particularmente la enfermedad de Alzheimer. Dicha molécula de unión puede ser un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. También se describen en esta invención anticuerpos anti-idiotípicos de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados descritos anteriormente en esta invención. Estos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la única
- 45 secuencia peptídica antigénica ubicada en una región variable del anticuerpo próxima al sitio de unión al antígeno y son útiles, *por ejemplo*, para detectar anticuerpos anti-tau en la muestra de un sujeto.
- En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende cualquiera de las moléculas de unión de tau, anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la
- 50 invención descritos anteriormente y medios opcionalmente adecuados para la detección, tales como reactivos usados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico a base de ácidos nucleicos o inmunitarios. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuados para su uso en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un excipiente en fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos
- 55 inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo tipo sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de inmunoelectrotransferencia. Los antígenos y anticuerpos de la invención se pueden unir a diferentes excipientes y usarse para aislar células específicamente unidas a los mismos. Los ejemplos de excipientes conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del excipiente puede ser
- 60 soluble o insoluble para los fines de la invención. Existen numerosas etiquetas y procedimientos de etiquetado diferentes conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que se pueden usar en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos

quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véase también las realizaciones analizadas antes mencionadas.

Mediante una realización adicional, los anticuerpos de unión a tau de la presente invención también se pueden usar en un procedimiento para el diagnóstico de un trastorno en un individuo mediante la obtención de una muestra de fluido corporal del individuo sometido a prueba que puede ser una muestra de sangre, una muestra linfática o cualquier otra muestra de fluido corporal y poner en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno. El nivel de dichos complejos se determina a continuación mediante procedimientos conocidos en la técnica, un nivel significativamente mayor a aquel formado en una muestra de control indica la enfermedad en el individuo sometido a prueba. De la misma manera, el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención también puede usarse. Por tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, *por ejemplo*, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención.

En este contexto, también se describen en esta invención medios diseñados específicamente para este propósito. Por ejemplo, se puede usar una matriz basada en anticuerpos, que esté, por ejemplo, cargada con anticuerpos o moléculas de unión al antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente tau. El diseño de inmunoensayos de micromatrices se resume en Kusnezow y col., *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, también se describe en esta invención micromatrices cargadas con moléculas de unión a tau identificadas según la presente invención.

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una enfermedad tauopática en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento determinar la presencia de tau y/o tau agregada y/o modificada patológicamente en una muestra del sujeto a ser diagnosticado con al menos un anticuerpo de la presente invención, un fragmento de unión a tau del mismo o una molécula de unión a tau que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de uno cualquiera de los mismos, donde la presencia de tau agregada y/o modificada patológicamente indica una tautopatía neurodegenerativa y un aumento en el nivel de tau agregada y/o modificada patológicamente en comparación con el nivel de formas de tau fisiológica, indica el avance de una tautopatía neurodegenerativa en dicho sujeto.

El sujeto a diagnosticar puede ser asintomático o preclínico para la enfermedad. En una realización, el sujeto de control tiene una tauopatía, por ejemplo, EA, ALS-PDC, AGD, CBD, CJD, FTD, FTDP-17, NP-C, PiD, PSP u otras tauopatías como se ha mencionado anteriormente, donde una similitud entre el nivel de tau patológicamente modificada y/o agregada y el patrón de referencia indica que el sujeto a diagnosticar tiene una tauopatía. Como alternativa, o además como un segundo control, el sujeto de control no tiene una tauopatía, donde una diferencia entre el nivel de tau y/o de tau patológicamente modificada y/o agregada y el patrón de referencia indica que el sujeto a diagnosticar tiene una tauopatía. En una realización, el sujeto a diagnosticar y el sujeto o sujetos de control tienen la misma edad. La muestra a analizar puede ser cualquier fluido corporal que se sospeche que contiene tau modificada y/o agregada patológicamente, por ejemplo, una muestra de sangre, LCR u orina.

El nivel de tau y/o de tau patológicamente modificada y/o agregada se puede evaluar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica que comprenda, por ejemplo analizar tau por una o más técnicas seleccionadas de entre inmuno electrotransferencia, inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, espectroscopia de masas (MS), desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo-MS (MALDI-TOF), desorción/ionización láser mejorada por superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC), cromatografía líquida (LC) multidimensional seguido por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y densitometría láser. En una realización, dicha formación de imágenes *in vivo* de tau comprende tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), imagen óptica de infrarrojo cercano (NIR) o imagen por resonancia magnética (MRI).

Los procedimientos para diagnosticar una enfermedad tauopática tal como la enfermedad de Alzheimer, controlar el avance de una enfermedad tauopática y controlar el tratamiento de una enfermedad tauopática usando anticuerpos y medios relacionados que se pueden adaptar según la presente invención también se describen en las solicitudes internacionales WO93/08302, WO94/13795, WO95/17429, WO96/04309, WO2002/062851 y WO2004/016655. De manera similar, los procedimientos de detección basados en anticuerpos para tau se describen en la solicitud internacional WO2005/080986. Estos procedimientos se pueden aplicar tal como se describen, pero con un anticuerpo específico de tau, fragmento de unión, derivado o variante de la presente invención.

También se describen en esta invención péptidos que tienen un epítipo de tau reconocido específicamente por cualquier anticuerpo de la presente invención. Dicho péptido comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en: residuos 125-131, 397-441, 226-244, 217-227, 37-55, 387-406, 421-427, 427-439, 1-158, 197-207, 57-67, 355-441, 313-319, 309-319, 221-231 de la

SEQ ID NO:6, y cualquier combinación de los mismos, y una secuencia modificada de los mismos en donde se sustituyen, delecionan y/o agregan uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más aminoácidos, donde el péptido se reconoce por cualquier anticuerpo de la presente invención.

- 5 Tal péptido se puede usar para diagnosticar una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto, que comprende una etapa de determinar la presencia de un anticuerpo que se une a un péptido en una muestra biológica de dicho sujeto, y que se usa para el diagnóstico de una tauopatía en dicho sujeto mediante la medición de los niveles de anticuerpos que reconocen el péptido descrito anteriormente de la presente invención y por la comparación de las mediciones con los niveles que se encuentran en sujetos sanos de edad y género comparables. Un nivel elevado de anticuerpos medidos  
10 específicos para dicho péptido indicaría el diagnóstico de una tauopatía en dicho sujeto. El péptido se puede formular en una matriz, un kit y una composición, respectivamente, como se ha descrito anteriormente.

Se puede recuperar más bibliografía relacionada con uno cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos a emplearse según la presente invención de bibliotecas públicas y bases de datos, usando por ejemplo  
15 dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", a cargo del Centro Nacional para la Información Biotecnológica y/o la Biblioteca Nacional de Medicina en los Institutos Nacionales de Salud. Las bases de datos y direcciones web adicionales, tales como las del Instituto de Bioinformática Europeo (EBI), que forma parte del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL) se conocen por los expertos en la materia y también se pueden obtener usando motores de búsqueda de Internet. Una descripción general de información de patente en  
20 biotecnología y un estudio de fuentes relevantes de información de patente útil para la búsqueda retrospectiva y para conciencia actual se da en Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

La descripción anterior generalmente describe la presente invención. A menos que se indique otra cosa, un término como se usa en esta invención da la definición tal como la proporciona el Oxford Dictionary of Biochemistry and  
25 Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2.. Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Se pueden encontrar citas bibliográficas completas al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Se puede obtener una comprensión más completa por referencia a los siguientes ejemplos específicos que se  
30 proporcionan en esta invención con fines de ilustración solamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

#### EJEMPLOS

35 Los siguientes ejemplos ilustran además la invención, pero no se debería considerar que limiten el alcance de la invención de forma alguna. Los experimentos en los siguientes Ejemplos se ilustran y se describen con respecto a los anticuerpos NI-105.4E4, NI-105.24B2 y NI-105.4A3 como se clonan, *es decir* las regiones variables de Ig de estructura 1 (FR1) sin ajustarse a las secuencias de línea germinal (LG) de las cadenas variables pesada y ligera humana; véase la Figura 1.

40

#### Materiales y procedimientos

Las descripciones detalladas de los procedimientos convencionales, tales como los que se emplean en esta invención se pueden encontrar en la bibliografía citada; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy"  
45 Seventeenth Ed. editada por Beers y Berkow (Merck & Co., Inc. 2003) y la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0087861.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e  
50 inmunología, que están dentro de la habilidad de la técnica. Para una mayor elaboración de técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el profesional puede consultar libros de texto estándar y revisiones en biología celular y cultivo de tejidos; véanse también las referencias citadas en los ejemplos. Se pueden encontrar procedimientos generales en bioquímica molecular y celular en libros de texto estándar como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook y col., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volúmenes I y II (Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (Hames y Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (Hames y Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (Freshney y Alan, Liss, Inc., 1987); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller y Calos, eds.); Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edition (Ausubel y col., eds.); y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells  
60 (Miller y Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu y col., eds.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer

y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag y col., John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner y col. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplitt & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (Lefkovits ed., Academic Press 1997); y Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998). Los reactivos, vectores de clonación y kits para la manipulación genética a los que se hace referencia en esta descripción, se encuentran disponibles en proveedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich y ClonTech. Las técnicas generales en el cultivo celular y recolección de medios se describen en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu y col., Curr. Opin. Biotechnol. 8 (1997), 148); Serum-free Media (Kitano, Biotechnology 17 (1991), 73); Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr. Opin. Biotechnol. 2 (1991), 375); y Suspension Culture of Mammalian Cells (Birch y col., Bioprocess Technol. 19 (1990), 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzal y col., CHAOS 11 (2001), 98-107.

#### Procedimientos de identificación de células B específicas de tau y clonación de los anticuerpos respectivos

15 A menos que se indique lo contrario más adelante, la identificación de células B específicas de tau y clonación molecular de anticuerpos anti-tau que muestran especificidad de interés, así como su expresión recombinante y caracterización funcional se ha desempeñado o se puede desempeñar por lo general como se describe en la sección de Ejemplos y procedimientos complementarios de la solicitud internacional PCT/EP2008/00053 publicada como WO2008/081008. Véase también la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0087861.. Se proporciona en esta solicitud un nuevo procedimiento para la identificación de células B específicas de tau y clonación molecular de anticuerpos tau que muestran especificidad de interés, así como su expresión recombinante y caracterización funcional. Como se ha descrito anteriormente, en una realización de la presente invención, se cultivan los cultivos de células B simples u oligoclonales y se identifica de manera sistemática el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por dichas células B, para determinar la presencia y afinidad de los nuevos anticuerpos anti-tau en los mismos. El procedimiento de identificación selectiva comprende las etapas de un ensayo de inmunorreactividad sobre el amiloide de placas tisulares (TAPIR) como se describe en la solicitud internacional WO 2004/095031, y como se muestra en la Figura 3; identificación selectiva sobre extractos del cerebro para la unión a PHFTau como se describe en el Ejemplo 2, identificación selectiva para la unión de un péptido derivado de tau de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO:6 con grupos fosfato en aminoácidos Ser-202 y Ser-205; en el aminoácido Thr-231; y/o en los aminoácidos Ser-396 y Ser-404 de dicha secuencia como se describe de forma análoga en el Ejemplo 3 con péptidos no fosforilados debido a experimentos de confirmación de epítomos para el anticuerpo NI-105.4E4; una identificación selectiva para la unión de tau de longitud completa de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:6 y aislamiento del anticuerpo para el que se detecta la unión o la célula que produce dicho anticuerpo como se describe en la patente internacional WO2008/081008 y como se describe en el Ejemplo 1.

#### Purificación de antígeno

Tau40 humana recombinante se adquirió en rPeptide (Bogart, GA, EE:UU.). Se extrajo PHFTau del cerebro con EA. El aislamiento de los filamentos helicoidales apareados que contienen filamentos de tau fosforilada patológicamente (PHFTau) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Goedert y col. (Goedert y col., Neuron 8 (1992), 159-168) con modificaciones. Un gramo de tejido cerebral con EA se cortó en partes de 5 mm y se retiraron todos los vasos sanguíneos visibles. El tejido se lavó con 40 ml de solución de lavado enfriada con hielo (Tris 100 mM pH 7,4, EGTA 6 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM y NaF 1 mM) tres veces seguido de homogeneización con 20 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM, 1 x cóctel de inhibidor de proteasa, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, AEBSF 1 mM, sacarosa al 10 %). El homogeneizado se centrifugó a 4 °C a 20.000 xg durante 20 min. El sobrenadante se recogió con la adición de sarcosinato de N-lauroilo (Sigma, Suiza) al 1 % (p/v). Después de dos horas de incubación a 37 °C con agitación, el sobrenadante se centrifugó entonces a 4 °C a 100.000 xg durante una hora. El sedimento se recogió y se suspendió de nuevo en PBS. Después de aclarar posibles inmunoglobulinas contaminantes con perlas magnéticas de proteína A, la suspensión de PHFTau se almacenó a -80 °C antes de su uso. Por consiguiente, se preparó un extracto de control de tejido de cerebro humano sano de control.

#### Identificación selectiva de anticuerpo tau humano

55 ELISA:

Se recubrieron microplacas de media área de 96 pocillos (Costar, Corning, EE. UU.) con proteína Tau recombinante (rPeptide, Bogart, EE. UU.) a una concentración estándar de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato (pH 9,6) a 4 °C durante la noche. Para la identificación selectiva de PHFTau, se recubrieron microplacas Immobilizer de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) con PHFTau extraída del cerebro humano con EA en 1:100 diluciones en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato (pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron en PBS-

T pH 7,6 y se bloquearon sitios de unión no específica durante 2 horas a TA con PBS-T que contiene ASB al 2 % (Sigma, Buchs, Suiza). El medio acondicionado de células B se transfirió desde placas de cultivo de células B de memoria a placas de ELISA y se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas de ELISA se lavaron con PBS-T y a continuación se incubaron con anticuerpo policlonal IgG (específico del fragmento Fc $\gamma$ ) anti-humano de burro conjugado con peroxidasa de rábano picante (PRP) (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Reino Unido). Después de lavar con PBS-T, la unión de anticuerpos humanos se determinó por medición de la actividad de PRP en un ensayo colorimétrico estándar.

Identificación selectiva de microplacas MULTI-ARRAY®

Se recubrieron placas MULTI-SPOT con 10 manchas estándar de 96 pocillos (Meso Scale Discovery, EE. UU.) con 30  $\mu$ g/ml de rTau (rPeptide), extracto de cerebro de PHFTau y extracto de cerebro de control sano en PBS. Los sitios de unión no específicos se bloquearon durante 1 h a TA con PBS-T que contenía ASB al 3 % seguido de la incubación con un medio acondicionado con células B durante 1 h a TA. Las placas se lavaron en PBS-T y a continuación se incubaron con anticuerpo policlonal anti-humano conjugado con SULFO-Tag (Meso Scale Discovery, EE. UU.). Después de lavar con PBS-T, la unión de anticuerpo se detectó mediante medición por electroquimioluminiscencia usando un SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery, EE. UU.).

Clonación molecular de anticuerpos tau

Las muestras que contienen células B de memoria se obtuvieron de sujetos humanos sanos. Las células B vivas de cultivos de células B de memoria seleccionados se cultivan y se prepara ARNm. Las secuencias de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina se obtienen entonces usando una estrategia de PCR anidada.

Se usa una combinación de cebadores que representan todas las familias de secuencias del repertorio de línea germinal de inmunoglobulina para las amplificaciones de péptidos líder, segmentos V y segmentos J. La primera ronda de amplificación se realiza usando cebadores específicos de péptidos líderes en el extremo 5' y cebadores específicos de la región constante en el extremo 3' (Smith y col., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras kappa, la segunda ronda de amplificación se realiza usando cebadores específicos del segmento V en el extremo 5' y cebadores específicos del segmento J en el extremo 3'. Para las cadenas ligeras lambda, la segunda ronda de amplificación se realiza usando cebadores específicos del segmento V en el extremo 5' y un cebador específico de la región C en el extremo 3' (Marks y col., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard y col., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realiza por medio de la reidentificación selectiva en ELISA tras la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos IgG1 humanos o anticuerpos IgG2a quiméricos se logra tras la inserción de las secuencias variables de la cadena pesada y ligera "en el marco de lectura adecuado" en vectores de expresión que complementan la secuencia de región variable con una secuencia que codifica un péptido líder en el extremo 5' y el extremo 3' con una secuencia que codifica el o los dominios constantes apropiados. A estos efectos, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de secuencias variables de la cadena pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. Las inmunoglobulinas de cadena pesada se expresan insertando el producto RT-PCR de cadena pesada de inmunoglobulina en marco en un vector de expresión de cadena pesada que porta un péptido señal y los dominios constantes de inmunoglobulina gama 1 humana o inmunoglobulina gama 2a de ratón. Las inmunoglobulinas de cadena ligera kappa se expresan mediante la inserción en el producto RT-PCR de cadena ligera kappa en el marco en un vector de expresión de cadena ligera proporcionando un péptido señal y el dominio constante de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana. Las inmunoglobulinas de cadena ligera lambda se expresan mediante la inserción del producto RT-PCR de cadena ligera lambda en el marco en el vector de expresión de cadena ligera lambda proporcionando un péptido señal y el dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera lambda de ratón o humano.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales se obtienen tras la co-transfección en células HEK293 o CHO (o cualquier otra línea celular receptora apropiada de origen humano o de ratón) de un vector de expresión de cadena pesada de Ig y un vector de expresión de cadena ligera de Ig lambda o kappa. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se purifica posteriormente a partir del medio acondicionado usando purificación de columna de proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se puede producir en cantidades ilimitadas usando células transfectadas de forma transitoria o estable. Se pueden establecer líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales humanos recombinantes usando vectores de expresión de Ig directamente o por medio de la reclonación de regiones variables de Ig en diferentes vectores de expresión. Los derivados, tales como F(ab), F(ab) $_2$  y scFv también se pueden generar a partir de estas regiones variables de Ig.

Anticuerpos

Se usaron el anticuerpo monoclonal tau anti-humano de ratón Tau12 (Covance, California, EE. UU.) y el anticuerpo tau monoclonal de ratón AT180 (Thermo Scientific, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. Se describen los anticuerpos anti-tau humanos NI-105.4E4, NI-105.24B2 y NI-105.4A3 en la publicación de patente estadounidense n.º 2012/0087861. Los anticuerpos humanos recombinantes tau NI-105.17C1, NI-105.17C1(N31Q), NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40B8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-1Q5.6QE7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, y NI-105.9C4 son anticuerpos descritos en esta invención. Se expresaron en células HEK293 o CHO, se purificaron a partir del medio acondicionado y se usaron directamente en aplicaciones posteriores a menos que se indique otra cosa.

10

#### ELISA directo

Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Costar, Corning, EE. UU.) con proteína Tau recombinante (hTau40, rPeptide, Bogart, EE. UU.) diluida a una concentración de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato (50 mM, pH 9,6) a 4 °C durante una noche. Se bloquearon los sitios de unión no específica durante 2 h a TA con PBS que contenía ASB al 2 % (Sigma, Buchs, Suiza) y Tween20 al 0,5 %. La unión de anticuerpos humanos de la presente invención se determinó usando Fcγ de IgG anti-humano de cabra conjugado con PRP (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Reino Unido), seguido de la medición de la actividad de PRP en un ensayo colorimétrico estándar. Los valores de CE<sub>50</sub> se calcularon mediante una regresión no lineal usando el software GraphPad Prism (San Diego, EE. UU.).

20

#### Tinción de proteína por inmunoelectrotransferencia

Se resolvieron PHFTau y hTau40 recombinante mediante SDS-PAGE en gradiente (NuPAGE 4-12 %; Invitrogen, Basilea, Suiza) seguido de electrotransferencia en membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la unión no específica con ASB al 2 % a temperatura ambiente durante una hora, las transferencias se incubaron durante una noche con anticuerpos anti-tau humanos primarios o Tau12 (anticuerpo monoclonal de ratón, Covance, California, EE. UU.), seguido de IgGfcγ anti-humano de cabra conjugado con PRP (para anticuerpos primarios humanos) o un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra conjugado con PRP.

30

Las transferencias se desarrollaron usando ECL y detección ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza).

#### Extracción de PHFTau del cerebro con EA

El aislamiento de los filamentos helicoidales apareados que contienen filamentos de tau fosforilada patológicamente (PHFTau) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Goedert y col. (Goedert y col., Neuron 8 (1992), 159-168) con modificaciones. Un gramo de tejido cerebral con EA se cortó en partes de 5 mm y se retiraron todos los vasos sanguíneos visibles. El tejido se lavó con 40 ml de solución de lavado enfriada con hielo (Tris 100 mM pH 7,4, EGTA 6 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM y NaF 1 mM) tres veces seguido de homogeneización con 20 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM, 1 x cóctel de inhibidor de proteasa, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, AEBSF 1 mM, sacarosa al 10 %). El homogeneizado se centrifugó a 4 °C a 20.000 xg durante 20 min. El sobrenadante se recogió con la adición de sarcosinato de N-lauroilo (Sigma, Suiza) al 1 % (p/v). Después de dos horas de incubación a 37 °C con agitación, el sobrenadante se centrifugó entonces a 4 °C a 100.000 xg durante una hora. El sedimento se recogió y se suspendió de nuevo en PBS. Después de aclarar posibles inmunoglobulinas contaminantes con perlas magnéticas de proteína A, la suspensión de PHFTau se almacenó a -80 °C antes de su uso. Por consiguiente, se preparó un extracto de control de tejido de cerebro humano sano de control.

45

#### Síntesis de péptidos tau

Un péptido correspondiente a los aminoácidos 333-346 de hTau40 (<sup>333</sup>GGGQVEVKSEKLD<sub>346</sub>) que incluye el epítipo de NI-105.4E4 identificado por mapeo Pepspot (aminoácidos 337-343) se sintetizó por Schafer-N (Copenhague, Dinamarca). Se añadió una cisteína adicional al extremo C-terminal para permitir la unión covalente a microplacas Immobilizer (Nunc, Dinamarca). Por consiguiente, un segundo péptido que correspondía a los aminoácidos 226-239 de tau humana (<sup>226</sup>VAVVRpTPPKSPSSA<sub>239</sub>), el epítipo cognado del anticuerpo tau monoclonal de ratón comercialmente disponible AT180 (Thermo Scientific, EE. UU.), se sintetizó y se usó como control.

55

#### Ratones transgénicos

Se usan tres modelos animales diferentes para tauopatías para validar los anticuerpos tau (y moléculas con las especificidades de unión de los mismos)

60

1. Ratones TauP301L transgénicos (línea 183): que expresan Tau40 humana con la mutación P301L bajo el

promotor Thy1.2 murino (la creación de estos animales transgénicos se describe en Götz y col., J. Biol. Chem. 276 (2001), 529-534 y en la solicitud internacional WO 2003/017918.)

2. Ratones JNPL3 que expresan la isoforma de tau humana 4R más corta con la mutación P301L bajo el promotor PrP murino (disponible en Taconic, Hudson, NY, EE. UU.).

5 3. Ratones P301STau (línea PS19) que expresan tau humana con la mutación P301S bajo el promotor PrP humano (disponible en Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, EE. UU.).

10 Los modelos de ratón de tauopatías y los ratones correspondientes de tipo silvestre se mantienen en condiciones de alojamiento estándar en un ciclo de 12 h:12 h de luz/oscuridad inverso con acceso libre a agua y comida. Los grupos de tratamiento se equilibran según la edad y el género.

#### Ejemplo 1

Validación de especificidad de diana y de unión de anticuerpos tau humanos

15 Para validar la tau como una diana reconocida de anticuerpos aislados se realizaron ensayos ELISA tal como se describe anteriormente. Para el anticuerpo NI-105.4A3 humano recombinante ejemplar se recubrieron las microplacas de 96 pocillos (Costar, Corning, EE. UU.) con tau humana recombinante (hTau40, rPeptide, Bogart, EE. UU.) diluida a una concentración de 3 µg/ml o con ASB en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato (pH 9,6) y se ensayó  
20 la eficiencia de unión del anticuerpo. El anticuerpo NI-105.4A3 ejemplar se une específicamente a tau humana mediante ELISA. No se observa ninguna unión a ASB.

Para una determinación de concentración eficaz de media máxima (CE<sub>50</sub>) de los anticuerpos ejemplares NI-105.4E4 y NI-105.24B2, se realizaron experimentos ELISA directos adicionales con concentraciones de anticuerpo variantes.  
25 Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Costar, Corning, EE. UU.) con tau humana recombinante (hTau40, rPeptide, Bogart, EE. UU.) diluida hasta una concentración de 1 µg/ml (para el ensayo con anticuerpo NI-105.4E4), o de 3 µg/ml (para el ensayo con anticuerpo NI-105.24B2) en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato y se sometió a ensayo para la eficiencia de unión del anticuerpo. Los valores de CE<sub>50</sub> se calcularon mediante una regresión no lineal usando el software GraphPad Prism. El anticuerpo derivado de humano recombinante NI-105.4E4 se une a hTau40  
30 con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a CE<sub>50</sub> 2,4 nM. NI-105.24B2 se une a hTau40 con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a CE<sub>50</sub> 6,6 nM.

La concentración eficaz de media máxima (CE<sub>50</sub>) del anticuerpo ejemplar NI-105.4A3 también se determinó usando experimentos ELISA directos. Las placas ELISA se recubrieron con tau humana recombinante (hTau40, 1 µg/ml),  
35 PHFTau (1:100) y preparación de control (1:100), y se incubaron con concentraciones de anticuerpo variables. NI-105.4A3 se une a rTau con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a CE<sub>50</sub> 1,4 nM. NI-105.4A3 se une a PHFTau con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a CE<sub>50</sub> 1,2 nM.

#### Ejemplo 2

40 Análisis de unión de anticuerpos humanos recombinantes a tau recombinante y tau patológica extraídas de cerebros con EA

Para determinar la capacidad de unión de NI-105.4E4 y NI-105.24B2 a especies de tau patológica extraídas de  
45 cerebros con EA, se realizó un análisis SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia como se ha descrito en detalle anteriormente. Las transferencias se incubaron durante una noche con anticuerpos primarios NI-105.4E4 (humano), NI-105.24B2 (humano) o Tan12 (anticuerpo monoclonal de ratón, Covance, California, EE. UU.), seguido de IgGFcy anti-humano de cabra conjugado con PRP (para anticuerpos humanos) o un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra conjugado con PRP.

50 Los anticuerpos recombinantes NI-105.4E4 y NI-105.24B2 reconocen hTau40 recombinante, así como PHFTau modificada patológicamente extraída de cerebros con EA en la inmunoelectrotransferencia Western. El anticuerpo de control Tau12 también reconoce ambas especies tau.

55 Adicionalmente, como se ha analizado en el Ejemplo 1 anterior, la concentración eficaz de media máxima (CE<sub>50</sub>) del anticuerpo NI-105.4A3 ejemplar se determinó en experimentos de ELISA directo usando PHFTau. NI-105.4A3 se une a PHFTau con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a CE<sub>50</sub> 1,2 nM.

#### Ejemplo 3

60 Mapeo del epítipo de unión a NI-105.4E4 y NI-105.4A3 en hTau40.

- Una matriz de péptidos de 118 secuencias de péptidos que cubre hTau40 de longitud completa (aminoácidos 1-441) con una superposición de 11 aminoácidos entre dos péptidos adyacentes se manchó en una membrana de nitrocelulosa (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania). La inmunomarcación de anticuerpos, así como la regeneración de membranas se realizó según las instrucciones del fabricante. Para descartar la unión no específica del anticuerpo de detección, la membrana se sondó primero por IgG anti-humana de cabra conjugada con PRP omitiendo el anticuerpo primario. Después de la regeneración la membrana se sondó con el anticuerpo NI-105.4E4 recombinante 100 nM. El anticuerpo unido se detectó usando ECL y detección ImageQuant 350 (GE Healthcare, Otelfingen, Suiza).
- 10 Dos grupos de manchas de péptidos adyacentes (péptido 83, 84 y 85; péptido 96 y 97) se identificaron específicamente por NI105.4E4 en comparación con el anticuerpo de detección solamente. Las secuencias cubiertas por estos dos grupos de péptidos corresponden a los aminoácidos 329-351 y 387-397 de hTau40. Estos datos sugieren que NI-105.4E4 reconoce un epítipo discontinuo que comprende dos secuencias lineales: uno en el dominio de unión a microtúbulos R4 y otro en el dominio C-terminal.
- 15 La secuencia compartida por los péptidos 83-85 comprende los residuos de aminoácidos 337-343 de hTau40. Los datos de Pepspot (JPT) sugieren que NI-105.4E4 reconoce un epítipo en hTau que comprende los aminoácidos 337-343 de tau humana. Esta región está ubicada dentro del dominio de unión a microtúbulos de tau y se conserva entre todas las isoformas de tau humanas neuronales, así como a través de otras especies que incluyen ratón y rata.
- 20 Como este dominio está unido a microtúbulos en tau asociada a microtúbulos fisiológicos, se espera que NI-105.4E4 se dirija preferiblemente al grupo patológicamente relevante de tau que se desprende de los microtúbulos.
- Para determinar los residuos clave dentro de los péptidos de unión a NI-105.4E4, el barrido de alanina se realizó para
- 25 sustituir cada residuo con alanina de uno en uno. Los residuos de alanina en la secuencia original (A384 y A390) se sustituyeron con prolina y glicina. Las manchas 35-50 y 51-68 son los péptidos originales (mancha 35 y mancha 51) y sus variantes sustituidas de alanina. El barrido de alanina sugiere que los residuos V339, E342, D387, E391 y K395 contribuyen a la unión de NI-105.4E4.
- 30 Se realizó un experimento adicional mediante la prueba de la unión de NI-105.4E4 a los péptidos tau. El análisis por ELISA directo muestra que NI-105.4E4 reconoce específicamente un péptido que corresponde a los aminoácidos 333-346 de hTau40, que contiene los residuos de aminoácidos 337-343 identificados por mapeo Pepspot. No se observó reactividad cruzada de NI-105.4E4 para el péptido de control que cubría el epítipo AT180. Por el contrario, AT180 reconoce su epítipo cognado que contiene péptido, pero no puede realizar la unión al péptido específico de NI-
- 35 105.4E4. Los anticuerpos secundarios específicos de especies no se unen a ninguno de los péptidos. Juntos, el análisis por ELISA directo y los péptidos recubiertos confirman que NI-105.4E4 reconoce específicamente un péptido que contiene los residuos de aminoácidos 337-343 de tau humana mediante mapeo Pepspot.
- Para mapear ampliamente el epítipo de unión de NI-105.4A3 en hTau40, se produjeron cuatro polipéptidos del
- 40 dominio tau (dominio Tau I, dominio II, dominio III y dominio IV). Los fragmentos de ADN, sintetizados usando GeneArt® (Invitrogen), que codifican cada dominio Tau con 6xHis etiquetada en el extremo N-terminal, se clonaron en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen), y se transfectoraron en E. Coli BL21 (DE3) (New England Biolabs). Las expresiones de los dominios Tau etiquetados con His se indujeron por IPTG 0,5 mM durante seis horas antes de que las bacterias se lisaran con lisozima con sonicación. El lisado se hirvió durante cinco minutos antes de purificarse
- 45 adicionalmente con Ni-NTA Superflow Columns (Qiagen). Los dominios Tau etiquetados con His se recubrieron en placas ELISA o se cargaron en gel de poliacrilamida para inmunoelectrotransferencia. Estos polipéptidos de dominio tau superpuestos cubren la longitud completa de hTau40. Los dominios tau purificados se recubrieron en una placa ELISA y se ensayó la unión de NI-105.4A3. NI-105.4A3 se une solamente al dominio tau I y hTau40 de longitud completa, indicando que el epítipo se encuentra dentro de la parte del extremo N-terminal de hTau40 (aa1-136). La
- 50 inmunoelectrotransferencia confirmó la unión específica de NI-105.4A3 al dominio 1 de tau. El mapeo de epítopos de NI-105.4A3 con la tecnología PepSpot (JPT) identificó aminoácidos Q35-Q49 de la Tau40 humana. Para determinar los residuos clave dentro del epítipo para la unión de NI-105.4A3, el barrido de alanina se realizó para sustituir cada residuo con alanina de uno en uno. El residuo de alanina en la secuencia original (A41) se sustituyó con glicina o prolina. El barrido de alanina mostró que D40, A41 y K44 son residuos clave para la unión de NI-105.4A3.
- 55
- Ejemplo 4
- Evaluación de la unión de NI-105.4E4 a las formas fisiológicas, así como los agregados de tau patológicos de tejidos de cerebro con EA y en ratones transgénicos con tau humana
- 60 Los ovillos neurofibrilares (ONF) compuestos por filamentos de tau hiperfosforilada son una característica neuropatológica de EA. Los filamentos de tau hiperfosforilada también son los componentes principales de las neuritas

distróficas e hilos del neurópilo, ambos de los cuales son características neuropatológicas comunes en EA. La sobreexpresión de tau humana que contiene la mutación de tau P301L familiar en ratones induce la formación de ONF a los seis meses de edad (Gotz y col., 2001a).

5 Para evaluar la unión del anticuerpo tau humano recombinante a las formas fisiológicas, así como agregados patológicos de tau, las tinciones inmunohistológicas se realizaron en tejidos de cerebro con EA y en ratones transgénicos con TauP301L con el anticuerpo NI-105.4E4 ejemplar.

Se perfundieron los ratones con 20 ml de TrisCl 100 mM/EGTA 6 mM (pH 7,4) a temperatura ambiente bajo anestesia profunda. Se recogieron los cerebros y se sumergieron en PFA al 4 % en PBS (pH 7,4) a 4 °C durante una noche para la fijación seguido de la inclusión en parafina. Para el tejido humano, la parafina bloquea los tejidos cerebrales de EA y se usaron sujetos de control sanos. La tinción DAB se realizó siguiendo protocolos estándar. Se usó como control positivo el anticuerpo monoclonal de ratón Tau-12 (Covance, California, EE. UU.). También se incluyeron anticuerpos de detección conjugados con PRP sin anticuerpos primarios.

15 El anticuerpo humano recombinante NI-105.4E4 identifica diversos ONF e hilos del neurópilo en un cerebro con EA (Figura 2A), que están ausentes en el cerebro de control sano (Figura 2B). El anticuerpo secundario por sí solo no da señales ni en el cerebro con EA (Figura 2C) ni en el cerebro de control (Figura 2D). En el cerebro de ratón transgénico con tau P301L, NI-105.4E4 se une fuertemente a la tau patológica similar a ONF (Figura, 2E, F y H), hilos del neurópilo (Figura 2E y G) y neuritas distróficas (Figura 2E y H). Además, NI-105.4E4 también identifica agregados de tau en la etapa pre-ovillo (Figura 2I). En el cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan tanto tau humana P301L como APP humana con mutaciones suecas y árticas, NI-105.4E4 se une específicamente a neuritas distróficas que rodean las placas beta-amiloide (Figura 2J).

25 Ejemplo 5

*Pruebas in vivo de los anticuerpos de la presente invención*

Tal como se describe anteriormente, estudios posteriores en líneas de ratones transgénicos usando vacunación activa con péptidos de tau fosforilada revelaron una reducción en los niveles cerebrales de agregados de tau en el cerebro y un avance más lento del deterioro de la conducta (Sigurdsson, J. *Alzheimers Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel y col., *Exp. Neurol.* 224 (2010), 472-485). Sin embargo, la vacunación activa puede no ser capaz de usarse particularmente en humanos dado que se espera que una fracción considerable de la población de edad avanzada no responda a la vacunación. Además, los efectos secundarios potenciales asociados a la respuesta inmunitaria dirigida a tau puede ser difícil de controlar. Se puede esperar razonablemente que las moléculas de unión a tau de la presente invención alcancen reducciones similares en niveles cerebrales de agregados de tau como se ha descrito anteriormente para anticuerpos de ratón, dadas sus especificidades de unión similares contra especies de tau patológica. Sin embargo, dado que la optimización evolutiva y la maduración de afinidad dentro de los anticuerpos del sistema inmunitario humano de la presente invención proporciona una herramienta terapéutica valiosa debido a que se aíslan de sujetos humanos sanos con altas probabilidades de perfiles de seguridad excelentes y falta de inmunogenicidad. La confirmación de estos efectos terapéuticos esperados se puede proporcionar mediante procedimientos de prueba tal como se describe en los experimentos mencionados anteriormente con los anticuerpos de ratón. En particular, los anticuerpos a identificar selectivamente se pueden aplicar en diversas vías posibles a los animales, tal como inyección de anticuerpo de forma intraperitoneal, inyección intracraneal, infusión intraventricular al cerebro y se pueden ensayar para determinar los efectos del tratamiento. Cualquiera de las posibilidades de aplicación mencionadas anteriormente también se puede usar antes de la inyección en el cerebro de preparaciones beta-amiloides en el cerebro de ratones transgénicos con tau para evaluar los efectos del tratamiento en patologías tau inducidas por beta-amiloide.

La evaluación de los efectos del tratamiento se puede realizar mediante procedimientos histoquímicos que comprenden la cuantificación de recuentos de células positivas a Gallyas, tinción total de tau humana, carga en el cerebro de tau fosforilada y/o determinación bioquímica de tau soluble e insoluble en el cerebro y niveles de fósforo-tau tras la extracción en serie del cerebro. Además, se pueden realizar pruebas del comportamiento de los ratones tratados, por ejemplo, por aversión condicionada al sabor, el condicionamiento del miedo contextual para una confirmación de los efectos terapéuticos de los anticuerpos de la presente invención (Pennanen, *Genes Brain Behav.* 5 (2006), 369-79, Pennanen *Neurobiol Dis.* 15 (2004), 500-9.)

Ejemplo 6

Quimerización de anticuerpos NI-105.4E4 y NI-105.4A3 con dominios constantes IgG2a de ratón.

60 Para generar anticuerpos con inmunogenicidad reducida para el uso en estudios del tratamiento crónico, se generaron versiones quiméricas de ratón de los anticuerpos NI-105.4E4 y NI-105.4A3 usando tecnología de ADN recombinante.

Se seleccionó un isotipo IgG2a/lambda de ratón para estos anticuerpos quiméricos, para poder generar una molécula que se uniera con afinidad elevada a receptores Fc-gamma de ratón y, por lo tanto, fue capaz de inducir una respuesta efectora inmunitaria. Las secuencias de aminoácidos de las construcciones de cadena ligera y pesada de NI-105.4E4 (ch4E4) y NI-105.4A3 quimérico (ch4A3) se muestran a continuación.

5

Tabla 5: Secuencias de aminoácidos de N1-105.4E4 quimérico (ch4E4) y NI-105.4A3 (ch4A3) quimérico

cadena pesada de ch4E4 maduro (IgG2a de ratón) SEQ ID NO: 20	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGKGLEWVGR IRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTV LSANYDTFDYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDKKEIPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPK IKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNHTTKSFSRTPG K
cadena ligera de ch4E4 maduro (lambda de ratón) SEQ ID NO: 21	SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAPVLIYKD TERPSGIPERFSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYCLSDNSATWVFGG GTKVTVLQPKSSPSVTLFPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWK VDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMASYLTLTARAWERHSSYSQCQVTHEG HTVEKLSLRADCS

Ejemplo 7

10

Eliminación del sitio de glicosilación enlazado a N de consenso de la cadena pesada ch4E4 (IgG2a de ratón)

Se identificó un sitio de glicosilación enlazado a N de consenso en la región CDR1 de la cadena pesada de NI-105.4E4. Tras la expresión celular de mamífero (CHO), el sitio de N-glicosilación predicho (Asn-30) se ocupó totalmente por glicano, como se demostró por espectrometría de masas. Para eliminar la N-glicosilación en esta región y reducir la heterogeneidad del producto, se cambió el Asn-30 de la cadena pesada de ch4E4 por Gln (Tabla 4). Cuando se produjo y se purificó de células CHO, el anticuerpo modificado se unió a tau recombinante con afinidad de unión aparente ~4 veces mayor con respecto al anticuerpo glicosilado original.

20

Tabla 6: Secuencias de aminoácidos de cadena pesada de ch4E4(N30Q) maduro (IgG2a de ratón). El residuo de Gln sustituido está en **negrita y subrayado**.

cadena pesada de ch4E4(N30Q) maduro	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFN <b><u>FQ</u></b> ISAIHWVRQASGKGLEWVGR IRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTV LSANYDTFDYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDKKEIPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPK
(IgG2a de ratón) SEQ ID NO: 22	IKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLP PPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNHTTKSFSRTPG K

Ejemplo 8

25

Producción de NI-105.4E4 (N30Q) quimérico aglicosilado (ch4E4(N30Q) mIgG1 Agli)

Se produjo una variante aglicosilada quimérica de ratón de NI-105.4E4 de línea germinal ("ch4E4(N30Q) IgG1-Agli") para evaluar la relación entre la actividad y la función efectora del anticuerpo. Para la cadena pesada (SEQ ID NO: 214), el dominio variable de NI-105.4E4(N30Q) (SEQ ID NO: 43) se fusionó a una región constante de cadena pesada de IgG1 de ratón que contenía una mutación de Asn a Gln para eliminar el sitio de glicosilación de Fc de consenso.

30

La región variable de la cadena pesada también contenía el cambio de N30Q para eliminar el sitio de N-glicosilación de consenso en CDR1 (Ejemplo 7). La cadena ligera era la cadena ligera de lambda ch4E4 descrita anteriormente. (SEQ ID 21).

## 5 Ejemplo 9

Estudio de penetración aguda en el cerebro de 4E4 y 4A3 humano

Se produjeron anticuerpos NI-105.4E4 y NI-105.4A3 humanos de línea germinal mediante transfección transitoria de células CHO y se purificaron mediante purificación por afinidad. Los niveles de endotoxina se controlaron y todos estaban por debajo de 1 EU/mg. A los ratones TauP301L se les inyectó de forma intraperitoneal 30 mg/kg de anticuerpo NI-105.4E4 (n=7), 4A3 (n=7) o igual volumen de PBS (n=7) en el día 1 y día 4. En el día 5 se perfundieron los ratones con anestesia con PBS que contenía 1 Unidad/ml de heparina. Se recogieron sangre, cerebro y médula espinal para el análisis. El hemisferio derecho del cerebro se congeló a -80 °C, el hemisferio izquierdo del cerebro y la médula espinal se fijaron después en formalina al 10 % neutralizada a 4 °C durante dos días antes de embeberse en un bloque de parafina y seccionarse. El plasma se almacenó a -80 °C en alícuotas.

Extracción de proteínas del cerebro: el hemisferio derecho congelado se pesó y se homogeneizó en 5 volúmenes (5 ml/g de tejido húmedo) de una solución que contenía NaCl 50 mM, dietilamina al 0,2 %, inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics GmbH) e inhibidor de fosfatasa (Roche Diagnostics GmbH). Las muestras se transfirieron a continuación a tubos de policarbonato y se añadieron otros 5 volúmenes de solución de homogeneización, y se mantuvieron en hielo durante 30 min. A continuación, la fracción soluble se recogió tras la centrifugación a 100.000 g, 4 °C durante 30 min. Esta fracción soluble se usó en el ensayo de IgG humana. El sedimento se suspendió de nuevo en 3 volúmenes de PBS con inhibidor de proteasa y fosfatasa. Después de la centrifugación a 16.000 g, 4 °C durante 30 min, los sobrenadantes y sedimentos se almacenaron por separado a -80 °C para la extracción de tau insoluble adicional. Los sedimentos se extrajeron además con extracción de sarcosilo modificado (Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. *Neuron* 8, 159 (1992)).

ELISA tipo sándwich específico de IgG humana: se usaron 2 µg/ml de Fab de IgG anti-humano de cabra (Jackson) en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato 50 mM (pH 9,6) como anticuerpo de captura. Las placas de microtitulación de 96 pocillos de área media se recubrieron con 30 µl/pocillo con anticuerpo de captura a 4 °C durante una noche. La placa se lavó a continuación 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % antes de la incubación con 50 µl/pocillo de PBS que contenía ASB al 2 % a temperatura ambiente durante una hora. Las fracciones solubles de extractos de cerebro, las muestras de plasma y anticuerpo estándar (4A3) se diluyeron en PBS que contenía ASB al 2 % y Tween 20 al 0,1 %. Se agregaron 30 µl de las muestras diluidas en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó a continuación con 200 µl/pocillo de PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % cuatro veces antes de incubarse con Fcy anti-humano de burro conjugado con PRP (Jackson, diluido a 1:10.000 en PBS que contenía ASB al 2 % y Tween 20 al 0,1 %) a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, la placa se lavó con 200 µl/pocillo de PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % cuatro veces antes de añadir 20 µl/pocillo de TMB (1:20 en una solución de citrato 10 mM a pH = 4,1). A continuación, la reacción se detuvo añadiendo 10 µl de H2SO4 1 M a cada pocillo. La curva estándar de anticuerpo se obtuvo a partir de diluciones en serie de NI-105.4A3. Las concentraciones de anticuerpo en muestras de plasma y cerebro se calcularon según los estándares. El nivel de IgG humana en el cerebro se convirtió a continuación en µg de anticuerpo/gramo de tejido cerebral fresco (suponiendo 1 g/10 ml) como se indica en la Figura 6.

Se detectaron niveles elevados de IgG humana en el plasma de todos los ratones tratados con NI-105.4E4 y NI-105.4A3. Por el contrario, no se detectó IgG humana en el plasma de los ratones tratados con PBS (Figura 5). La cantidad significativa de IgG humana se detectó en homogeneizados de cerebro de ratones tratados con 4E4 y 4A3 (Figura 6).

## 50 Ejemplo 10

Estudio crónico con NI-105.4E4 y NI-105.4A3 quimérico.

NI-105.4E4 y NI-105.4A3 quimérico que contenían los dominios variables del anticuerpo humano original y las regiones constantes de IgG2a de ratón se pueden producir por transfección transitoria de células CHO y purificarse por purificación por afinidad. Los niveles de endotoxina en cada lote de los anticuerpos se controlarán y mantendrán por debajo de 1 Eu/mg. A los ratones TauP301L equilibrados por sexo de 7,5-8 meses de edad se les inyectará por vía intraperitoneal 10 mg/kg, 3 mg/kg de solución de anticuerpo, o un volumen equivalente de PBS de control. Cada grupo de tratamiento tendrá 20-25 ratones. El tratamiento se realizará una vez a la semana durante 26 semanas. Como alternativa, el tratamiento se realizará dos veces a la semana durante 13 semanas. El peso corporal se controlará cada dos semanas. Los ratones se perfundirán con anestesia al final del período de tratamiento. Se recogerán cerebro,

médula espinal y sangre. La mitad del cerebro y la médula espinal pueden fijarse posteriormente en formalina al 10 % durante tres días antes de embeberse en el bloque de parafina. Se pueden utilizar secciones de 4-6 µm de espesor cortadas de estos bloques de tejido para estudios de inmunohistoquímica. La otra mitad del cerebro se pesará y se congelará a -80 °C para análisis bioquímicos.

5 Los efectos de los fármacos se evaluarán comparando el nivel de ovillos neurofibrilares (ONF) y el nivel de tau con características de solubilidad diferentes en muestras tratadas y de control. ONF se puede visualizar mediante impregnación de plata de Gallyas (F Gallyas Acta Morphol. Acad. Sci. Hung 19.1 (1971)), o mediante inmunotinción con anticuerpo de ratón monoclonal AT100 y AT180, que reconocen tau fosforilada patológicamente en ONF. La  
10 cantidad o frecuencia de neuronas positivas a Gallyas y/o neuronas etiquetadas AT100, AT180 en el cerebro y en la médula espinal en ratones tratados con el anticuerpo y animales de control, se puede determinar para evaluar el efecto del tratamiento con anticuerpos.

Se puede extraer tau soluble e insoluble siguiendo el protocolo de extracción de proteína del cerebro descrito en esta  
15 invención. Como alternativa, se puede extraer tau soluble e insoluble con extracción de sarcosilo modificado (Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Neuron 8, 159 (1992)). Brevemente, el cerebro congelado se homogeneiza en 10 volúmenes (p/vol) de 10 % de tampón homogeneizado de sacarosa que consiste en Tris•HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, AEBSF 1 mM, inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics GmbH) e inhibidor de fosfatasa (Roche Diagnostics GmbH). El homogeneizado se centrifugó durante 20 min a 20.000  
20 g, y se conservó el sobrenadante. El sedimento se homogeneizó en 10 volúmenes de tampón de homogeneización y se centrifugó una segunda vez. Los sobrenadantes se pueden agrupar, y se agrega N-lauril-sarcosinato (Sigma) a 1 % (p/vol) de concentración final, y se incubaron a 37 °C con 300 rpm de rotación durante 1,5 horas, seguido de centrifugación a 100.000 g durante 1 h. Se recogió el sobrenadante como fracción soluble de sarcosilo y el sedimento de 1 g de tejido cerebral se volvió a suspender en 0,2 ml de Tris•HCl 50 mM (pH 7,4) como fracción de FHA.

25 Los niveles de tau soluble e insoluble se medirán con kits de ELISA de tau comercialmente disponibles (Invitrogen). Además, los extractos de proteína de cerebro se separarán con SDS-PAGE Bis-Tris al 4-12 % seguido de inmunotransferencia con anticuerpos Tau12 (tau humana), AT8 (pS202/pT205), AT100 (pT212/pS214), AT180 (pT231) y E178 (pS396). Se realizará un análisis semicuantitativo midiendo la densidad integrada de cada muestra frente a  
30 estándares de cantidades conocidas de tau.

Adicionalmente, se pueden realizar pruebas conductuales como se indica en el Ejemplo 5 anterior. Por ejemplo, la mejora en la memoria funcional en ratones TauP301L tratados con anticuerpo se puede someter a ensayo usando una tarea de laberinto en Y en dos ensayos (por ejemplo, Pennanen, Genes Brain Behav. 5 (2006), 369-79). Los tres  
35 brazos del laberinto tienen 22 cm de largo, 5 cm de ancho y 15 cm de profundidad. Se colocan señales abstractivas de color blanco y negro en una cortina negra alrededor del laberinto. Los experimentos se realizan con un nivel de luz ambiente de 6 lux durante la fase oscura. Cada experimento comprende una sesión de entrenamiento y una sesión de observación. Durante la sesión de entrenamiento, se asigna un ratón a dos de los tres brazos (el brazo de partida y el segundo brazo), que se pueden explorar libremente durante 4 min, sin acceso al tercer brazo (el brazo nuevo). A  
40 continuación, se retira el ratón del laberinto y se mantiene en una jaula durante 1,5-5 min, mientras se limpia a fondo el laberinto con etanol al 70 % para eliminar cualquier señal olfativa. Después, se coloca de nuevo al ratón en el laberinto para la observación con los tres brazos accesibles durante 4 min. Se registra la secuencia de entradas, la cantidad de entradas a cada brazo y el tiempo transcurrido en cada brazo. A partir de esto, se calcula la relación del tiempo transcurrido en el tercer brazo nuevo con respecto al promedio del tiempo transcurrido en los otros dos brazos  
45 (brazo de partida y segundo brazo) y se compara en diferentes grupos de tratamiento en modelos de ratón con tauopatía y los correspondientes ratones de tipo silvestre de control. Los roedores prefieren normalmente investigar un nuevo brazo del laberinto antes que volver a uno que ya visitaron previamente. Los efectos de los anticuerpos se pueden controlar con respecto a recuperar esta preferencia por los ratones del modelo de tauopatía tratados en comparación con el comportamiento no discriminatorio de los ratones no tratados debido a su deterioro de la memoria  
50 funcional relacionada con un trastorno. Por lo tanto, una relación cercana a 1 indica una memoria funcional deteriorada. Una relación mayor indica una mejor memoria funcional. Se considera que la memoria funcional deteriorada en ratones TauP301L se debe a una patología de tau resultado de la sobreexpresión de tau humana. Por lo tanto, una relación observada en ratones TauP301L tratados con anticuerpo anti-tau significativamente mayor que en los ratones TauP301L de control indicará que el anticuerpo anti-tau tiene un efecto terapéutico en una patología tau.

55 Ejemplo 11

Identificación de anticuerpos anti-tau humanos

60 Los anticuerpos tau humanos recombinantes NI-105.17C1, NI-105.6C5, NI-105.29G10, NI-105.6L9, NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6E3, NI-105.22E1, NI-105.26B12, NI-105.12E12, NI-105.60E7, NI-105.14E2, NI-105.39E2, NI-105.19C6, y NI-105.9C4 se aislaron según los procedimientos descritos en esta invención. La especificidad diana y

de unión de estos anticuerpos anti-tau humanos se validaron tal como se describió anteriormente. Se proporciona un resumen de los hallazgos en la Tabla 5. Se modificaron las líneas germinales de todos los anticuerpos utilizados, excepto NI-105.17C1.

5

Tabla 7. Caracterización in vitro de anticuerpos anti-tau humanos.

Anticuerpo	ELISA CE <sub>50</sub> [nM]/rTau	ELISA CE <sub>50</sub> [nM]/PHFTau	Región de unión (hTau40)*	Fosforilación requerida**
NI-105.6C5	0,033	0,04	125-131	N.º
NI-105.17C1	3,3	4,7	397-441	N.º
NI-105.40E8	>100	0,133	226-244	Sí, pS235
NI-105.6E3	>100	18,7	SD	Sí
NI-105.29G10	3,8	5,3	217-227	N.º
NI-105.48E5	>500	13,2	37-55; 387-406	pS396, pS46 sin confirmar
NI-105.26B12	2,9	>90	421-427	SD
NI-105.6L9	2,5	>60	427-439	SD
NI-105.12E12	28,6	>150	1-158	SD
NI-105.60E7	0,18	-	197-207	La fosforilación en 198, 199, 202 o 205 interrumpe la unión
NI-105.14E2	0,65	-	57-67	N.º
NI-105.39E2	0,7	-	355-441	SD
NI-105.19C6	4,0	-	313-319	N.º
NI-105.22E1	1,1	>200	309-319	N.º
NI-105.9C4	5,2	-	221-231	pS231 interrumpe la unión

\*: la región de unión en hTau40 se identificó mediante estrategias combinadas de PepSPOT, inmunoelectrotransferencia de fragmentos de tau y ELISA, ELISA de péptidos de tau y barrido de alanina.  
 \*\*: Se verificó si la unión del anticuerpo requiere fosforilación en determinados aminoácidos en la proteína tau mediante la comparación de la unión del anticuerpo a rTau, PHFTau, PHFTau desfosforilada por fosfatasa del intestino del ternero, rTau fosforilada in vitro por GSK3β o GSK3β/CDK5/p35 y péptidos de tau fosforilada en PepSPOT y ELISA directo.

Ejemplo 12

10 Quimerización de anticuerpos humanos con dominios constantes IgG2a de ratón.

Para generar anticuerpos con inmunogenicidad reducida para el uso en estudios del tratamiento crónico, se generaron versiones quiméricas de ratón de los anticuerpos NI-105.17C1 ("ch17C1"), NI-105.6C5 ("ch6C5"), NI-105.40E8 ("ch40E8"), y NI-105.6E3 ("eh6E3") usando tecnología de ADN recombinante. Se seleccionó un isotipo IgG2a/lambda de ratón para estos anticuerpos quiméricos, para poder generar una molécula que se uniera con afinidad elevada a receptores Fc-gamma de ratón y, por lo tanto, fue capaz de inducir una respuesta efectora inmunitaria. Las secuencias de aminoácidos de las construcciones de cadena ligera y pesada de ch17C1, ch6C5, ch40E8, ch40E8(R104W), y ch6E3 se muestran a continuación.

15

cadena pesada de ch17C1 (IgG2a de ratón)	SEQ ID NO:203
cadena ligera de ch17C1 (lambda de ratón).	SEQ ID NO:204
cadena pesada de ch6C5 (IgG2a de ratón)	SEQ ID NO:205
cadena ligera de ch6C5 (lambda de ratón)	SEQ ID NO:206

cadena pesada de ch40E8 (IgG2a de ratón)	SEQ ID NO:207
cadena pesada de ch40E8(R104W) (IgG2a de ratón)	SEQ ID NO:208
cadena ligera de ch40E8 (lambda)	SEQ ID NO:209
cadena pesada de ch6E3 (IgG2a de ratón)	SEQ ID NO:210
cadena ligera de ch6E3 (kappa de ratón)	SEQ ID NO:211

Ejemplo 13

5 Eliminación del sitio de glicosilación de CDR en la cadena ligera de NI-105.17C1.

Se identificó un sitio de glicosilación enlazado a N de consenso en la región CDR1 de la cadena ligera de NI-105.17C1. Tras la expresión celular de mamífero (CHO), el sitio de N-glicosilación predicho (Asn-31) se ocupó totalmente por glicano, como se demostró por espectrometría de masas. Para eliminar la N-glicosilación en esta región y reducir la heterogeneidad del producto, se cambió el Asn-31 de la cadena ligera de ch17C1 por Gln (véase la secuencia a continuación). Cuando se produce y purifica a partir de células CHO, el anticuerpo modificado (ch17C1(N31Q) mlgG2a) se unió a tau recombinante con afinidad de unión similar aparente con respecto al anticuerpo glicosilado original (véase la Figura 8A). La región variable de la cadena ligera de NI-105.17C1(N31Q) comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:221.

15

cadena ligera de ch17C1(N31Q) (lambda de ratón)	SEQ ID NO:212
VL de NI-105.17C1(N31Q) humano	SEQ ID NO:221

Ejemplo 14

20 Producción de anticuerpos con función efectora reducida.

Se generaron mutaciones que contenían variantes de anticuerpos dentro del sitio de N-glicosilación de consenso en el dominio Fc de cadena pesada. Estas variantes, designadas "Agli", se diseñaron para generar anticuerpos anti-tau con función efectora inmunitaria reducida. Las secuencias de aminoácidos de variantes de Agli de los anticuerpos de tau se proporcionan a continuación.

25

cadena pesada de ch4A3-mlgG1-Agli	SEQ ID NO:213
cadena pesada de ch4E4(N30Q)-mlgG1-Agli	SEQ ID NO:214
cadena pesada de ch6C5-mlgG1-Agli	SEQ ID NO:215
cadena pesada de ch17C1-mlgG1-Agli	SEQ ID NO:216

Ejemplo 15

30 Comparación de la actividad de unión de ch17C1-mlgG2a y ch17C1-mlgG1-Agli.

Se evaluó la relación entre la actividad y la función efectora del anticuerpo para ch17C1 Agli (Figura 8A). El anticuerpo ch17C1 comprendía la cadena pesada de ch17C1 (SEQ ID NO:203) y la cadena ligera de ch17C1 (SEQ ID NO:204). El anticuerpo ch17C1(N31Q) mlgG2a comprendía la cadena pesada de ch17C1 (SEQ ID NO:203) y la cadena ligera de ch17C1(N31Q) (SEQ ID NO:212), que incorpora la mutación N31Q en CDR1 para eliminar el sitio de glicosilación de CDR. El anticuerpo ch17C1(N31Q) mlgG1 Agli comprendía la cadena pesada de ch17C1-mlgG1-Agli (SEQ ID NO:216), donde los dominios variables de 17C1 se fusionaron a una cadena pesada de IgG1 de ratón que contenía una mutación Asn a Gln en la posición 294 (residuo 297 de Kabat) para eliminar el sitio de glicosilación de Fc de consenso y la cadena ligera de ch17C1(N31Q) (SEQ ID NO:212). Cuando se produce y purifica a partir de células CHO, ch17C1(N31Q) mlgG1 Agli se unió a tau recombinante con afinidad de unión similar aparente con respecto al anticuerpo glicosilado original (véase la Figura 8A).

40

Ejemplo 16

45 Comparación de valina vs. isoleucina en la posición 48 de la cadena ligera de 17C1.

En el proceso de generación de la versión de IgG2a quimérico de ratón de anticuerpo NI-105.17C1 modificado de línea germinal, el residuo 48 de la cadena ligera también se cambió de valina a isoleucina. Para confirmar que esta sustitución no afectó la afinidad de unión de NI-105.17C1, se preparó una versión de IgG2a quimérico de ratón de NI-105.17C1 con valina en la posición 48. Cuando se produce y purifica a partir de células CHO, el anticuerpo ch17C1(N31Q, I48V) mIgG2a se unió a tau recombinante con afinidad de unión similar aparente con respecto al ch17C1(N31Q) mIgG2a (véase la Figura 8B). El anticuerpo ch17C1 (N31Q) mIgG2a comprendía la cadena pesada de ch17C1 (SEQ ID NO:203), y la cadena ligera de ch17C1 (N31Q, I48V) (SEQ ID NO:217).

cadena ligera de ch17C1(N31Q, I48V) (lambda de ratón)	SEQ ID NO:217
VL de NI-105.17C1(N31Q, I48V) humano	SEQ ID NO:222

10

Ejemplo 17

Comparación de Arg vs. Trp en la posición 104 de NI-105.40E8.

15 El anticuerpo NI-105.40E8, que es selectivo para la forma fosforilada de tau que se encuentra en los filamentos helicoidales apareados (FHA) humanos contiene un residuo de arginina inusual en la posición 104 de la VH de NI-105.40E8. Normalmente, esta posición dentro del repertorio de inmunoglobulina humano está ocupada por un residuo de triptófano. Se generó una forma de la cadena pesada de NI-105.40E8, NI-105.40E8(R104W)-hlgG1, en la cual el residuo Arg104 se reemplazó con triptófano. Cuando se produce y purifica a partir de células CHO, el anticuerpo NI-105.40E8(R104W)-hlgG1 se unió a tau de FHA con afinidad de unión similar aparente con respecto al NI-105.40E8-hlgG1 (véase la Figura 9). La cadena ligera de los dos anticuerpos era idéntica.

20

NI-105.40E8(R104W)-hlgG1 humano, cadena pesada	SEQ ID NO:218
cadena ligera de NI-105.40E8 humano (lambda humana)	SEQ ID NO:219
VH de NI-105.40E8(R104W) humano	SEQ ID NO:220

25 Ejemplo 18

Los anticuerpos anti-tau humanos se unen a tau agregada patológicamente en el cerebro con EA y en el cerebro del modelo de tauopatía de ratones transgénicos.

30 Las muestras de tejido cerebral obtenidas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y de control, así como del cerebro de ratones transgénicos de tauopatía y de control de tipo silvestre se tiñeron con los anticuerpos anti-tau humanos modificados de línea germinal proporcionados en esta invención. Imágenes representativas de anticuerpos anti-tau NI-105.40E8, NI-105.48E5, NI-105.6C5 y NI-105.17C1 humanos modificados de línea germinal que se unen a agregados de tau patológicos en el cerebro con enfermedad de Alzheimer (EA) y en el cerebro de ratones transgénicos de tauopatía (Tg) se muestran en la Figura 10. Ninguno de estos anticuerpos se une a tau normal en sujetos mentalmente sanos (Ctr) o el cerebro de ratones de tipo salvaje (ts). Los diferentes patrones entre estos anticuerpos reflejaron sus diferencias en la especificidad de los epítomos y la afinidad de unión.

35

Ejemplo 19

40

Penetración cerebral de anticuerpos en ratones TauP301L.

Se produjeron anticuerpos anti-tau NI-105.6C5, NI-105.40E8 y NI-105.6E3 mediante transfección transitoria de células CHO y se purificaron usando procedimientos estándares. Se usó un anticuerpo humanizado sin reactividad cruzada a antígenos de ratones como un control de isotipo (hlgG1). En el primer experimento, la mitad de los anticuerpos inyectados NI-105.6C5, NI-105.6E3 y hlgG1 se marcaron con Cy3 (GE Healthcare, PA13105) con una relación aproximada de anticuerpo: Cy3 de 1:3. El etiquetado Cy3 no cambió la unión del anticuerpo según lo confirmado por ELISA y la inmunotinción con cerebro con TauP301L (datos no mostrados). En el segundo experimento, se usaron anticuerpos anti-tau NI-105.6C5 y NI-105.40E8 sin etiquetar.

50

Los ratones TauP301L de entre 18-22 meses de edad recibieron dos dosis de 30 mg/kg de NI-105.6C5, NI-105.6E3 o hlgG1 de control de isotipo de IgG1 humano mediante inyección i.p. dentro de los siete días. Las muestras de tejido se recogieron de tres ratones de cada grupo tratado en momentos de un día, ocho días y 22 días después de la administración de la segunda dosis. En el segundo experimento, a los ratones TauP301L se les inyectó i.p. 30 mg/kg

de h40E8 y h6C5 dos veces dentro de los siete días y se recogieron muestras de tejido de dichos ratones un día después de la segunda inyección.

5 Para la recogida de la muestra de tejido, los ratones se anestesiaron profundamente con ketamina/xilazina antes de que se extrajera la sangre a través del atrio derecho. Luego se recolectó LCR mediante punción de la cisterna magna. Posteriormente se recogió el cerebro y la médula espinal después de la perfusión durante 2 min con PBS congelado, que contenía 10 UI/ml de heparina y cinco minutos con formalina neutralizada al 10 % a través del ventrículo izquierdo. El cerebro se fijó en formalina neutralizada al 10 % durante otras 3 h a 4 °C, seguido de la inmersión en sacarosa al 10 % durante 48 h. A continuación, se congeló el cerebro en hielo seco y posteriormente se seccionó en una serie de secciones coronales de 30 µm de espesor. La serie de secciones se almacenó a -20 °C en una solución anticongelante que contenía glucosa 1 M, etilenglicol al 37,5 % en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, con azida de sodio al 0,025 % antes del uso. La médula espinal se fijó posteriormente en formalina neutralizada al 10 % durante dos días y se embebió en bloques de parafina.

15 Inmunohistoquímica: Las secciones coronales de 30 µm de espesor se sondaron con IgG (H+L) anti-humano de burro biotinilado mediante tinción de flotación libre. Las secciones de flotación libre se lavaron en Tris-Triton pH 7,4 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,05 %), se incubaron en PBS de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1 % durante 30 min y se incubaron con una solución de bloqueo que contenía suero de cabra y caballo normal al 2 % en Tris-Triton con Triton X-100 al 0,2 % adicional durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las secciones con IgG (H+L) anti-humano de burro biotinilado (Jackson ImmunoResearch Labs, 709-065-149) a 1:200 en solución de bloqueo durante 16 h a 4 °C con agitación a 100 rpm para detectar IgG de humano neuronal. El anticuerpo biotinilado unido a tejidos se visualizó mediante la reacción cromogénica de peroxidasa usando el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, PK6100, 1:100). La reacción enzimática se detuvo con PBS congelada y las secciones se lavaron en PBS 3 veces. A continuación, las secciones se colocaron en portaobjetos de vidrio y se secaron al aire durante la noche antes de que se contratiñeran con solución de hemalum para visualizar los núcleos (Carl Roth GmbH + Co., T865.1). Después de las etapas de deshidratación, los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos antes de escanearse con el sistema de microscopio virtual Olympus dotSlide 2.1.

30 Se detectaron anticuerpos humanos en los cerebros de ratones TauP301L, los cuales habían recibido anticuerpos anti-tau humanos o anticuerpo de control hIgG1 mediante inyección i.p., pero no en ratones TauP301L y de tipo silvestre sin tratamiento con anticuerpos (figura 11). Sin embargo, se observó tinción neuronal únicamente en los hipocampos de ratones tratados con anticuerpos anti-tau NI-105.6C5, NI-105.6E3 y NI-105.40E8, pero no en ratones tratados con hIgG1. La tinción neuronal con anticuerpos anti-tau fue fácilmente detectable un día después de la inyección, de manera menos pronunciada a los ocho días posteriores a la inyección y fue indetectable a los 22 días posteriores a la inyección (no se muestran los datos). Los ratones TauP301L producen altos niveles de tau humana transgénica en la formación hipocámpal y el hipocampo es una de las primeras regiones en desarrollar ovillos neurofibrilares. De este modo, los anticuerpos anti-tau inyectados periféricamente no solo se introdujeron en el cerebro, sino que también probablemente se introdujeron en neuronas que contenían altos niveles de tau.

#### 40 Ejemplo 20

Efectos de tratamiento crónico de ratones TauP301L con ch4E4(N30Q) y ch17C1(N31Q).

45 Animales y tratamientos con anticuerpos: El NI-105.4E4(N30Q) ("ch4E4(N30Q)") quimérico y NI-105.17C1(N31Q) ("ch17C1(N31Q)") quimérico que contienen dominios variables del anticuerpo humano y las regiones constantes de IgG2a de ratón se produjeron mediante transfección transitoria de células CHO y se purificaron mediante procedimientos estándares.

50 A los ratones TauP301L equilibrados por género a las edades de 7,5-8 meses se les administró semanalmente 10 mg/kg de ch17C1(N31Q) (n=20), 10 mg/kg de ch4E4(N30Q) (n=20) o un volumen igual de PBS (n=20) mediante inyección intraperitoneal. El peso corporal se controló cada dos semanas. No se observó una pérdida de peso significativa. Dos ratones del grupo de PBS y un ratón del grupo tratado con ch17C1(N31Q) murieron prematuramente. Los ratones se anestesiaron un día después del 25° tratamiento para la recolección de tejido. La sangre se extrajo a través del seno orbital. Posteriormente se recolectó el cerebro y la médula espinal después de la perfusión durante 2 min con PBS congelada, que contenía 10 UI/ml de heparina a través del ventrículo izquierdo. A continuación, la mitad izquierda del cerebro se pesó, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C antes del uso. La mitad derecha del cerebro y la médula espinal se fijaron posteriormente en formalina al 10 % neutralizada a 4 °C durante dos días seguido de almacenamiento adicional en PBS antes de procesarse para obtener bloques de médula espinal y cerebro embebidos en parafina.

60

Extracción de proteína cerebral: Posteriormente se extrajo la proteína cerebral en función de la solubilidad. En primer lugar, se homogeneizó la mitad izquierda del cerebro en 10 veces el p/v de NaCl 50 mM que contenía dietilamina al

0,2 %, 1X inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics GmbH) y 1X inhibidor de fosfatasa (Roche Diagnostics GmbH). Después de 30 min de incubación en hielo, el homogeneizado se centrifugó a 100.000 g a 4 °C durante 30 min. Posteriormente, se recolectó el sobrenadante y se definió como la fracción soluble. El sedimento restante se homogeneizó en 12 veces el p/v de tampón de lisis de sacarosa al 10 % que contenía Tris 7,4 10 mM, NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM, 1X inhibidor de fosfatasa, 1X inhibidor de proteasa, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM y AEBSF 1mM. Después de 30 min de incubación en hielo, el homogeneizado se centrifugó a 20.500 g a 4 °C durante 20 min. Se recolectó cuidadosamente el 95 % del sobrenadante para la extracción de sarcosilo. El sedimento se almacenó a -80 °C. Se añadió N-lauril-sarcosinato al sobrenadante (1 % (p/v) de concentración final). Después de 1 h de incubación a 37 °C con agitación a 220 rpm, la solución se centrifugó a 100.000 g a 4 °C durante una hora. El sobrenadante se recolectó y se definió como la fracción soluble en sarcosilo. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min, a continuación se disolvió en Tris 50 mM pH 7,4 (20 % v/p de peso cerebral inicial) y se definió como la fracción insoluble de FHA, que se almacenó a -80 °C hasta el uso.

Mediciones de ELISA: Se cuantificó tau fosforilada y tau total humana en tres fracciones de proteína cerebral con kits de ELISA comerciales (Life Technologies) siguiendo el protocolo del fabricante. Se detectó la tau humana total, tau humana fosforilada en treonina 231 (tau de pT231), tau humana fosforilada en serina 199 (tau de pS199) y tau humana fosforilada en treonina 181 (tau de pT181). Las muestras de la fracción soluble se estandarizaron a 1 mg/ml en función del contenido de proteína total medido con el ensayo de proteínas BCA (Pierce) con Tris 50 mM pH 7.4. Se prepararon alícuotas de las muestras estandarizadas para las mediciones de ELISA y la inmunoelectrotransferencia. Para preparar una fracción insoluble de FHA solubilizados para ELISA, se incubaron 10 µl de PHFTau con 10 µl de clorhidrato de guanidina 8 M a temperatura ambiente durante una hora seguido de la adición de 180 µl de Tris 7,4 50 mM. Las mediciones de ELISA se llevaron a cabo siguiendo los protocolos estándares. Los niveles de tau en cada muestra medidos por ELISA se normalizaron al peso cerebral inicial para el análisis final.

Los niveles de fármaco en plasma de valores extremos se midieron usando un ELISA tipo sándwich. En resumen, se incubaron 3 µg/ml de rTau (rPeptide) (SEQ ID NO:6) en tampón de recubrimiento de ELISA con carbonato 100 nM (pH 9,6) en placas de ELISA de área media Costar a 4 °C durante la noche. Las placas se bloquearon con ASB al 3 % en PBS a temperatura ambiente durante una hora. Las muestras de plasma se diluyeron en ASB al 3 % en PBS que contenía Tween@20 al 0,1 % a 1:200, 1:400 y 1:800. Se usaron diluciones en serie de ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) para generar curvas estándares. Después de una hora de incubación, las placas se lavaron 4 veces con PBS que contenía Tween@20 al 0,1 % seguido de una hora de incubación con IgGFcy anti-ratón de burro PRP (1:10 000). Después del lavado, el anticuerpo unido se determinó además mediante un ensayo colorimétrico estándar. Las curvas estándares se generaron mediante un ajuste de curva sigmoidea con GraphPad Prism 5.

Inmunoelectrotransferencia: Se calentaron muestras de proteínas de las tres fracciones a 70 °C durante 10 min en 4X tampón de muestra de LDS NuPAGE® (Life Technologies) y una cantidad igual de proteína total de cada muestra se sometió a electroforesis en 4-12 % (p/v) de gel NuPAGE®. Después de una transferencia semiseca de proteína a la membrana de PVDF, la membrana se bloqueó en ASB al 3 % que contenía Tween-20 al 0,1 % en TBS y posteriormente se sondeó con anticuerpos anti-tau diferentes a 4 °C durante la noche. A continuación, los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h seguido de 4 lavados con TBST. Posteriormente, los anticuerpos unidos se detectaron mediante quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Pierce). Se realizó un análisis densitométrico de inmunoelectrotransferencias con el programa ImageJ de los Institutos Nacionales de Salud.

Laberinto en Y de dos ensayos: Se analizaron ratones en busca de memoria espacial de corto plazo usando una prueba de laberinto en Y de dos ensayos. Los brazos del laberinto tenían 35 cm de largo, 5 cm de ancho y 10 cm de profundidad. Se colocaron señales abstractivas en la cortina que rodeaba al laberinto. Los experimentos se llevaron a cabo con un nivel de luz ambiente de 6 lux. Durante la fase de exposición, se asignaron ratones a dos brazos (el brazo de partida y un brazo distinto), que se pueden explorar con libertad durante 4 min, sin acceso al tercer brazo (brazo nuevo), bloqueado mediante una puerta hecha del mismo material que el laberinto. A continuación, se sacaron a los ratones del laberinto y se mantuvieron en la jaula de retención durante 2 min, cuando se limpió el laberinto con etanol al 50 %. Durante la fase de prueba, los ratones se colocaron al final del brazo de partida y se les dejó explorar con libertad los tres brazos durante 4 min. La fase de prueba se registró con el software TSE videoMot2 para el seguimiento por vídeo y el análisis del comportamiento animal (TSE Systems, Bad Homburg, Alemania). Se registró la cantidad de entradas en el brazo y de tiempo transcurrido en el brazo nuevo. Se calculó el promedio de cantidad de entradas en el brazo y de tiempo transcurrido en los otros dos brazos que estaban abiertos durante la sesión de entrenamiento. Se calculó una relación entre la cantidad de entradas en los brazos (o tiempo transcurrido en) el nuevo brazo y el promedio de los otros dos brazos. Los animales de control de tipo silvestre que no tienen un déficit en la memoria de funcionamiento espacial tendrán normalmente una relación entre 1,5 y 2 en esta prueba. Pennanen y col., Genes Brain Behav 5(5):369-79 (2006).

Análisis de datos: Los datos de ELISA se transformaron logarítmicamente para cumplir el presupuesto de normalidad

para los análisis de varianza de dos vías. La diferencia se consideró significativa cuando  $p < 0,05$ .

Tau humana soluble con ch4E4(N30Q) significativamente reducida en ratones TauP301L: Los niveles de tau humana en las fracciones solubles en DEA, solubles en sarcosilo e insolubles de los extractos de proteína cerebral se cuantificaron mediante ELISA. La mayoría de la tau humana se encontró en la fracción soluble en DEA (no se muestran los datos). La tau humana total (hTau) se redujo en la fracción soluble en DEA de ratones tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) en comparación con los ratones tratados con PBS (29 % de reducción en promedio en ch17C1(N31Q) y 37 % en ch4E4(N30Q), figura 12A). También se observaron reducciones en tau fosforilada (pT231, pS199 y pT181) en la fracción soluble en DEA (figura 12B, C y D respectivamente). Previamente se ha observado una expresión de tau humana inferior en ratones TauP301L hembra que en sus contrapartes macho. Por lo tanto, para analizar con precisión los datos se usó ANOVA de dos vías con el género y el tratamiento como las dos variables. Se confirmó un efecto de género con un  $p < 0,01$  en todas las mediciones de tau humana soluble (tau humana total, tau humana pS199, pT181 y pT231). No existe interacción entre género y tratamiento ( $0,49 < p < 0,91$  en todas las mediciones de tau humana soluble). De manera importante, hubo un efecto de tratamiento significativo en tau humana soluble en DEA ( $p < 0,05$  para hTau, pS199 y pT231 y  $p = 0,06$  para pT181). El efecto de tratamiento fue impulsado de manera predominante por ch4E4(N30Q). En comparación con el control de PBS, ch4E4(N30Q) redujo significativamente la hTau ( $p < 0,05$ ), pS199 ( $p < 0,01$ ), pT231 ( $p < 0,01$ ) y pT181 ( $p < 0,05$ ). Las mediciones de ELISA que usaron la fracción insoluble en sarcosilo mostraron una alta variabilidad entre los animales, y no se observó ningún efecto de género significativo. No se observó ningún efecto de tratamiento significativo en la fracción insoluble en sarcosilo. De manera similar, no se observó ningún efecto de tratamiento significativo mediante ELISA en la fracción insoluble en sarcosilo.

Las inmunoelectrotransferencias que usaron el anticuerpo Tau12 monoclonal específico de tau humana mostraron tau humana de longitud completa, como una única banda en 62 kDa, como el mayor componente inmunorreactivo de tau en la fracción soluble en DEA. Se observó una clara reducción de la tau humana de longitud completa en la mayoría de los ratones tratados con ch4E4(N30Q) y ch17C1(N31Q). En la fracción insoluble en sarcosilo, se observó una banda de 64 kDa y varias otras bandas de peso molecular más alto, así como bandas de peso molecular más pequeño correspondiente presuntamente a fragmentos de tau humana. El análisis densitométrico mostró un alto grado de variabilidad entre los animales individuales, lo que evitó toda comparación cuantitativa. Sin embargo, hubo una reducción cualitativa general en todas las proteínas tau humanas en la fracción insoluble en sarcosilo detectada por Tau12 en ratones tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) (la inmunoelectrotransferencia representativa se muestra en la figura 13).

Niveles de fármaco en plasma: Los ratones se trataron con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) en 10 mg/kg semanalmente mediante inyección i.p. Para evaluar la exposición al fármaco, se recolectaron muestras de plasma 24 h después del último tratamiento. Los niveles de fármaco en plasma se midieron con ELISA usando rTau como agente de captura. Los niveles en plasma promedio de ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) fueron de 200  $\mu\text{g/ml}$  y 145  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, lo que sugiere que ambos anticuerpos tuvieron una buena exposición a la sangre (figura 14).

Tratamiento con anticuerpos y memoria espacial: Un estudio previo sugirió déficits en la memoria de referencia espacial, que depende del hipocampo, en ratones TauP301L (Pennanen y col., *Genes Brain Behav* 5(5):369-79 (2006)). Se notificó que el laberinto en Y de dos ensayos es una prueba sensible para detectar déficits en la memoria espacial de corto plazo en ratones transgénicos tau (Troquier y col., *Curr Alzheimer Res.* 9(4):397-405 (2012)). Durante la fase de exposición, todos los grupos exploraron el laberinto de la misma manera, pasando una cantidad de tiempo similar en cada brazo disponible (no se muestran los datos). No se encontraron diferencias en cuanto a la comparación de la distancia recorrida. Durante la fase de prueba, los ratones TauP301L tratados con PBS realizan casi la misma cantidad de entradas en el brazo nuevo que el promedio de los otros dos brazos explorados durante la fase de exposición (relación=1,18), lo que sugiere una memoria de funcionamiento espacial pobre en ratones TauP301L tratados con PBS. Tanto los ratones tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) mostraron una preferencia para el nuevo brazo en relación con los otros dos brazos y realizaron más visitas al brazo nuevo que el promedio de los otros dos brazos (relación=1,50 para ch17C1(N31Q) y 1,30 para ch4E4(N30Q)). La relación de la entrada en el brazo nuevo en ratones TauP301L tratados con ch17C1(N31Q) y ch4E4(N30Q) en comparación con la del grupo tratado con PBS se muestra en la figura 15.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Biogen Idec MA Inc. Biogen Idec International Neuroscience GmbH Weinreb, Paul H. Chen, Feng Garber, Ellen A. Grimm, Jan Montrasio, Fabio

5

<120> ANTICUERPOS ANTI-TAU HUMANOS

<130> 2159.404PC01

10 <140> A asignar

<141> Con la presente

<150> 61/745.410

<151> 21-12-2012

15

<160> 224

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1) ..(352)

<223> Isoforma de Fetal-Tau

30

<300>

<301> Goedert M., Wischik C., Crowther R., Walker J., Klug A.

<302> Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau.<303> Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.<304> 85<306>4051-

35 4055<307> 1988-06-01

<300>

<308> P10636-2

<309> 05-10-2010

40 <313> (1) .. (352)

<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 Ala Glu Glu Ala  
35 40 45

45

ES 2 816 700 T3

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val  
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro  
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg  
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly  
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser  
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro  
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys  
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met  
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu  
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val  
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His  
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp  
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr  
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr  
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val

ES 2 816 700 T3

290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser  
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu  
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
340 345 350

<210> 2

<211> 381

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

10 <222> (1) ..(381)

<223> Isoforma de Tau-B

<300>

<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.

15 <302> Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease

<303> Neuron

<304> 3

<306> 519-526

20 <307> 1989-10-01

<300>

<308> P10636-4

<309> 05-10-2010

25 <313> (1) .. (381)

<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 Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly  
65 70 75 80

30

ES 2 816 700 T3

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala  
 85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys  
 100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala  
 115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala  
 130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro  
 145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr  
 165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Thr Arg  
 180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser  
 195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu  
 210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln  
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser  
 245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro  
 260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp  
 275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro  
 290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu  
 305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser  
 325 330 335

ES 2 816 700 T3

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser  
 340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
 355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 370 375 380

<210> 3

<211> 410

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1) ..(410)

<223> Isoforma de Tau-C

<300>

<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.

15 <302> Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.

<303> Neuron

<304> 3

<306> 519-526

20 <307> 01-10-1989

<300>

<308> P10636-5

<309> 05-10-2010

25 <313> (1) .. (410)

<400> 3

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

30

ES 2 816 700 T3

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  
 165 170 175  
 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 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr  
 275 280 285  
 Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly  
 290 295 300  
 Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly  
 325 330 335

ES 2 816 700 T3

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys  
 340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val  
 355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly  
 370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu  
 385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 405 410

<210> 4

<211> 383

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDO

10 <222> (1) ..(383)

<223> Isoforma de Tau-D

<300>

<301> Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.-C., Ulrich J., Crowther R.A.

15 <302> Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain.

<303> EMBO J.

<304> 8

<306> 393-399

20 <307> 01-02-1989

<300>

<308> P10636-6

<309> 05-10-2010

25 <313> (1) .. (383)

<400> 4

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 Ala Glu Glu Ala  
 35 40 45

30

ES 2 816 700 T3

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val  
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp  
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro  
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg  
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly  
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser  
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro  
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys  
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met  
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu  
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu  
210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys  
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp  
245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His  
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe  
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His  
290 295 300

ES 2 816 700 T3

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe  
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr  
325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn  
340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala  
355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
370 375 380

<210> 5

<211> 412

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1) ..(412)

<223> Isoforma de Tau-E

<300>

<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.

15 <302> Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.

<303> Neuron

<304> 3

<306> 519-526

20 <307> 01-10-1989

<300>

<308> P10636-7

<309> 05-10-2010

25 <313> (1) .. (412)

<400> 5

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

30



ES 2 816 700 T3

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg  
305 310 315 320

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly  
325 330 335

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn  
340 345 350

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro  
355 360 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser  
370 375 380

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala  
385 390 395 400

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
405 410

<210> 6

<211> 441

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

10 <222> (1) ..(441)

<223> Isoforma de Tau-F

<300>

<301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A.

15 <302> Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.

<303> Neuron

<304> 3

<306> 519-526

20 <307> 01-10-1989

<300>

<308> P10636-8

<309> 05-10-2010

25 <313> (1) .. (441)

<400> 6

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

30

ES 2 816 700 T3

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  
 165 170 175

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

ES 2 816 700 T3

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 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

<210> 7  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Epítopo reconocido por el anticuerpo NI-105.4E4

10 <220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1) .. (7)  
 <223> Epítopo de NI-105.4E4

15 <400> 7

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys  
 1 5

20 <210> 8  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <220>

ES 2 816 700 T3

<221> CDS  
 <222> (1) .. (363)  
 <223> secuencia variable de la cadena pesada (VH) de NI-105.4E4-VH

5 <220>  
 <221> región V  
 <222> (91) .. (105)  
 <223> CDR1 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

10 <220>  
 <221> región V  
 <222> (148) .. (204)  
 <223> CDR2 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

15 <220>  
 <221> región V  
 <222> (301) .. (330)  
 <223> CDR3 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

20 <400> 8

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg gga Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	48
tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc aat ttc aac atc tct Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser 20 25 30	96
gct ata cac tgg gtc cgc cag gct tcc ggg aaa ggg ctg gag tgg gtt Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45	144
ggc cga ata aga agt aaa tct cac aat tac gcg act tta tat gct gcg Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala 50 55 60	192
tcc ctg aaa ggc cgg ttc acc ctc tcc aga gat gat tca agg aac acg Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr 65 70 75 80	240
gcg tat ctg caa atg agc agc ctg caa acc gag gat atg gcc gtc tat Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr 85 90 95	288
tac tgt act gtt ctg agt gcg aat tac gac acc ttt gac tac tgg ggc Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly 100 105 110	336
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120	363

<210> 9  
 25 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 30

ES 2 816 700 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser  
 20 25 30  
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 10

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (321)

<223> secuencia variable de la cadena ligera (VL) de NI-105.4E4-VL donde la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Glu en las posiciones 1-3 también puede ser Leu-Pro-Val

<220>

15 <221> región V

<222> (67) .. (99)

<223> CDR1 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)

<220>

20 <221> región V

<222> (145) .. (165)

<223> CDR2 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)

<220>

25 <221> región V

<222> (262) .. (291)

<223> CDR3 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)

ES 2 816 700 T3

<400> 10  
tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag 48  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
acg gcc agg atc tcc tgc ttt gga gat aca ttg cca aag caa tat act 96  
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr  
20 25 30  
tat tgg tat cag cag aag cct ggc cag gcc cct gtg tta gtg att tat 144  
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
aaa gac act gag agg ccc tca ggg atc ccc gag cga ttc tct ggc tcc 192  
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
agc tca ggg aca aca gtc acc ttg acc atc agt gga gtc cag gca gaa 240  
Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
65 70 75 80  
gac gag gct gac tat tac tgt cta tca gct gac aac agt gct act tgg 288  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp  
85 90 95  
gtg ttc ggc gga ggg acc aag gtg acc gtc cta 321  
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

<210> 11  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr  
20 25 30  
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp  
85 90 95  
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
100 105

10

<210> 12  
15 <211> 345

ES 2 816 700 T3

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

<222> (1) .. (345)

<223> secuencia variable de la cadena pesada (VH) de NI-105.24B2-VH donde Gln en la posición 1 de la secuencia también puede ser Glu

10 <220>

<221> región V

<222> (91) .. (105)

<223> CDR1 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

15 <220>

<221> región V

<222> (148) .. (198)

<223> CDR2 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

20 <220>

<221> región V

<222> (295) .. (312)

<223> CDR3 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

25 <400> 12

cag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	ggg	gct	gag	gtg	aag	aag	cct	ggg	gcc	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
tcg	gtg	aag	gtt	tcc	tgt	aag	gca	tct	gga	tac	acc	ttc	gtc	aat	tac	96
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Val	Asn	Tyr	
			20					25					30			
att	ata	cac	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
Ile	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
		35					40					45				
gga	atc	atc	aat	cct	aat	ggc	gga	aac	aca	agt	tat	gca	gag	aaa	ttc	192
Gly	Ile	Ile	Asn	Pro	Asn	Gly	Gly	Asn	Thr	Ser	Tyr	Ala	Glu	Lys	Phe	
	50					55					60					
cag	gcc	cga	gtc	acc	ttg	acc	agc	gac	acg	tct	acg	agt	acg	gtg	tac	240
Gln	Ala	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr	
65					70					75					80	
atg	gac	ctg	agc	agc	ctg	aca	tct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tac	tgt	288
Met	Asp	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcc	gtc	ctt	tcc	cct	tcg	aat	ccc	tgg	ggc	cag	ggg	acc	acg	gtc	acc	336
Ala	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	Asn	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	
			100					105					110			
gtc	tcc	tcg														345
Val	Ser	Ser														
		115														

<210> 13

30 <211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

35

ES 2 816 700 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn Tyr  
 20 25 30

Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Glu Lys Phe  
 50 55 60

Gln Ala Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Val Leu Ser Pro Ser Asn Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser  
 115

- <210> 14
- <211> 324
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
  
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1) .. (324)
- <223> secuencia variable de la cadena ligera (VL) de NI-105.24B2-VL donde Glu en la posición 3 en la secuencia también puede ser Val
  
- <220>
- 15 <221> región V
- <222> (67) .. (99)
- <223> CDR1 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)
  
- <220>
- 20 <221> región V
- <222> (145) .. (165)
- <223> CDR2 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)
  
- <220>
- 25 <221> región V
- <222> (262) .. (294)
- <223> CDR3 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)
  
- <400> 14
- 30

ES 2 816 700 T3

```

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag      48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

acg gcc ggg atc acc tgc tct gga gat gct ttg cca aag caa ttt gtt      96
Thr Ala Gly Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Phe Val
          20          25          30

tat tgg tac cag aag aag cca ggc cag gcc cct gtg tta ttg ata tat      144
Tyr Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
          35          40          45

aaa gac act gag agg ccc tca cga atc cct gag cgc ttc tct ggc tcc      192
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

acc tca ggg aca aca gtc gcg ttg acc atc aat ggg gtc cag gca gag      240
Thr Ser Gly Thr Thr Val Ala Leu Thr Ile Asn Gly Val Gln Ala Glu
          65          70          75          80

gac gag gct gac tat tac tgt caa tca gcc gac cgc agt ggt gct ctt      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ala Leu
          85          90          95

tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      324
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 15  
 <211> 108  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 15

```

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

Thr Ala Gly Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Phe Val
          20          25          30

Tyr Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Leu Ile Tyr
          35          40          45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

Thr Ser Gly Thr Thr Val Ala Leu Thr Ile Asn Gly Val Gln Ala Glu
          65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ala Leu
          85          90          95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

10

<210> 16  
 15 <211> 378  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 816 700 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (378)

<223> secuencia variable de la cadena pesada (VH) de NI-105.4A3-VH donde Gln en la posición 1 de la secuencia 5 también puede ser Glu y Ser en la posición 7 de la secuencia también puede ser Thr

<220>

<221> región V

<222> (91) .. (105)

10 <223> CDR1 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

<220>

<221> región V

<222> (148) .. (198)

15 <223> CDR2 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

<220>

<221> región V

<222> (295) .. (345)

20 <223> CDR3 de VH de región determinante de complementariedad (CDR)

<400> 16

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gcg	gtc	cag	cct	ggg	ggg	48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1			5					10						15		
tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	gac	tat	96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
			20					25						30		
gcc	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	cag	tgg	gtg	144
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Gln	Trp	Val	
		35					40							45		
gca	gtt	ata	tcg	tat	gag	gga	act	tat	aaa	tac	tat	gca	gac	tcc	gtg	192
Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Gly	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55							60		
aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	aac	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Asn	
65					70					75					80	
ttg	cag	atg	agc	agc	ctg	aga	gtt	gaa	gac	acg	gct	gtg	tat	ttc	tgt	288
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
				85						90				95		
gtg	aaa	gct	cga	gcc	ttt	gcc	tcc	gga	cag	cga	agc	acc	tcc	acc	gta	336
Val	Lys	Ala	Arg	Ala	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Arg	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	
				100						105					110	
cct	gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg			378
Pro	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
			115					120					125			

<210> 17

<211> 126

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 816 700 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Val Lys Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val  
 100 105 110

Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 18

<211> 324

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (324)

<223> secuencia variable de la cadena ligera (VL) de NI-105.4A3-VL

<220>

<221> región V

15 <222> (67) .. (99)

<223> CDR1 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)

<220>

<221> región V

20 <222> (145) .. (165)

<223> CDR2 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)

<220>

<221> región V

25 <222> (262) .. (294)

<223> CDR3 de VL de región determinante de complementariedad (CDR)

<400> 18

ES 2 816 700 T3

```

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga caa      48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gca ttg cca aaa aaa tat gct      96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
          20          25          30

tat tgg tac cag cag aag tca ggc cag gcc cct gtg ttg gtc atc tat      144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

gag gac aac aaa cga ccc tcc ggg atc cct gag aga ttc tct ggc tcc      192
Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

agc tca ggg aca gtg gcc acc ttg act atc agt ggg gcc cag gtg gac      240
Ser Ser Gly Thr Val Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Asp
          65          70          75          80

gat gaa gct gac tac tac tgc tac tcg aca gac atc agt ggt gac ctt      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asp Leu
          85          90          95

cgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctc      324
Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 19  
 <211> 108  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 19

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
          20          25          30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

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

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

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 20  
 15 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 816 700 T3

<220>

<223> cadena pesada de ch4E4 maduro (IgG2a de ratón)

<400> 20

5

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser  
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser  
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val  
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu  
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175

ES 2 816 700 T3

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr  
180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro  
195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr  
210 215 220

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly  
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met  
245 250 255

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu  
260 265 270

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val  
275 280 285

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu  
290 295 300

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly  
305 310 315 320

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile  
325 330 335

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val  
340 345 350

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr  
355 360 365

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu  
370 375 380

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro  
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val  
405 410 415

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val  
420 425 430

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr  
435 440 445

Pro Gly Lys  
450

ES 2 816 700 T3

<210> 21  
 <211> 213  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> cadena ligera de ch4E4 maduro (lambda de ratón)

<400> 21  
 10

```

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr
          20          25          30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

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

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp
          85          90          95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser
          100          105          110

Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Glu Thr
          115          120          125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Val
          130          135          140

Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val Thr Gln Gly Met
145          150          155          160

Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Met Ala Ser
          165          170          175

Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His Ser Ser Tyr
          180          185          190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser
          195          200          205

Arg Ala Asp Cys Ser
          210
    
```

15 <210> 22  
 <211> 451

ES 2 816 700 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cadena pesada de ch4E4(N30Q) maduro (IgG2a de ratón)

<400> 22

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gln Ile Ser  
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala  
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr  
 85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser  
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val  
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu  
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

10



ES 2 816 700 T3

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val  
420 425 430

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr  
435 440 445

Pro Gly Lys  
450

<210> 23

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de NI-105.4E4-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

10

<400> 23

Ile Ser Ala Ile His  
1 5

15 <210> 24

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> CDR2 de NI-105.4E4-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

<400> 24

Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala Ser  
1 5 10 15

25

Leu Lys Gly

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de NI-105.4E4-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

35 <400> 25

Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 26

40 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR1 de NI-105.4E4-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

<400> 26

ES 2 816 700 T3

Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr Tyr  
 1 5 10

<210> 27  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR2 de NI-105.4E4-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)  
 10  
 <400> 27

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser  
 1 5

15 <210> 28  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CDR3 de NI-105.4E4-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)  
 <400> 28

Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp Val  
 1 5 10

25 <210> 29  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR1 de NI-105.24B2-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)  
 35 <400> 29

Asn Tyr Ile Ile His  
 1 5

40 <210> 30  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> CDR2 de NI-105.24B2-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)  
 <400> 30

Ile Ile Asn Pro Asn Gly Gly Asn Thr Ser Tyr Ala Glu Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

50  
 Ala

<210> 31  
 <211> 6  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 816 700 T3

<220>

<223> CDR3 de NI-105.24B2-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

<400> 31

5

Leu Ser Pro Ser Asn Pro  
1 5

<210> 32

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de NI-105.24B2-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

15

<400> 32

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

20 <210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> CDR2 de NI-105.24B2-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

<400> 33

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser  
1 5

30

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de NI-105.24B2-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

40 <400> 34

Gln Ser Ala Asp Arg Ser Gly Ala Leu Trp Val  
1 5 10

<210> 35

45 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> CDR1 de NI-105.4A3-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

<400> 35

Asp Tyr Ala Met His  
1 5

55

<210> 36

<211> 17

ES 2 816 700 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> CDR2 de NI-105.4A3-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

<400> 36

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

<210> 37

<211> 17

15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> CDR3 de NI-105.4A3-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH)

<400> 37

	Ala	Arg	Ala	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Arg	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Pro	Asp
	1				5					10					15	
25	Tyr															

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de NI-105.4A3-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

35 <400> 38

	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Pro	Lys	Lys	Tyr	Ala	Tyr
	1				5					10	

<210> 39

40 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> CDR2 de NI-105.4A3-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

<400> 39

	Glu	Asp	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser
	1				5		

50

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> CDR3 de NI-105.4A3-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL)

# ES 2 816 700 T3

<400> 40

Tyr Ser Thr Asp Ile Ser Gly Asp Leu Arg Val  
1 5 10

5 <210> 41  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Péptido

<400> 41

Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro  
1 5 10

15  
<210> 42  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Péptido

25 <400> 42

Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 43  
30 <211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> anticuerpo de VH

<400> 43

ES 2 816 700 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gln Ile Ser  
 20 25 30  
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 44

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys

10

ES 2 816 700 T3

85

90

95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 45

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe  
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10

<210> 46

<211> 111

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 46

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn Tyr

20



ES 2 816 700 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe  
 100 105 110  
 His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 49  
 <211> 108  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 49

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Arg Tyr Val  
 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Thr Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Asn Gly His His  
 85 90 95  
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

10  
 <210> 50  
 15 <211> 121  
 <212> PRT

ES 2 816 700 T3

<213> Homo sapiens

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Tyr Val Ser Gly Gly Thr Gly Thr Met Tyr  
 50 55 60  
 Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Ser Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr  
 85 90 95  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Tyr Asp Tyr Gly Glu Asp Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5

<210> 51

<211> 113

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Arg Ser Val Leu Tyr Ser  
 20 25 30

15

ES 2 816 700 T3

Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 52  
 <211> 124  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Thr Arg Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Lys Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10  
 <210> 53  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 53

ES 2 816 700 T3

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Ala Ser Lys Ser Val  
 20 25 30  
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
 35 40 45  
 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Thr Ser Asp His  
 85 90 95  
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

<210> 54  
 5 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 54  
 10

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Phe Pro Asn Tyr  
 20 25 30  
 Val Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Arg Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

15 <210> 55  
 <211> 110

ES 2 816 700 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 55

5

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
 20 25 30  
 Asn Tyr Val Ser Trp His Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 35 40 45  
 Leu Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Val Gly Ser  
 85 90 95  
 Tyr Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 56

<211> 118

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

15



ES 2 816 700 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Gly Ser Ser Gly Met Thr Phe Ser Ser  
 20 25 30  
 Tyr Ala Phe Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Val Ser Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ser Thr Val Asp Tyr Thr Asp Ser  
 50 55 60  
 Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Arg Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Val Arg Ser Thr Ala Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Ile Ile Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 59  
 <211> 107  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 59

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 Ile Val Asn Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

10

<210> 60  
 15 <211> 126  
 <212> PRT

ES 2 816 700 T3

<213> Homo sapiens

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Thr Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Tyr  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Gly Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Val Ala Gly Asp Ile Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly  
 100 105 110  
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

5

<210> 61

<211> 113

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly  
 20 25 30

15

ES 2 816 700 T3

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Gln  
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Gly Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 62  
 <211> 118  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Glu Gly Phe Gln Gly Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

10  
 <210> 63  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 63

ES 2 816 700 T3

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 64

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys

ES 2 816 700 T3

<210> 65  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 65

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser  
 20 25 30  
 Ala Phe His Trp Ala Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Gly Asn Asn Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Thr Arg Gln Gly Pro Ser Tyr Gly Gly Ile Asn Trp Gly Leu  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10 <210> 66  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 66

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly



ES 2 816 700 T3

100

105

110

Val Ser Ser  
115

<210> 68  
<211> 113  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 68

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30  
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Arg Arg Leu Met Tyr Lys Val Ser Lys Arg Asp Pro Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95  
Ser Leu Trp Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

10 Lys

<210> 69  
<211> 121  
<212> PRT  
15 <213> Homo sapiens  
  
<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Asp  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Pro Asn Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

20

ES 2 816 700 T3

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ser Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Val Ala Asp Ser Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Val Glu Arg Pro Asp Lys Gly Gly Trp Phe Gly Pro Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 70  
 <211> 113  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Thr  
 20 25 30

Ser Asn Asn Gln Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Asn Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 100 105 110

10 Lys  
 <210> 71  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 71

ES 2 816 700 T3

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Phe Ser Ala Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala His Ile Thr Gly Ser Gly Thr Pro Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asn Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Gly Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110  
 Ser Ser

<210> 72  
 <211> 110  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 72

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Asp Leu Arg Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Thr Leu Thr Cys Ser Gly Asn Ser Asn Asn Val Gly Asn Gln  
 20 25 30  
 Gly Ala Ala Trp Leu Gln Gln Phe Pro Gly His Pro Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 Phe Tyr Glu Asn Ile Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Ala Ser Arg Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Gly His Leu  
 85 90 95  
 Asn Ala Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

<210> 73  
 15 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 816 700 T3

<400> 73

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Ser Tyr  
 20 25 30  
 Trp Val Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Glu Gly Gln Val Ser Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Trp Gly Pro Ala Ala Val Thr Asp Ser Pro Trp Phe Gly  
 100 105 110  
 Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5

<210> 74  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Thr  
 20 25 30

ES 2 816 700 T3

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His  
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 75  
 <211> 117  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 75

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Phe  
 20 25 30

Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ala Thr Lys Tyr Ala His Asn Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Thr Gly Met Ala Val Thr Gly Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

10  
 <210> 76  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 76

ES 2 816 700 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Phe  
 20 25 30  
 Phe Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ala Thr Lys Tyr Ala His Asn Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Phe  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Gly Leu Lys Ser Asp Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Thr Gly Met Ala Val Thr Gly Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 77

5 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

10

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Ala Glu Thr Tyr Ala  
 20 25 30  
 Arg Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr  
 35 40 45  
 Arg Asp Arg Glu Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Gly Asn Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Val Tyr His Cys His Ser Val Ala Asp Asn Asn Leu Asp  
 85 90 95  
 Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

ES 2 816 700 T3

<210> 78  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 78

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Val Leu Ala Glu Thr Tyr Ala  
 20 25 30

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

Arg Asp Arg Glu Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Val Tyr His Cys His Ser Val Ala Asp Asn Asn Leu Asp  
 85 90 95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105

10 <210> 79  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 79

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 80  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 80

25

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
 1 5

<210> 81  
 <211> 11  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 81

35

Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr  
 1 5 10

ES 2 816 700 T3

<210> 82  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 82

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn Tyr Ser Phe Val Ser  
 1 5 10

10 <210> 83  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 83

Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser  
 1 5

<210> 84  
 20 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 84

25

Ser Ser Tyr Gly Gly Ser Lys Tyr Pro Trp Val  
 1 5 10

<210> 85  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met His  
 35 1 5 10

<210> 86  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 86

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

45

<210> 87  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50

<400> 87

Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe His His  
 1 5 10 15

ES 2 816 700 T3

<210> 88  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 88

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Arg Tyr Val Tyr  
 1 5 10

10 <210> 89  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 89

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 90  
 20 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 90

25

Tyr Ser Thr Asp Ser Asn Gly His His Trp Val  
 1 5 10

<210> 91  
 <211> 10  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Gly Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Ser Met Ala  
 1 5 10

35

<210> 92  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 92

Tyr Ile Ser Gly Thr Tyr Val Ser Gly Gly Thr Gly Thr Met Tyr Tyr  
 1 5 10 15

Leu Asp Ser Val Lys Gly  
 20

45

<210> 93  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50

<400> 93

Val Tyr Asp Tyr Gly Glu Asp  
 1 5

ES 2 816 700 T3

<210> 94  
<211> 17  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens

<400> 94

Lys Ser Ser Arg Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

10  
<210> 95  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15  
<400> 95

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

20 <210> 96  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <400> 96

Gln Gln Tyr Tyr Gly Thr Pro Arg Thr  
1 5

<210> 97  
30 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 97

35  
Arg Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Gly  
1 5 10

<210> 98  
<211> 17  
40 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 98

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

45  
Gly  
<210> 99  
<211> 15  
<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 99

ES 2 816 700 T3

Gly Val Tyr Asp Tyr Leu Trp Gly Ser Tyr Arg Leu Phe Asp Tyr  
 1 5 10 15

<210> 100  
 5 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 100  
 10

Gly Gly Asn Asn Ile Ala Ser Lys Ser Val His  
 1 5 10

<210> 101  
 <211> 7  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 101

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser  
 1 5

20 <210> 102  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens

<400> 102

Gln Val Trp Asp Ser Thr Ser Asp His Val Val  
 1 5 10

30 <210> 103  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 103

Gly Phe Thr Phe Pro Asn Tyr Val Met Thr  
 1 5 10

40 <210> 104  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 104

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

Lys Gly

<210> 105  
 50 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 105

ES 2 816 700 T3

Gly Ser Gly Gly Ile  
1 5

<210> 106  
5 <211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 106  
10

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser  
1 5 10

<210> 107  
<211> 7  
15 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 107

20 Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser  
1 5

<210> 108  
<211> 10  
<212> PRT  
25 <213> Homo sapiens

<400> 108

30 His Ser Tyr Val Gly Ser Tyr Thr Leu Val  
1 5 10

<210> 109  
<211> 10  
<212> PRT  
35 <213> Homo sapiens

<400> 109

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Ser Ala Met His  
1 5 10

40 <210> 110  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

45 <400> 110

Arg Ile Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Ala Tyr Ala Ala Ser  
1 5 10 15

50 Val Lys Gly  
<210> 111  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 111

ES 2 816 700 T3

Thr Ser Pro Thr Val Thr Thr Glu Val  
1 5

<210> 112  
<211> 17  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 112

10 Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asp Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 113  
15 <211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 113

20 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 114  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 114

30 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Ile Thr  
1 5

<210> 115  
<211> 11  
<212> PRT  
35 <213> Homo sapiens  
  
<400> 115

40 Ser Gly Met Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Phe Asn  
1 5 10

<210> 116  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
45  
<400> 116

Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ser Thr Val Asp Tyr Thr Asp Ser Val Arg  
1 5 10 15

Gly

50 <210> 117  
<211> 14  
<212> PRT

ES 2 816 700 T3

<213> Homo sapiens

<400> 117

5 Val Arg Ser Thr Ala Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Ile Ile  
1 5 10

<210> 118

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

15 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Val Asn Asn Leu Ala  
1 5 10

<210> 119

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

25 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly  
1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 120

35 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp Thr  
1 5

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 121

Gly Tyr Arg Phe Thr Thr Tyr Trp Ile Gly  
1 5 10

45 <210> 122

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50 <400> 122

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr  
1 5

<210> 123

55 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 816 700 T3

<400> 123

Val Ala Gly Asp Ile Gly Tyr Glu Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15

5 Val

<210> 124

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15

15 Ala

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 125

Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser  
 1 5

25

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 126

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr  
 1 5

35 <210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 127

Gly Phe Thr Phe Thr Arg Tyr Gly Met His  
 1 5 10

<210> 128

45 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

50

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

Gly

ES 2 816 700 T3

<210> 129  
<211> 9  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
  
<400> 129

Glu Gly Phe Gln Gly Ala Ile Asp Tyr  
1 5

10  
<210> 130  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15  
<400> 130

Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Ser Ser Asp Asn Lys Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

20 <210> 131  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 131

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
1 5

<210> 132  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 132  
35

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Arg Thr  
1 5

<210> 133  
<211> 11  
40 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 133

Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Ala Phe His  
1 5 10

<210> 134  
<211> 19  
<212> PRT  
50 <213> Homo sapiens  
  
<400> 134

ES 2 816 700 T3

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

Val Lys Gly

<210> 135  
 <211> 11  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 135

Thr Arg Gln Gly Pro Ser Tyr Gly Gly Ile Asn  
 1 5 10

<210> 136  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 136

Lys Ser Ser Gln Thr Ile Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala

20 <210> 137  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 137

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

30 <210> 138  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <400> 138

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Gln Thr  
 1 5

<210> 139  
 40 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 139

45 Ser Gly Phe Thr Phe Thr Lys Ala Trp Met Thr  
 1 5 10

<210> 140  
 <211> 19  
 50 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 816 700 T3

<400> 140

His Ile Lys Thr Arg Ile Glu Gly Ala Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro  
 1 5 10 15

Val Glu Gly

5

<210> 141  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 141

Ser Thr Asp Phe Asp Tyr  
 1 5

15 <210> 142

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 142

Thr Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn  
 1 5 10 15

<210> 143

25

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 143

30

Lys Val Ser Lys Arg Asp Pro  
 1 5

<210> 144

<211> 10

35

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 144

Met Gln Gly Ser Leu Trp Pro Arg Tyr Thr  
 1 5 10

40

<210> 145

<211> 10

<212> PRT

45

<213> Homo sapiens

<400> 145

Gly Tyr Asn Phe Pro Asn Tyr Trp Ile Gly  
 1 5 10

50

<210> 146

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 816 700 T3

<400> 146

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
1 5 10 15

Gly His Val Thr Ile Ser Ser Asp  
20

5

<210> 147

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 147

Ala Arg Val Glu Arg Pro Asp Lys Gly Gly Trp Phe Gly Pro  
1 5 10

15 <210> 148

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 148

Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Thr Ser Asn Asn Gln Asn Tyr Leu  
1 5 10 15

Ala

<210> 149

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

30

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Tyr  
1 5

<210> 150

<211> 9

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Gln Gln Tyr Tyr Asn Ser Pro Tyr Thr  
1 5

40

<210> 151

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 151

Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr Gly Met Asn  
1 5 10

50

ES 2 816 700 T3

<210> 152  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 152

His Ile Thr Gly Ser Gly Thr Pro Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15

Gly

10 <210> 153  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 153

Val Arg Gly Thr Val Asp Tyr  
 1 5

<210> 154  
 20 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 154

25

Ser Gly Asn Ser Asn Asn Val Gly Asn Gln Gly Ala Ala  
 1 5 10

<210> 155  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 155

35 Glu Asn Ile Asn Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 156  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 156

Ser Ala Trp Asp Gly His Leu Asn Ala Trp Val  
 1 5 10

45

<210> 157  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50

<400> 157

Gly Tyr Ser Phe Ile Ser Tyr Trp Val Gly  
 1 5 10

ES 2 816 700 T3

<210> 158  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 158

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Glu  
 1 5 10 15

Gly Gln Val Ser Ile Ser Ala Asp  
 20

10 <210> 159  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 159

His Trp Gly Pro Ala Ala Val Thr Asp Ser Pro Trp Phe Gly Pro  
 1 5 10 15

<210> 160  
 20 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 160

25

Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Thr Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala

<210> 161  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 161

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

35

<210> 162  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 162

Gln His Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr  
 1 5

45

<210> 163  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50

<400> 163

ES 2 816 700 T3

Gly Tyr Ile Phe Thr Ala Phe Phe Met His  
 1 5 10

<210> 164  
 5 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 164  
 10

Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Ala Thr Lys Tyr Ala His Asn Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 165  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 165

Gly Met Ala Val Thr Gly Asn Phe  
 1 5

<210> 166  
 25 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 166  
 30

Ser Gly Asp Val Leu Ala Glu Thr Tyr Ala Arg  
 1 5 10

<210> 167  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 167

Arg Asp Arg Glu Arg Pro Ala  
 1 5

40  
 <210> 168  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens

<400> 168

His Ser Val Ala Asp Asn Asn Leu Asp Trp Val  
 1 5 10

50  
 <210> 169  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 169

ES 2 816 700 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgcaagg catttggata cagttttacc aacttctgga tcggctgggt gcgccagggt 120  
 cccgggaaag gcctggagtg ggtgggaatc atctatcctg gtgactctga caccagatac 180  
 agtccgtcct tccaaggcca ggtcaccatt tcagccgaca agtccattga caccgcctac 240  
 ctacagtggg gccacctgaa ggcctcggac agcgcctatgt atttctgtgc cagacggggt 300  
 ttttggactg gaagtcaaat tgaatactgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcctcg 360

5 <210> 170  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 170

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaagaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgcaagg catttggata cagttttacc aacttctgga tcggctgggt gcgccagggt 120  
 cccgggaaag gcctggagtg ggtgggaatc atctatcctg gtgactctga caccagatac 180  
 agtccgtcct tccaaggcca ggtcaccatt tcagccgaca agtccattga caccgcctac 240  
 ctacagtggg gccacctgaa ggcctcggac agcgcctatgt atttctgtgc cagacggggt 300  
 ttttggactg gaagtcaaat tgaatactgg ggccagggca cccaggtcac cgtctcctcg 360

<210> 171  
 15 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 171

20

cagtctgcc tgcactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacactc agtcaccatc 60  
 tcctgcactg gaactagtag tgacgttgggt aattatagtt ttgtctcctg gtatcaacag 120  
 tatcccggca aagcccccaa agtcatcatt tatgacgtca gtaagcggtc ctcaggggtc 180  
 cctgatcgct tctttggctc caagtctgcc aacacggcct ccctgaccgt ctctggggtc 240  
 caggaagagg atgaggctga ctatttttgc agctacatcg gaggcagcaa atatccgtgg 300  
 gtgtttggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctt 333

<210> 172  
 <211> 375  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 172

ES 2 816 700 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagagtc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatgaca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggtt atatggtttg atggaagtaa tgaattctat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacctc 300  
 ggggcctcag tgactacttc caacgctgaa aacttcacc actggggcca gggcaccctg 360  
 gtcaccgtct cctcg 375

<210> 173  
 <211> 375  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 173

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagagtc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agttatgaca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggtt atatggtttg atggaagtaa tgaattctat 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacctc 300  
 ggggcctcag tgactacttc caacgctgaa aacttcacc actggggcca gggcaccctg 360  
 10 gtcaccgtct cctcg 375

<210> 174  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 174

tcctatgagc tgactcagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc 60  
 acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaga tatgtttatt ggtaccagca gaatcaggc 120  
 caggcccctg tgctggcat ctatgaggac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaca 180  
 ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtagag 240  
 gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcaatg gtcattcattg ggtgttcggc 300  
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 175  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 175

ES 2 816 700 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cgacttcagc ggctatagca tggcctgggt ccgccaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtttcgtat attagcggca cttatgttag tgggtgtaca 180  
 ggcacgatgt attatrtaga ctctgtgaag ggccgattct tcatctccag agacgatgcc 240  
 accagttcac tgtatctgca aatggacagc ctgagggagc aggacacggc tgtgtattac 300  
 tgtcgcagag tttatgacta cgggtgaagac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360  
 tcg 363

<210> 176  
 <211> 339  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 176

gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagccg gagtgtctta tacagctcca acagtaagaa ctacttagct 120  
 tggatcagc agaaaccccg acagcctcct aagtgtctca tttactgggc atctacggcg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagaatt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggcg gtttattact gtcagcaata ttatggctact 300  
 10 cctcgcacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 177  
 <211> 372  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 177

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag gcactagatt cacctttagc acctatgcc a tgggctgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaggg ggctggagtg ggtctcggct attggtggtg gtgggtgatag cacatcctac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgc gaaagggggt 300  
 tatgattacc tttgggggag ttatcggctc tttgactact ggggccaggg aaccctggtc 360  
 accgtctcct cg 372

20 <210> 178  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 178

ES 2 816 700 T3

tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccagattt 60  
 acctgtgggg gaaacaacat tgcaagtaaa agtgtgcaact ggtaccagca gaagccaggc 120  
 caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcacggat ccctgagcga 180  
 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg 240  
 gatgaggccg actattactg tcagggtggtg gatagtacta gtgatcatgt ggtattcggc 300  
 ggagggacca agctgaccgt ccta 324

<210> 179  
 <211> 342  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 179

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttccc aactatgtca tgacgtgggt ccgccaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagggt attagtggta gtggtgtag cacagactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgttgat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agtcgaggac acggccttgt attactgtgc gaagggctca 300  
 10 ggtggtatcc ggggcccaagg gacaatggtc accgtctctt cg 342

<210> 180  
 <211> 330  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 180

cagtctgccc tgactcagcc tcgctcagtg tccgggtctc ctggacagtc agtcaccatc 60  
 tcctgcactg gaaccagcag tgatgttggg ggtataact atgtctcctg gcaccagcag 120  
 caccagggca aagcccccaa actcctgatt tatgatgtca ctaagcggcc ctgaggggtc 180  
 cctgatcgct tctctggctc caagtctggc aacacggccg ccctgaccat ctctgggctc 240  
 caggctgagg atgaggctga ttattactgc cactcatatg taggcagcta cactttggta 300  
 20 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc 330

<210> 181  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 181

ES 2 816 700 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgaaactc 60  
 tcctgtgcag cctctggggt cacattcagc ggctctgcta tgcactgggt ccgccaggct 120  
 tccgggaaag ggctggagtg ggttgccgt attagaagca aagctaataag ttatgcgaca 180  
 gcatatgctg cgtcggtgaa aggcaggtc accatctcca gagatgattc aaagaacacg 240  
 gcgtatctac aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtactagc 300  
 cctacgggtga ctaccgaggt ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctgc 354

<210> 182  
 <211> 339  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 182

gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagga ctacttagct 120  
 10 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atctaccggg 180  
 gaatccgggg tctctgaccg attcagtgcc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtgtattact gtcagcaata ttatagtacc 300  
 ccgatcacct tcggccaagg gacacgactg gagattaa 339

<210> 183  
 15 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 183

20 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggggggtc cctgagactg 60  
 tcctgtatag gtcctctggt aatgaccttc agtagttatg ccttcaactg ggtccgccag 120  
 actccaggga aggggctgga gtgggtttca tccatcagtc gtttcgggtc gaccgtggac 180  
 tacacagact cgggtcgggg cggatttacc atctccagag acgatggcca gaggtcactg 240  
 tatctgcaaa tgaacagcct gagagtcgaa gacacggctg tttattattg tgtcagatcg 300  
 acggcttctg gttcgcggtc ccccgaatt atctggggcc aggggaccac ggtcaccgtc 360  
 tcctcg 366

<210> 184  
 <211> 321  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 184

ES 2 816 700 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcgagtca gggcattgtc aataatntag cctggtttca gcagaagcca 120  
 gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaggtgg ggtcccatca 180  
 aaattcagcg gcagtgcgtc tgggacagat ttcagtctca ccatcagcaa cctgcagcct 240  
 gaagactttg caacttattt ctgccaacag tataatagtt acccttggac gttcggccaa 300  
 gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 185  
 <211> 378  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 185

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaagg gttctggata caggtttacc acctactgga tcggctgggt gcgccagatg 120  
 cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac 180  
 agcccgtcct accaaggcca ggtcaccatt tcagccgaca agtccatcag taccgcctac 240  
 10 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accggcatgt attactgtgc gagagtggca 300  
 ggggatattg gctacgagaa ctactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360  
 acggtcaccg tctcctcg 378

<210> 186  
 15 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 186

20

gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctgggtgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tatggctcca acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaaactagg acagtctcct aaactgctca tttactgggc atctgcccgg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcgggtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtctattact gtcagcaata ttacagtact 300  
 ccgtggacgt tcggccaggg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 187  
 <211> 354  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 187

ES 2 816 700 T3

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt cacgttcaact agatatggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaactaa taaatattat 180  
 gcagactcac tgcagggccg attcaccatc tccagagaca cttccacgaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acggcctgag agtcgaggac agggctgtat attactgtgc gagagagggg 300  
 tttcagggag cgatcgacta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcg 354

<210> 188  
 <211> 339

5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 188

gaaattgtga tgactcagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtcaagcca gaatatatta tacagctccg acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctoct aaactactca tttactgggc atctaccggg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtatt 300  
 cctcgggacgt tggccaagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

<210> 189  
 <211> 360  
 <212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 189

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgaaactc 60  
 tcctgtgcag cctctgggtt cagtttcagt gactctgctt tccactgggc ccgccaggct 120  
 tccgggaaag ggctggagtg ggttggccgt attagaagta aaggtaataa ttacgcgaca 180  
 gcatatgctg cgtcggtgaa aggcaggttc accgtctcca gagatgattc aaagaacacg 240  
 acgtatctac agatgaacag cctgaaaacc gacgacacgg ccatatatta ctgtactaga 300  
 cagggccct cctacggtg tattaattgg gcctgggca ccctggtcac cgtctcctcg 360

<210> 190  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 190

ES 2 816 700 T3

gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gactatthta tacagttcca acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcca aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcgggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagttct 300  
 cctcaaactg tggccaggg gaccaaggtg gaaatcaaa 339

<210> 191  
 <211> 345  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 191

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttcgtgaggc cgggggggtc cattacactg 60  
 tcctgtgcaa cctctggatt tactttcact aaagcctgga tgacctgggt ccgccaggct 120  
 ccagtgaagg ggctggagtg gattggccat attaaaacca gaattgaagg tgcgacaaca 180  
 gactacgctg cgcccgtgga aggccgattc accatttcaa gagacgattc aaaaaatatg 240  
 gtatatcttc aatgaacag cctgaagacc gaagactcag gcatttatta ctgttcaca 300  
 10 gactttgact attggggcca gggaaacctg gtcaccgtct cctcg 345

<210> 192  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 192

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgccgtca cccttgaca gccggcctcc 60  
 20 atctcctgca cgtctagtca aagcctccta tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg 120  
 tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgctaagt ataaggttc taagcgggac 180  
 cctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt ggtcaggca ctgattcac actgagcatc 240  
 agcaggggtg aggctgagga tgttggcgtt tattactgca tgcaaggttc actctggcct 300  
 cggtacactt ttggccaggg gaccaaggtg gagatcaaa 339

<210> 193  
 <211> 363  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 193

ES 2 816 700 T3

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagaa gtgaaaaagc cgggggactc tctgaggatc 60  
 tcctgtaagg cttctggata caactttccc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120  
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggaatc atctaccctg gtgactctga tatcagatac 180  
 agcccgtcct tccagggaca cgtcaccatc tccagtgaca agtccatcac caccgcctat 240  
 ctccagtgga ccagtctgaa ggtcgcggac agcgcctatg attattgtgc gagagtggaa 300  
 aggctgaca aggggggctg gttcggcccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360  
 tcg 363

<210> 194  
 <211> 339  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 194

gatattgtga tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gactcttttg tacacgtcca ataatcagaa ctatttagct 120  
 tggtagcaac acaaaccggg acagcctcct aaggtgctca tatactgggc atctaccggg 180  
 gaatatgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg gaacagatth cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcagcctga agatgtggct gtttattact gtcagcaata ttataatagt 300  
 10 ccctacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 195  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 195

gaggtgcagc tgggtggagt cgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gcatatggca tgaactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggaaagg ggctggagtg ggttgcacac attactggta gtggcactcc catcttctac 180  
 20 gcagactctg tgaagggccg attcaccatt tccagagaca atgccaagag ttccctatat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag aaacgatgac acggctctat atttctgtgt gagaggtacc 300  
 gttgactact gggggccagg caccctggtc accgtctcct cg 342

<210> 196  
 <211> 330  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 196

ES 2 816 700 T3

caggctggtc tgactcagcc accctcgggtg tccaaggact tgagacagac cgccacactc 60  
 acctgcagtg ggaacagcaa caatgtcggc aaccaaggag cagcttggtc gcagcagttc 120  
 ccgggccacc ctoccaaact cctcttctac gaaaatatca accggccctc aggaatttca 180  
 gagagattct ctgcatccag gtcaggaaac acagcttccc tgaccattac tggactccag 240  
 cctgaggacg aggctgacta ttactgctca gcgtgggacg gccacctcaa tgcttgggtg 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 197  
 <211> 372  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 197

gaggtgagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60  
 tcctgtaagg cttctggata tagttttatc agctactggg tcggctgggt gcgccagatg 120  
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggcatc atctatcccg gtgactctga caccagatac 180  
 agcccgtcct tcgaaggcca ggtcagcatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240  
 ctccagtgga ccagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacattgg 300  
 gggccggcag cagtgcagga ttctccctgg ttcggcccct ggggccaggg aaccctggtc 360  
 10 accgtctcct cg 372

<210> 198  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 198

gatattgtga tgaccagag tccagactcc ctggtgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtccagcca gactgtttta tatacctcca acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaagccagg acagcctcct aagttactca tttactgggc atctaccgg 180  
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcacta ttatagtact 300  
 20 ccattcactt tcggccctgg gaccaaagtg gatatcaaa 339

<210> 199  
 <211> 351  
 25 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 199

ES 2 816 700 T3

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggctgag gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata catctttacc gccttcttta tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag gccttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtgggtc cacaaagtat 180  
 gcacacaact ttcagggcag ggttaccatg accagggaca cgtccatcag cacagccttc 240  
 atggagctga gtggactgaa gtctgacgac acgggcgtat attactgtgc gacgggtatg 300  
 gcagtgactg gtaacttctg gggccagggc accctgggtca ccgtctcctc g 351

<210> 200

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 200

caggtgcagc tgggtgcaatc tggggctgag gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggata catctttacc gccttcttta tgcactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggacaag gccttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtgggtc cacaaagtat 180  
 gcacacaact ttcagggcag ggttaccatg accagggaca cgtccatcag cacagccttc 240  
 atggagctga gtggactgaa gtctgacgac acgggcgtat attactgtgc gacgggtatg 300  
 gcagtgactg gtaacttctg gggccagggc accctgggtca ccgtctcctc g 351

10

<210> 201

<211> 324

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 201

ctgcctgtgc tgactcagcc accctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc 60  
 acctgctcag gagatgtact ggcagaaaca tatgctcggc ggttccagca gaagccaggc 120  
 caggcccctg tgttggtgat gtatagagac cgtgagcggc ccgcagggat ccctgagcga 180  
 ttctccggct ccagctcagg gaacacagtc acctgacca tcagcggggc ccaggctgag 240  
 gatgaggctg tctatcattg tcactctgtg gctgacaaca atctagattg ggtgttcggc 300  
 ggagggacca aactgaccgt ccta 324

20

<210> 202

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<400> 202

ES 2 816 700 T3

tcctatgagc tgactcagcc accctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc 60  
 acctgctcag gagatgtact ggcagaaaca tatgctcggg ggttccagca gaagccaggc 120  
 caggcccctg tgttggtgat gtatagagac cgtgagcggc ccgcagggat ccctgagcga 180  
 ttctccggct ccagctcagg gaacacagtc accttgacca tcagcggggc ccaggetgag 240  
 gatgaggctg tctatcattg tcactctgtg gctgacaaca atctagattg ggtgttcggc 300  
 ggagggacca aactgaccgt ccta 324

<210> 203

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 203

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr  
 130 135 140

ES 2 816 700 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser  
 180 185 190  
 Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala  
 195 200 205  
 Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile  
 210 215 220  
 Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp  
 260 265 270  
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335  
 Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val  
 385 390 395 400

ES 2 816 700 T3

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu  
 405 410 415

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His  
 420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 204

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 204

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Asn Tyr  
 20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile  
 35 40 45

Ile Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val  
 65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser  
 85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe  
 130 135 140

ES 2 816 700 T3

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val  
145 150 155 160

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
165 170 175

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg  
180 185 190

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser  
210 215

<210> 205

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 205

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

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe  
100 105 110

His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr  
115 120 125

Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr

ES 2 816 700 T3

130 135 140

Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His  
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser  
180 185 190

Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn  
195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro  
210 215 220

Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro  
225 230 235 240

Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys  
245 250 255

Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val  
260 265 270

Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn  
275 280 285

Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr  
290 295 300

Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp  
305 310 315 320

Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu  
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg  
340 345 350

Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys  
355 360 365

Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp  
370 375 380

ES 2 816 700 T3

Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys  
385 390 395 400

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser  
405 410 415

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser  
420 425 430

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser  
435 440 445

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
450 455

<210> 206

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 206

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

Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Arg Tyr Val Tyr  
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Glu  
35 40 45

Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Thr Phe Ser Gly Ser Ser  
50 55 60

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

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Asn Gly His His Trp  
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser  
100 105 110

Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Glu Thr  
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe Tyr Pro Gly Val

ES 2 816 700 T3

130 135 140

Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val Thr Gln Gly Met  
145 150 155 160

Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Met Ala Ser  
165 170 175

Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His Ser Ser Tyr  
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser  
195 200 205

Arg Ala Asp Cys Ser  
210

<210> 207  
<211> 444  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Quimera

10 <400> 207

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Phe Pro Asn Tyr  
20 25 30

Val Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Arg Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val  
115 120 125

ES 2 816 700 T3

Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu  
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr  
 165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln  
 180 185 190

Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp  
 195 200 205

Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys  
 210 215 220

Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val  
 245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile  
 260 265 270

Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr  
 275 280 285

His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro  
 290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val  
 305 310 315 320

Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro  
 325 330 335

Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu  
 340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp  
 355 360 365

Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr

ES 2 816 700 T3

370 375 380

Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
385 390 395 400

Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu  
405 410 415

Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His  
420 425 430

His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
435 440

<210> 208

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 208

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Phe Pro Asn Tyr  
20 25 30

Val Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val  
115 120 125

Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys  
130 135 140

ES 2 816 700 T3

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu  
145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr  
165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln  
180 185 190

Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp  
195 200 205

Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys  
210 215 220

Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe  
225 230 235 240

Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val  
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile  
260 265 270

Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr  
275 280 285

His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro  
290 295 300

Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val  
305 310 315 320

Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro  
325 330 335

Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu  
340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp  
355 360 365

Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr  
370 375 380

Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser



ES 2 816 700 T3

Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
 165 170 175

Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg His  
 180 185 190

Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu Lys  
 195 200 205

Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser  
 210 215

<210> 210

<211> 452

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 210

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Gly Ser Ser Gly Met Thr Phe Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Ala Phe Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

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

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

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

Cys Val Arg Ser Thr Ala Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Ile Ile Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
 115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser  
 130 135 140

ES 2 816 700 T3

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
180 185 190

Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His  
195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro  
210 215 220

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu  
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu  
245 250 255

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
260 265 270

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu  
275 280 285

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr  
290 295 300

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser  
305 310 315 320

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro  
325 330 335

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln  
340 345 350

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val  
355 360 365

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val  
370 375 380

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu  
385 390 395 400

ES 2 816 700 T3

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg  
 405 410 415

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val  
 420 425 430

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg  
 435 440 445

Thr Pro Gly Lys  
 450

<210> 211

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 211

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 Ile Val Asn Asn  
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp  
 85 90 95

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

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly  
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile  
 130 135 140

ES 2 816 700 T3

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu  
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr  
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210

<210> 212

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 212

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr  
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile  
35 40 45

Ile Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val  
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser  
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

ES 2 816 700 T3

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val  
 145 150 155 160

Thr Gln Gly Met Glu Thr Thr Gln Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 165 170 175

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg  
 180 185 190

His Ser Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly His Thr Val Glu  
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser  
 210 215

<210> 213  
 <211> 450  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Quimera  
 10  
 <400> 213

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Val Lys Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val  
 100 105 110

Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys



ES 2 816 700 T3

Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp  
370 375 380

Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile  
385 390 395 400

Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln  
405 410 415

Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His  
420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro  
435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 214

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 214

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Gln Ile Ser  
20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala  
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser



ES 2 816 700 T3

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly  
 385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu  
 405 410 415

Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn  
 420 425 430

His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 215

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 215

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

Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Phe Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Leu Gly Ala Ser Val Thr Thr Ser Asn Ala Glu Asn Phe  
 100 105 110

His His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr  
 115 120 125

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr

ES 2 816 700 T3

130 135 140

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu  
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His  
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser  
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn  
195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro  
210 215 220

Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser  
225 230 235 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr  
245 250 255

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp  
260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr  
275 280 285

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Phe Arg Ser  
290 295 300

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
305 310 315 320

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr  
340 345 350

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln  
370 375 380

ES 2 816 700 T3

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met  
385 390 395 400

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys  
405 410 415

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu  
420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly  
435 440 445

Lys

<210> 216

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 216

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Phe  
20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Trp Gly His Leu Lys Ala Ser Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Phe Trp Thr Gly Ser Gln Ile Glu Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val  
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr



ES 2 816 700 T3

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser  
385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala  
405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His  
420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
435 440

<210> 217

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 217

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr  
20 25 30

Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val  
35 40 45

Ile Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
50 55 60

Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val  
65 70 75 80

Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser  
85 90 95

Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe  
130 135 140

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val



ES 2 816 700 T3

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 165 170 175  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 180 185 190  
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 195 200 205  
 Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 210 215 220  
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 225 230 235 240  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
 260 265 270  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 290 295 300  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 325 330 335  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
 340 345 350  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370 375 380  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

ES 2 816 700 T3

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gln Ser Ala Leu Thr  
435 440 445

Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly  
450 455

<210> 219

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 219

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp His Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys His Ser Tyr Val Gly Ser  
85 90 95

Tyr Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
130 135 140

ES 2 816 700 T3

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys  
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 220

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Quimera

10

<400> 220

Glu Val Gln Leu Val 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 Thr Phe Pro Asn Tyr  
20 25 30

Val Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

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

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

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

Ala Lys Gly Ser Gly Gly Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser

15 <210> 221

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Quimera

ES 2 816 700 T3

<400> 221

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His  
 1 5 10 15  
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr  
 20 25 30  
 Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile  
 35 40 45  
 Ile Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser  
 85 90 95  
 Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

5

<210> 222  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Quimera

<400> 222

15

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly His  
 1 5 10 15  
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr  
 20 25 30  
 Ser Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val  
 35 40 45  
 Ile Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 50 55 60  
 Phe Gly Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 Gln Glu Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ser Ser Tyr Gly Gly Ser  
 85 90 95  
 Lys Tyr Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105 110

ES 2 816 700 T3

<210> 223  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 223  
 gatattgtta tgactcaatc accagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60  
 atcaactgca agtcaagcca gaatatttta tacagctccg acaataagaa ctacttagct 120  
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aaactactca tttactgggc atctaccgg 180  
 gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtatt 300  
 cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gagatcaaa 339

10 <210> 224  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 224

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gln Tyr Ser Phe Val Ser  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo, donde:
  - 5 (a) la región variable de la cadena pesada (VH) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 48 y  
la región variable de la cadena ligera (VL) comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49, o
  - 10 (b) la VH comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 47 y la VL comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 49.
2. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau se selecciona de entre el grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub>, un Fd, un Fv, un Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo de cadena sencilla; y un Fv unido por disulfuro (sdFv).
3. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo de la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo comprende polietilenglicol o un marcador detectable seleccionado de entre el grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto bioluminiscente, y un metal pesado.
4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-tau o el fragmento de unión a tau del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Un polinucleótido o polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos o secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo anti-tau o un fragmento de unión a tau del mismo de la reivindicación 1 o 2.
6. El polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5, que comprenden la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 173 y SEQ ID NO:174.
7. Un vector o vectores de expresión que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5 o 6.
8. Una célula huésped aislada que comprende el vector o vectores de expresión de la reivindicación 7 o el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5 o 6.
9. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo, comprendiendo el procedimiento:
  - 40 cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 en un cultivo celular, y  
aislar el anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo del cultivo celular.
10. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o la composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto humano que lo necesite, preferiblemente donde la tauopatía neurodegenerativa se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, demencia argirofílica granulosa, angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de motoneuronas no de Guam con ovillos neurofibrilares, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico.
11. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el diagnóstico in vivo de una tauopatía en un paciente humano que lo necesite.
12. Un procedimiento de diagnóstico o control in vitro del avance de una tauopatía neurodegenerativa,

comprendiendo el procedimiento:

- (a) medir el nivel de tau agregada o modificada patológicamente en una muestra obtenida del sujeto humano con el anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 mediante  
5 inmunohistoquímica (IHC), y
  - (b) comparar el nivel de tau modificada o agregada con un patrón de referencia que indique el nivel de la tau modificada o agregada patológicamente en uno o más sujetos de control,
- 10 donde una diferencia o similitud entre el nivel de tau agregada o modificada patológicamente y el patrón de referencia indica que el sujeto humano tiene una tauopatía neurodegenerativa.

**Figura 1**

**A)** NI-105.4E4-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH, SEQ ID NO:9)

```

--FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSHNYATLY
-----FR3-----CDR3-----JH-----
AASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGLTVTVSS
    
```

NI-105.4E4-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL, SEQ ID NO:11)

```

--FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQKPGQAPVLVIYKDTERPSGIPERFS
LPV
-----CDR3-----JK-----
GSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCLSDNSATWVFGGGTKVTVL
    
```

**B)** NI-105.24B2-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH, SEQ ID NO: 13)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFVNYIIHWVRQAPGQGLEWMGIINPNGGNTSYAE
E
-----FR3-----CDR3-----JH-----
KFQARVTLTSDTSTSTVYMDLSSLTSEDTAVYYCAVLSPSNPWGQGTTVTVSS
    
```

NI-105.4E4-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL, SEQ ID NO: 15)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
SYELTQPPSVSVSPGQTAGITCSGDALPKQFVYWYQKKPGQAPVLLIYKDTERPSRIPERFS
V
-----CDR3-----JK-----
GSTSGTTVALTINGVQAEDEADYYCQADRSGALWVFGGGTKLTVL
    
```

**C)** NI-105.4A3-VH (secuencia variable de la cadena pesada VH, SEQ ID NO: 17)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMHWVRQAPGKGLQWVAVISYEGTYKYAD
E      T
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVKGRFTISRDNKNTLNLMSSLRVEDTAVYFCVKARAFASGORSTSTVDPDYWGQGLTVTV
    
```

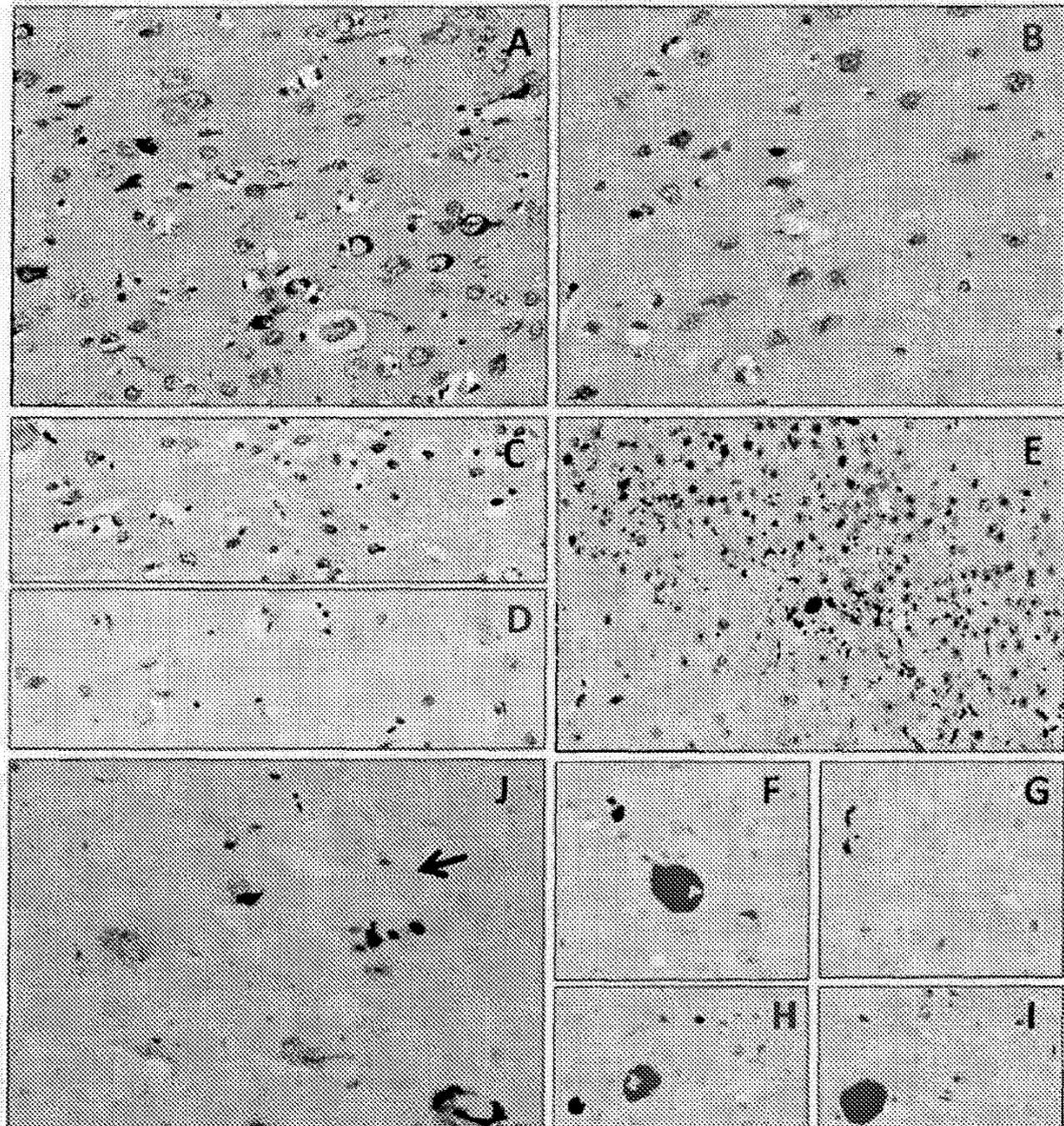
SS

NI-105.4A3-VL (secuencia variable de la cadena ligera VL, SEQ ID NO: 19)

```

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3-----
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQKSGQAPVLVIYEDNKRPSGIPERFS
-----CDR3-----JK-----
GSSSGTVATLTIISGAQVDDEADYYCYSTDISGDLRVFGGGTKLTVL
    
```

Figura 2



**Figura 3**

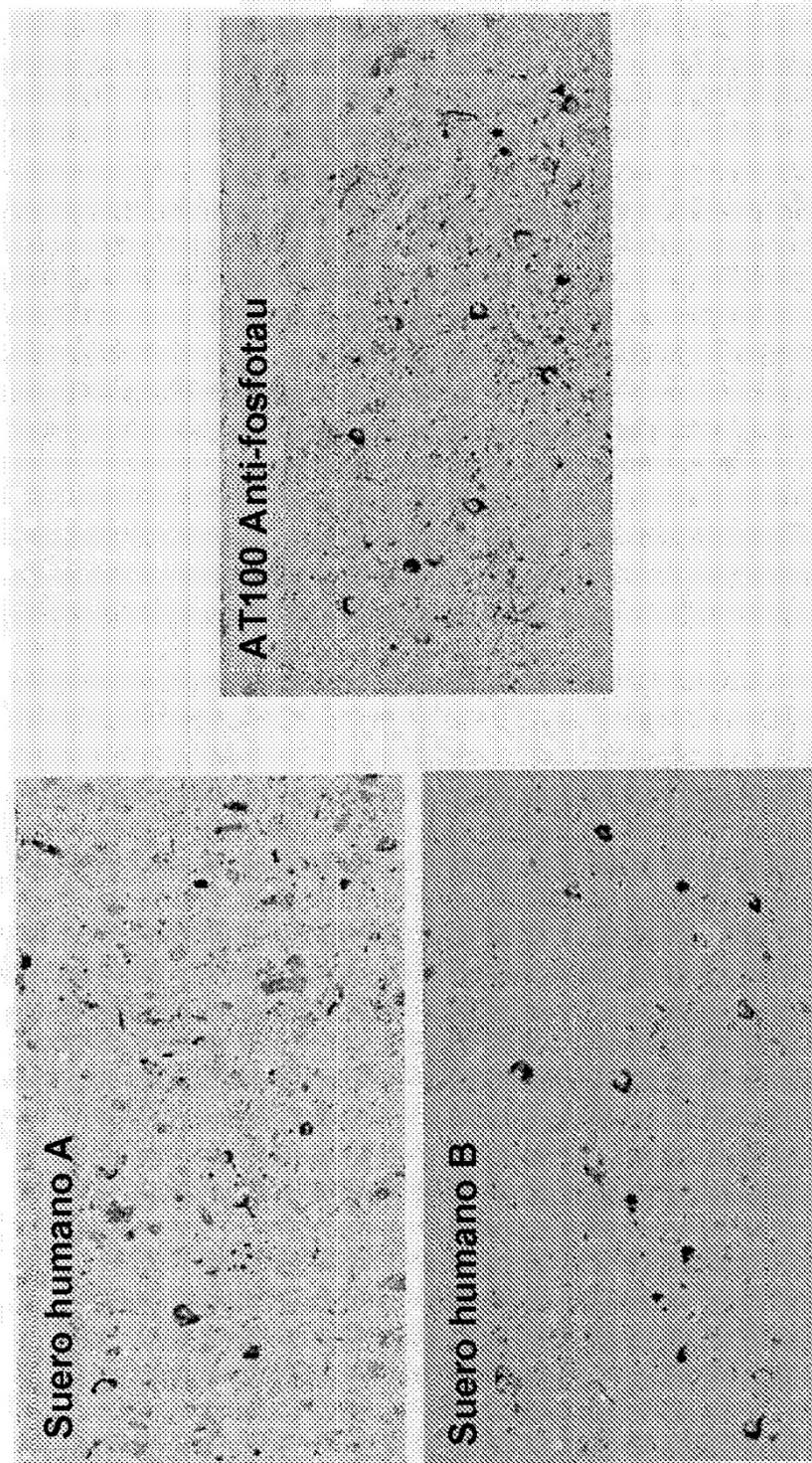


Figura 4

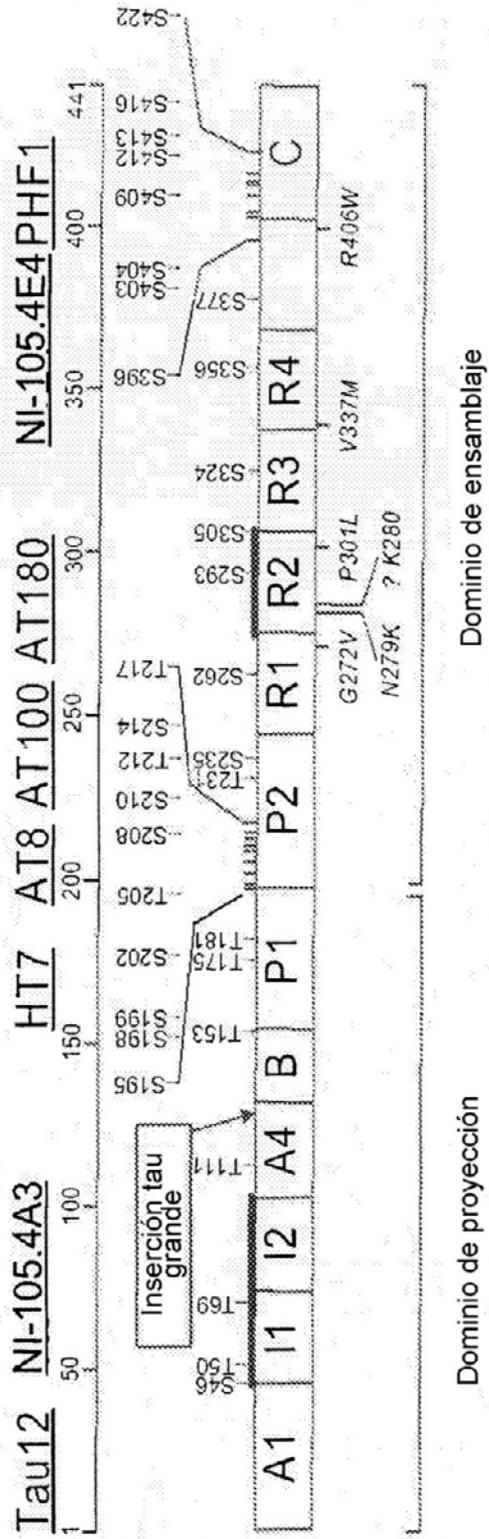


Figura 5

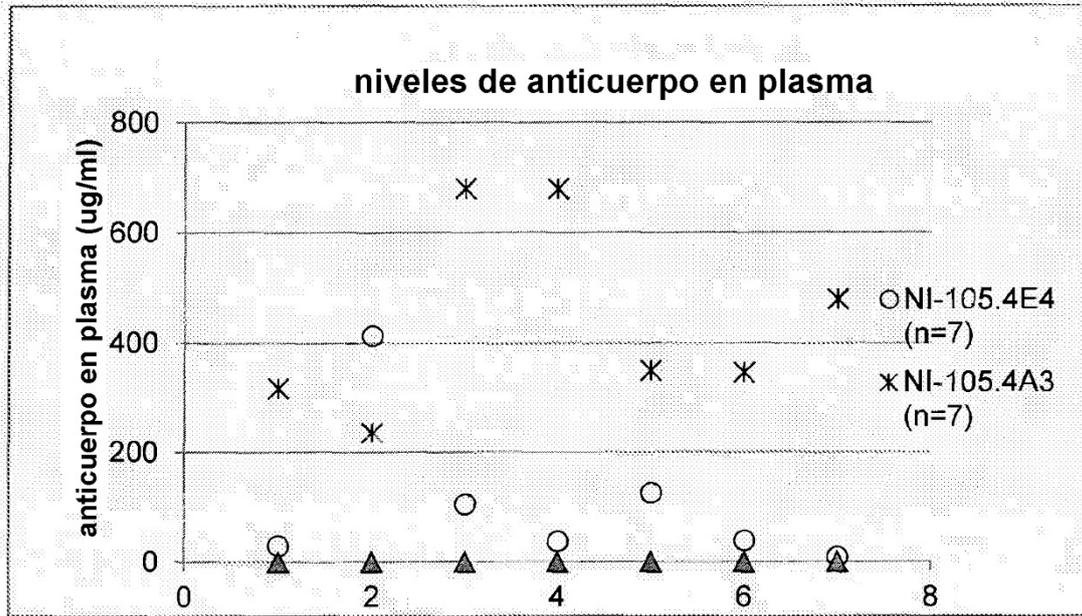
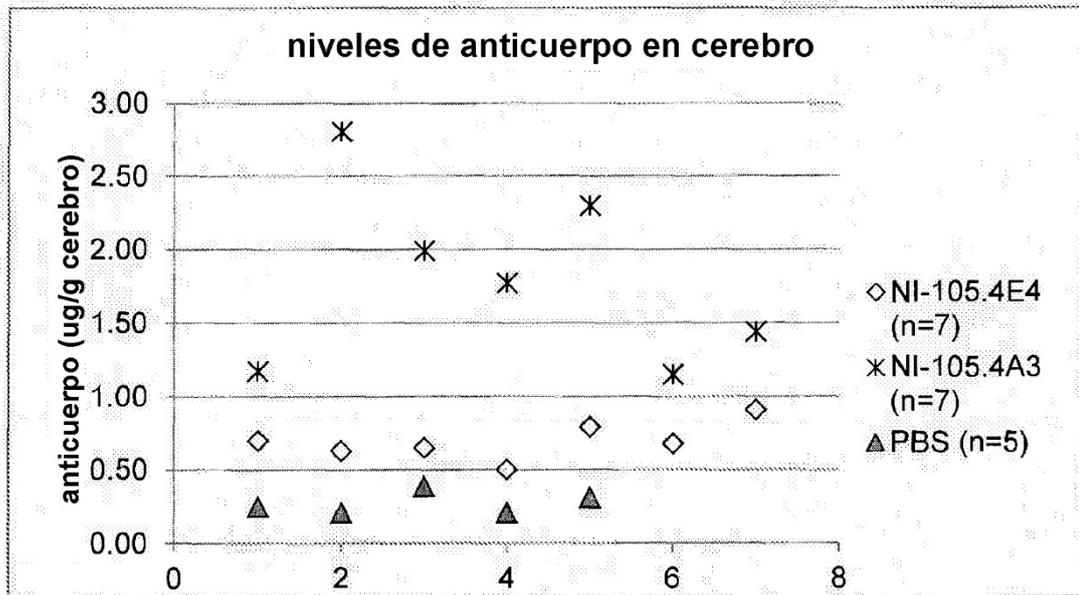


Figura 6



**Figura 7A-C**

**Fig. 7A**

**NI-105.17C1 VH (SEQ ID NO:44)**

EVQLVQSGAEVVKPGESLKISCKAFGYSFTNFWIGWVRQVPGKGLEWVGIIPGDSD  
TRYSPSFQGGQVTISADKSIDTAYLQWGHKASDSAMYFCARRGFWTGSQIEYWGQG  
TQVTVSS

**NI-105.17C1 VL (SEQ ID NO:46)**

QSALTQPPSASGSPGHSVTISCTGTSSDVGNYSFVSWYQQYPGKAPKVIIDVSKRS  
SGVPDRFFGSKSANTASLTVSGVQEEDEADYFCSSYGGSKYPWVFGGGTKLTVL

**Fig. 7B**

**NI-105.6C5 VH (SEQ ID NO:48)**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRVSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWF  
GSNEFYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGASVTTNAEN  
FHHWGQGTLTVSS

**NI-105.6C5 VL (SEQ ID NO:49)**

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKRYVYQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGI  
PETFSGSSSGTMATLTISGAQVEADYCYSTDSNGHHWVFGGGTKLTVL

**Fig. 7C**

**NI-105.29G10 VH (SEQ ID NO:50)**

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFDFSGYSMAWVRQAPGKGLEWWSYISGT  
VSGGTGTMYLDSVKGRFFISRDDATSSLYLQMDSLRDEDTAVYYCARVYDYGEDW  
GQGTLTVSS

**NI-105.29G10 VK (SEQ ID NO:51)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSRSVLYSSNSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTEFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYGTPRTFGGQTKVEIK

**Figura 7D-F**

**Fig. 7D**

**NI-105.6L9 VH (SEQ ID NO:52)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGTRFTFSTYAMGWVRQAPGRGLEWVSAIGGSG  
DSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGVYDYLWGSYRLF  
DYWGQGTLVTVSS

**NI-105.6L9 VL (SEQ ID NO:53)**

SYVLTQPPSVSVAPGQTARFTCGGNNIASKSVHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPS  
RIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSTSDHVVFGGGTKLTVL

**Fig. 7E**

**NI-105.40E8 VH (SEQ ID NO:54)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPNYVMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSG  
GSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTALYYCAKGGGIRGQGMVT  
VSS

**NI-105.40E8 VL (SEQ ID NO:55)**

QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNYVSWHQHPGKAPKLLIYDVKR  
PSGVPDRFSGSKSGNTAALTISGLQAEDEADYYCHSYVGSYTLVFGGGTKLTVL

**Fig. 7F**

**NI-105.48E5 VH (SEQ ID NO:56)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKA  
NSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSPVTTEWVGQ  
TLVTVSS

**NI-105.48E5 VK (SEQ ID NO:57)**

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKDYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVSDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPITFGQGRLEIK

**Figura 7G-I**

**Fig. 7G**

NI-105.6E3 VH (SEQ ID NO:58)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCIGSSGMTFSSYAFNWVRQTPGKGLEWSSISRFG  
STVDYTDVSRGRFTISRDDGQRSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRSTASGSRSPGIIWG  
QGTTVTVSS

NI-105.6E3 VK (SEQ ID NO:59)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIVNNLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLOGG  
VPSKFSGSASGTDFTLTISNLQPEDFATYFCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK

**Fig. 7H**

NI-105.22E1 VH (SEQ ID NO:60)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS  
DTRYSPSYQQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTGMYYCARVAGDIGYENYYYYG  
MDVWGQGTTVTVSS

NI-105.22E1 VK (SEQ ID NO:61)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYGSNNKNYLAWYQQKLGQSPKLLIYWA  
SARESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPWTFGQGTKVEIK

**Fig. 7I**

NI-105.26B12 VH (SEQ ID NO:62)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTRYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYD  
GTNKYYADSLQGRFTISRDTSTNTLYLQMNGLRVEDRAVYYCAREGFQGAIDYWGQ  
GTLVTVSS

NI-105.26B12 VK (SEQ ID NO:64)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNILYSSDNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSIPRTFGQGTKVEIK

**Figura 7J-L**

**Fig. 7J**

**NI-105.12E12 VH** (SEQ ID NO:65)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFSFSDSAFHVARQASGKGLEWVGRIRSKG  
NNYATAYAASVKGRFTVSRDDSKNTTYLQMNSLKTDDTAIYYCTRQGPSYGGINWG  
LGTLVTVSS

**NI-105.12E12 VK** (SEQ ID NO:66)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTILYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAS  
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLRAEDVAVYYCQQYYSSPQTFGQGTKVEIK

**Fig. 7K**

**NI-105.60E7 VH** (SEQ ID NO:67)

EVQLVESGGGFVRRPQGSITLSCATSGFTFTKAWMTWVRQAPVKGLEWIGHIKTRIEG  
ATDYAAPVEGRFTISRDDSKNMVYLQMNSLKTEDSGIYYCSTDFDYWGQGLVTV  
SS

**NI-105.60E7 VK** (SEQ ID NO:68)

DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCTSSQSLLYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLMYKV  
SKRDPGVPDRFSGSGSGTDFTLSISRVEAEDVGVYYCMQGS�WPRYTFGQGTKVEI  
K

**Fig. 7L**

**NI-105.14E2 VH** (SEQ ID NO:69)

EVQLVQSGAEVKKPGDSLRIKASGYNFPNYWIGWVRQMPGKGLEWVGMIIYPGDS  
DIRYSPSFQGHVTISSDKSITTAYLQWTS�KVADSAMYVCARVERPDKGGWFGPWG  
QGLVTVSS

**NI-105.14E2 VK** (SEQ ID NO:70)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLYTSNNQNYLAWYQHKPGQPPKVLIIYWA  
STREYGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVAVYYCQQYYNSPYTFGQGTKLEIK

**Figura 7M-O**

**Fig. 7M**

**NI-105.39E2 VH** (SEQ ID NO:71)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMNWVRQAPGKGLEWVAHITGSG  
TPIFYADSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRNDDTALYFCVRGTVDYWGQGLTVT  
SS

**NI-105.39E2 VL** (SEQ ID NO:72)

QAGLTQPPSVSKDLRQTATLTCSGNSNNVGNQGAAWLQQFPGHPPKLLFYENINRP  
SGISERFSASRSGNTASLTITGLQPEDEADYCSAWDGHLNAWVFGGGTKLTVL

**Fig. 7N**

**NI-105.19C6 VH** (SEQ ID NO:73)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYFISYWVGWVRQMPGKGLEWMGIYPGDS  
DTRYSPSFEGQVSISADKSISTAYLQWTSLKASDTAMYCARHWGPAAVTDSSPWFG  
PWGQGLTVTVSS

**NI-105.19C6 VK** (SEQ ID NO:74)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYTSNNKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWA  
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHYYSTPFTFGPGTKVDIK

**Fig. 7O**

**NI-105.9C4 VH** (después de las correcciones de una mutación inducida por un cebador) (SEQ ID NO:76)

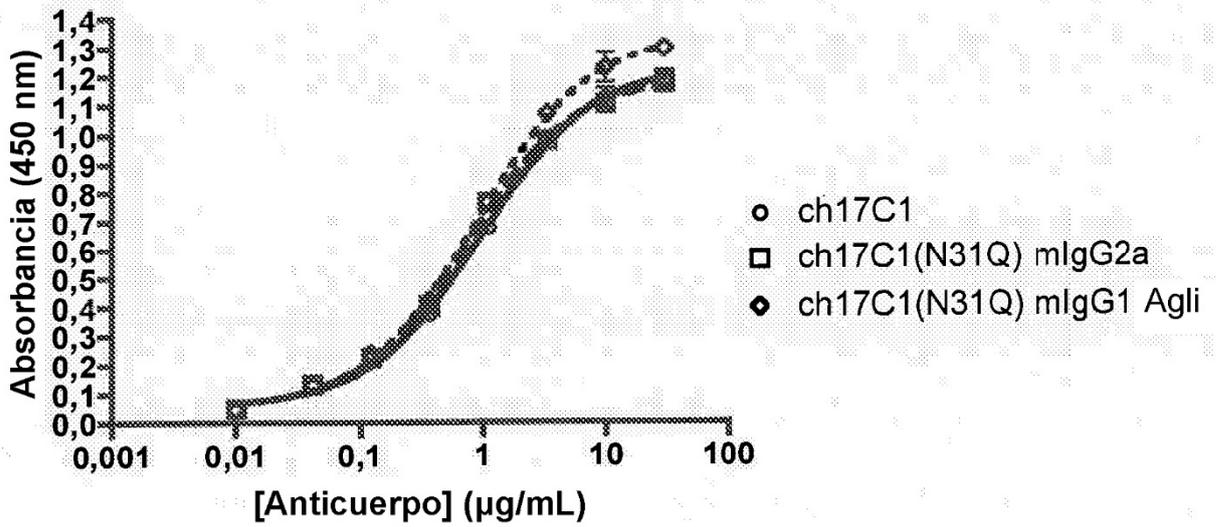
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAFFMHWVRQAPGQGLEWMGWINPDS  
GATKYAHNFQGRVTMTRDSISTAFMELSGLSDDTGVYYCATGMAVTGNFWGQ  
GLTVTVSS

**NI-105.9C4 VL** (después de las correcciones de una mutación inducida por un cebador) (SEQ ID NO:78)

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAETYARWFQKPGQAPVLVMYRDRERPAG  
IPERFSGSSSGNTVTLTISGAQAEDEAVYHCHSVADNNLDWVFGGGTKLTVL

Figura 8A-B

A)



B)

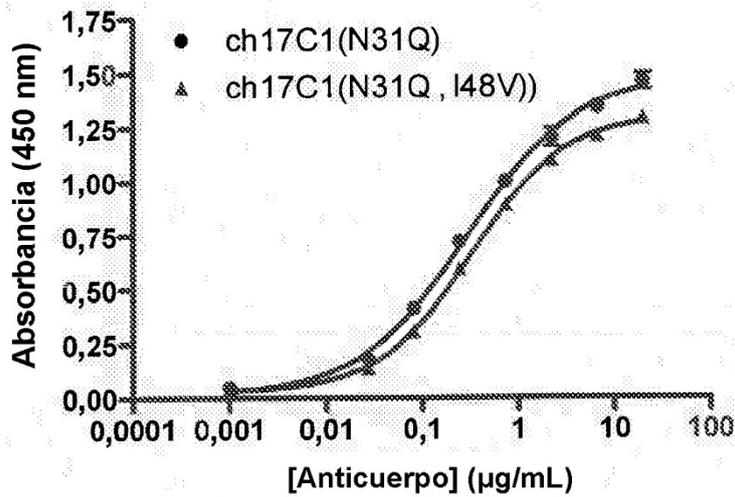


Figura 9

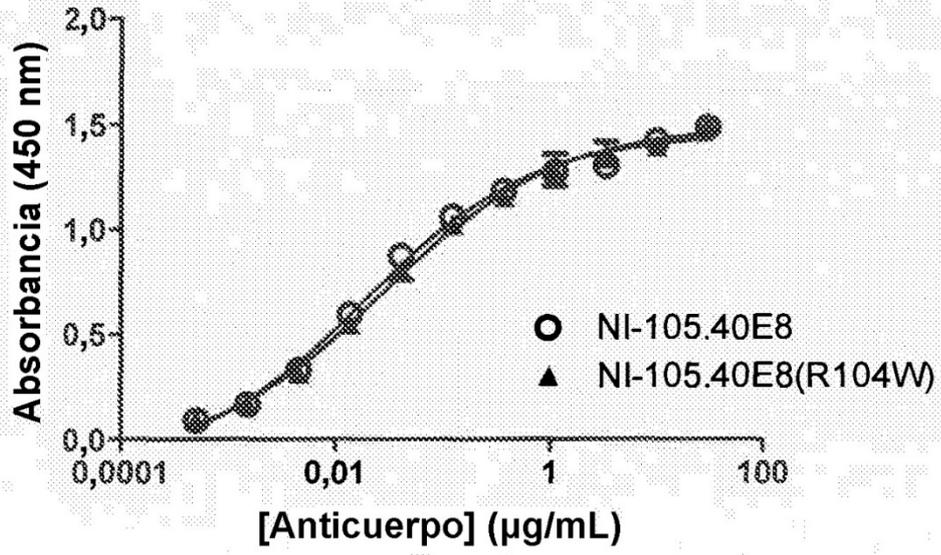


Figura 10

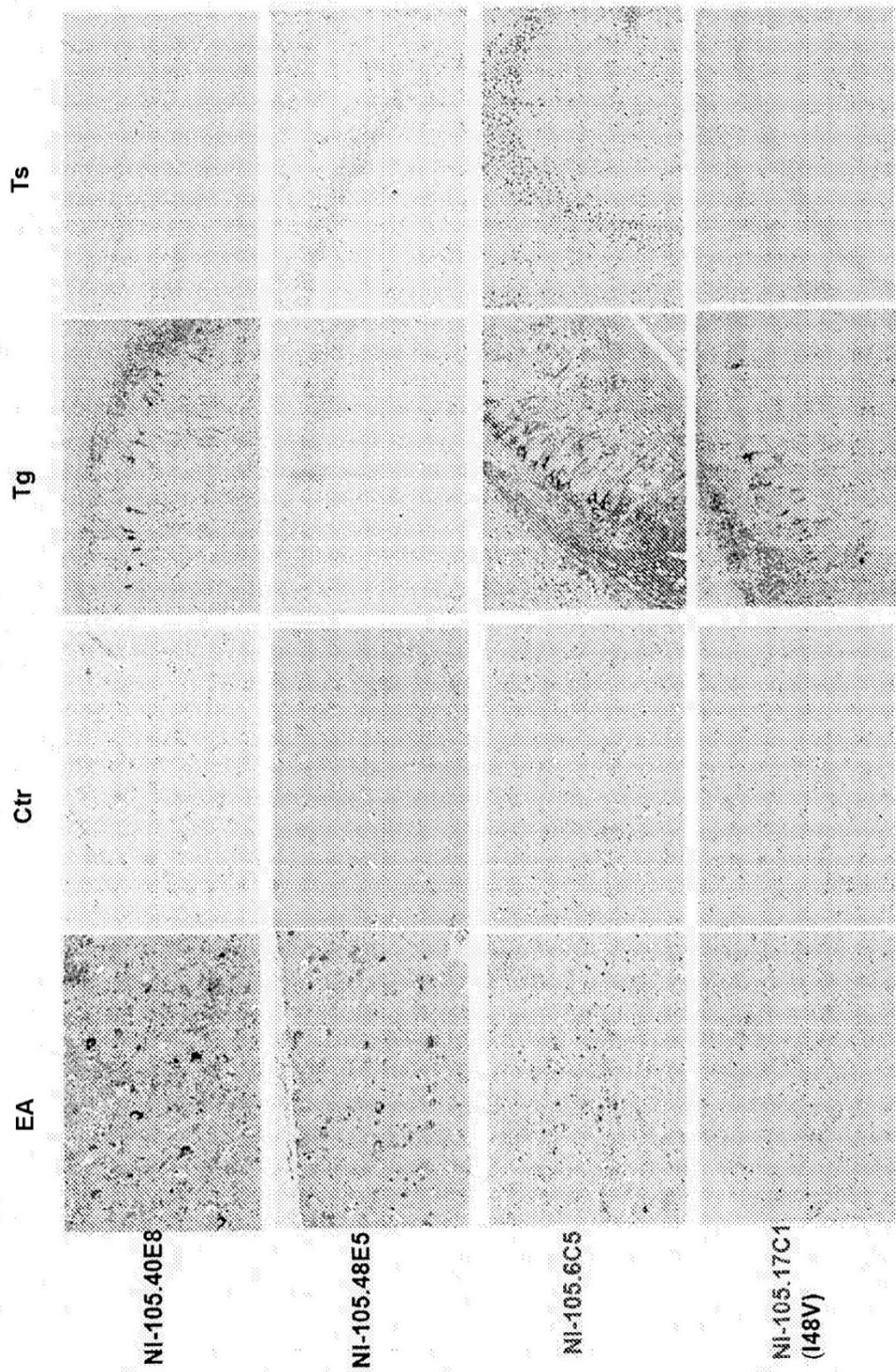


Figura 11

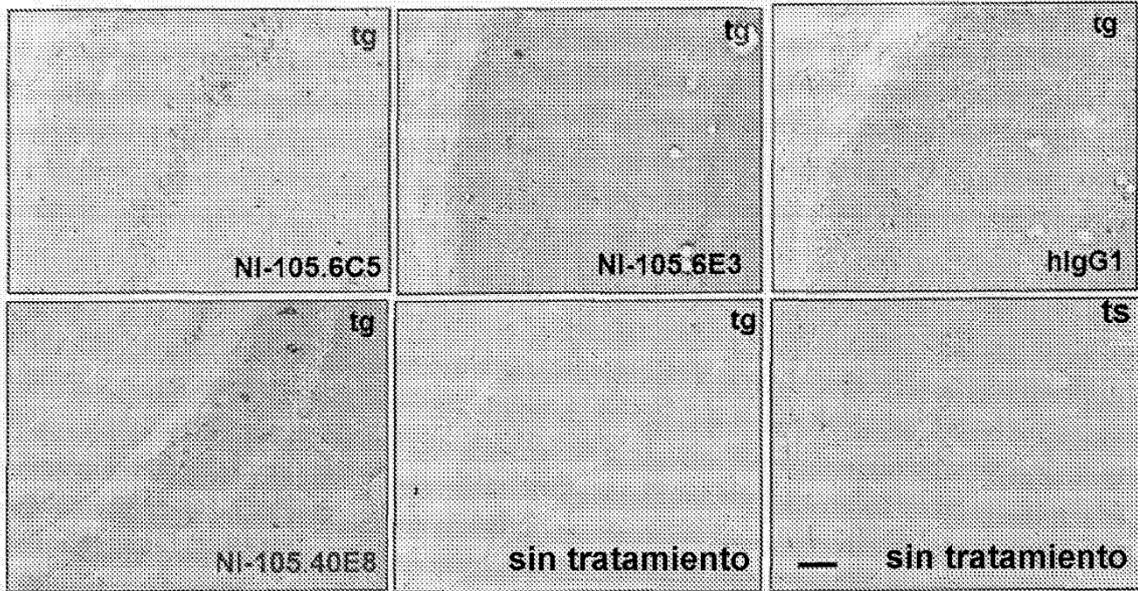


Figura 12A-C

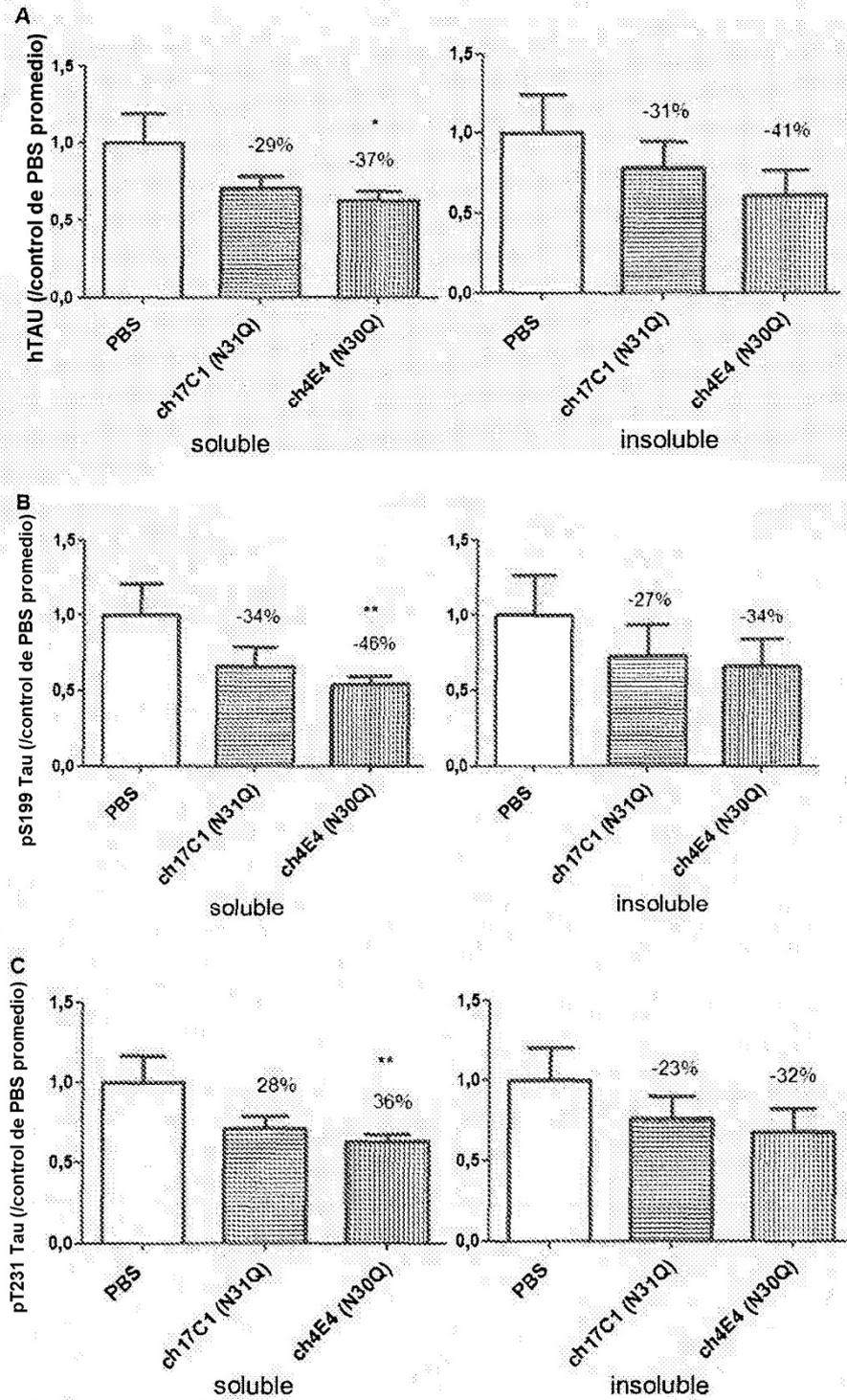
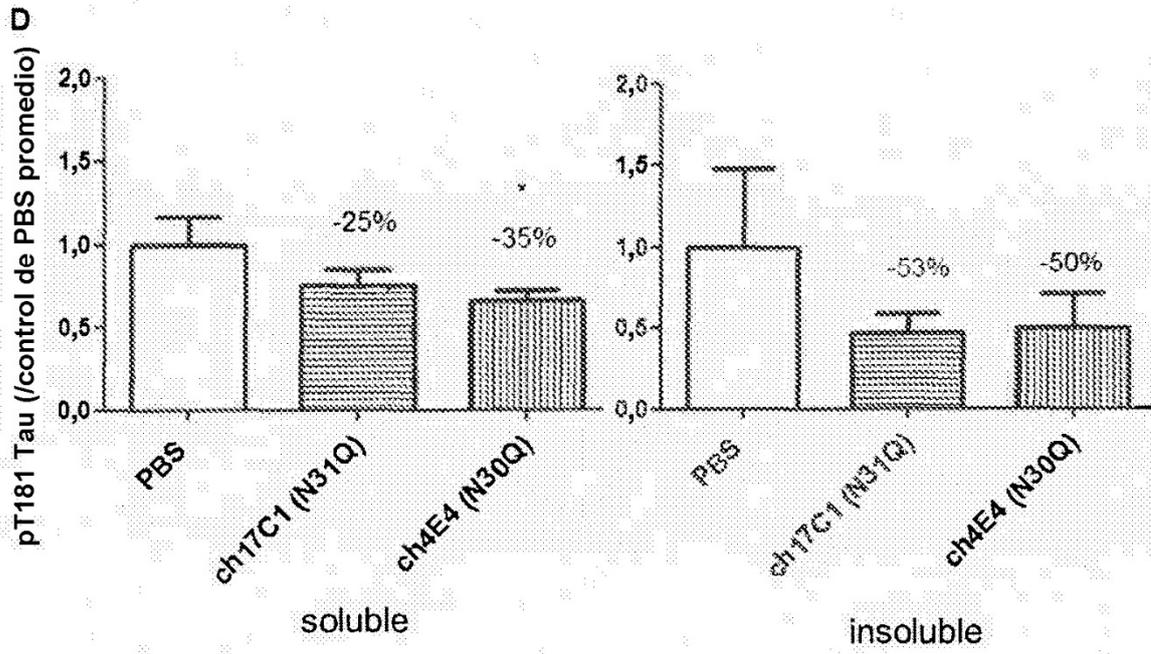
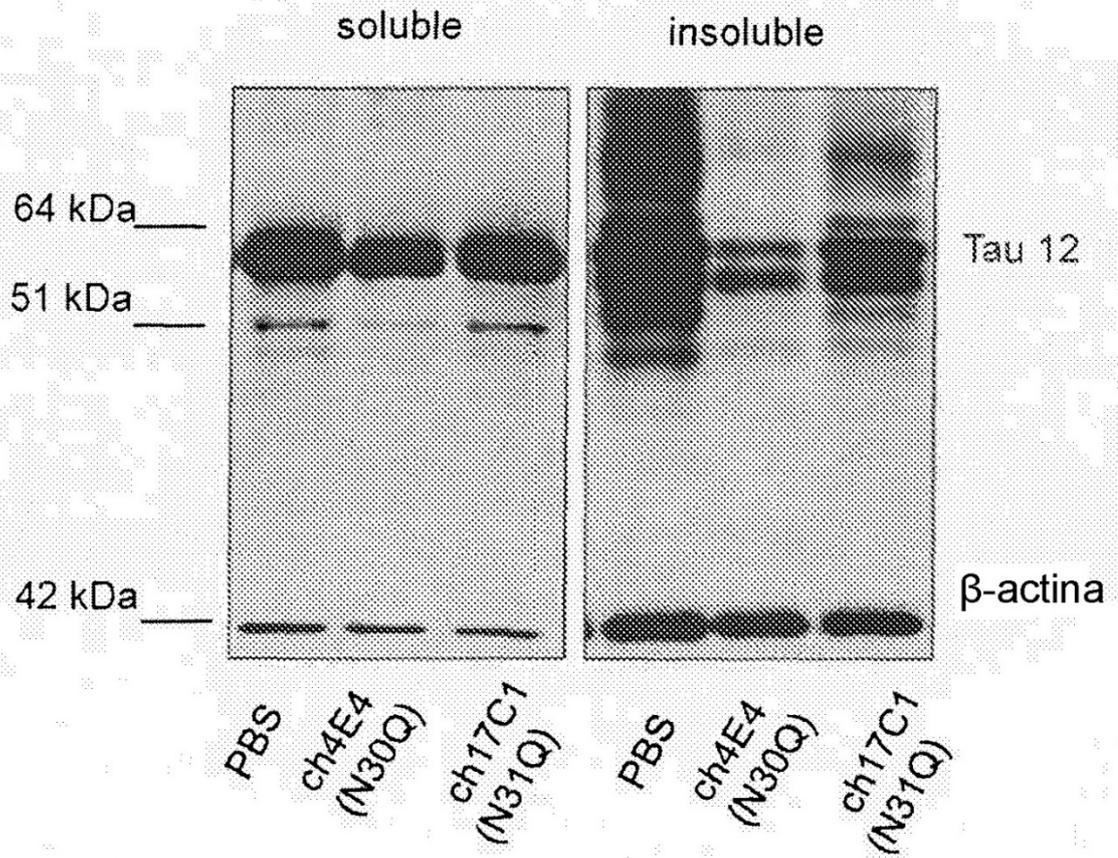


Figura 12D



**Figura 13**



**Figura 14**

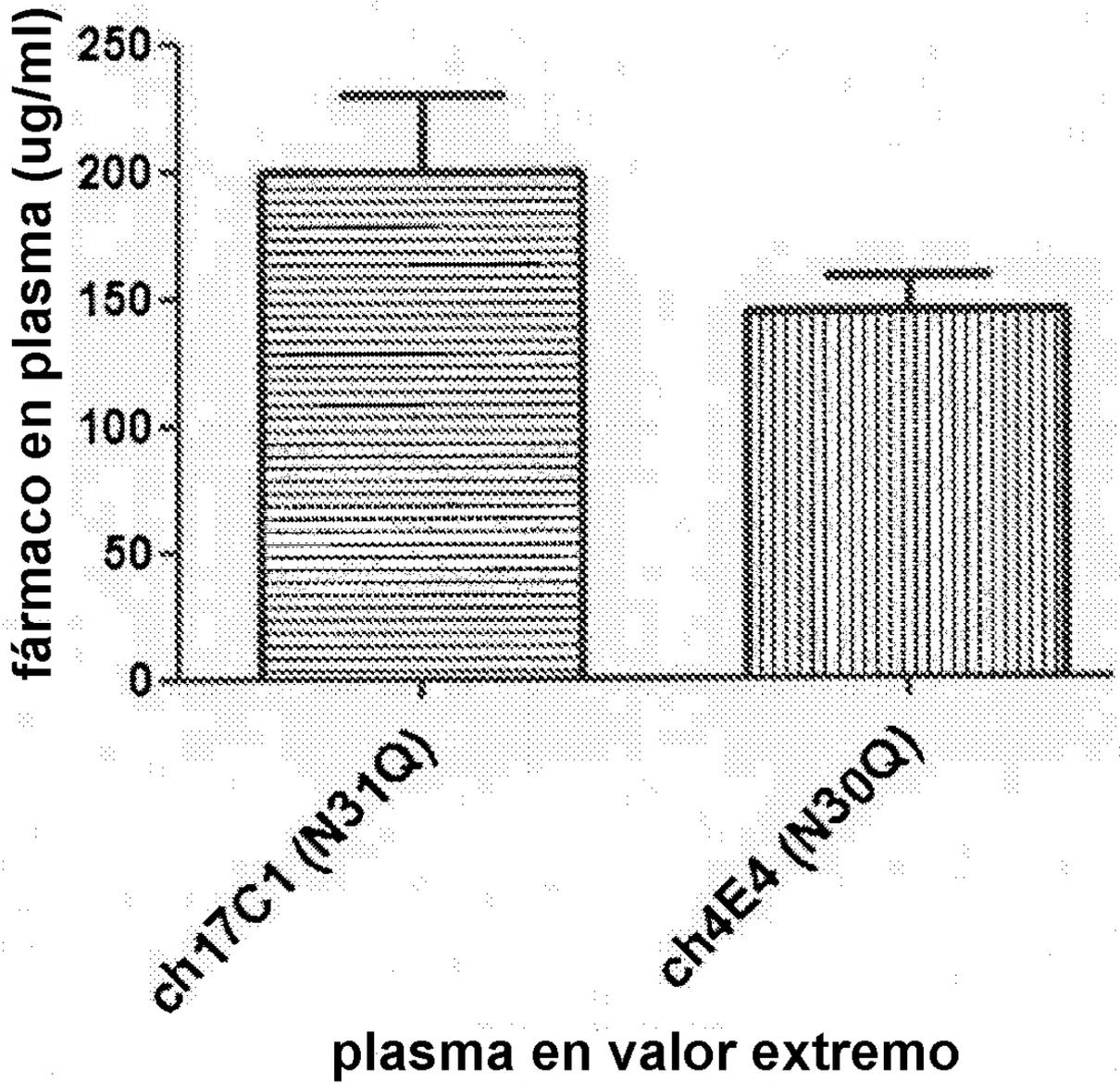


Figura 15

