

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 550**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2011 PCT/IB2011/002786**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11797115 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2627672**

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

30 Prioridad:

11.10.2010 US 391751 P
11.10.2010 EP 10013494

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.10.2018

73 Titular/es:

**BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE
GMBH (50.0%)**
Landis + Gyr-Strasse 3
6300 Zug, CH y
UNIVERSITY OF ZURICH (50.0%)

72 Inventor/es:

CHEN, FENG;
GRIMM, JAN;
BAERISWYL, JEAN-LUC;
NITSCH, ROGER y
HOCK, CHRISTOPH

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 686 550 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 nuevos anticuerpos humanos específicos de tau, así como a
 10 fragmentos 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 dichos anticuerpos y fragmentos 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
 15 tratar tauopatías neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral
 amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia (ALS-PDC), demencia argirofílica granulosa (AGD), angiopatía
 amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de
 Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down,
 demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP-17),
 degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, enfermedad de Hallervorden-
 20 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 (PiD),
 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 confórmers tau hiperfosforilados,
 30 son una característica distintiva de las tauopatías y se correlacionan con la gravedad de las enfermedades.

Tau es una proteína asociada a microtúbulos expresada en el sistema nervioso central con la 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,
 35 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 - son 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 informado
 40 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 et al., 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 β se encuentra aguas arriba de tau (Götz et al.,
 Science 293 (2001), 1491-1495). Sin embargo, otro hallazgo apunta a un modelo de doble ruta donde ambas
 45 cascadas funcionan independientemente entre sí (van de Nes et al., 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
 50 adicionales para la EA (Holmes et al., Lancet 372 (2008), 216-223; Boche et al., 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 encontró 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 et al., Arch
 55 Neurol. 63 (2006), 1459-1467). Estudios posteriores en líneas de ratones transgénicos usando vacunación activa
 con péptidos tau fosforilados 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
 et al., Exp. Neurol. 224 (2010), 472-485). Estos hallazgos destacan el potencial beneficio pero también los enormes
 riesgos asociados con los enfoques de inmunoterapia activa dirigidos a tau. Se necesitan urgentemente estrategias
 60 terapéuticas novedosas que aborden las proteínas tau patológicas con una terapia eficaz y segura.

El documento WO 03/014960 A2 describe anticuerpos monoclonales anti-tau scFv aislados de una genoteca de
 fragmentos de anticuerpos humanos (scFv) expresados en fagos (biblioteca de presentación de fagos scFv) para
 uso intracelular.

65

El documento WO 98/22120 A1 describe un procedimiento para aislar anticuerpos anti-tau, que comprende el

cribado de anticuerpos que se unen a péptidos tau recombinantes normales, tau adulto, tau fetal, PHF-tau, fosforilados y no fosforilados derivados de autopsia.

- 5 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.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

- 10 La presente invención se define por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. 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 por los inventores tuvieron éxito en el aislamiento de anticuerpos monoclonales específicos de tau de un grupo de sujetos humanos sanos sin señales de tauopatía neurodegenerativa.

- 15 Por lo tanto, la presente invención se refiere a anticuerpos humanos, fragmentos de unión al antígeno y moléculas de unión al antígeno similares, como se caracterizan en las reivindicaciones, 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
20 agregada o patológicamente modificada. En el presente documento se proporcionan anticuerpos humanos selectivos para las formas de longitud completa, patológicamente fosforiladas y agregadas.

- En una realización particular de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo demuestra las características de unión inmunológicas de un anticuerpo caracterizado por las regiones
25 variables V_H y/o V_L tal como se expone en la Fig. 1.

- El fragmento de unión al antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento F_v monocatenario, un fragmento $F(ab')$, un fragmento $F(ab)$ y un fragmento $F(ab')_2$, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno. En una realización específica, más adelante, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo de isotipo IgG humano. Como
30 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, y a procedimientos inmunoterapéuticos y de inmunodiagnóstico que usan dichas
35 composiciones para su uso en la prevención, diagnóstico o tratamiento de una tauopatía, donde una cantidad eficaz de la composición se administra a un paciente que lo necesita.

- Naturalmente, la presente invención se extiende al linfocito B de memoria humano inmortalizado y el linfocito B, respectivamente, que produce el anticuerpo que tiene las características distintas y únicas que se definen a
40 continuación.

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

- Por consiguiente, la presente invención también incluye vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células
45 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. Los medios y procedimientos para la producción recombinante de anticuerpos e imitaciones de los mismos, así como procedimientos para cribar moléculas de unión competitivas, que pueden ser anticuerpos o no, se conocen en la técnica. Sin embargo, como se describe en el presente documento, en particular con respecto a las aplicaciones terapéuticas en seres humanos, el anticuerpo de la presente invención
50 es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta inmune dirigida contra dicho anticuerpo observada de otro modo para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

- Además, en el presente documento se describen composiciones y procedimientos que pueden usarse para
55 identificar tau en muestras. Los anticuerpos anti-tau descritos pueden usarse para cribar 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 que se describen en el presente documento pueden ayudar en tauopatías neurodegenerativas tales como el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y pueden usarse para controlar la progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica.

- 60 Por lo tanto, es un objeto particular de la presente invención proporcionar un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo, para su uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de una tauopatía neurodegenerativa tal como enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica/complejo 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
65 Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el 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 postencefalítico, 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.

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

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

15 FIG. 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 marco (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 de acuerdo con 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.

20 FIG. 2. Las placas ELISA se recubrieron con tau humano recombinante (isoforma hTau40) a 1 µg/ml y se incubaron con las concentraciones indicadas de anticuerpo NI-105.4E4. El anticuerpo recombinante derivado de humano NI-105.4E4 se une a la tau recombinante con alta afinidad a EC₅₀ 2 nM.

25 FIG. 3. PHFTau y hTau40 recombinante se resolvieron por SDS-PAGE de gradiente seguido de análisis de Western Blot. Las transferencias se incubaron con anticuerpos primarios NI-105.4E4 (humanos) o anticuerpo Tau12 monoclonal de ratón, seguido de anticuerpos secundarios conjugados por HRP. El anticuerpo tau humano recombinante NI-105.4E4 se une a hTau40 recombinante, así como isoformas de tau patológicamente modificada (PHFTau) extraídas de un cerebro con EA mediante análisis Western blot.

30 FIG. 4. Mapeo del epítipo de unión a NI-105.4E4 en hTau40. Tecnología PepSpot (JPT): Dos grupos de manchas de péptidos adyacentes (péptido 83, 84 y 85; péptido 96 y 97) se identificaron específicamente por NI105.4E4 (A y A'), en comparación con el anticuerpo de detección solamente (B). El anticuerpo de detección IgG de cabra anti-humano conjugado con HRP solo produce una fuerte señal en una única mancha (péptido 50) pero no detecta los péptidos 83, 84, 85, 96 y 97. Barrido de alanina: (C) Las manchas #35-50 y #51-68 contienen los péptidos originales (manchas #35 y #51) y sus variantes sustituidas (#36-50 y #52-68) (D y E) Secuencia de aminoácidos de los péptidos originales y sustituidos (#35-50 y #51-68). El barrido de alanina sugiere que los residuos V339, E342, D387, E391 y K395 contribuyen a la unión de NI-105.4E4.

35 FIG. 5. Confirmación de que el anticuerpo NI-105.4E4 recombinante humano se une específicamente a un péptido tau que correspondiente a los aminoácidos 333-346 de hTau40.

40 FIG. 6. NI-105.4E4 se une a ovillos neurofibrilares (NFT), neuritas distróficas e hilos del neurópilo en cerebro con EA y ratones que expresan TauP301L humano. La tinción de NI105-4E4 identifica NFT 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 TauP301L (E-I) NI-105.4E4 se une fuertemente a la tau patológica similar a NFT (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 NFT, 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 solo no da señales tanto a EA humana (C) como un control sano (D).

45 FIG. 7. Las placas ELISA se recubrieron con tau humano recombinante (hTau40) a 3 µg/ml y se incubaron con las concentraciones indicadas de anticuerpo NI-105.24B2. El anticuerpo recombinante derivado de humano NI-105.24B2 se une a hTau40 con alta afinidad a EC₅₀ 6 nM.

50 FIG. 8. PHFTau y hTau40 recombinante se resolvieron por SDS-PAGE de gradiente seguido de análisis de Western Blot. Las transferencias se incubaron durante una noche con anticuerpos primarios NI-105.24B2 (humanos), seguido de IgG anti-humano conjugado con HRP. El anticuerpo tau humano recombinante NI-105.24B2 se une a hTau40 recombinante, así como isoformas de tau patológicamente modificada (PHFTau) extraídas de un cerebro con EA mediante análisis Western blot.

55 FIG. 9. Ensayo de inmunoreactividad sobre el amiloide de placas tisulares (TAPIR) - El suero aislado de sujetos ancianos se añadió a secciones del cerebro con EA histológicas. En comparación, se realizó una tinción inmunohistológica con el anticuerpo AT100 anti-fosfo-tau comercialmente disponible. Los ovillos neurofibrilares se tiñeron en la tinción de control con anticuerpo AT100 anti-fosfo-tau al someterse a sueros aislados, demostrando la presencia de especies de anticuerpo reactivo a ovillos neurofibrilares en los sueros analizados.

60

65

FIG. 10. El anticuerpo humano recombinante NI-105.4A3 se une específicamente a tau humana mediante ELISA. No se observa ninguna unión a BSA.

FIG. 11. Se muestran 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 epítopo 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 et al., Science 293 (2001), 1487-1491).

FIG. 12. Las placas ELISA se recubrieron con tau humano recombinante (hTau40, 1 ug/ml), PHFTau (1:100) y preparación de control (1:100), y se incubaron con la concentración indicada de NI-105.4A3. 4A3 se une a rTau con EC50 1,4 nM, a PHFTau con EC50 1,2 nM.

FIG. 13. Mapeo del epítopo de unión a NI-105.4A3 en hTau40. (A) Representación esquemática de los cuatro dominios hTau40 en superposición (dominio I (AA 1-158), dominio II (AA 136-258), dominio III (AA 235-373) y dominio IV (AA 355-441)) usados. (B) NI-105.4A3 se une únicamente al dominio I de tau y al polipéptido hTau40 de longitud completa. (C) El análisis Western blot confirma la unión específica de NI-105.4A3 al dominio I de tau.

FIG. 14. Mapeo del epítopo NI-105.4A3 con tecnología PepSpot (JPT) (A) y barrido de alanina (B y C).

FIG. 15. Unión de ch4E4 y variantes a tau recombinante (ELISA).

FIG. 16. Niveles de IgG humana en el plasma de ratones tras la administración intraperitoneal de 30 mg/kg de anticuerpo anti-tau humano 4E4 o 4A3.

FIG. 17. Niveles de IgG humana en homogeneizado de cerebro de ratones tras la administración intraperitoneal de 30 mg/kg de anticuerpo anti-tau humano 4E4 o 4A3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Definiciones

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 hiperfosforilado 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 vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17). Debido a la heterogeneidad de sus manifestaciones clínicas, se puede proporcionar una lista potencialmente no exhaustiva de enfermedades tautopáticas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica/complejo 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 relacionado con el 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 supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia solo con ovillos, demencia por infarto múltiple, e ictus isquémico; véase, para una revisión, por ejemplo, Lee et al., Annu. Rev. Neurosci. 24 (2001), 1121-1159 en cuya Tabla 1 catalogan los únicos miembros de tauopatías, o Sergeant et al., Bioch. Biophys. Acta 1739 (2005), 179-97, con una lista en la Figura 2 en la misma.

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

Isoforma Fetal-tau de 352aa

ES 2 686 550 T3

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAE EAGIGD
TPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTR
EPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV
QIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNIT
HVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSNV SSTGS
IDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL (SEQ ID NO:1)

Isoforma Tau-B de 381aa

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTG
SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKGGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSG
DRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV
PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPG
GGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNITHV PGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTD
HGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSNV SSTGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL
(SEQ ID NO:2)

5

Isoforma Tau-C de 410aa

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQP HTEIPEGTTAE EAGI
GDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP G
QKGGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTP
PTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG
KVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLD
NITHV PGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSNV SS
TGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQGL (SEQ ID NO:3)

10

Isoforma Tau-D de 383aa

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAE EAGIGD
TPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLTPPTR
EPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV
QIINKKLDLSNVQSKCGSKDN IHHV PGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHH
KPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNITHV PGGGNKKIETHK LTFRENAKA
KTDHGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSNV SSTGSIDMVDS PQLATLADEV SASLAKQ
GL (SEQ ID NO:4)

15

Isoforma Tau-E de 412aa

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVVTQARMVSKSKDGTG
 SDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQKGGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKPKS
 GDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPV
 PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPG
 GGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSL
 DNITHVPGGGNKKIETHKLTFRNAKAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRHLNSV
 STGSIDMVDSPQLATLADEVASLAKQGL (SEQ ID NO:5)

Isoforma Tau-F de 441aa

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEAEAGI
 GDTPSLEDEAAGHVVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPQ
 QKGGQANATRIPAKTPPAPKTPSSGEPKPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPT
 PTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG
 KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNI
 HHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRNA
 KAKTDHGAEIVYKSPVVSVDTSRHLNSVSTGSIDMVDSPQLATLADEVASLA
 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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10 85 (1988), 4051-4055, Goedert et al., EMBO J. 8(1989), 393-399, Goedert et al., EMBO J. 9 (1990), 4225-4230y 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 potenciales sitios 15 de fosforilación de serina (Ser) y treonina (Thr). Tau es altamente fosforilada durante el desarrollo cerebral. El grado de fosforilación disminuye en la adultez. 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 anormales (PHF), un 20 componente principal de los ovillos neurofibrilares (NFT) en el cerebro de pacientes con EA. Los PHF 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 PHF 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 "tau-patología", "tautopatología" o "patología 25 relacionada con tau". Para una descripción más detallada de características neuropatológicas de tauopatías véase Lee et al., 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 et al., J. Biol. Chem. 281 (2006), 1205-1214). Las especies 30 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 (NFT) en varias tauopatías, tales como enfermedad de Alzheimer (EA), demencias frontotemporales, parálisis supranuclear, enfermedad de Pick, enfermedad argirofílica granular (AGD), degeneración corticobasal, FTDP-17, enfermedad de Parkinson, demencia pugilística (Revisado en Gendron y Petrucelli, Mol. 35 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 et al., 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 transferir entre células co-cultivadas (Frost et al., 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 tiene una función crucial en el daño neuronal y patofisiología clínica de trastornos neurovasculares, tal como ictus isquémico (Zheng et al., J. Cell. Biochem. 109 5 (2010), 26-29).

Los anticuerpos humanos anti-tau descritos en el presente documento se unen específicamente a tau y epítomos de la misma y a diversas conformaciones de tau y epítomos de la misma. Por ejemplo, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen específicamente a tau, tau en su longitud completa, isoformas de tau 10 patológicamente modificada y agregados de tau. Como se usa en el presente documento, 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 el presente documento puede unirse a tau o un epítomo de la misma y no mostrar ninguna unión por encima de aproximadamente 1,5 veces para otras proteínas. Un anticuerpo que "se une específicamente" o "se une selectivamente" a un confórmero 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 confórmero de tau. Por ejemplo, en el presente documento se describen anticuerpos que pueden unirse preferiblemente a formas agregadas de tau en tejido de EA. Debido a que los anticuerpos humanos anti-tau de la presente invención se han aislado de un conjunto de sujetos humanos sanos que presentaban una respuesta inmunitaria específica de tau, los anticuerpos tau de la presente invención también 20 pueden llamarse "autoanticuerpos humanos" para enfatizar que estos anticuerpos eran realmente expresados por los sujetos y no se han aislado de, por ejemplo, una biblioteca de fagos que expresa inmunoglobulina humana, lo que hasta ahora representaba un procedimiento común para intentar proporcionar anticuerpos de tipo humano.

Cabe destacar que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, se debe 25 entender que "un anticuerpo" representa uno o más anticuerpos. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" pretende incluir un único "polipéptido", así como varios "polipéptidos", y se refiere a una molécula compuesta por monómeros (aminoácidos) unidos de forma lineal 30 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 lo 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 forma intercambiable con, cualquiera de estos 35 términos.

El término "polipéptido" también pretende hacer referencia a los productos de modificaciones post-expresión del polipéptido, incluyendo, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural. Un 40 polipéptido puede derivar 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 mediante síntesis química.

Un polipéptido de la descripción puede tener un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o 45 más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 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 el presente documento, el término glucoproteína se refiere a una proteína acoplada al menos a un resto carbohidrato que está unido a la proteína a través de una 50 cadena lateral que contiene oxígeno o nitrógeno de un residuo de aminoácido, por ejemplo, un residuo de serina o un residuo de asparagina.

Por un polipéptido "aislado" o un fragmento, variante o derivado del mismo se refiere a un polipéptido que no está en 55 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 incluyen 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 60 retenga al menos algunas de las propiedades de unión al antígeno de la molécula de unión, anticuerpo o polipéptido nativos correspondientes. Los fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como también fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpo específicos descritos en otro punto 65

en el presente documento. 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, eliminaciones 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, eliminaciones 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 el presente documento "análogos de polipéptidos". Como se usa en el presente documento 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 por prolina, 5-hidroxilisina se puede sustituir por lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; homoserina se puede sustituir por serina; y ornitina se puede sustituir por lisina.

El término "polinucleótido" pretende incluir un único ácido nucleico, así como varios ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aisladas, 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 (PNA)). 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 natural. 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 transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con 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 el presente documento, 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 ribosoma, terminadores de transcripción, intrones y similares, no son parte de una región codificante. Dos o más regiones de codificación 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 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 una molécula de unión, un anticuerpo, un fragmento, variante o derivado de los mismos. 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 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 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 lo 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. 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 el presente documento se describen promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción.

Se conoce una diversidad de regiones de control de la transcripción por los expertos en la técnica. Estas incluyen,

- sin limitación, regiones de control de transcripción que funcionan en células vertebradas, tales como, sin limitación, 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 Rous sarcoma). Otras regiones de control de transcripción incluyen las derivadas de genes vertebrados tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y β -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).
- 10 De forma similar, se conoce una diversidad de elementos de control de traducción por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero sin limitación, sitios de unión a ribosoma, codones de iniciación y terminación de traducción, y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno, o IRES, también llamado secuencia CITE).
- 15 En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

Las regiones de codificación de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar asociadas con regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. De acuerdo con 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 técnica son conscientes de que los polipéptidos secretados por células vertebradas generalmente tienen un péptido de señal fusionado al extremo N-terminal del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o "de longitud completa" para producir un forma secretada o "madura" del polipéptido. En algunas 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 operativamente con el mismo. Como alternativa, se puede usar un péptido señal heterólogo de mamífero, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede estar sustituida por la secuencia líder de activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

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

Una "molécula de unión" como se usa en el presente documento, 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 sin limitación, hormonas, receptores, ligandos, moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (MHC), chaperonas tales como proteínas de choque térmico (HSP), así como moléculas de adhesión célula-célula tales como membranas de la cadherina, integrina, lectina tipo C y superfamilias de inmunoglobulina (Ig). Las siguientes realizaciones se analizan con respecto a anticuerpos y moléculas de tipo anticuerpo que representan una realización específica de moléculas de unión para el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a tau que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, 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 et al., *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 polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica reconocerán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre las mismas (por ejemplo, γ 1- γ 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 cada una de estas clases e isotipos son fácilmente distinguibles para el experto en la técnica en vista 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 23 000 Daltons, y dos polipéptidos idénticos de cadena pesada de peso molecular 53 000-70 000. Las cuatro cadenas están típicamente 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 (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede estar unida con 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, linfocitos B o células huésped
5 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.

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
10 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 (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren 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 del anticuerpo. La porción N-terminal es una
15 región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL en realidad comprenden el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se ha indicado anteriormente, la región variable permite al anticuerpo reconocer selectivamente y unirse específicamente epítomos en antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones
20 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 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 el presente documento de manera
25 intercambiable como "fragmento de anticuerpo" o "fragmento inmunoespecífico".

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
30 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 "marco" o "FR" relativamente conservadas que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación β -lámina y las CDR forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura β -lámina. Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar un andamiaje que proporciona el posicionamiento de las CDR en una orientación correcta mediante
35 interacciones no covalentes de intercatenarias. 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 marco, respectivamente, se pueden identificar fácilmente por un experto en la técnica para determinar cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada, debido a que se han definido con precisión; véase,
40 "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., 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 el presente documento pretende incluir todos estos significados, a menos que se indique
45 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 se ha descrito por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "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
50 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 el presente documento. 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 incluyen una CDR en particular variarán dependiendo de la secuencia y el
55 tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica 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.

Tabla 1: Definiciones de CDR¹

| | Kabat | Chothia |
|------------|--------------|----------------|
| CDR1 de VH | 31-35 | 26-32 |
| CDR2 de VH | 50-65 | 52-58 |
| CDR3 de VH | 95-102 | 95-102 |

| | Kabat | Chothia |
|---|--------------|----------------|
| CDR1 de VL | 24-34 | 26-32 |
| CDR2 de VL | 50-56 | 50-52 |
| CDR3 de VL | 89-97 | 91-96 |
| ¹ La numeración de las definiciones de todas las CDR de la Tabla 1 es según las convenciones de numeración establecidas en Kabat <i>et al.</i> (véase a continuación). | | |

Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que se aplica a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ninguna información experimental más allá de la propia secuencia. Como se utiliza en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "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 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. Por ejemplo, dependiendo de la posición de la primera CDR, las siguientes CDR pueden cambiar de dirección.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, multiespecíficos o humanos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fvs enlazados a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio V_L o V_H, fragmentos producidos mediante una biblioteca de expresión de Fab, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id). Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 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.

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.

En una realización particular, 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.

Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la región o regiones variables solas o junto 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 también comprenden cualquier combinación de una o más 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 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 conductivo (por ejemplo, de tiburones).

En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado de un ser humano. Opcionalmente, la región marco del anticuerpo humano se alinea y se adopta de acuerdo con 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 anticuerpos de tipo humano generados artificialmente tales como fragmentos de anticuerpo monocatenarios (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 que el anticuerpo es de origen humano, los riesgos de reactividad cruzada en comparación con autoantígenos se minimizan. Por lo tanto, de acuerdo con 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 un linfocito B o híbrido del mismo, o el ADNc del que se ha clonado directamente de ARNm de una célula humana, por ejemplo, un linfocito B de memoria humano. 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
 5 inmunoglobulinas humanas, o que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo en la patente de Estados Unidos n.º 5.939.598 por Kucherlapati et al., 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
 10 sintéticos y semisintéticos típicamente aislados de expresión en fagos no reflejan necesariamente la equiparación original como ocurrió en el linfocito B humano 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.

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

Como se usa en el presente documento, 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
 20 región marco humana que contiene sustituciones y/o eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos que están basadas en 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 marco se denomina "donante". Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, normalmente son sustancialmente idénticas a regiones constantes de anticuerpo de ratón, es decir, al menos idénticas en aproximadamente el 85-90
 25 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más. Por lo tanto, 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 región marco sustancialmente humana que tiene la cantidad de sustituciones de aminoácidos "murinizantes". Típicamente, un "anticuerpo murinizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena
 30 pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado no incluiría 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 inmunógeno en ratones, en comparación con el anticuerpo parental.

35 Como se usa en el presente documento, 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 dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido
 40 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 polipéptido 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 polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio
 45 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, todo o parte de un dominio CH2). Como se ha expuesto anteriormente, un experto en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) se pueden modificar de tal forma que varíen en la secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de
 50 inmunoglobulina de origen natural.

En determinadas realizaciones, los fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismo descritos en el presente documento, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un multímero son idénticas a las de una segunda cadena de polipéptidos del multímero. Como alternativa, los monómeros que
 55 contienen porciones de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o diacuerpo.

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

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido de unión para su uso en los procedimientos de tratamiento y de diagnóstico descritos en el presente documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por
 65 ejemplo, 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 región bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1 y, en parte, de una molécula IgG4.

- 5 Como se usa en el presente documento, 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 V_L o CL.

Se considera que el tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo debe ser de
10 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 la presente invención, un epítipo de péptido o polipéptido reconocido por anticuerpos de la presente
15 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.

20 Por "unir específicamente" o "reconocer específicamente", usados de manera intercambiable en el presente documento, se entiende generalmente que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión implica algo de complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. De acuerdo con 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
25 uniría a un epítipo aleatorio, no relacionado. Un experto en la técnica 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 el presente documento para calificar la afinidad relativa mediante la cual un determinado anticuerpo se une a 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
30 tiene por el epítipo "D" relacionado.

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
35 cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

"Unir preferiblemente" significa 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 lo tanto, un anticuerpo que "se une preferiblemente" a un epítipo dado tendría más probabilidades de unirse al epítipo que a un
40 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
45 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.

50 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 ($k(\text{off})$) que es menor que la $k(\text{off})$ 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 $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede
55 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 $k(\text{off})$ del anticuerpo para el segundo epítipo.

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

Puede decirse que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante o
65 derivado descrito en el presente documento se une a tau o a un fragmento o variante de la misma con una tasa de asociación ($k(\text{on})$) 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, puede

decirse que un anticuerpo de la invención se une a tau o un fragmento o variante de la misma con una tasa de asociación ($k(\text{on})$) 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 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 el presente documento a tau, por ejemplo, hTau40, puede inhibirse de forma competitiva mediante microtúbulos.

Como se usa en el presente documento, 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 et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) en las páginas 27-28. Como se usa en el presente documento, 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 epítopos 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 epítipo de alta repetición, tal como un polímero, sería una de alta avidez. La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno puede determinarse de forma experimental usando cualquier procedimiento adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "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 New York, N Y (1992), y procedimientos descritos en el presente documento. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo por 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 ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno, por ejemplo, K_D , CI_{50} , se hacen preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en el presente documento, 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 lo tanto, un anticuerpo tiene reactividad cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo con reactividad cruzada generalmente contiene muchas de las características estructurales de complementariedad como el epítipo inductor, y en algunos casos, puede ajustarse realmente mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, ya que se unen a epítopos relacionados pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, y al menos un 50 % de identidad (según los cálculos usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítopos con menos del 95 %, menos del 90 %, menos del 85 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 %, y menos del 50 % de identidad (según los cálculos usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para determinado epítipo si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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 $5 \times 10^{-2} \text{M}$, 10^{-2}M , $5 \times 10^{-3} \text{M}$, 10^{-3}M , $5 \times 10^{-4} \text{M}$, 10^{-4}M , $5 \times 10^{-5} \text{M}$, 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6} \text{M}$, 10^{-6}M , $5 \times 10^{-7} \text{M}$, 10^{-7}M , $5 \times 10^{-8} \text{M}$, 10^{-8}M , $5 \times 10^{-9} \text{M}$, 10^{-9}M , $5 \times 10^{-10} \text{M}$, 10^{-10}M , $5 \times 10^{-11} \text{M}$, 10^{-11}M , $5 \times 10^{-12} \text{M}$, 10^{-12}M , $5 \times 10^{-13} \text{M}$, 10^{-13}M , $5 \times 10^{-14} \text{M}$, 10^{-14}M , $5 \times 10^{-15} \text{M}$, o 10^{-15}M .

Como se indica previamente, se conocen bien las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "dominio V_H " incluye el dominio variable de extremo amino terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio CH_1 " incluye el primer (extremo más amino) dominio de región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH_1 es adyacente al dominio V_H y es extremo amino a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio CH_2 " 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 *et al. 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 los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado
5 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 el presente documento, 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
10 flexible, 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 Kabat Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083.

Como se usa en el presente documento, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos
15 átomos 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).

20 Como se usa en el presente documento, los términos "unido", "fusionado" o "fusión" se usan de manera intercambiable. Estos términos se refieren a la unión de dos elementos o componentes adicionales, por cualquier medio incluyendo conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión dentro de la estructura" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abierta de polinucleótido (ORF) para formar un ORF más largo continuo, de
25 manera que se mantenga el marco de lectura traduccional correcto de los ORF originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF 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
30 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 marco de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR "fusionadas" se cotraduzcan como parte de un polipéptido continuo.

35 El término "expresión", como se usa en el presente documento, 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, inactivación génica, así como también expresión transitoria y expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN de horquilla corto (ARNsc), ARN interferente pequeño (ARNsi) o cualquier otro
40 producto de ARN, y la traducción de dicho ARNm en uno o más 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 el presente documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen o un polipéptido que se traduce de una transcripción. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen,
45 además, ácidos nucleicos con modificaciones posteriores a la transcripción, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones posteriores a la traducción, por ejemplo, metilación, glucosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, escisión proteolítica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a cualquier material biológico obtenido de un
50 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, linfocitos B enriquecidos de muestras de sangre, y células cultivadas (por ejemplo, linfocitos B de un sujeto). Una muestra puede también incluir una biopsia o muestra 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
55 técnica. En un aspecto, el sedimento puede resuspenderse agitando vorticialmente 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 IX Sigma, e inhibidores de fosfatasa IX Sigma 1 y 2). La suspensión puede mantenerse en hielo durante 20 minutos con agitación vorticial intermitente. Después de girar a 15.000 x g durante 5 minutos a aproximadamente 4 °C, las alícuotas de sobrenadante pueden almacenarse a aproximadamente -70 °C.

60 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas preventivas y profilácticas, donde el objeto es prevenir o ralentiza (reducir) un cambio fisiológico o trastorno no deseado, tal como el desarrollo del Parkinsonismo. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de síntomas, reducción del alcance de enfermedad, estabilización del
65 estado de la enfermedad (es decir, que no empeora), demora o ralentización del avance de la enfermedad, mejora o mitigación de la patología, 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 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.

5 "Sujeto", "individuo", "animal", "paciente" o "mamífero" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para el cual se desea el diagnóstico, el pronóstico o la terapia.

10 II. Anticuerpos

La presente invención generalmente se refiere a anticuerpos anti-tau humanos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se caracteriza 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. De acuerdo con la presente invención los anticuerpos monoclonales monoclonales humanos específicos para tau se clonaron de un conjunto de sujetos humanos sanos.

En el transcurso de los experimentos realizados de acuerdo con 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 problema, los anticuerpos en medio acondicionado de cultivos de linfocitos B de memoria humanos se cribaron en paralelo para determinar la unión a la proteína tau recombinante, PHFTau extraído de un cerebro con EA, extractos de cerebro de control sano y albúmina sérica bovina (BSA). Solo los cultivos de linfocitos B que fueron positivos para PHFTau y/o tau recombinante pero no se sometió ningún extracto de cerebro de control o BSA a la clonación de anticuerpos.

25 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 linfocitos B de memoria humanos específicos de tau y los anticuerpos descritos en el presente documento invención se aislaron de grupos de sujetos humanos sanos que no se preseleccionaron para la alta reactividad en plasma de tau o tuvieron baja reactividad en plasma a tau.

30 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 linfocitos B de memoria se transcriben entonces por RT-PCR, se clonan y se combinan en 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 (Fig. 2, Fig. 7 y Fig. 12), formas modificadas patológicamente de los mismos en Western Blot (Fig. 3 y Fig. 8) 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 patológicamente de la proteína tau.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere generalmente a un anticuerpo anti-tau monoclonal humano aislado de origen natural y fragmentos de unión de los mismos. En una realización de la invención, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo tau que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 e (i) es capaz de unirse a tau modificada patológicamente; (ii) se une a tau agregada patológicamente en la fase pre-ovillos, en ovillos neurofibrilares (NFT), hilos del neurópilo y/o neuritas distróficas en el cerebro; y (iii) no se une sustancialmente a formas fisiológicas de tau en el cerebro de un donante sano cuando se evalúa mediante tinción inmunohistoquímica.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-tau, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, donde el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de tau como un anticuerpo de referencia NI-105-4E4 o NI-105.4A3. Además, los resultados preliminares de ensayos ELISA directos realizados con el anticuerpo ejemplar NI-105-4E4 revelaron que NI-105-4E4 reconoce específicamente el extremo C de tau. Los ensayos adicionales realizados sugieren que NI-105.4E4 reconoce un epítipo discontinuo que comprende dos secuencias lineales: una primera secuencia lineal dentro del dominio de unión a microtúbulos R4 y una segunda secuencia lineal dentro de la región entre los dominios R4 y C como se representa en la Fig. 11. En una realización, un polipéptido lineal comprendido por un epítipo no continuo, o un epítipo reconocido por un anticuerpo proporcionado por esta invención se sitúa en el dominio de unión a microtúbulos de tau, que se enmascara en tau fisiológica asociada a microtúbulos. El mapeo de epítopos identificó una primera secuencia dentro del dominio de unión a microtúbulos de tau humana que incluía aa337-343 VEVKSEK (SEQ ID NO: 7) como un único polipéptido lineal comprendido por el epítipo reconocido por el anticuerpo NI-105.4E4 de esta invención. Los experimentos adicionales y la comparación con un anticuerpo tau monoclonal de ratón AT180 disponible en el mercado confirmó que NI-105-4E4 reconoce específicamente el único epítipo de SEQ ID NO: 7. Más ventajosamente, el epítipo de SEQ ID NO: 7 reconocido por el anticuerpo NI-105.4E4 de esta invención está 100 % conservado en las 6 isoformas de tau presentes en el cerebro humano de las secuencias de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 1 a 6 y en otras especies, tales como ratón y rata, así como también proporciona una herramienta de búsqueda adicional en modelos animales respectivos con los anticuerpos de la presente invención. La experimentación adicional mostró que los residuos 3 y 6 del polipéptido de SEQ ID NO: 7, que corresponden a los residuos V339 y E342 de SEQ ID NO: 6, contribuyen a la

unión de NI-105.4E4. El mapeo de epítomos identificó además una segunda secuencia (SEQ ID NO: 41) dentro del dominio de unión a microtúbulos de tau humana que incluye aa387-397 de SEQ ID NO: 6 como un único polipéptido lineal comprendido por el epítomo reconocido por el anticuerpo NI-105.4E4 de esta invención. Los residuos 1, 5 y 9 de SEQ ID NO: 41, que corresponden a los residuos D387, E391 y K395 de SEQ ID NO: 6, contribuyen a la unión de
5 NI-105.4E4.

En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a tau en un epítomo que comprende los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En otra realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a tau en un epítomo que comprende los residuos de aminoácidos de
10 SEQ ID: 41. En una realización específica, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a tau en un epítomo que comprende los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 41. En una realización adicional, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a tau en un epítomo que comprende uno o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los residuos V339, E342, D387, E391 y K395 de SEQ ID NO:6. El epítomo puede comprender uno cualquiera, cualesquiera dos,
15 cualesquiera tres, cualesquiera cuatro o los cinco residuos del grupo que consiste en los residuos V339, E342, D387, E391 y K395 de SEQ ID NO: 6. En una realización específica, tau es hTau40.

En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a tau en un epítomo que comprende el dominio de unión a microtúbulos de tau. En una realización específica, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a tau en un epítomo que comprende los residuos de aminoácidos de la región R4 de tau como se describe en la Fig. 11. En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento compite con microtúbulos por la unión específica a tau. En otra realización, un anticuerpo descrito en el presente documento tiene afinidad de unión a tau asociada a microtúbulos reducida en comparación con la afinidad de unión a anticuerpos a tau no asociada con microtúbulos. En una realización adicional, un anticuerpo descrito en el presente
20 documento no se une, o no se une sustancialmente, a tau asociada con microtúbulos. En realizaciones específicas, la proteína tau puede ser una proteína tau nativa o proteína tau recombinante. En una realización específica, tau es hTau40.

El mapeo de epítomos identificó además una secuencia (SEQ ID NO: 42) de tau humano que incluía aa35-49 de
30 SEQ ID NO: 6 como un único epítomo reconocido por el anticuerpo NI-105.4A3 de esta invención. Los residuos 6, 7 y 10 de SEQ ID NO: 42, que corresponden a los residuos D40, A41 y K44 de SEQ ID NO: 6, contribuyen a la unión de NI-105.4A3. En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a tau en un epítomo que comprende los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. En una realización adicional, un anticuerpo descrito en el presente documento se une específicamente a tau en un epítomo que comprende uno o
35 más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los residuos D40, A41 y K44 de SEQ ID NO: 6. El epítomo puede comprender uno cualquiera, cualesquiera dos o tres cualesquiera residuos del grupo que consiste en los residuos D40, A41 y K44 de SEQ ID NO: 6. En una realización específica, tau es hTau40.

Además, sin pretender quedar ligado por observaciones experimentales iniciales como se demuestra en los Ejemplos y se muestra en la Fig. 6, el anticuerpo anti-tau NI-105-4E4 monoclonal humano de la presente invención se caracteriza por unirse específicamente a la tau agregada patológicamente y por no reconocer sustancialmente a tau en la forma fisiológica en el tejido cerebral. 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
45 caracterizarse además por su capacidad de reconocer tau en la etapa pre-ovillo, en ovillos neurofibrilares (NFT), hilos del neuropilo y/o neuritas distróficas en el cerebro. Por lo tanto, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos tau humanos con especificidades de unión, que son, por lo tanto, particularmente útiles con fines de diagnóstico y terapéuticos.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención presenta las propiedades de unión del anticuerpo NI-105-4E4 ejemplar como se describe en los Ejemplos. 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 de acuerdo con el Ejemplo 4. Además, o como alternativa, un anticuerpo anti-tau de la presente invención se une a mutantes causantes de enfermedades de tau humana, en particular las descritas en el Ejemplo 4. En este
50 contexto, las especificidades de unión pueden estar en el intervalo como se muestra para los anticuerpos NI-105.4E4 y NI-1054A3 ejemplares en la Fig. 2 y la Fig. 12, respectivamente, es decir, que tienen concentraciones eficaces máximas medias (EC50) de aproximadamente 100 pM a 100 nM, o una EC50 de aproximadamente 100 pM a 10 nM para tau de tipo silvestre.

Por lo tanto, 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 ilustra por tinción inmunohistoquímica descrita en el Ejemplo 4. En otra realización, un anticuerpo anti-tau de la presente invención se une preferiblemente tanto a tau recombinante como formas modificadas patológicamente de tau ilustradas en el
60 Ejemplo 2 por Western Blot.

La presente invención se dirige también a un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, donde el

anticuerpo comprende un dominio de unión al antígeno idéntico al del anticuerpo NI-105-4E4 o NI-105.4A3.

La presente invención ilustra además dichos anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, que pueden caracterizarse por comprender en su región variable, por ejemplo, un dominio de unión, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L que comprende las secuencias de aminoácidos representadas en la Fig. 1A o 1C. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se exponen en la Tabla 2 a continuación. Un ejemplo de conjunto de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región V_H y V_L se representa en la Fig. 1A y 1C. Sin embargo, como se analiza a continuación, el experto en la técnica 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 Fig. 1 por uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende las CDR que comprenden, o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23-25, 26-28, 35-37 y 38-40.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 23; una CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 24; y una CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 25, y comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 26; una CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 27; y una CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 28.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 de V_H de SEQ ID NO: 35; una CDR2 de V_H de SEQ ID NO: 36; y una CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 37, y comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 de V_L de SEQ ID NO: 38; una CDR2 de V_L de SEQ ID NO: 39; y una CDR3 de V_L de SEQ ID NO: 40.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la región V_H y V_L como se representa en la Fig. 1A o 1C. En una realización, el anticuerpo de la presente invención está caracterizado por la conservación del apareamiento cognado de la cadena pesada y ligera como se encontraba presente en el linfocito B humano.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende, o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, 17 y 93, y comprende además una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende, o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, y 19. En una realización específica, el anticuerpo comprende una V_H de SEQ ID NO: 9 y una V_L de SEQ ID NO: 11; o una V_H de SEQ ID NO: 93 y una V_L de SEQ ID NO: 11; o una V_H de SEQ ID NO: 17 y una V_L de SEQ ID NO: 19.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención se proporciona mediante cultivos de linfocitos B individuales u oligoclonales que se cultivan y el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por los linfocitos B, se criba para determinar la presencia y afinidad de los anticuerpos anti-tau en el mismo. El proceso de cribado comprende las etapas de un ensayo de inmunoreactividad sobre el amiloide de placas tisulares (TAPIR) como se describe en la solicitud internacional WO2004/095031; cribado en sectores del cerebro para unión al PHFTau; cribado para determinar la unión de un péptido derivado de tau de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO:6 con grupos de 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; un cribado para determinar la unión del 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 epítopos 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 y cribado *in vitro* de bibliotecas de presentación en fagos, respectivamente. Por consiguiente, es prudente estipular que el epítipo del anticuerpo anti-tau humano de la presente invención es único y no existe ningún otro anticuerpo que sea capaz de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención; véase también la Fig. 11 que muestra el único epítipo de los anticuerpos NI-105.4E4 y NI-105.4A3.

La competencia entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo ensayo inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como tau. Se conocen varios tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición sándwich; véase Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA de biotina-avidina directo de fase sólida; véase Kirkland et al., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung et al., *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo etiquetado de fase sólida, ensayo de tipo sándwich etiquetado directo de fase sólida; véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA etiquetado directo de fase sólida usando la etiqueta 125 ; véase Morel et al, *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Típicamente, tal ensayo

implica el uso de tau purificada o agregados de la misma unidos a una superficie sólida o 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 competición (anticuerpos competitivos) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente lo suficientemente cercano al epítipo 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 %.

Una inmunoglobulina o su ADNc codificante se puede modificar adicionalmente. Por lo tanto, en una realización adicional, el procedimiento de la presente invención comprende una cualquiera de las etapas de producción de un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo etiquetado o un análogo de uno cualquiera de estos. Los procedimientos correspondientes se conocen por los expertos en la técnica 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 presentación 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 cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento (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 en, por ejemplo, la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y la solicitud internacional WO90/07861. Una fuente adicional de anticuerpos a utilizar de acuerdo con 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 en, por ejemplo, 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)₂, así como en cadenas sencillas; véase, por ejemplo, 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 una o más eliminaciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/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 se conocen bien por un experto en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and 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 esqueleto, 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 incluye la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino fusionado a la molécula heteróloga, tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO00/30680 para detalles técnicos correspondientes.

Adicionalmente, la presente invención incluye 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 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 de acuerdo con la invención. Dichos procedimientos se conocen bien por los expertos en la técnica. Los péptidos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando sintetizadores peptídicos automatizados que se encuentran comercialmente disponibles. 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 lo tanto, la presente invención se refiere a cualquier anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que está orientado hacia los anticuerpos anti-tau humanos de la presente invención y presentan las propiedades mencionadas, es decir, que reconocen específicamente tau como se caracteriza en las reivindicaciones. Dichos anticuerpos y moléculas de unión se pueden someter a un ensayo para determinar su especificidad y afinidad de unión mediante ELISA y Western Blot e inmunohistoquímica, como se describe en el presente documento, véase, por ejemplo, los Ejemplos. Además, los resultados preliminares de experimentos posteriores realizados de acuerdo con la presente invención revelaron que el anticuerpo anti-tau humano de la presente invención, en particular, el

anticuerpo NI-105.4E4 se une principalmente a ovillos neurofibrilares (NFT) similares a tau agregada patológicamente, hilos del neurópilo presentes en secciones del cerebro humano de pacientes que padecieron además enfermedad de Alzheimer (EA). Por lo tanto, en una realización preferida particular de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión del mismo, reconoce tau en secciones del cerebro humano con EA.

- 5 Además, la capacidad diferente del anticuerpo NI-105.4E4 de unirse diferencialmente a patologías tau también se pueden mostrar en ratones transgénicos que sobreexpresan tau humana P301L. Además de los NFT ya mencionados e hilos del neurópilo, el anticuerpo NI-105.4E4 se une en secciones del cerebro de ratón también a neuritas distróficas e identifica agregados de tau en una etapa pre-ovillo; véase el Ejemplo 4 y Fig. 6.
- 10 Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas directamente del cultivo de linfocitos B inmortalizados o linfocitos B de memoria, las células inmortalizadas se pueden usar como una fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizados para la expresión posterior y/o la manipulación genética. Los genes de anticuerpo reorganizados se pueden transcribir de manea inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. Si se desea, la región constante de 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 monocatenarias. 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 anteriormente que conserva tanto su capacidad para unir la diana deseada es sencillo. Los procedimientos para la clonación de regiones variables de anticuerpo y la generación de anticuerpos
- 20 recombinantes se conocen por un experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *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 cadena pesada y ligera,

25 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 fin incluyen, sin limitación, células CHO, células HEK 293 o células NSO.

30 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. Después, 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 segregan en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

35 De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o la molécula de unión equivalente de la presente invención. En una realización, el polinucleótido codifica al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la V_H y V_L de la región variable de dicho anticuerpo.

El experto en la técnica 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 lo tanto, la presente invención también incluye polipéptidos y anticuerpos que

45 contienen al menos las 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 técnica 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 como se define por Kabat; véase, por ejemplo, Riechmann, et al, *Nature* 332 (1988), 323-327. En una realización, el anticuerpo de la invención comprende en ambas de sus cadenas de inmunoglobulina, las tres CDR de las regiones variables como se expone en la Fig. 1A o 1C.

Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, como se conoce por los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la

55 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 inflamatoria y puede estar implicada también en la hipersensibilidad autoinmune. 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.

60 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 cantidad de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la inmersión y destrucción de partículas recubiertas por anticuerpos, depuración de complejos inmunes, lisis de células diana recubiertas por anticuerpos mediante células asesinas (denominada citotoxicidad

65 mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia de placenta y control de producción de inmunoglobulina.

Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión 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 en comparación con un anticuerpo sin alteración completa de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos eliminados de dominio que comprenden una cadena de polipéptidos similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio CH2. En otras realizaciones, ciertos anticuerpos para su uso en procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG, que se altera para eliminar la glucosilación, denominados en el presente documento como anticuerpos aglucosilados o "agly". Dichos anticuerpos "agly" se pueden preparar enzimáticamente, así como mediante el diseño de uno o más sitios de glucosilación de consenso en la región constante. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que los anticuerpos "agly" pueden tener un perfil mejorado de seguridad y estabilidad *in vivo*. Los procedimientos para producir anticuerpos aglucosilados, que tienen una función efectora deseada, se encuentran, por ejemplo, en la solicitud internacional WO2005/018572.

En ciertos anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc se puede mutar para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando así la localización de tau. En otros casos, se puede dar que las modificaciones de región constante consistentes 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. Aun 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.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, 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). 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.

En determinados anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, 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 de barrera hematoencefálica.

Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, se pueden realizar a partir de anticuerpos precursores u parenterales completos usando técnicas conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares se analizan en más detalle en el presente documento. Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, se pueden realizar o fabricar 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 en más detalle en otra parte en el presente documento.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno 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 anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden realizar cualquiera de una cantidad de modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En realizaciones particulares, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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, humanos, aliviando o minimizando la aparición de respuestas inmunitarias perjudiciales.

La desinmunización se puede utilizar también para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítomos de linfocitos T; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO98/52976yWO00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de partida y un "mapa" del epítomo de linfocitos T humanos de cada región V que muestra la ubicación de los epítomos con relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Se analizan los epítomos de linfocitos T individuales del mapa del epítomo de linfocitos T para identificar las sustituciones de aminoácidos alternativas con un bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se designó un intervalo de secuencias V_H y V_L 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 inmuno-específicos de los mismos para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento, que después se ensayan para determinar su función. Típicamente, se generan y se ensayan entre 12 y 24 anticuerpos de variantes. Después, se clonan genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones modificadas V y humanas C , en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpos totales. Después, los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.

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 presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas, incluyendo las conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fagos, y no el procedimiento por el cual se produce. Por lo 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 derivan de linfocitos B humanos que se han immortalizado a través de transformación con virus Epstein-Barr, como se describe en el presente documento.

En el proceso de hibridoma bien conocido (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495), los linfocitos de vida relativamente corta o mortales de un mamífero, por ejemplo, linfocitos B derivados de un sujeto humano como se describe en el presente documento, 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 del linfocito 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 técnica apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medio para la formación, selección y el crecimiento de hibridomas están disponibles comercialmente a partir de una cantidad de fuentes y se establecen protocolos estándar. 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 inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) como se describe en el presente documento. Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitantes y se pueden cultivar por procedimientos estándar; 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 procesos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxapatita, 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 se pueden cribar para las IgG específicas que cumplan con los criterios de cribado. Las células de pocillos positivos

se pueden aislar. Los linfocitos B productores de Ig individuales se pueden aislar por FACS o identificándolos en un ensayo de placa hemolítica mediada por complemento. Los linfocitos B que producen Ig se pueden micromanipular en un tubo y los genes V_H y V_L se pueden amplificar utilizando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes V_H y V_L pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse en células (por ejemplo, células eucariotas o procariontas) para su expresión.

Como alternativa, las líneas celulares que producen anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse utilizando técnicas bien conocidas por el experto en la práctica. 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 et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítomos 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 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 inmunes específicas de inmunoglobulinas para detectar reactivos tales como radioisótopos.

Los anticuerpos humanos, tales como se describen en el presente documento, se desean particularmente para 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 tautopático, 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 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 verdadero 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.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir 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 el presente documento.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una región constante sintética donde uno o más dominios se eliminan parcial o completamente ("anticuerpos eliminados del dominio"). En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones eliminadas de dominio o variantes donde se ha eliminado todo el dominio de CH2 (construcciones de Δ CH2). Para otras realizaciones, un péptido conector corto se puede sustituir por el dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que dichas construcciones se prefieren particularmente debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en el índice catabólico del anticuerpo. Las construcciones eliminadas del dominio pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG_1 , véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO02/060955 y WO02/096948A2. Este vector está diseñado para eliminar el dominio CH2 y para proporcionar un vector sintético que exprese un dominio eliminado de la región constante de IgG_1 .

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

En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene eliminación 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 la unión de Fc y aumentar de este modo la localización de tau. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente esa parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión de complemento) a modular. Las deleciones 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 de la invención. Además, como se ha mencionado anteriormente, las 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. En este sentido, puede ser posible la interrupción de la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, la unión de Fc) mientras se mantienen de manera sustancial la configuración y el perfil inmunológico del anticuerpo modificado. Aun otras realizaciones comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para mejorar las características deseables, tales como la función efectora, 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.

Es posible introducir mutaciones solamente en regiones marco 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 el presente documento. Como 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 marco, 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 técnica 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 el presente documento o por técnicas de modificación rutinaria conocidas en la técnica.

Los anticuerpos de unión a tau de la presente invención se pueden caracterizar usando cualesquiera modelos *in vivo* o *in vitro* de tauopatías neurodegenerativas. Un experto en la técnica entiende fácilmente que un agente de unión a tau (por ejemplo, un anticuerpo) de la invención puede estar caracterizado en un modelo de ratón para tauopatías neurodegenerativas, por ejemplo, pero sin limitación, 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. Ratón TauP301L transgénico (línea 183): que expresa Tau40 humana con la mutación P301L en el promotor murino Thy1.2 (La generación de estos animales transgénicos se describe en Götz et al., 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, Estados Unidos).

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

Un experto en la técnica 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 en un agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) de la invención, la 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 en un agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) la capacidad de tratar, reducir o aliviar las tauopatías neurodegenerativas o un síntoma de las mismas. Los síntomas de las tauopatías neurodegenerativas incluyen, pero sin limitación, la acumulación de depósitos de tau patológico, ovillos neurofibrilares (NFT), polipéptido tau hiperfosforilado, fracciones tau insolubles en las neuronas, cerebro, médula espinal, líquido cefalorraquídeo o suero del objeto experimental. Un experto en la técnica 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.

En una realización, un agente de unión a tau (por ejemplo, un anticuerpo) 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. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 6 y 7. 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 los 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 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 compartimento tisular particular de los animales experimentales, por

ejemplo, pero sin limitación, suero, sangre, líquido cefalorraquídeo, tejido cerebral, se puede establecer usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 9 y 10. En una realización, un agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) de la invención es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica. Un experto 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 agente de unión a tau (por ejemplo, anticuerpo) de la presente invención en los modelos de tauopatía se pueden 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 (NFT) 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 fosforilado patológicamente en NFT. 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, el 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, 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 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 pre-ovillos, ovillos neurofibrilares intraneuronales u ovillos neurofibrilares extraneuronales en el cerebro o en la médula espinal de un sujeto. Véase, por ejemplo, Augustinack et al, Acta Neuropathol 103:26-35 (2002). El síntoma puede ser también la presencia, o concentración o cantidad elevada de tau 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 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 el 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 el 90 %. En otra realización, la relación de la tarea de laberinto en 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 un procedimiento para prevenir o retrasar el comienzo de al menos un síntoma de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo tau descrito en el presente documento. La presente invención proporciona además un procedimiento para reducir o eliminar al menos un síntoma de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo tau descrito en el presente documento. En una realización, el sujeto es un organismo experimental, tal como, pero sin limitación, ratón transgénico. En una

realización, el sujeto es un ser humano.

III. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

- 5 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 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
- 10 es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más típicamente, 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 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 del mismo, también puede contener una
- 15 o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados para determinar la estabilidad y 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 lo tanto, "polinucleótido" incluye formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.
- 20 Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido que proviene 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 eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de tal forma que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos se introducen en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas
- 25 estándar, tales como la mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. En una realización, las sustituciones de aminoácido conservativas se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

Como es bien sabido, el ARN se puede aislar de los linfocitos B originales, células de hibridoma o de otras células transfectadas por técnicas estándar, tales como extracción de isotiocianato de guanidina y precipitación seguida de

30 centrifugación o cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm se puede aislar del ARN total por técnicas estándar tal como cromatografía en celulosa oligo dT. Se conocen en la técnica las técnicas adecuadas. En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo se pueden hacer, ya sea simultáneamente o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de acuerdo con procedimientos bien conocidos. El análisis por PCR se puede iniciar por cebadores de región constante de consenso o por cebadores más específicos

35 basados en las secuencias publicadas de ADN de cadena pesada y ligera y de aminoácidos. 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 cribar las bibliotecas por cebadores de consenso o sondas homologas más grandes tales como sondas de región constante humana.

40 El ADN, típicamente ADN plasmídico, se puede aislar de las células usando técnicas conocidas en la técnica, se mapearon por restricción y se secuenciaron de acuerdo con 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 de acuerdo con la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o el posterior análisis.

45 La presente invención proporciona un polipéptido 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) en la que las regiones V_H -CDR1, V_H -CDR2, y V_H -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_H -CDR1, V_H -CDR2, y V_H -CDR3 mostrados en la Fig. 1A o 1C. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_H es

50 SEQ ID NO: 23 o 35; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_H es SEQ ID NO: 24 o 36; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_H es SEQ ID NO: 25 o 37.

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) en la que

55 las regiones V_L -CDR1, V_L -CDR2, y V_L -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_L -CDR1, V_L -CDR2, y V_L -CDR3 mostrados en la Fig. 1A o 1C. La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de V_L es SEQ ID NO: 26 o 38; la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de V_L es SEQ ID NO: 27 o 39; y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de V_L es SEQ ID NO: 28 o 40.

60 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 el presente documento, si cualquier polipéptido particular es al menos aproximadamente un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o un 95 % idéntico a otro polipéptido se puede determinar usando procedimientos y programas

65 informáticos/software conocidos en la técnica tal como, pero sin limitación, el 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 las 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 secuencia de referencia de acuerdo con 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.

En una realización de la presente invención, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la región V_H o V_L de un anticuerpo anti-tau como se representa en la Tabla 2. En este sentido, el experto en la técnica comprenderá fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo de una. La presente invención proporciona además un polinucleótido que comprende, o que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: 93.

Tabla 2: Secuencias de nucleótidos de la región V_H y V_L de anticuerpos específicos de tau.

| Anticuerpo | Secuencias de nucleótidos de cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) |
|---|--|
| NI-105.4E4 -V _H SEQ ID NO. 8 | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGATC CCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTC AATTTCAACATCTCTGCTA TACACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGA ATAAGAAGTAAATCTCACAATTACGCGACTTTATATGCTGCGTCCCTGAA AGGCCGGTTCACCCTCTCCAGAGATGATTCAAGGAACACGGCGTATCTGC AAATGAGCAGCCTGCAAACCGAGGATATGGCCGTCTATTACTGTACTGTT CTGAGTGCGAATTACGACACCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGT CACCGTCTCCTCG |
| NI-105.4E4 -V _L SEQ ID NO. 10 | TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGAC GGCCAGGATCTCCTGCTTTGGAGATACATTGCCAAAGCAATATACTTATT GGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGGCCCTGTGTTAGTGAATTTATAAAGAC ACTGAGAGGCCCTCAGGGATCCCCGAGCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG GACAACAGTCACCTTGACCATCAGTGGAGTCCAGGCAGAAGACGAGGCTG ACTATTACTGTCTATCAGCTGACAACAGTGCTACTTGGGTGTTTCGGCGGA GGGACCAAGGTGACCGTCTCTA |
| NI-105.24B2-V _H SEQ ID NO. 12 | CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTC GGTGAAGGTTTCCCTGTAAGGCATCTGGATACACCTTCGTCAATTACATTA TACACTGGGTGCGACAGGCCCTTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATC ATCAATCCTAATGGCGGAAACACAAGTTATGCAGAGAAATTCCAGGCCCG AGTCACCTTGACCAGCGACACGTCTACGAGTACGGTGTACATGGACCTGA GCAGCCTGACATCTGAGGACACGGCCGTCTATTTACTGTGCCGTCTTTCC CCTTCGAATCCCTGGGGCCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG |
| NI-105.24B2-V _L SEQ ID NO. 14 | TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAGAC GGCCGGGATCACCTGCTCTGGAGATGCTTTGCCAAAGCAATTTGTTTATT GGTACCAGAAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTGTTATTGATATATAAAGAC ACTGAGAGGCCCTCACGAATCCCTGAGCGCTTCTCTGGCTCCACCTCAGG GACAACAGTCGCGTTGACCATCAATGGGGTCCAGGCAGAGGACGAGGCTG ACTATTACTGTCAATCAGCCGACCGCAGTGGTGCTCTTTGGGTGTTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCTCTA |
| NI-105.4A3-V _H SEQ ID NO: 16 | CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGCGGTCCAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTGACTATGCCA TGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGCAGTGGGTGGCAGTT |
| | ATATCGPATGAGGGAACTTATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGAACTTGCAGATGA GCAGCCTGAGAGTTGAAGACACGGCTGTGTATTTCTGTGTGAAAGCTCGA GCCTTTGCCTCCGGACAGCGAAGCACCTCCACCGTACCTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG |

| Anticuerpo | Secuencias de nucleótidos de cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) |
|---------------|--|
| NI-105.4A3-VL | TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCCCCAGGACAAAC |
| SEQ ID NO. 18 | GGCCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCATTGCCAAAAAATATGCTTATT GGTACCAGCAGAAGTCAGGCCAGGCCCTGTGTTGGTCATCTATGAGGAC AACAAACGACCCTCCGGGATCCCTGAGAGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG GACAGTGGCCACCTTGACTATCAGTGGGGCCAGGTGGACGATGAAGCTG ACTACTACTGCTACTCGACAGACATCAGTGGTGACCTTCGGGTGTTCCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTC |

En una realización, la presente invención proporciona 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 al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % o un 95 % idéntica con la VH de cadena pesada de referencia. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de referencia es SEQ ID NO: 9, 17 o 93.

En una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % o un 95 % idéntica con la VL de cadena ligera de referencia. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de referencia es SEQ ID NO: 11, 19.

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte. Adicionalmente, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en el presente documento, también se contemplan por la invención.

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

Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno 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⁺ARN, aislada 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 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 se pueden clonar entonces en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento ya conocido en la técnica.

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 de sitio dirigido, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel et al., 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, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan típicamente 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 análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana se describe en el presente documento. 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

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 lo tanto, los procedimientos para preparar una proteína por la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo se describen en el presente documento. Los procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica se pueden usar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y las 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 lo tanto, la invención 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 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 uno de estos vectores para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para hacer referencia a vectores usados de acuerdo con 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 técnica, dichos vectores se pueden seleccionar fácilmente a partir del grupo que consiste 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 replicar 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 poliovirus, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, 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 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, secuencias de corte y empalme, 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 los genes de región constante de cadena pesada y ligera (por ejemplo, genes de región constante de 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 sin limitación, los 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, el cribado de grandes números de células transformadas para aquellas que expresan niveles adecuadamente superiores si las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina es experimentación de rutina que se puede realizar, por ejemplo, por sistemas robóticos. Los sistemas de vector también se enseñan en las patentes de Estados Unidos 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 de los mismos, de la invención se pueden expresar usando construcciones policistrónicas tales como las descritas en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003-0157641 A1. 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 de entrada al ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de Estados Unidos n.º 6.193.980. Los expertos en la técnica 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 por diversas técnicas ya conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero sin limitación, transfección, incluyendo lipotransfección usando, por ejemplo, Fugene® o lipofectamina, fusión protoplásmica, precipitación de fosfato de calcio, fusión celular con ADN con

envoltura, microinyección e infección con virus intacto. Típicamente, la introducción del plásmido en el huésped es a través 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 por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Por lo 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 monocatenarios, en la célula huésped se pueden coexpresar vectores que codifican las cadenas tanto pesada como ligera para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, 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 de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Como se usa en el presente documento, "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 de células enteras centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vector de expresión de huésped para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Dichos sistemas de expresión de huésped representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos adecuadas, pueden expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contiene secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos, sistemas celulares de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovir) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus de mosaico de la coliflor, CaMV; virus de mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene secuencias codificantes de anticuerpo; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7,5K del virus vaccinia). En una realización, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante se usan células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa. Por ejemplo, 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 eficaz para los anticuerpos; véase, por ejemplo, Foecking et al., Gene 45 (1986), 101; Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2.

La línea celular huésped usada para la expresión de proteína es a menudo de origen mamífero; los expertos en la técnica 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 sin limitación, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CV1 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CV1 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 típicamente se encuentran disponibles en servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos Tipo o en la bibliografía publicada.

- 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, glucosilación) 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
- 5 procesado post-traducciona l 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 glucosilación, y la fosforilación del producto génico.
- 10 Para una producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, se pueden modificar por ingeniería genética líneas celulares que expresan de forma estable la molécula del anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, 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
- 15 marcador seleccionable. Tras la introducción del ADN extraño, se puede dejar que células modificadas por ingeniería genética crezcan durante 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 se puede usar de manera
- 20 ventajosa para modificar genéticamente líneas celulares que expresen de manera estable la molécula del anticuerpo.

Se pueden usar varios sistemas de selección, que incluyen, pero sin limitación, la timidina cinasa del virus herpes simple (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), y pueden emplearse genes de adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia anti-metabolito se puede usar como la base de selección de los siguientes genes: dhfr que otorga resistencia al metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, que otorga resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, que otorga

30 resistencia al aminoglucósido G-418 Goldspiel et al., 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 hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147. Los procedimientos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al.

35 (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981).

- 40 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
- 45 amplificada está asociada al gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo; véase Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

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

50 cultivo de suspensiones homogéneas, por ejemplo, en un reactor aerotransportado o en un reactor de agitación continuo, 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 se 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, después

55 de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintético o antes de o posterior a la etapa de cromatografía HIC que se describe en el presente documento.

Los genes que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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

60 bacterias que absorben fácilmente los ácidos nucleicos incluyen miembros de enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente 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

65 subunidades se auto-ensamblarán en anticuerpos tetravalentes, véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO02/096948.

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. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), en el que la secuencia codificante de anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en el marco con la región codificante lacZ de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden usarse 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.

Además de los procariotas, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadero común, es la más comúnmente usada entre microorganismos eucariotas pese a que varias otras cepas están comúnmente disponibles, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, comúnmente se usa el YRp7 plasmídico, por ejemplo, (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., 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 eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa típicamente 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).

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 de acuerdo con 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). Como alternativa, se describe otro procedimiento para aumentar la afinidad de anticuerpos de la invención en la publicación de patente de Estados Unidos 2002-0123057 A1.

V. Proteínas de fusión y conjugados

En algunas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o una o más porciones normalmente no asociadas con un anticuerpo. Las modificaciones ejemplares se describen en más detalle a continuación. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo fv monocatenario 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 el presente documento, 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 el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden fusionarse adicionalmente recombinantemente 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 recombinantemente o conjugar con moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas; véase, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; patente de Estados Unidos n.º 5.314.995; y la solicitud de patente europea EP 0 396 387.
- 10 Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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 se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Dichas modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como también en extensa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden tener lugar en cualquier lugar del anticuerpo, incluyendo el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, 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. Además, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos se pueden ramificar, por ejemplo, como un resultado de ubiquitinación, y luego pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser resultado de procesos naturales de postraducción o se pueden realizar por procedimientos sintéticos. Las modificaciones pueden incluir acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una porción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfotidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de ancla 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 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 et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48-62.

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, y un polipéptido heterólogo. La proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_H de un anticuerpo de la invención, y la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_L de un anticuerpo de la invención o un fragmento de unión a tau del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. En una realización, las regiones V_H y V_L de la proteína de fusión corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a tau. En aún otra realización, una proteína de fusión para su uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las V_HCDR de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de las V_LCDR de un anticuerpo, o fragmento de unión a tau del mismo, y una secuencia de polipéptido heterólogo. En una realización, las V_H-CDR o V_L-CDR corresponden a un único anticuerpo fuente (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también se incluyen por la invención.

Las proteínas de fusión ejemplares indicadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de linfocitos T (Gascoigne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al., *Nature* 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., *Nature* 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., *DNA Cell Biol. USA* 9 (1990), 347-353; y Byrn et al., *Nature* 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor de alojamiento) (Watson et al., *J. Cell. Biol.* 110 (1990), 2221-2229; y Watson et al., *Nature* 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., *Cell* 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley et al., *J. Exp. Med.* 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., *Cell* 66 (1991), 1133-1144); receptor TNF (Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 27 (1991), 2883-2886; y Poppel et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor IgE a (Ridgway y Gorman, *J. Cell. Biol.* 115 (1991), Resumen N.º 1448).

Como se analiza en otra parte en el presente documento, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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 con los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida in vivo; véase, por ejemplo, Leong et al., *Cytokine* 16 (2001), 106-119; *Adv. in Drug Deliv. Rev.* 54 (2002), 531; oWeir et al., *Biochem. Soc. Transactions* 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención se pueden fusionar a secuencias de marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En 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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 sin limitación, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de influenza (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767) y la etiqueta "indicador".

Las proteínas de fusión se pueden preparar usando procedimientos que se conocen bien en la técnica; véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 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 después a una célula huésped para expresión.

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una diversidad 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 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 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 que incluyen anticuerpos convencionales se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales o pueden producirse inmunotoxinas que contienen porciones de toxina 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 por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar usando una diversidad 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 el presente documento, o mediante la reacción con un isotiocianato, o isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención se preparan de manera análoga.

La presente invención comprende además anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno 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, una tauopatía 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 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 diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -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}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{99}Tc .

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

Una de las maneras en las que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se puede etiquetar de manera detectable es mediante el enlace del mismo a una enzima y el uso del producto enlazado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller et al., 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. et al., (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, pero sin limitación, 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 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 inmunoensayos. Por ejemplo, etiquetando de manera radioactiva el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno 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 autoradiografía.

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo también se puede etiquetar de manera detectable usando metales emisores de fluorescencia tales como ¹⁵²Eu 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).

Las técnicas para conjugar diversos restos a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (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 et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Como se menciona, en algunas realizaciones, se puede conjugar un resto que mejora la estabilidad o eficacia de un anticuerpo o fragmento inmuno específico del mismo. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar con las moléculas de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Composiciones y procedimientos de uso

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a tau mencionada anteriormente, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención, o el polinucleótido, vector o célula de la invención. La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente agentes tales como interleucinas o interferones dependiendo del pretendido de la composición farmacéutica. Para su uso en el tratamiento de una tauopatía, por ejemplo, de la enfermedad de Alzheimer, el agente adicional se puede seleccionar del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-tau y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, en una realización particular, la presente invención se refiere al uso de una molécula de unión a tau, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención o de una molécula de unión que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una tauopatía, control de la evolución de una tauopatía, o una respuesta a un tratamiento de una tauopatía en un sujeto, o para determinar el riesgo de un sujeto a desarrollar una tauopatía.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a las moléculas de unión a tau descritas anteriormente, anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células de la presente invención para su uso en el tratamiento de un trastorno neurológico caracterizado por una acumulación anormal y/o la deposición de tau en el cerebro y el sistema nervioso central, respectivamente. El término "trastorno neurológico" incluye, pero sin limitación, enfermedades tautopáticas tales como enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica/complejo 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 relacionado con el 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 postencefalítico, 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 el presente documento.

Una ventaja particular del enfoque terapéutico de la presente invención reside en que los anticuerpos de la presente invención se derivan de linfocitos B o linfocitos B de memoria de sujetos humanos sanos sin signos de una tauopatía y, por lo tanto, son, con cierta probabilidad, capaces de prevenir una tauopatía 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. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención también 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 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 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.

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 anticuerpo anti-tau, fragmento de unión, 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 composición, por ejemplo, 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 enfermedad de Alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia (ALS-PDC), demencia argirofílica granulosa (AGD), angiopatía amiloide de tipo británica, angiopatía amiloide cerebral, degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, síndrome de Down, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el 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 (PiD), parkinsonismo postencefalítico, 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 se pueden formular de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular mediante procedimientos convencionales bien conocidos. Estas composiciones 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 pulverización, 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 compatible con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo adecuado.

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, la molécula de unión, especialmente anticuerpo o fármaco basado en el anticuerpo de la presente invención, puede atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite la administración intravenosa u oral.

El régimen de dosificación se determinará 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, edad, el compuesto particular a administrar, sexo, tiempo y vía de

administración, salud general y otros fármacos administrados simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg (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 5 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. Dichas dosis se pueden administrar a los sujetos diariamente, en días alternos, semanalmente o de 10 acuerdo con cualquier otra programación determinada por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica una administración en dosificaciones múltiples durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento 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 programaciones de dosificación ejemplares incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg por semana. En algunos procedimientos, dos o 15 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 evaluación periódica. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales 20 como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios 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, 25 por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente agentes tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

Además, en una realización particular de la presente invención la composición farmacéutica se puede formular como 30 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, las especies fósforo-tau se han indicado de forma extracelular en plasma y LCR (Aluise et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1782 (2008), 549-558) y estudios en líneas de ratones transgénicos usando vacunación activa con péptidos tau fosforilados revelaron una reducción en los niveles cerebrales de agregados tau en el 35 cerebro y una evolución más lenta de los deterioros conductuales (Sigurdsson, J. *Alzheimers Dis.* 15 (2008), 157-168; Boimel et al., *Exp Neurol.* 224 (2010), 472-485). Por consiguiente, es prudente esperar que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-tau humanos y las moléculas de unión a tau equivalentes de la presente invención ayudarían a evitar diversos efectos de los conceptos de terapia de inmunización activa como ya se ha descrito en la sección de antecedentes. Por lo tanto, los presentes anticuerpos anti-tau y sus equivalentes de la presente invención 40 serán particularmente útiles como una vacuna para la prevención o mejora de tauopatías tales como EA, ALS-PDC, AGD, CBD, CJD, FTD, FTDP-17, NP-C, PiD, PSP u otras tauopatías como se ha descrito anteriormente.

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. 45 Dicha molécula biespecífica se puede diseñar para dirigirse a tau con un brazo de unión y otra entidad patológica tal como Aβ o alfa-sinucleína o una conformación patológica diferente de tau con un segundo brazo de unión. Como alternativa, 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 monocatenarios (scFv) del anticuerpo de la presente invención, que podría penetrar más fácilmente una membrana celular. Por ejemplo, Robert et al., *Protein Eng. Des. Sel.* (2008) Oct 16; S1741-0134, publicado antes en línea, describen el uso de Fab recombinante quimérico (rFab) y fragmentos monocatenarios (scFv) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítipo en la región N-terminal de Aβ. Los fragmentos diseñados podían (i) impedir la fibrilización de tipo 55 amiloide, (ii) desagregar las fibrillas Aβ1-42 preformadas, e (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por el oligómero Aβ1-42 *in vitro* de manera tan eficiente como la molécula IgG entera. Las ventajas percibidas de usar formatos de anticuerpos Fab y scFv pequeños diseñados 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 que los anticuerpos de dominio único y scFv conservan la especificidad de unión de los 60 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.

En un enfoque diferente Muller et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2005), 237-241, describen una plataforma de 65 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.

En una realización adicional, puede desearse la co-administración o administración secuencial de otros anticuerpos
5 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, sin limitación, anticuerpos que se dirigen a beta-amiloide, alfa-sinucleína, TDP-43 y SOD-1.

En una realización adicional, puede desearse la co-administración o administración secuencial de otros agentes
10 neuroprotectores útiles para tratar una tauopatía. 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 sin limitación, un inhibidor de acetilcolinesterasa, un antagonista del receptor glutamatérgico, inhibidores de cinasa, inhibidores de HDAC, agentes antiinflamatorios, sodio de divalproex o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de agentes neuroprotectores que se pueden usar
15 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.

Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del principio activo suficiente para mejorar
20 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, ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y LD₅₀ (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 LD₅₀/ED₅₀. En una realización, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente
25 para restaurar o conservar el comportamiento normal y/o las propiedades cognitivas en caso de EA, ALS-PDC, AGD, CBD, CJD, FTD, FTDP-17, NP-C, PiD, PSP u otras tauopatías como se ha mencionado anteriormente.

A partir de lo anterior, es evidente que la presente invención incluye cualquier uso del anticuerpo descrito
30 anteriormente, en particular para el diagnóstico y/o el tratamiento de una tauopatía como se ha mencionado anteriormente, particularmente la enfermedad de Alzheimer. Además, la presente solicitud describe anticuerpos anti-idiotípicos de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados descritos anteriormente en el presente documento. Estos son anticuerpos u otras moléculas de unión que se unen a la única 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.

35 En otra realización la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende uno cualquiera de los anticuerpos de unión a tau descritos anteriormente, fragmentos de unión al antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la invención y opcionalmente medios adecuados para detectar dichos reactivos usados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico basados en el sistema inmune o ácido nucleico. 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 vehículo de fase sólida. Los ejemplos de inmunoensayos que se pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo tipo sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de Western blot. Los antígenos y anticuerpos de la invención se
40 pueden unir a diferentes vehículos y usarse para aislar células específicamente unidas a los mismos. Los ejemplos de vehículos conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Hay muchas etiquetas y procedimientos diferentes para etiquetar conocidos para los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que se
45 pueden usar en el presente documento invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones analizadas anteriormente en el presente documento.

Mediante una realización adicional, las moléculas de unión a tau, en particular anticuerpos de la presente invención,
55 se pueden usar también 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 ensayo que puede ser una muestra de sangre, una muestra de linfa o cualquier otra muestra de fluido corporal, y el contacto de 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 entonces por procedimientos conocidos en la técnica, un nivel
60 significativamente mayor al formado en una muestra de control que indica la enfermedad en el individuo sometido a ensayo. De la misma manera, también se puede usar el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. Por consiguiente, 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.

65 En este contexto, la presente invención también se refiere a medios específicamente diseñados para este fin. 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 resumen en Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión a tau identificadas de acuerdo con la presente invención.

5

En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una tauopatía en un sujeto, comprendiendo el procedimiento determinar la presencia de tau y/o tau patológicamente modificada y/o agregada en una muestra del sujeto a diagnosticar 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
10 cualquiera de los mismos, donde la presencia de tau patológicamente modificada y/o agregada indica una tauopatía neurodegenerativa y un aumento en el nivel de tau patológicamente modificada y/o agregada en comparación con el nivel de las formas de tau fisiológica, que indica la evolución de una tauopatía 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
15 tauopatías como se ha mencionado anteriormente, donde una similitud entre el nivel de tau patológicamente modificada y/o agregada y el estándar 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 estándar de referencia indica que el
20 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
25 procedimiento adecuado conocido en la técnica que comprenda, por ejemplo, analizar tau por una o más técnicas escogidas de Western blot, inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, espectroscopia de masas (MS), MS de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF), desorción/ionización por láser potenciada por superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía
30 líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC) seguido de 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).

35

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

La presente solicitud también describe péptidos que tienen un epítipo de tau reconocido específicamente por
45 cualquier anticuerpo de la presente invención. En una realización, dicho péptido comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 o una secuencia modificada de la misma en la que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más aminoácidos se sustituyen, eliminan y/o añaden, donde el péptido se reconoce por medio de cualquier anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, por el anticuerpo NI-105.4E4 o NI-105.4E3.

50

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
55 mediciones con los niveles que se encuentran en sujetos sanos de edad y género comparables. Un nivel elevado de anticuerpos medidos 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 en el presente documento.

Estas y otras realizaciones se describen y se incluyen por la descripción y los ejemplos de la presente invención. Se puede recuperar bibliografía adicional concerniente a cualquiera de los materiales, procedimientos, usos y compuestos a emplear de acuerdo con la presente invención de bibliotecas públicas y bases de datos, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", que se aloja por el National Center for Biotechnology Information y/o la National Library of Medicine at the National Institutes of
60 Health. Las bases de datos y direcciones web adicionales, tales como las del European Bioinformatics Institute (EBI), que forma parte del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) se conocen por los expertos en la técnica y
65

también se pueden obtener usando motores de búsqueda de Internet. Una descripción general de información de patente en 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.

5 La descripción anterior generalmente describe la presente invención. A menos que se indique otra cosa, un término como se usa en el presente documento da la definición tal como la proporciona el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpreso en 2003, ISBN 0 19 850673 2. Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. No se admite que cualquier documento citado sea de hecho técnica anterior en cuanto a la presente invención.

10

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

15 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no se debería considerar que limiten el alcance de la invención de forma alguna. Los siguientes experimentos en los Ejemplos 1 a 4 se ilustran y se describen con respecto a los anticuerpos NI-105.4E4, NI-105.24B2 y 105.4A3 como se clonan, es decir, las regiones variables de

20 Ig marco 1 (FR1) sin ajustarse a las secuencias de línea germinal (GL) de cadenas variables pesada y ligera humana; véase la Fig. 1.

Material y procedimientos

25 Se pueden encontrar descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en el presente documento, en la bibliografía citada; véase también "The Merck Manual of Diagnosis and Therapy" 17ª Ed. editado por Beers y Berkow (Merck & Co., Inc. 2003).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de
30 biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Para una elaboración adicional de las técnicas generales útiles en la práctica de esta invención, el médico se puede dirigir a libros de texto estándar y reseñas sobre biología celular y cultivo tisular; véanse también las referencias citadas en los ejemplos. Los procedimientos generales sobre bioquímica molecular y celular se pueden encontrar en dichos libros de texto estándar como
35 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); DNA Cloning, Volúmenes I e 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
40 Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Edición (Ausubel et al., eds.); y Recombinant DNA Methodology (Wu, ed., Academic Press). Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller y Calos, eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 y 155 (Wu et al., 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,
45 Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (Weir y Blackwell, eds., 1986). Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Non-viral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplit & 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
50 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 et al., 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 et al., Bioprocess Technol. 19 (1990),
55 251); Extracting information from cDNA arrays, Herzel et al., CHAOS 11 (2001), 98-107.

Procedimientos de identificación de linfocitos B específicos de tau y clonación de los anticuerpos respectivos

60 A menos que se indique otra cosa a continuación, la identificación de linfocitos B específicos de tau y la clonación molecular de anticuerpos anti-tau que presentan especificidad de interés, así como su expresión recombinante y caracterización funcional se ha realizado, o se puede realizar generalmente como se describe en la sección de Ejemplos y Procedimientos Complementarios de la solicitud internacional PCT/EP2008/000053 publicada como WO2008/081008. Se proporciona en esta solicitud un nuevo procedimiento para la identificación de linfocitos B
65 específicos de tau y la clonación molecular de anticuerpos tau que presentan 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 linfocitos B simples u oligoclonales y se criba el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por dichos linfocitos B, para determinar la presencia y afinidad de los nuevos anticuerpos anti-tau en los mismos. El proceso de cribado comprende las etapas de un ensayo de Inmunorreactividad sobre el amiloide de placas tisulares (TAPIR) como se describe en el Ejemplo 1 y como se muestra en la Fig. 9; cribado sobre extractos del cerebro para la unión a PHFTau como se describe en el Ejemplo 2 y como se muestra en las Figuras 3 y 8; cribado 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 y como se muestra en la Fig. 5 con péptidos no fosforilados debido a experimentos de confirmación de epítomos para el anticuerpo NI-105.4E4; una criba 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 y como se muestra en las Figuras 2, 5 y 7.

15 **Purificación del antígeno**

Se adquirió Tau40 humano recombinante en rPeptide (Bogart, GA, Estados Unidos). Se extrajo PHFTau del cerebro con EA.

20 El aislamiento de los filamentos helicoidales apareados que contiene filamentos de tau fosforilada patológicamente (PHFTau) se realizó siguiendo el procedimiento de Goedert *et al.* (Goedert *et al.*, 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, Na₃VO₄ 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, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, AEBSF 1 mM, sacarosa al 10 %). El homogeneizado se centrifugó a 4 °C a 20.000 x g 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 x g 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.

Cribado de anticuerpo tau humano

35 **ELISA:**

Se recubrieron las microplacas de media área de 96 pocillos (Corning) con proteína Tau recombinante (rPeptide, Bogart, Estados Unidos) a una concentración estándar de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento ELISA con carbonato (pH 9,6) durante una noche a 4 °C. Para el cribado de PHFTau, se recubrieron microplacas Immobilizer Microplates (Nunc, Dinamarca) de 96 pocillos con PHFTau extraído de cerebro humano con EA a 1:100 diluciones en tampón de recubrimiento ELISA con carbonato (pH 9,6) durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron en PBS-T a pH 7,6 y se bloquearon sitios de unión no específica durante 2 h a TA con PBS-T que contenía BSA al 2 % (Sigma, Buchs, Suiza). El medio acondicionado de linfocitos B se transfirió desde placas de cultivo de linfocitos B de memoria a placas de ELISA y se incubaron durante 1 hora a TA. Las placas ELISA se lavaron con PBS-T y después se incubaron con anticuerpo policlonal IgG (específico del fragmento Fcy) anti-humano de burro conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immuno Research, Newmarket, Reino Unido). Después de lavar con PBS-T, la unión de anticuerpos humanos se determinó por medición de la actividad de HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

50 **Cribado de microplacas MULTI-ARRAY®**

Se recubrieron placas MULTI-SPOT estándar de 96 pocillos y 10 manchas (Meso Scale Discovery, Estados Unidos) con 30 µg/ml de rTau (rPeptide), extracto de cerebro 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 BSA al 3 % seguido de la incubación con un medio acondicionado con linfocitos B durante 1 h a TA. Las placas se lavaron en PBS-T y luego se incubaron con anticuerpo policlonal anti-humano conjugado con SULFO-Tag (Meso Scale Discovery, Estados Unidos). Después de lavar con PBS-T, la unión de anticuerpo se detectó mediante medición por electroquimioluminiscencia usando un SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Estados Unidos).

60 **Clonación molecular de anticuerpos tau**

Las muestras que contenían linfocitos B de memoria se obtuvieron de sujetos humanos sanos. Los linfocitos B vivos de cultivos de linfocitos B de memoria seleccionados se cultivan y se prepara ARNm. Las secuencias de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina se obtienen entonces usando un enfoque PCR anidado.

65

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 et al., 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 et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).
- 10 La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realiza por medio del nuevo cribado en ELISA tras la expresión recombinantes de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos IgG1 humanos o anticuerpos IgG2a quiméricos se logra tras la inserción de las secuencias de cadena pesada y ligera variables "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 uno o más dominios constantes apropiados. A estos efectos, los cebadores contenían en sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de secuencias de cadena pesada y ligera variable 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 cotransfección 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, Estados Unidos) y el anticuerpo tau monoclonal de ratón AT180 (Thermo Scientific, Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos tau humanos recombinantes NI-105.4E4 y NI-105.4A3 son anticuerpos de esta invención. Los anticuerpos NI-105.4E4, NI105.24B2 y NI-105.4A3 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. En los Ejemplos 1 a 4 se usaron los anticuerpos recombinantes purificados de la presente invención.

ELISA directo

Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Costar, Corning, Estados Unidos) con proteína Tau recombinante (hTau40, rPeptide, Bogart, Estados Unidos) diluida a una concentración de 1 µg/ml en tampón de recubrimiento 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 BSA al 2 % (Sigma, Buchs, Suiza) y Tween20 al 0,5 %. La unión de anticuerpos humanos de la presente invención (NI-105.4E4, NI-105.24B2 y NI-105.4A3) se determinó usando Fcy de IgG anti-humano de cabra conjugado con HRP (Jackson Immuno Research, Newmarket, Reino Unido), seguido de la medición de la actividad de HRP en un ensayo colorimétrico estándar. Los valores de EC₅₀ se calcularon mediante una regresión no lineal usando el software GraphPad Prism (San Diego, Estados Unidos).

Tinción de proteínas por Western Blotting

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 BSA al 2 % a temperatura ambiente durante una hora, las transferencias se incubaron durante una noche con anticuerpos primarios NI-105.4E4, NI-105.24B2 (humano) o Tau12 (anticuerpo monoclonal de ratón, Covance, California, Estados Unidos), seguido de IgGFcy anti-humano de cabra conjugado con HRP (para anticuerpos primarios humanos) o un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP.

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

Extracción de PHFTau de cerebro con EA

- 5 El aislamiento de los filamentos helicoidales apareados que contiene filamentos de tau fosforilada patológicamente (PHFTau) se realizó siguiendo el procedimiento de Goedert *et al.* (Goedert *et al.*, *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, Na₃VO₄ 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, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, AEBSF 1 mM, sacarosa al 10 %). El homogeneizado se centrifugó a 4 °C a 20.000 x g 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 x g 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.

Síntesis de péptidos tau

- 20 Un péptido correspondiente a los aminoácidos 333-346 de hTau40 (₃₃₃GGGQVEVKSEKLD₃₄₆) 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 Microplates (Nunc, Dinamarca). Por consiguiente, un segundo péptido que correspondía a los aminoácidos 226-239 de tau humana (₂₂₆VAVVRpTPPKSPSSA₂₃₉), el epítipo cognado del anticuerpo tau monoclonal de ratón comercialmente disponible AT180 (Thermo Scientific, Estados Unidos), se sintetizó y se usó como control.

Ratones transgénicos

- 30 Se usan tres modelos animales diferentes para tauopatías para validar los anticuerpos tau (y modelos con las especificidades de unión de los mismos) de la presente invención.
1. Ratón TauP301L transgénico (línea 183): que expresa Tau40 humana con la mutación P301L en el promotor murino Thy1.2 (La generación de estos animales transgénicos se describe en Götz *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 529-534 y en la solicitud internacional WO 2003/017918.
 - 35 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, Estados Unidos).
 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, Estados Unidos).

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 sexo.

Ejemplo 1

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

Para validar tau como una diana reconocida de anticuerpos aislados se realizaron ensayos ELISA directos como se ha descrito anteriormente. Para el anticuerpo NI-105.4A3 humano recombinante ejemplar se recubrieron las microplacas de 96 pocillos (Costar, Corning, Estados Unidos) con tau humana recombinante (hTau40, rPeptide, Bogart, Estados Unidos) diluida a una concentración de 3 µg/ml o con BSA en tampón de recubrimiento ELISA con carbonato (pH 9,6) y se ensayó 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 BSA (Fig. 10).

Para una determinación de la concentración eficaz máxima media (EC₅₀) de los anticuerpos NI-105.4E4 y NI-105.24B2 ejemplares, se realizaron experimentos ELISA directos adicionales con concentraciones de anticuerpo variables. Se recubrieron microplacas de 96 pocillos (Costar, Corning, Estados Unidos) con tau humana recombinante (hTau40, rPeptide, Bogart, Estados Unidos) diluida a una concentración de 1 µg/ml (para el ensayo con el anticuerpo NI-105.4E4), o de 3 µg/ml (para el ensayo con el anticuerpo NI-105.24B2) en tampón de recubrimiento ELISA con carbonato y se ensayó la eficiencia de unión del anticuerpo. Los valores de EC₅₀ 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 con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a EC₅₀ 2,4 nM (Fig. 2). NI-105.24B2 se une a hTau40 con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a EC₅₀ 6,6 nM (Fig. 7).

La concentración eficaz máxima media (EC₅₀) 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), 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 EC_{50} 1,4 nM. NI-105.4A3 se une a PHFTau con alta afinidad en el intervalo nanomolar bajo a EC_{50} 1,2 nM (Fig. 12).

Ejemplo 2

5

Análisis de unión a anticuerpos humanos recombinantes con respecto a tau recombinante y tau patológica extraída de cerebro con EA

Determina la capacidad de unión de NI-105.4E4 y NI-105.24B2 a especies tau patológicas extraídas de cerebro con EA. Se realizó un análisis SDS-PAGE y Western Blot 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 Tau12 (anticuerpo monoclonal de ratón, Covance, California, Estados Unidos), seguido de IgGfCy anti-humano de cabra conjugado con HRP (para anticuerpos humanos) o un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP.

15

Los anticuerpos recombinantes NI-105.4E4 (Fig. 3) y NI-105.24B2 (Fig. 8) reconocen hTau40 recombinante, así como PHFTau patológicamente modificado extraído de cerebro con EA en Western blot. Como se esperaba, el anticuerpo de control Tau12 también reconoce ambas especies tau (Fig. 3).

Adicionalmente, como se ha analizado en el Ejemplo 1 anterior, la concentración eficaz máxima media (EC_{50}) 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 EC_{50} 1,2 nM (Fig. 12).

Ejemplo 3

25

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 el hTau40 de longitud completa (aminoácidos 1-441) con una superposición de 11 aminoácidos entre dos péptidos adyacentes se machó en una membrana de nitrocelulosa (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania). La inmunomarcación de anticuerpos, así como la regeneración de membranas se realizó de acuerdo con 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 HRP omitiendo el anticuerpo primario (Fig. 4B). 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).

Dos grupos de manchas de péptidos adyacentes (péptido 83, 84 y 85; péptido 96 y 97) se identificaron específicamente por NI105.4E4 (Figura 4A y A'), en comparación con el anticuerpo de detección solamente (Figura 4B). 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.

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.

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.

50

Para determinar los residuos clave dentro de los péptidos de unión a NI-105.4E4, el barrido de alanina se realizó para 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 (Fig. 4E). Las manchas 35-50 y 51-68 (Fig. 4C) son los péptidos originales (mancha 35 y mancha 51) y sus variantes sustituidas por alanina, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Fig. 4D y 4E. El barrido de alanina sugiere que V339, E342, D387, E391 y K395 son necesarios para la unión de NI-105.4E4.

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 (Fig. 5). 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-105.4E4. Los anticuerpos 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.

65

Para mapear ampliamente el epítipo de unión de NI-105.4A3 en hTau40, se produjeron cuatro polipéptidos del 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, se clonaron en el vector de expresión pRSET-A (Invitrogen), y se transfectaron 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 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 Western Blot. Estos polipéptidos de dominio tau superpuestos cubren la longitud completa de hTau40 (Fig. 13A). 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 N-terminal del hTau40 (aa1-136) (Fig. 13B). El análisis Western blot confirma la unión específica de NI-105.4A3 al dominio I de tau (Fig. 13C).

El mapeo del epítipo NI-105.4A3 con tecnología PepSpot (JPT) identificó los aminoácidos Q35-Q49 de la Tau40, humana (Fig. 14A y C). 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 por glicina o prolina (Fig. 14B). Las manchas enumeradas de izquierda a derecha con 1 y 17 son el epítipo original (mancha 1) y sus sustituciones de alanina, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en la Figura 14C. El escaneo de alanina mostró que D4 0, A41 y K44 son residuos clave para la unión de NI-105.4A3.

Ejemplo 4

Evaluación de la unión de NI-105.4E4 a las formas fisiológicas, así como los agregados patológicos de tejidos de cerebro con EA con tau y en ratones transgénicos con tau humana

Lo ovillos neurofibrilares (NFT) compuestos por filamentos tau hiperfosforilados son una característica neuropatológica distintiva 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 NFT a los seis meses de edad (Gotz *et al.*, 2001a).

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 de esta invención.

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, Estados Unidos). También se incluyeron anticuerpos de detección conjugados con HRP sin anticuerpos primarios.

El anticuerpo humano recombinante NI-105.4E4 identifica diversos NFT e hilos del neurópilo en un cerebro con EA (Fig. 6A), que están ausentes en el cerebro de control sano (Fig. 6B). El anticuerpo secundario por sí solo no da señales ni en el cerebro con EA (Fig. 6C) ni en el cerebro de control (Fig. 6D). En el cerebro de ratón transgénico con tau P301L, NI-105.4E4 se une fuertemente a la tau patológica similar a NFT (Figs. 6E, 6F y 6H), hilos del neurópilo (Figs. 6E y 6G) y neuritas distróficas (Figs. 6E y 6H). Además, NI-105.4E4 también identifica agregados de tau en la etapa pre-ovillo (Fig. 6I). 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 (Fig. 6J).

Ejemplo 5

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

Como ya se ha descrito anteriormente, los estudios en líneas de ratones transgénicos usando vacunación activa con péptidos tau fosforilados 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 *et al.*, *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 pueden 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 ensayo como se describe en los experimentos mencionados anteriormente con anticuerpos de ratón. En particular, los anticuerpos a cribar se pueden aplicar en diversas rutas 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 cerebral secuencial. Además, las pruebas conductuales de los ratones tratado se pueden realizar, por ejemplo, por aversión condicionada al sabor, o condicionamiento contextual del miedo 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 los anticuerpos 4E4 y 4A3 con dominios constantes de IgG2a de ratón

Para generar anticuerpos con inmunogenicidad reducida para su uso en estudios de tratamiento crónico, se generaron las versiones quiméricas de ratón de los anticuerpos 4E4 y 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 con 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 4E4 (ch4E4) y 4A3 quimérico (ch4A3) se muestran a continuación.

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de 4E4 quimérico (ch4E4) y 4A3 quimérico (ch4A3)

| | |
|---|---|
| cadena pesada de ch4E4 maduro (IgG2a de ratón) SEQ ID NO: 20 | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFI SAIHVVQRQASGKGLEWVGR IRSKSHNYATLYAASLKGKRFSLRDDSNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTV LSANYDTFDYWGQGLVTVSSAKTTPAPSVYPLAPVCGDFTGSSVTLGCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPK IKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEP VLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K |
| cadena ligera de ch4E4 maduro (lambda de ratón) SEQ ID NO: 21 | SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAPVLIYKD TERPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYCLSDNSATWVFGG GTKVTVLGQPKSSPSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGVVTVDWK VDGTPVTQGMETTQPSKQSNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEG HTVEKSLSRADCS |

Ejemplo 7

Quimerización de los anticuerpos 4E4 y 4A3 con dominios constantes de IgG2a de ratón

Se identificó un sitio de glucosilación unido a N de consenso en la región CDR1 de la cadena pesada de 4E4. Tras la expresión celular de mamífero (CHO), el sitio de N-glucosilación predicho (Asn-30) se ocupó totalmente por glicano, como se demostró por espectrometría de masas. Para eliminar la N-glucosilación 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 glucosilado original (véase la Fig. 15).

Tabla 4: 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 (IgG2a de ratón) SEQ ID NO: 22 | □ |
|--|---|

| | |
|--|---|
| | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFOISAIHWVRQASGKGLEWVGR IRSKSHNYATLYAASLKGRFTLSRDDSRNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTV LSANYDTFDYWGGQTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLV KGYFPEPVTTLTWNSSGLSSGVHTFPVAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPK IKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFEVNNVEVHTAQTQTHREY NSTLRVVSALPIQHQDWMSSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEP VLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPG K</p> |
|--|---|

Ejemplo 8

Producción de 4E4 aglucosilado quimérico (ch4E4(N30Q) mlgG1 Agly)

- 5 Se produjo una variante aglucosilada quimérica de ratón de 4E4 (ch4E4(N30Q) IgG1-Agly) para evaluar la relación entre la función y la actividad efectora del anticuerpo. Para la cadena pesada, el dominio variable de 4E4 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 glucosilación de Fc de consenso. La región variable de cadena pesada también contenía el cambio de
- 10 N30Q para eliminar el sitio de N-glucosilación de consenso en CDR1 (Ejemplo 7). La cadena ligera era la cadena ligera de lambda ch4E4 descrita anteriormente.

Ejemplo 9

15 Estudio de penetración cerebral aguda de 4E4 y 4A3 humanos

- Se produjeron 4E4 y 4A3 humanos mediante transfección transitoria de células CHO y se modificaron 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 por vía intraperitoneal 30 mg/kg de anticuerpo 4E4 (n = 7) , 4A3 (n = 7) o un volumen equivalente de PBS (n = 7) el día 1 y el día 4. El día 5, los ratones se perfundieron 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 incluirse en un bloque de parafina y seccionarse. El plasma se almacenó a -80 °C en alícuotas.

- 25 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 entonces a tubos de policarbonato y se añadieron 5 volúmenes más de solución de homogeneización, y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Después, 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 adicionalmente con extracción de sarcosilo modificada (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 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 entonces 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % antes de la incubación con 50 µl/pocillo de PBS que contenía BSA al 2 % a temperatura ambiente durante una hora. Las fracciones solubles de extractos de cerebro, las muestras de plasma y el estándar de anticuerpo (4A3) se diluyeron en PBS que contenía BSA al 2 % y Tween 20 al 0,1 %. Se añadieron 30 µl de las muestras diluidas en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó entonces con 200 µl/pocillo de PBS que contenía Tween 20 al 0,1 % cuatro veces antes de incubarse con Fcγ anti-humano de burro conjugado con HRP (Jackson, diluido a 1:10.000 en PBS que contenía BSA al 2 % y Tween 20 al 0,1 %) a temperatura ambiente durante una hora. Después, 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). Después, 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 seriadas de 4A3. Las concentraciones de anticuerpo en muestras de plasma y cerebro se calcularon de acuerdo con los estándares. El nivel de IgG humana en el cerebro se convirtió entonces en µg de anticuerpo/gramo de tejido cerebral fresco (suponiendo 1 g/10 ml) como se indica en la Fig. 17.

Se detectaron niveles elevados de IgG humana en el plasma de todos los ratones tratados con 4E4 y 4A3. Por el

contrario, no se detectó IgG humana en el plasma de los ratones tratados con PBS (Fig. 16). La cantidad significativa de IgG humana se detectó en homogeneizados de cerebro de ratones tratados con 4E4 y 4A3 (Fig. 17).

Ejemplo 10

5

Estudio crónico con 4E4 quimérico y 4A3

4E4 quimérico y 4A3 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 mantendrá 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 periodo de tratamiento. Se recogerán cerebro, médula espinal y sangre. Se puede fijar posteriormente medio cerebro y médula espinal en formalina al 10 % durante tres días antes de incluirse en un bloque de parafina. Se pueden usar secciones de 4-6 µm de espesor tomadas 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.

20

Los efectos de los fármacos se evaluarán comparando el nivel de ovillos neurofibrilares (NFT) y el nivel de tau con características de solubilidad diferentes en muestras tratadas y de control. NFT 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 NFT. 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.

25

Se puede extraer tau soluble e insoluble siguiendo el protocolo de extracción de proteína del cerebro descrito en el presente documento. 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 tampón de homogeneizado de sacarosa al 10 % que consistía en Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 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 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 pueden agruparse, y se añade N-lauril-sarcosinato (Sigma) a una concentración final al 1 % (p/vol), y se incuban 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 suspende de nuevo en 0,2 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) como fracción de PHF.

30

35

40

Los niveles de tau soluble e insoluble se medirán con kits 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 estándares de cantidades conocidas de tau.

45

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 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). Luego 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 retirar 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 entrada 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 (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 típicamente 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 funcional relacionada con un trastorno. Por lo tanto, una relación cercana a 1 indica una memoria

50

55

60

65

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.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Chen, Feng
- 10 Grimm, Jan
- Baeriswyl, Jean-Luc
- Nitsch, Roger
- Hock, Christoph
- Panima Pharmaceuticals AG
- 15 University of Zurich

- <120> ANTICUERPOS ANTI-TAU HUMANOS

- <130> 2159.341PC02
- 20
- <140> A asignar
- <141> Con la presente

- <150> EP 10 013 494.9
- 25 <151> 11-10-2010

- <150> 61/391.751
- <151> 11-10-2010

- 30 <160> 93

- <170> PatentIn versión 3.5

- <210> 1
- 35 <211> 352
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <220>
- 40 <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(352)
- <223> Isoforma Fetal-Tau

- <300>
- 45 <301> Goedert M., Wischik C., Crowther R., Walker J., Klug A.
- <302> Clonación y secuenciación del ADNc que codifica una proteína central del filamento helicoidal emparejado de la enfermedad de Alzheimer: identificación como la proteína tau asociada a microtúbulos.
- <303> Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
- 50 <304> 85
- <306> 4051-4055
- <307> 01-06-1988

- <300>
- 55 <308> P10636-2
- <309> 05-10-2010
- <313> (1)..(352)

- <400> 1
- 60
- 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
- 65 20 25 30

ES 2 686 550 T3

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 5 50 55 60
 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 10 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
 15 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
 20 130 135 140
 Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 25 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
 30 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
 35 210 215 220
 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 225 230 235 240
 40 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
 45 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
 50 290 295 300
 Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
 305 310 315 320
 55 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
 60
 <210> 2
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65
 <220>

<221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(381)
 <223> Isoforma Tau-B

5 <300>
 <301>Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther
 R.A.
 <302>Múltiples isoformas de la proteína tau asociada a microtúbulos humanos:
 secuencias y localización en ovillos neurofibrilares de
 10 la enfermedad de Alzheimer.
 <303> Neurona
 <304> 3
 <306> 519-526
 <307> 01-10-1989

15 <300>
 <308> P10636-4
 <309> 05-10-2010
 <313> (1)..(381)

20 <400> 2

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

25 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
 30 35 40 45

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

35 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80

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

40 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
 45 115 120 125

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

50 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

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

60 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

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

ES 2 686 550 T3

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

5 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

10 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
 15 305 310 315 320

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

20 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

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

<210> 3
 30 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 35 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(410)
 <223> Isoforma Tau-C

<300>
 40 <301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther
 R.A.
 <302> Múltiples isoformas de la proteína tau asociada a microtúbulos humanos:
 secuencias y localización en ovillos neurofibrilares de
 la enfermedad de Alzheimer.

45 <303> Neurona
 <304> 3
 <306> 519-526
 <307> 01-10-1989

50 <300>
 <308> P10636-5
 <309> 05-10-2010
 <313> (1)..(410)

55 <400> 3

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

60 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

65 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

ES 2 686 550 T3

50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 5
 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
 10 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 15 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
 20 145 150 155 160
 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
 25 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 30 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
 35 225 230 235 240
 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
 40 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 275 280 285
 45 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
 50 305 310 315 320
 Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 325 330 335
 Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
 55 340 345 350
 Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 355 360 365
 60 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
 65 385 390 395 400
 Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu

405 410

<210> 4

<211> 383

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

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

<223> Isoforma Tau-D

<300>

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

15 R.A.

<302> Clonación y secuenciación del ADNc que codifica una isoforma de proteína tau asociada a microtúbulos que contiene cuatro repeticiones en tándem: expresión diferencial de ARNm de proteína tau en cerebro humano.

20 <303> EMBO J.

<304> 8

<306> 393-399

<307> 01-02-1989

25 <300>

<308> P10636-6

<309> 05-10-2010

<313> (1)..(383)

30 <400> 4

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

35 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

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

45 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

50 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

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

60 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

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

ES 2 686 550 T3

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

5 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

10 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
 15 260 265 270

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

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

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

25 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
 30 340 345 350

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

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

<210> 5
 <211> 412

40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PÉPTIDO

45 <222> (1)..(412)
 <223> Isoforma Tau-E

<300>
 <301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther
 50 R.A.
 <302> Múltiples isoformas de la proteína tau asociada a microtúbulos humanos:
 secuencias y localización en ovillos neurofibrilares de
 la enfermedad de Alzheimer.

<303> Neurona

55 <304> 3
 <306> 519-526
 <307> 01-10-1989

<300>
 60 <308> P10636-7
 <309> 05-10-2010
 <313> (1)..(412)

<400> 5

65 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

ES 2 686 550 T3

1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 5
 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
 10 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 15 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
 20 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
 25 130 135 140
 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 30 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 Pro Thr Arg
 180 185 190
 35 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
 40 210 215 220
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240
 45 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 260 265 270
 50 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 55 290 295 300
 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 305 310 315 320
 60 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
 65 Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro

ES 2 686 550 T3

355 360 365
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 370 375 380
 5 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
 10 405 410

 <210> 6
 <211> 441
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(441)
 20 <223> Isoforma Tau-F

 <300>
 <301> Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther
 R.A.
 25 <302> Múltiples isoformas de la proteína tau asociada a microtúbulos humanos:
 secuencias y localización en ovillos neurofibrilares de
 la enfermedad de Alzheimer.
 <303> Neurona
 <304> 3
 30 <306> 519-526
 <307> 01-10-1989

 <300>
 <308> P10636-8
 35 <309> 05-10-2010
 <313> (1)..(441)

 <400> 6

 40 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
 45 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 50 55 60

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

 55 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
 60 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
 65 130 135 140

ES 2 686 550 T3

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
 5 165 170 175

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

10 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

15 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
 20 245 250 255

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

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

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

30 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
 35 325 330 335

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

40 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

45 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
 50 405 410 415

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

55 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

<210> 7
 <211> 7
 60 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

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

65 <220>

ES 2 686 550 T3

<221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)
 <223> Epitope NI-105.4E4

5 <400> 7

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
 1 5

10 <210> 8

<211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <220>

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

20 <220>

<221> V_region
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

25 <220>

<221> V_region
 <222> (148)..(204)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

30 <220>

<221> V_region
 <222> (301)..(330)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

35 <400> 8

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg gga 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

40

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc aat ttc aac atc tct 96
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Ile Ser
 20 25 30

45

gct ata cac tgg gtc cgc cag gct tcc ggg aaa ggg ctg gag tgg gtt 144
 Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

50

ggc cga ata aga agt aaa tct cac aat tac gcg act tta tat gct gcg 192
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Ser His Asn Tyr Ala Thr Leu Tyr Ala Ala
 50 55 60

55

tcc ctg aaa ggc cgg ttc acc ctc tcc aga gat gat tca agg aac acg 240
 Ser Leu Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Thr
 65 70 75 80

60

gcg tat ctg caa atg agc agc ctg caa acc gag gat atg gcc gtc tat 288
 Ala Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Met Ala Val Tyr
 85 90 95

65

tac tgt act gtt ctg agt gcg aat tac gac acc ttt gac tac tgg ggc 336
 Tyr Cys Thr Val Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

70

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 686 550 T3

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

15 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

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

25 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

30 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 321

35 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

40 <222> (1)..(321)

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

45 <220>

<221> V_region

<222> (67)..(99)

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

50 <220>

<221> V_region

<222> (145)..(165)

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

55 <220>

<221> V_region

<222> (262)..(291)

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

60 <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

65 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

ES 2 686 550 T3

```

                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
5   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
10  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

15  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
20  Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
        100         105

    <210> 11
    <211> 107
25  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 11

30  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
35

    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
40  50         55         60

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

45  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
50

    <210> 12
    <211> 345
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens
55

    <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(345)
    <223> NI-105.24B2-VH secuencia de cadena pesada variable (VH) donde Gln en
60  la posición 1 de la secuencia también puede ser Glu

    <220>
    <221> V_region
    <222> (91)..(105)
65  <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

```

ES 2 686 550 T3

<220>
 <221> V_region
 <222> (148)..(198)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

5

<220>
 <221> V_region
 <222> (295)..(312)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

10

<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

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

20 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
 25 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
 30 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

35

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

40 gtc tcc tcg 345
 Val Ser Ser
 115

<210> 13
 45 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 50 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
 55 20 25 30

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

60 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

65

Met Asp Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 686 550 T3

85 90 95

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

5 Val Ser Ser
 115

<210> 14
 10 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 15 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <223> NI-105.24B2-VL secuencia de cadena ligera variable (VL) donde Glu en la posición 3 en la secuencia también puede ser Val

20 <220>
 <221> V_region
 <222> (67)..(99)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

25 <220>
 <221> V_region
 <222> (145)..(165)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

30 <220>
 <221> V_region
 <222> (262)..(294)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

35 <400> 14
 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

40 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
 45 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
 50 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

55 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

60 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
 65 <211> 108
 <212> PRT

ES 2 686 550 T3

<213> Homo sapiens

<400> 15

5 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

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

15 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

20 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

25

<210> 16

<211> 378

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

35 <223> NI-105.4A3-VH secuencia de cadena pesada variable (VH) donde Gln en la posición 1 de la secuencia también puede ser Glu y Ser en la posición 7 de la secuencia también puede ser Thr

<220>

<221> V_region

40 <222> (91)..(105)

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

<220>

<221> V_region

45 <222> (148)..(198)

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

<220>

<221> V_region

50 <222> (295)..(345)

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

<400> 16

55 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

60 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

65 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

ES 2 686 550 T3

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

5 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
 10 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
 15 100 105 110

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

20 <210> 17
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 17

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

30 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 35 40 45

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

40 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

45 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
 50 115 120 125

<210> 18
 <211> 324
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

60 <223> NI-105.4A3-VL secuencia de cadena ligera variable (VL)

<220>
 <221> V_region
 <222> (67)..(99)

65 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

ES 2 686 550 T3

<220>
 <221> V_region
 <222> (145)..(165)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

5

<220>
 <221> V_region
 <222> (262)..(294)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

10

<400> 18

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 19

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

50

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

55

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

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

65

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

ES 2 686 550 T3

100 105

<210> 20
 <211> 451
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena pesada madura ch4E4 (IgG2a de ratón)

10
 <400> 20

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

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
 20 35 40 45

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

25 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

30 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
 35 115 120 125

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

40 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

45 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
 50 195 200 205

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

55 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

60 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
 65 275 280 285

ES 2 686 550 T3

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
 5 305 310 315 320
 Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 10 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
 15 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
 20 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 405 410 415
 25 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
 30 Pro Gly Lys
 450
 <210> 21
 35 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cadena ligera madura ch4E4 (lambda de ratón)
 <400> 21
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 45 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr
 20 25 30
 50 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
 55 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
 60 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ser
 100 105 110
 65 Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Glu Thr
 115 120 125

ES 2 686 550 T3

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

5 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

10 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
 15 195 200 205

Arg Ala Asp Cys Ser
 210

20 <210> 22
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cadena pesada madura ch4E4(N30Q) (IgG2a de ratón)
 <400> 22

30 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

35 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
 40 50 55 60

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

45 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

50 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
 55 130 135 140

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

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

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

65 Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro

ES 2 686 550 T3

195 200 205

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

5
 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
 10 245 250 255

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

15 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

20
 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
 25 325 330 335

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

30 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

35
 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
 40 405 410 415

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

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

Pro Gly Lys
 450

50
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> NI-105.4E4-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR1

<400> 23

60
 Ile Ser Ala Ile His
 1 5

<210> 24
 65 <211> 19
 <212> PRT

ES 2 686 550 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

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

5

<400> 24

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

10

Leu Lys Gly

<210> 25

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> NI-105.4E4-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR3

<400> 25

Leu Ser Ala Asn Tyr Asp Thr Phe Asp Tyr

25

1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

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

35 <400> 26

Phe Gly Asp Thr Leu Pro Lys Gln Tyr Thr Tyr

1

5 10

40 <210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> NI-105.4E4-VL (secuencia de cadena ligera variable VL) CDR2

<400> 27

50 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser

1

5

<210> 28

<211> 10

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NI-105.4E4-VL (secuencia de cadena ligera variable VL) CD3

60

<400> 28

Leu Ser Ala Asp Asn Ser Ala Thr Trp Val

1

5 10

65

<210> 29

ES 2 686 550 T3

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

5 <220>
<223> NI-105.24B2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR1

<400> 29

10 Asn Tyr Ile Ile His
1 5

<210> 30
<211> 17

15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NI-105.24B2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CD2
20
<400> 30

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

25
Ala

<210> 31

30 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> NI-105.24B2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR3

<400> 31

Leu Ser Pro Ser Asn Pro

40 1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

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

50 <400> 32

Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Gln Phe Val Tyr

1 5 10

55 <210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

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

<400> 33

65 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser

1 5

ES 2 686 550 T3

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> NI-105.24B2-VL (secuencia de cadena ligera variable VL) CDR3

10 <400> 34

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

15 <210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> NI-105.4A3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR1

<400> 35

25 Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 36
<211> 17
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> NI-105.4A3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR2

35 <400> 36

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

40 Gly

<210> 37
45 <211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> NI-105.4A3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH) CDR3

<400> 37

Ala Arg Ala Phe Ala Ser Gly Gln Arg Ser Thr Ser Thr Val Pro Asp
55 1 5 10 15

Tyr

60 <210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> NI-105.4A3-VL (secuencia de cadena ligera variable VL) CDR1

<400> 38

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

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

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

15 <400> 39

Glu Asp Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

20 <210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

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

<400> 40

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

<210> 41

<211> 11

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

40

<400> 41

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

45

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Péptido

<400> 42

55

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

<210> 43

60 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 43

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 1 5 10 15

5

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 44

15

Ala Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 45

Gly Ala Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 30 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 46

Gly Gln Ala Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 47

Gly Gln Val Ala Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 55 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

65

<400> 48

ES 2 686 550 T3

Gly Gln Val Glu Ala Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
1 5 10 15

5 <210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 49

15 Gly Gln Val Glu Val Ala Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
1 5 10 15

<210> 50
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4
25 <400> 50

Gly Gln Val Glu Val Lys Ala Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
1 5 10 15

30 <210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 51

40 Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Ala Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
1 5 10 15

<210> 52
45 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 52

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Ala Leu Asp Phe Lys Asp Arg
55 1 5 10 15

<210> 53
<211> 15
<212> PRT
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

65 <400> 53

ES 2 686 550 T3

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Ala Asp Phe Lys Asp Arg
1 5 10 15

<210> 54

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 54

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Ala Phe Lys Asp Arg
15 1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

25 <400> 55

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

30 <210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 56

40 Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Ala Asp Arg
1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

50

<400> 57

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Ala Arg
1 5 10 15

55

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 58

65

Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Ala

1 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

10 <400> 59

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

15 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 60

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

<210> 61
 30 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 61

Lys Gly Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 40 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

50 <400> 62

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

55 <210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 63

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

ES 2 686 550 T3

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

10 <400> 64

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

15 <210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 65

25 Lys Ala Lys Thr Ala His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
1 5 10 15

<210> 66
<211> 15
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

35 <400> 66

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

40 <210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 67

50 Lys Ala Lys Thr Asp His Ala Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
1 5 10 15

<210> 68
55 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 68

Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Gly Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
65 1 5 10 15

ES 2 686 550 T3

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 69
10
Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Pro Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
1 5 10 15

<210> 70
15 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 70

Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Ala Ile Val Tyr Lys Ser Pro
25 1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

35 <400> 71

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

40 <210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 72

50 Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Ala Tyr Lys Ser Pro
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítopo de mutagénesis de alanina 4E4
60
<400> 73

Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Ala Lys Ser Pro
1 5 10 15
65
<210> 74

ES 2 686 550 T3

<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 74

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

<210> 75
<211> 15

15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

20 <400> 75

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

25 <210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Epítipo de mutagénesis de alanina 4E4

<400> 76

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

<210> 77
40 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Mutagénesis de alanina

<400> 77

Ala Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu Gln
50 1 5 10 15

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Mutagénesis de alanina

60 <400> 78

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

65 <210> 79
<211> 15

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Mutagénesis de alanina

<400> 79

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

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

20 <400> 80

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

25 <210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 81

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

<210> 82

<211> 15

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

45

<400> 82

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

50

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 83

60

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

<210> 84

65 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

5

<400> 84

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

10

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 85

20

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

<210> 86

25

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 86

Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Ala Lys Glu Ser Pro Leu Gln
35 1 5 10 15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

45

<400> 87

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

50

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 88

60

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

<210> 89

<211> 15

65

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

5 <400> 89

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

10 <210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 90

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

<210> 91

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

30

<400> 91

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

35

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Mutagénesis de alanina

<400> 92

45

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

<210> 93

50 <211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> anticuerpo VH

<400> 93

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
60 1 5 10 15

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

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

ES 2 686 550 T3

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

5 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

10 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
15 115 120

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-tau monoclonal humano aislado, o un fragmento de unión a tau del mismo que se une específicamente a un epítipo tau que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 e
 - (i) es capaz de unirse a tau patológicamente modificado;
 - (ii) se une a tau agregada patológicamente en la fase pre-ovillos, en ovillos neurofibrilares (NFT), hilos del neuropilo y/o neuritas distróficas en el cerebro; y
 - (iii) no se une sustancialmente a formas fisiológicas de tau en el cerebro de un donante sano cuando se evalúa mediante tinción inmunohistoquímica.
2. Un anticuerpo anti-tau monoclonal humano aislado, o un fragmento de unión a tau del mismo que comprende:
 - (a) una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, 24, y 25, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, 27, y 28, respectivamente; o
 - (b) una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, 36, 37, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, 39, y 40, respectivamente.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de la reivindicación 2 que comprende
 - (a) una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 11, respectivamente;
 - (b) una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y 11, respectivamente; o
 - (c) una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fv monocatenario (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), y un fragmento F(ab')₂.
5. Un polinucleótido o polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector o vectores que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5.
7. Una célula huésped que comprende el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5 o el vector o vectores de la reivindicación 6.
8. Un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-tau o un fragmento de unión a tau del mismo, que comprende
 - (a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 7; y
 - (b) aislar dicho anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo del cultivo.
9. Un anticuerpo anti-tau o un fragmento de unión a tau del mismo codificado por el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5 o que puede obtenerse por el procedimiento de la reivindicación 8.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 9, que
 - (a) está marcado de forma detectable donde el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado; o
 - (b) que está unido a un fármaco.
11. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 9 o 10, el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5, el vector o vectores de la reivindicación 6 o la célula huésped de la reivindicación 7, donde la composición es
 - (i) una composición farmacéutica que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable; o
 - (ii) una composición de diagnóstico que comprende además uno o más reactivos usados convencionalmente en procedimientos de diagnóstico basados en el sistema inmune o en ácido nucleico.
12. La composición de la reivindicación 11 que comprende además un agente neuroprotector útil para tratar una tauopatía neurodegenerativa.

13. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 9 o 10 para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto humano, donde la tauopatía neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica/complejo 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 relacionado con el 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 postencefalítico, 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.
- 15 14. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde la tauopatía neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.
15. El anticuerpo anti-tau o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 9 o 10, para su uso en el control de la progresión de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto humano, o la respuesta a un tratamiento de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto humano, donde la tauopatía neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica/complejo 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 relacionado con el 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 postencefalítico, 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.
16. Un procedimiento para diagnosticar o controlar la progresión de una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto humano, comprendiendo el procedimiento
- (a) evaluar el nivel de tau patológicamente modificada o agregada en una muestra del sujeto humano a diagnosticar con al menos un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 9 o 10; y
- (b) comparar el nivel de tau modificada o agregada con un estándar de referencia que indique el nivel de la tau patológicamente modificada o agregada en uno o más sujetos humanos de control,
- donde una diferencia o similitud entre el nivel de tau patológicamente modificada o agregada y el estándar de referencia indica que el sujeto tiene una tauopatía neurodegenerativa, donde la tauopatía neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica/complejo 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 relacionado con el 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 postencefalítico, 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.
17. El anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 9 o 10 para su uso en la detección *in vivo* de, o el direccionamiento de un agente terapéutico o de diagnóstico a tau en el cuerpo humano o animal, donde dicha detección *in vivo* comprende la tomografía por emisión de positrones (PET), la tomografía por emisión de fotón único (SPECT), la imagen óptica de infrarrojo cercano (NIR) o la imagen por resonancia magnética (MRI).
18. Un procedimiento para diagnosticar una tauopatía neurodegenerativa en un sujeto humano, que comprende detectar la presencia de tau que se une al anticuerpo de las reivindicaciones 2 o 3 en una muestra biológica de dicho sujeto.
19. Un kit útil en el diagnóstico de una tauopatía neurodegenerativa, comprendiendo dicho kit el anticuerpo o fragmento de unión a tau del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 9 o 10, el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 5, el vector o vectores de reivindicación 6, o la célula huésped de la reivindicación 7, con reactivos o instrucciones de uso.

ES 2 686 550 T3

A NI-105.4E4-VH (secuencia variable de cadena pesada VH; SEQ ID NO: 9)
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFNISAIHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSHNYATLY
-----FR3-----CDR3-----FR4-----
AASLKGRFTLSRDDSNTAYLQMSLQTEDMAVYYCTVLSANYDTFDYWGQGLVTVSS

NI-105.4E4-VL (secuencia variable de cadena ligera VL; SEQ ID NO: 11)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
SYELTQPPSVSVSPGQTARISCFGDTLPKQYTYWYQQKPGQAPVLVIYKDTERPSGIPERFS
LPV
-----CDR3-----FR4-----
GSSSGTTVTLTISGVQAEDYCYCLSDNSATWVFGGGTKVTVL

B NI-105.24B2-VH (secuencia variable de cadena pesada VH; SEQ ID NO: 13)
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFVNYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPNGGNTSYAE
E
----FR3-----CDR3--FR4-----
KFQARVTLTSDTSTSTVYMDLSSLTSEDYAVYYCAVLSPSNPWGQGTTVTVSS

NI-105.24B2-VL (secuencia variable de cadena ligera VL; SEQ ID NO: 15)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
SYELTQPPSVSVSPGQTAGITCSGDALPKQFVYWYQKKPGQAPVLLIYKDTERPSRIPERFS
V
-----CDR3-----FR4-----
GSTSGTTVALTINGVQAEDYCYCQSADRSGALWVFGGGTKLTVL

C NI-105.4A3-VH (secuencia variable de cadena pesada VH; SEQ ID NO: 17)
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVESGGGAVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMHWVRQAPGKGLQWVAVISYEGTYKYAD
E T
----FR3-----CDR3-----FR4-----
SVKGRFTISRDNKNTLNQMSLRLVEDTAVYFCVKARAFASGQRSTSTVDPDYWGQGLVTV
SS

NI-105.4A3-VL (secuencia variable de cadena ligera VL; SEQ ID NO: 19)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDNKRPSGIPERFS
-----CDR3-----FR4-----
GSSSGTVATLTISGAQVDDEADYCYSTDISGDLRVFGGGTKLTVL

FIG. 1

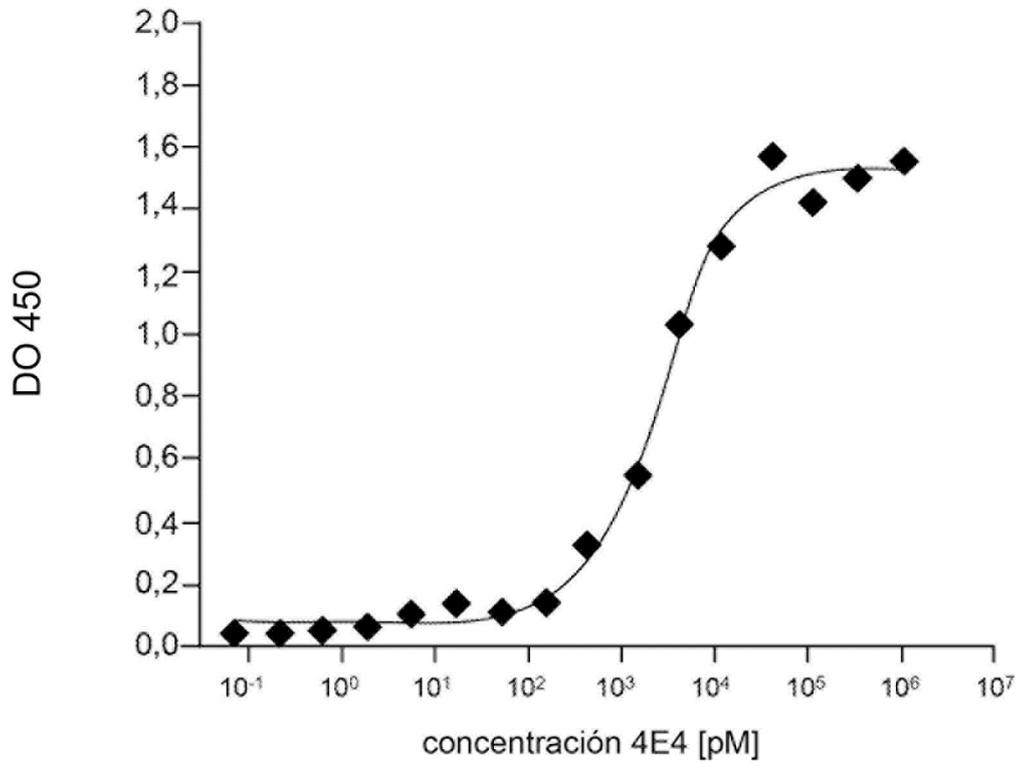


FIG. 2

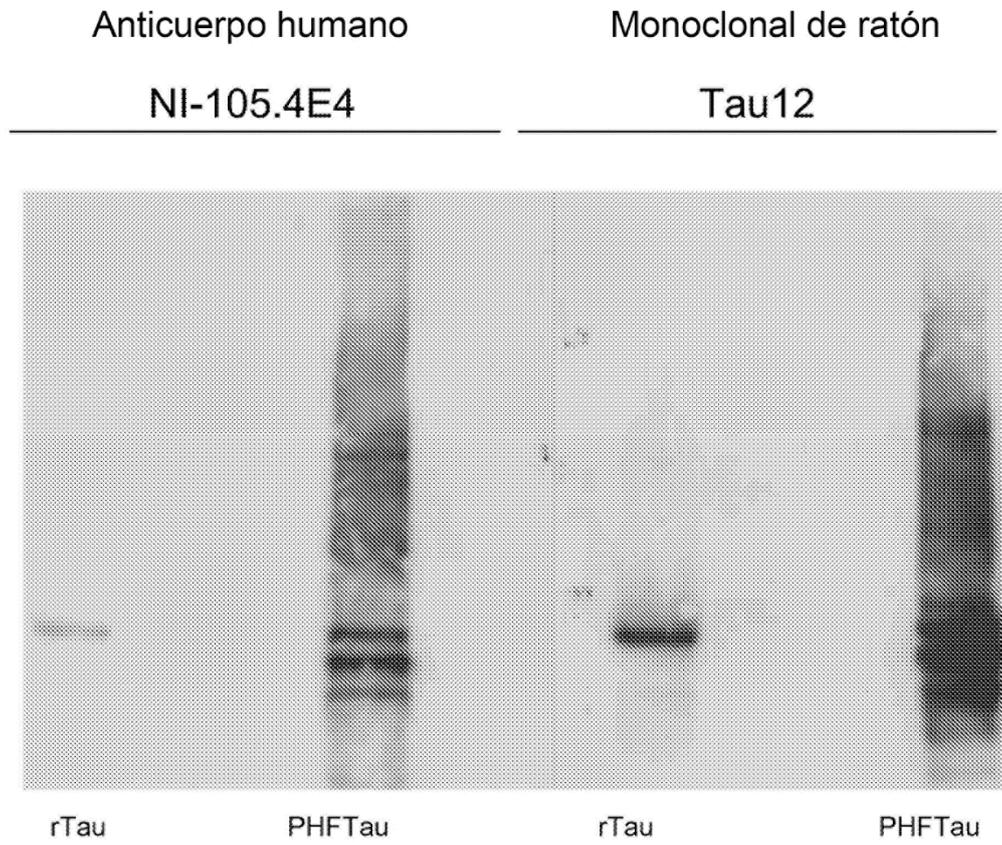


FIG. 3

FIG. 4A

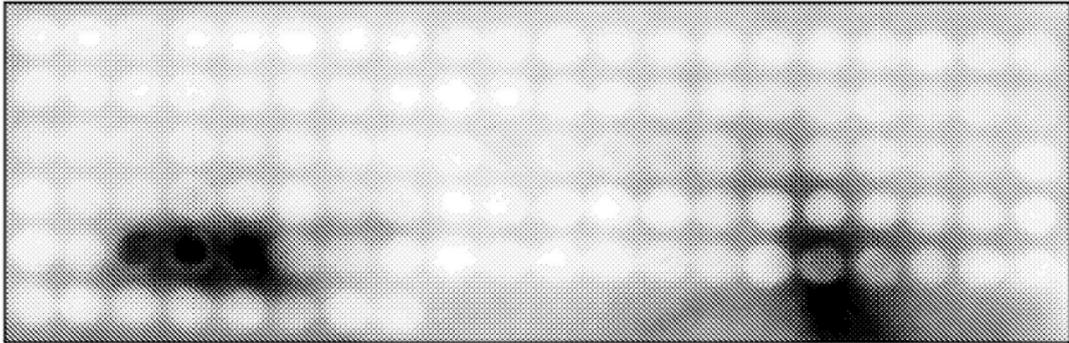


FIG. 4A'

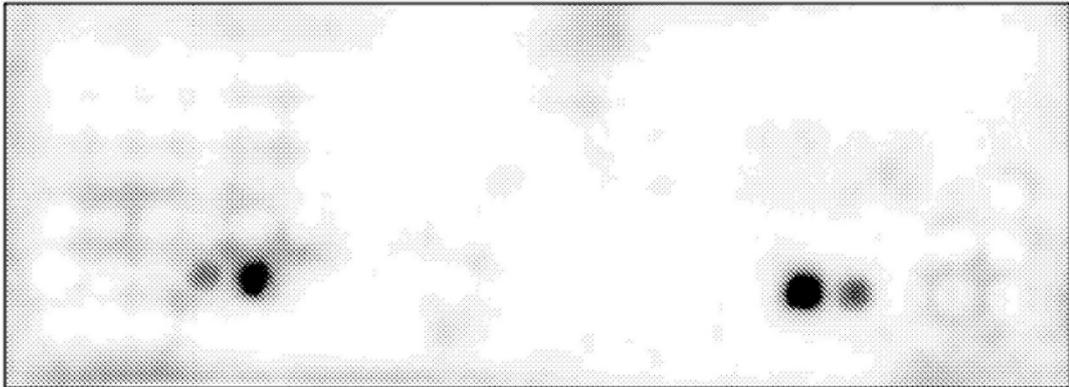


FIG. 4B

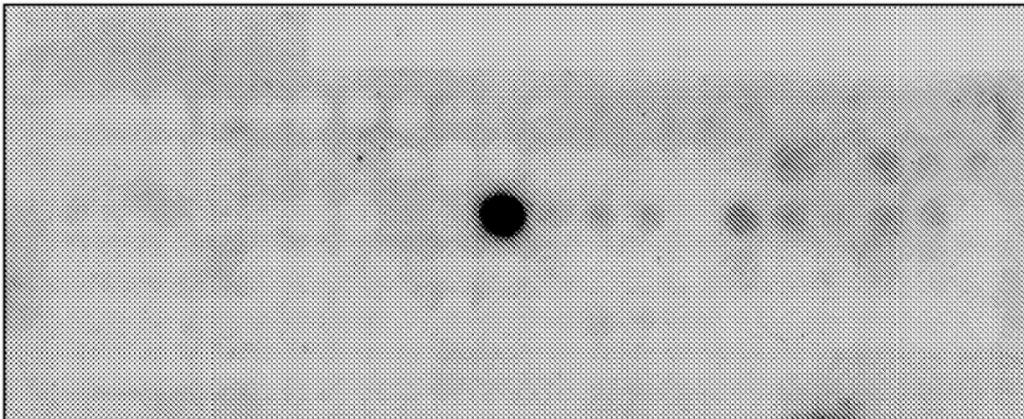


FIG. 4C

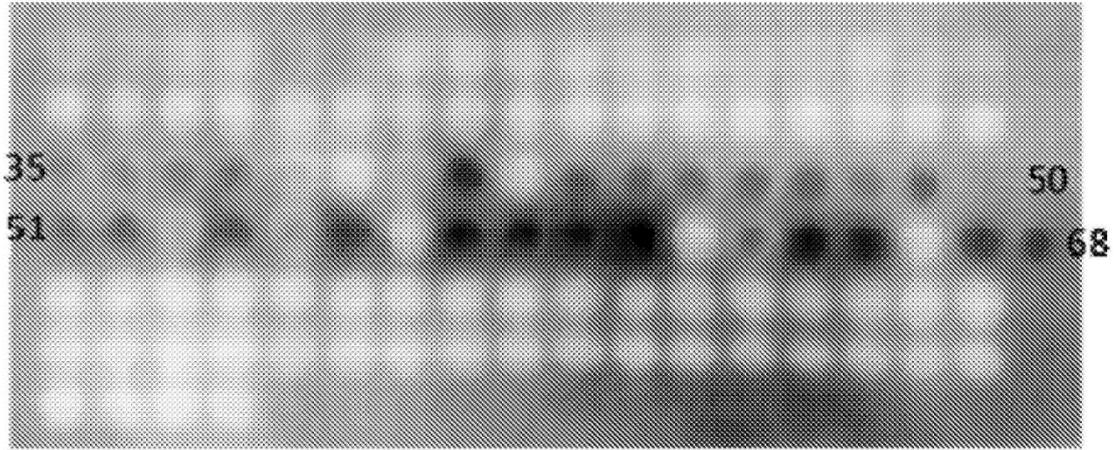


FIG. 4D

Tabla de mutagénesis de alanina del epítipo 4E4

³³⁵GQVEVK SEKLDFKDR₃₄₉

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------|
| 35 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 43 |
| 36 | A | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 44 |
| 37 | G | A | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 45 |
| 38 | G | Q | A | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 46 |
| 39 | G | Q | V | A | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 47 |
| 40 | G | Q | V | E | A | K | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 48 |
| 41 | G | Q | V | E | V | A | S | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 49 |
| 42 | G | Q | V | E | V | K | A | E | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 50 |
| 43 | G | Q | V | E | V | K | S | A | K | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 51 |
| 44 | G | Q | V | E | V | K | S | E | A | L | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 52 |
| 45 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | A | D | F | K | D | R | SEQ ID NO: 53 |
| 46 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | A | F | K | D | R | SEQ ID NO: 54 |
| 47 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | A | K | D | R | SEQ ID NO: 55 |
| 48 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | A | D | R | SEQ ID NO: 56 |
| 49 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | A | R | SEQ ID NO: 57 |
| 50 | G | Q | V | E | V | K | S | E | K | L | D | F | K | D | A | SEQ ID NO: 58 |

FIG. 4E

Tabla de mutagénesis de alanina del epítipo 4E4

383 **KAKTDHGA EIVYKSP** 397

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------------|
| 51 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 59 |
| 52 | A | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 60 |
| 53 | K | G | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 61 |
| 54 | K | P | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 62 |
| 55 | K | A | A | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 63 |
| 56 | K | A | K | A | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 64 |
| 57 | K | A | K | T | A | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 65 |
| 58 | K | A | K | T | D | A | G | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 66 |
| 59 | K | A | K | T | D | H | A | A | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 67 |
| 60 | K | A | K | T | D | H | G | G | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 68 |
| 61 | K | A | K | T | D | H | G | P | E | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 69 |
| 62 | K | A | K | T | D | H | G | A | A | I | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 70 |
| 63 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | A | V | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 71 |
| 64 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | A | Y | K | S | P | SEQ ID NO: 72 |
| 65 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | A | K | S | P | SEQ ID NO: 73 |
| 66 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | A | S | P | SEQ ID NO: 74 |
| 67 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | A | P | SEQ ID NO: 75 |
| 68 | K | A | K | T | D | H | G | A | E | I | V | Y | K | S | A | SEQ ID NO: 76 |

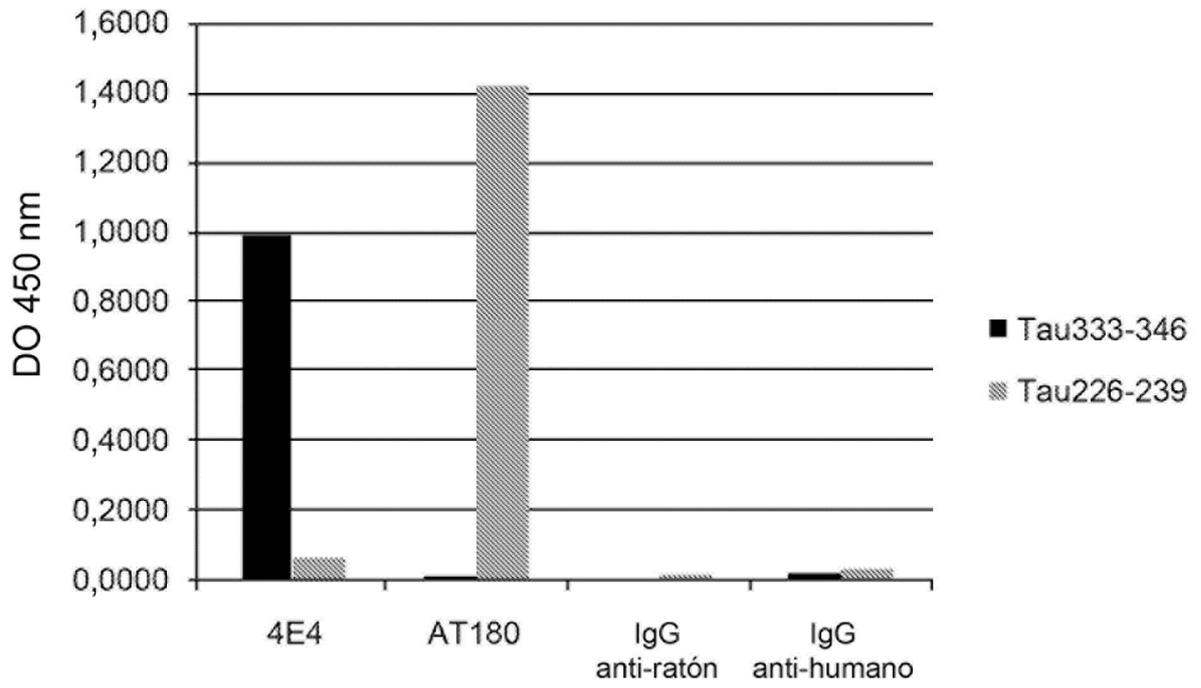


FIG. 5

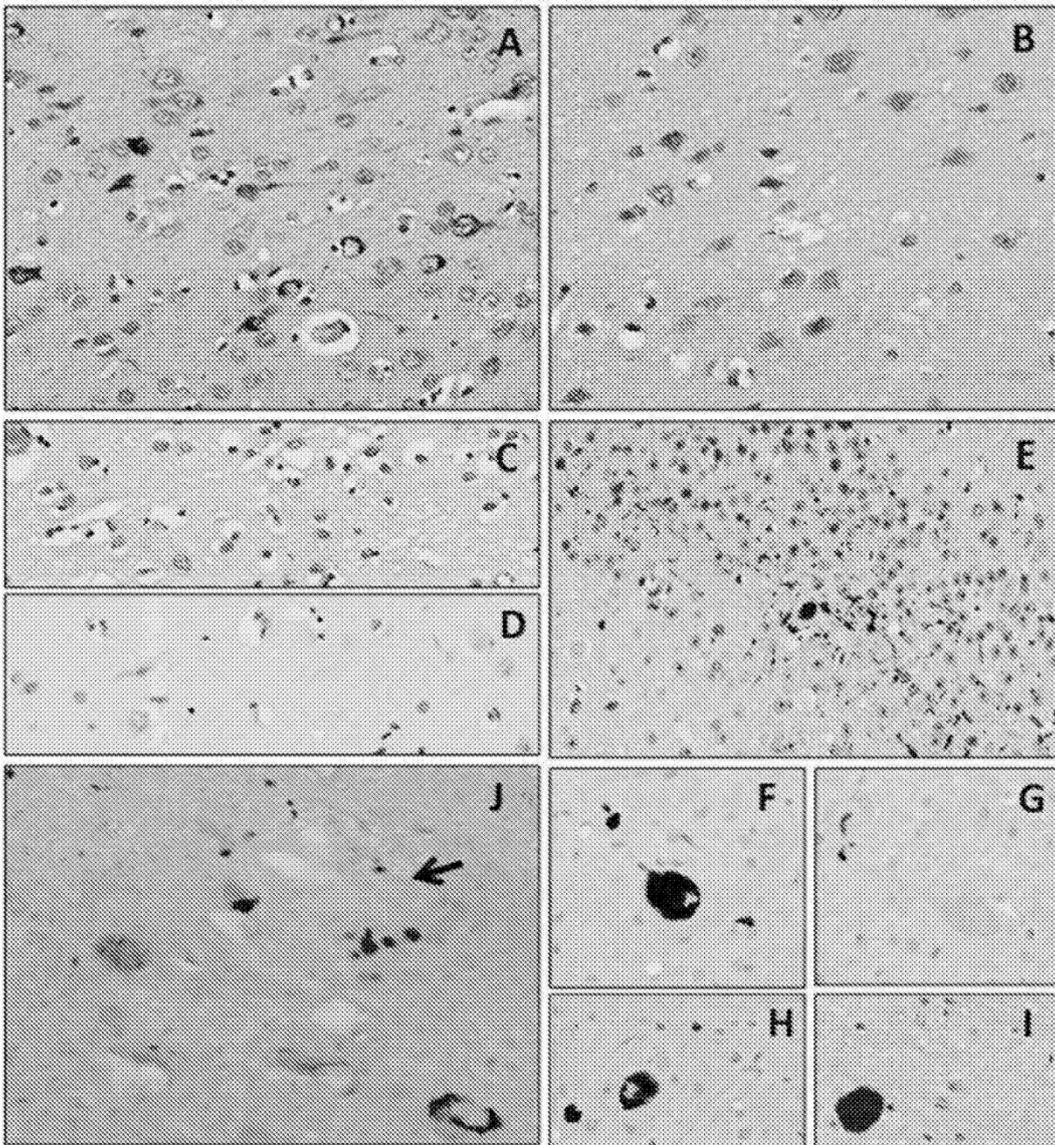


FIG. 6

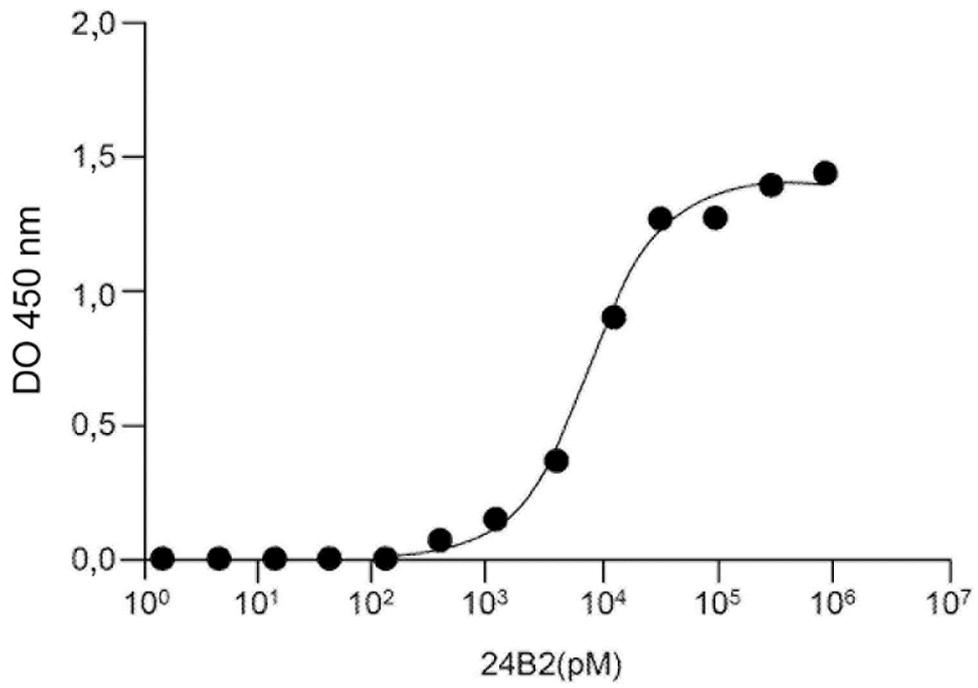


FIG. 7

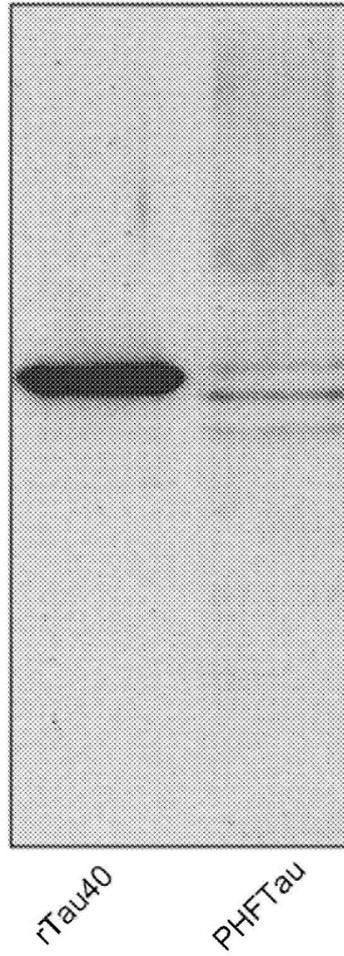


FIG. 8

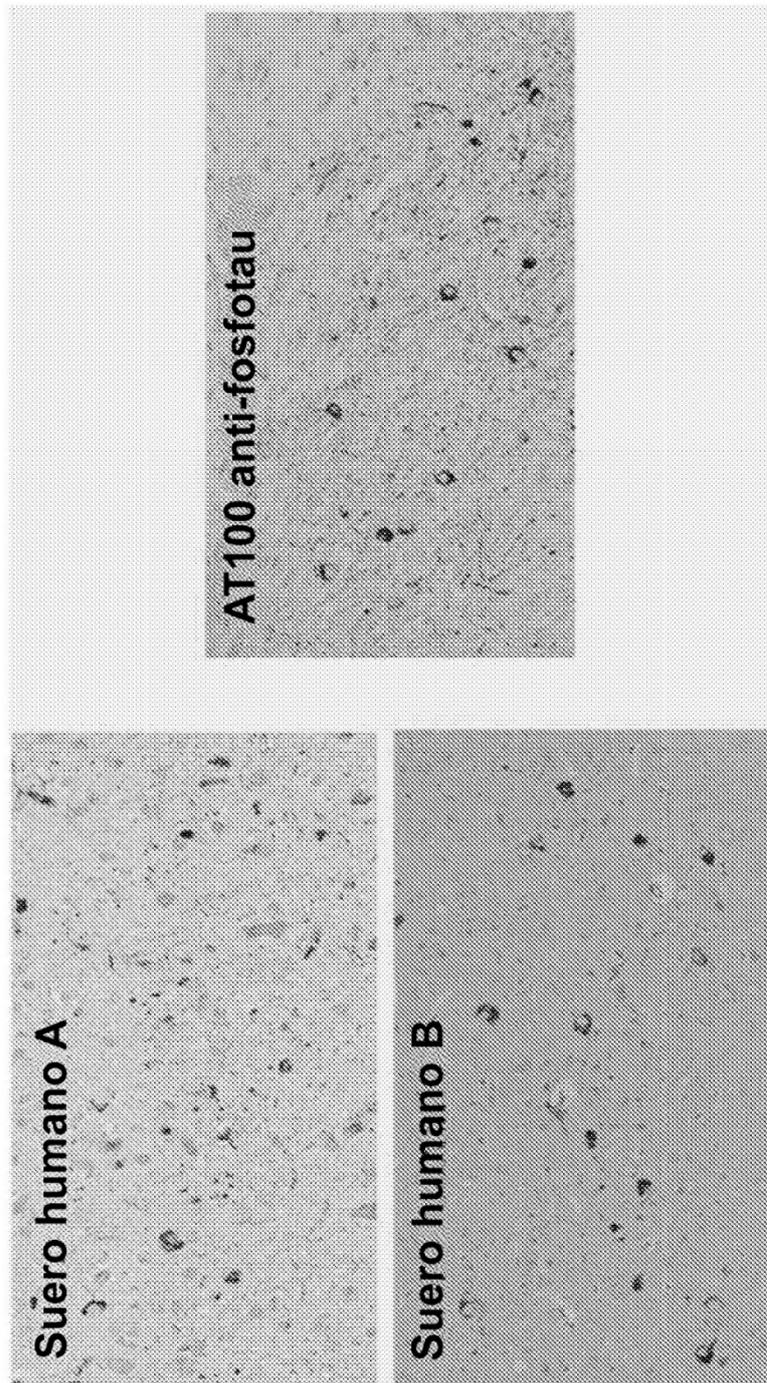


FIG. 9

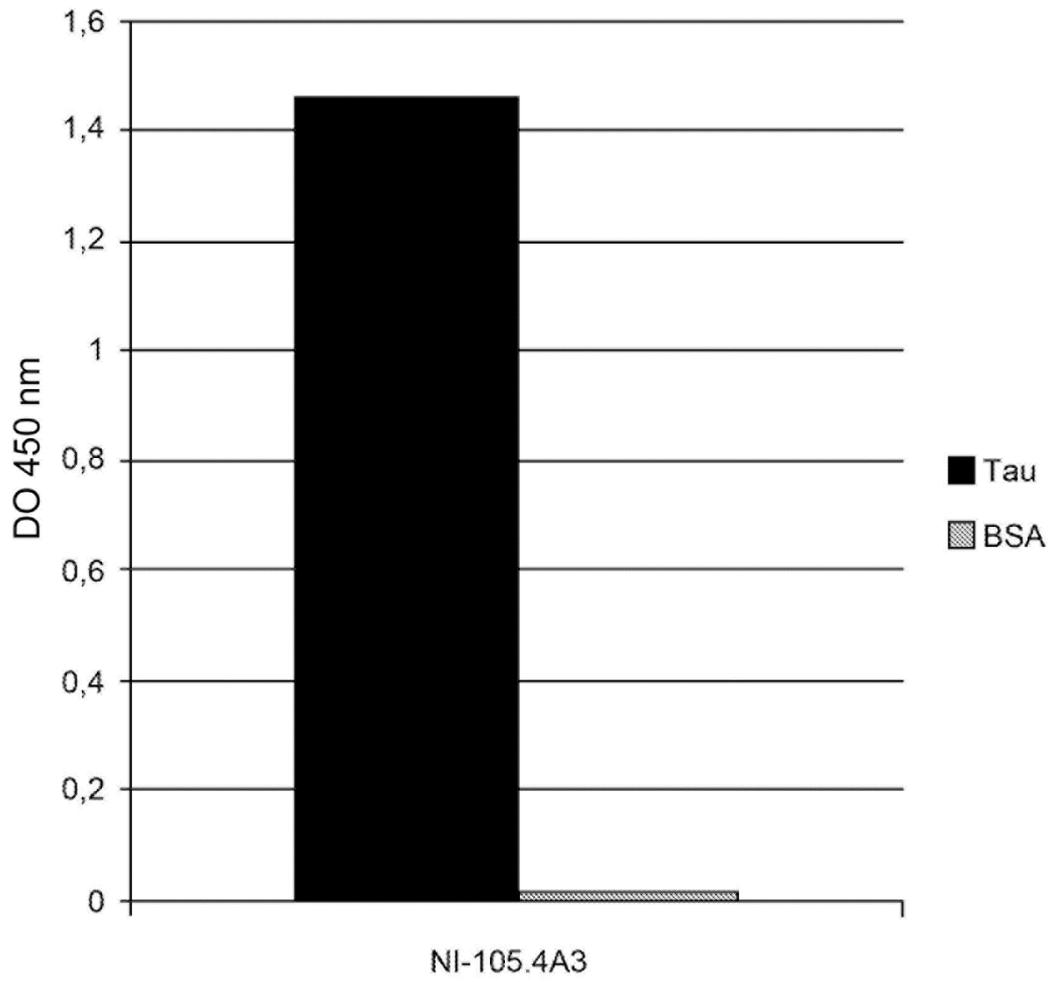


FIG. 10

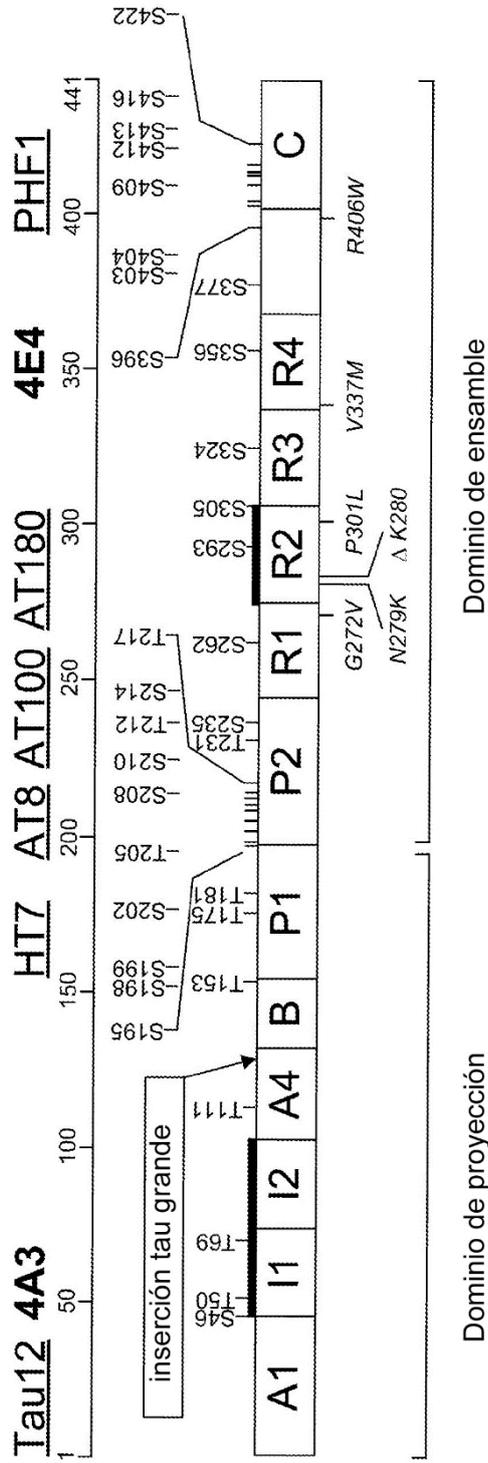


FIG. 11

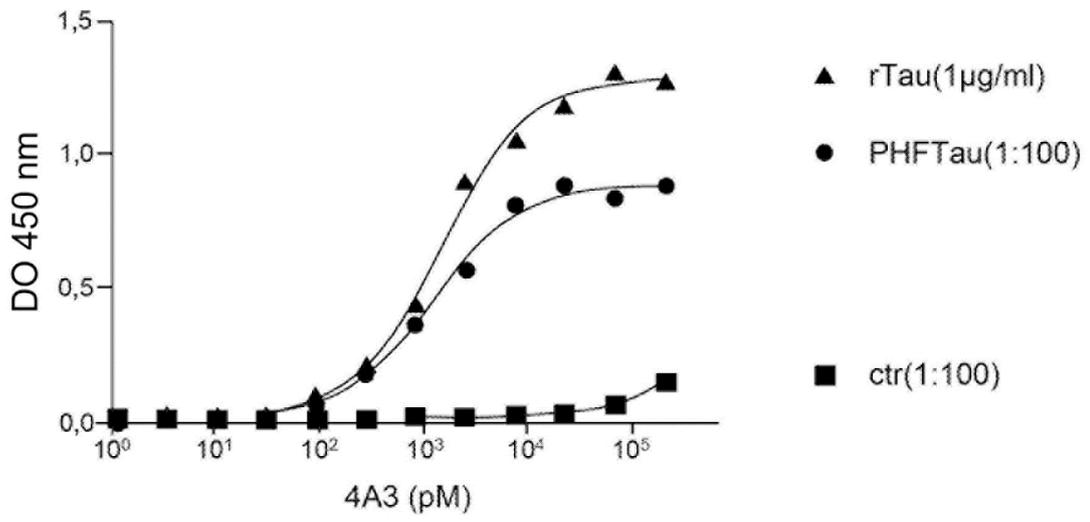


FIG. 12

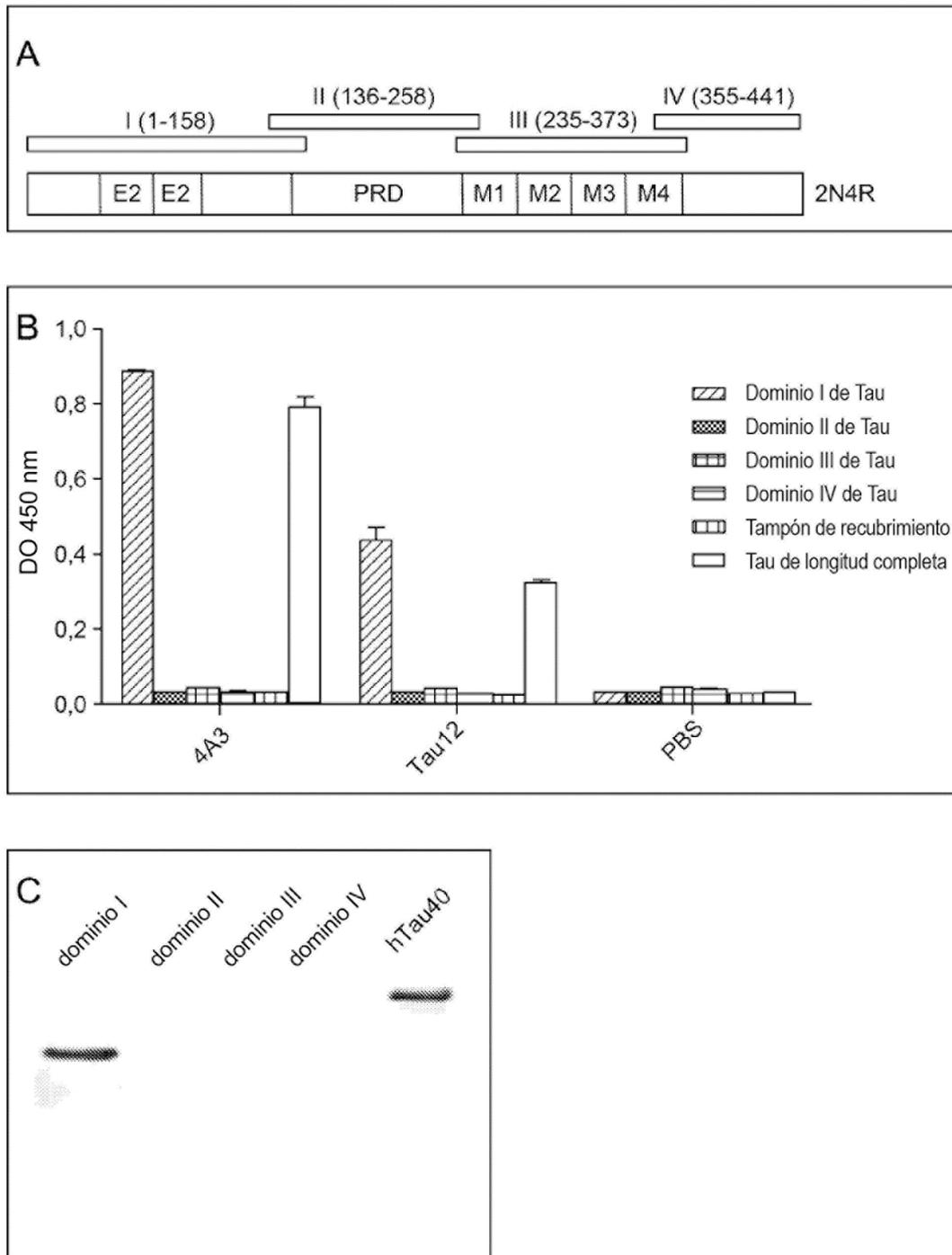


FIG. 13

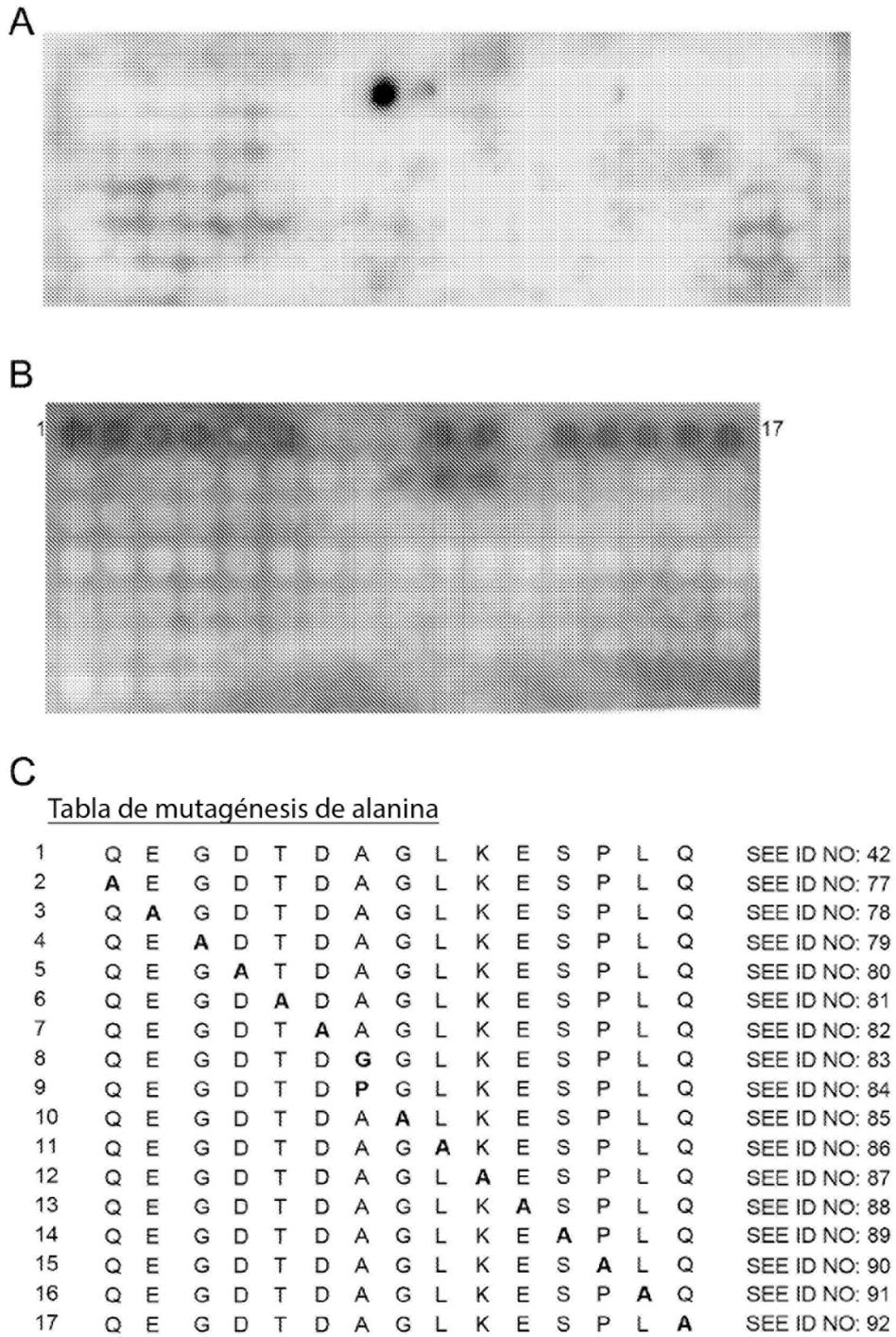


FIG. 14

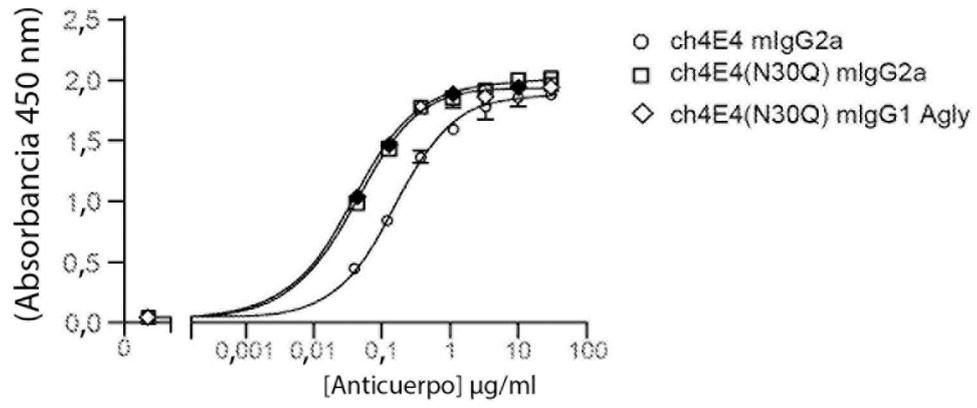


FIG. 15

FIG. 16

Niveles de anticuerpo en plasma

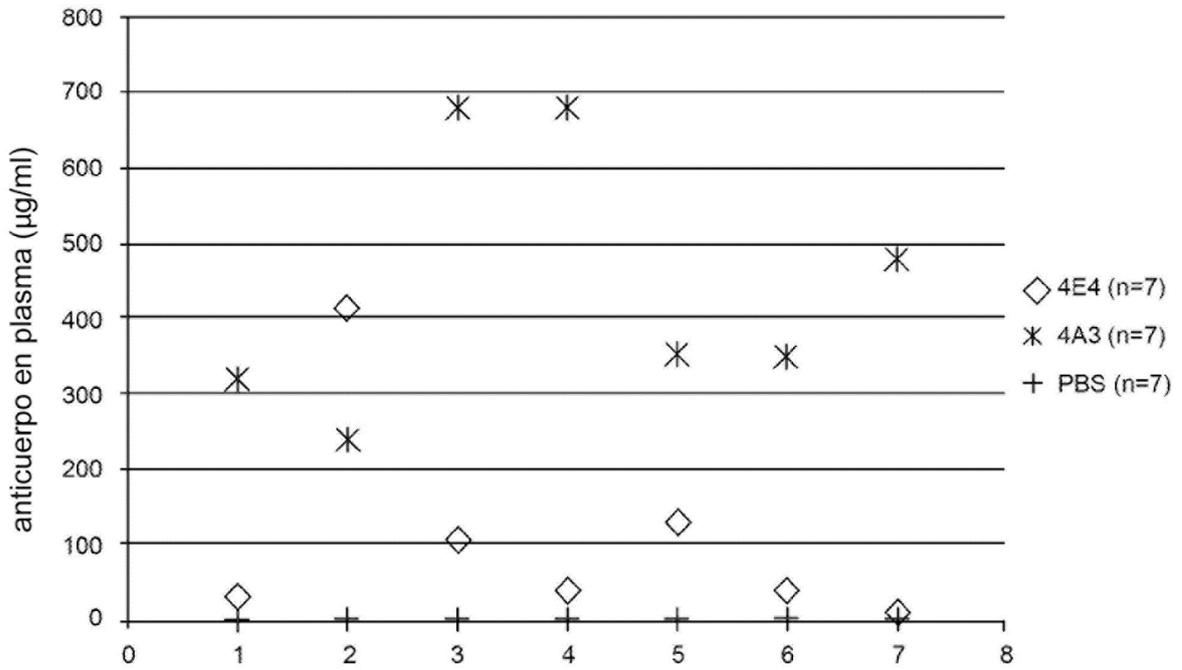


FIG. 17

Niveles de anticuerpo en cerebro

