

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 762**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2014 PCT/US2014/025044**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14165271**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2014 E 14778358 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2970453**

54 Título: **Inmunoterapia contra Tau**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780624 P

15.03.2013 US 201361800382 P

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

15.06.2020

73 Titular/es:

**PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
77 Sir Rogerson's Quay, Block C, Grand Canal
Docklands
Dublin 2, D02 T804, IE**

72 Inventor/es:

**SEUBERT, PETER;
DOLAN, PHILIP JAMES III;
LIU, YUE y
BARBOUR, ROBIN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 766 762 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

Inmunoterapia contra Tau

5 Antecedentes

10 Tau es una proteína humana bien conocida que puede existir en formas fosforiladas (Ver, *por ejemplo*, Goedert, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:4051-4055(1988); Goedert, EMBO J. 8:393-399(1989); Lee, Neuron 2:1615-1624(1989); Goedert, Neuron 3:519-526(1989); Andreadis, Biochemistry 31:10626-10633(1992). Se ha informado que Tau juega un papel en la estabilización de microtúbulos, particularmente en el sistema nervioso central. Tau total (t-tau, *es decir*, las formas fosforiladas y no fosforiladas) y fosfo-tau (tau p, *es decir*, tau fosforilada) se liberan por el cerebro en respuesta a daños neuronales y neurodegeneración y se ha informado que ocurre en niveles elevados en los pacientes en el CFS de Alzheimer en relación con la población general (Jack y otros, Lancet Neurol 9: 119-28, 2010)).

15 Tau es el principal constituyente de los ovillos neurofibrilares, que junto con las placas son un sello característico de la enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares constituyen las fibrillas anormales que miden 10 nm de diámetro que se producen en pares enrollados de forma helicoidal con una periodicidad regular de 80 nm. La tau dentro de ovillos neurofibrilares es anormalmente fosforilada (hiperfosforilada) con grupos fosfatos unidos a sitios específicos en la molécula. Se ve la implicación severa de ovillos neurofibrilares en las neuronas de la capa II de la corteza entorrinal y de las regiones CA1 y subicular del hipocampo, la amígdala y las capas más profundas (capas III, V y VI superficial) de la neocorteza en la enfermedad de Alzheimer. También se ha informado que la tau hiperfosforilada interfiere con el montaje microtubular, que puede promover la descomposición de la red neuronal.

25 Las inclusiones tau forman parte de la definición neuropatológica de varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la degeneración lobular frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva y enfermedad de Pick.

30 El documento WO2013/007839A1 se refiere a herramientas de afinidad para formas oligoméricas de proteína tau. Se relaciona con el campo de la neurodegeneración, más particularmente con el campo de las enfermedades y tauopatías relacionadas con tau.

Diana L. Castillo-Carrazza y otros, publicado en *Frontiers in Bioscience* (20130101), vol. 5, páginas 426 - 438, resumen páginas 430-431 se refieren a "agregados de Tau como objetivos inmunoterapéuticos".

35 El documento US2008/050383A1 se refiere a métodos para tratar y prevenir la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en un sujeto mediante la administración de una proteína tau, sus epítopos inmunogénicos o anticuerpos que reconocen la proteína tau o sus epítopos inmunogénicos en condiciones efectivas para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer de otras tauopatías.

40 El documento US2012/142602A1 se refiere a una composición y un método para la prevención y el tratamiento de una tauopatía. La composición de la invención incluye residuos de aminoácidos N-terminales de la proteína tau, que se han identificado como implicados en la activación tóxica de una cascada de señalización PP1/GSK3 y la inhibición del transporte axonal rápido en tauopatías humanas.

45 Breve descripción de la invención

La invención proporciona anticuerpos monoclonales como se define en las reivindicaciones.

50 Un anticuerpo monoclonal que es humanizado, quimérico o remodelado y se une a tau, en el que el anticuerpo comprende CDRL1 de la SEQ ID NO: 17, CDR-L2 de la SEQ ID NO: 18, CDR-L3 de la SEQ ID NO: 19 y CDR-H1 de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 24, CDR-H2 de la SEQ ID NO: 12 y CDR-H3 de la SEQ ID NO: 13. En una realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera madura al menos 90% idéntica a SEQ ID NO: 22.

55 Típicamente, al menos una de las posiciones H13, H48 y H91 está ocupada por K, M y F, respectivamente, y al menos una de las posiciones L1, L4, L36 y L43 está ocupada por N, L, F y S, respectivamente, o las posiciones provistas H13, H48 y H91 están ocupadas por K, M y F respectivamente y al menos dos de las posiciones L1, L4, L36 y L43 están ocupadas por N, L, F y S respectivamente, o las posiciones provistas H13, H48 y H91 están ocupadas por K, M y F respectivamente, y al menos tres de las posiciones L1, L4, L36 y L43 están ocupadas por N, L, F y S respectivamente, o, siempre que las posiciones H13, H48 y H91 estén ocupadas por K, M y F respectivamente, y las posiciones L1, L4, L36 y L43 están ocupadas por N, L, F y S, respectivamente, en donde las posiciones son las definidas por Kabat.

60 Típicamente, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera madura al menos 95%

idéntica a SEQ ID NO: 22.

Típicamente, la región variable de la cadena pesada madura se fusiona con una región constante de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera madura se fusiona con una región constante de la cadena ligera, opcionalmente, en donde la región constante de la cadena pesada es una forma mutante de la región constante humana natural que tiene unión reducida a un receptor Fcγ con respecto a la región constante humana natural o en la que la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1.

Típicamente, la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 22.

En otra realización, la región variable de la cadena pesada madura está codificada por la SEQ ID NO: 25 y la región variable de la cadena ligera madura está codificada por la SEQ ID NO: 27.

La invención también proporciona un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo como se describe en la presente.

La invención también proporciona un método para humanizar un anticuerpo que comprende:

determinar las secuencias de las regiones variables de cadena pesadas y ligeras de un anticuerpo de ratón; sintetizar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada humanizada que comprende CDR de la cadena pesada del anticuerpo de ratón y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera humanizada que comprende CDR de la cadena ligera del anticuerpo del ratón; y expresar los ácidos nucleicos en una célula huésped para producir un anticuerpo humanizado, en donde el anticuerpo de ratón se caracteriza por una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 10 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16.

La invención proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier anticuerpo descrito en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

Un anticuerpo como se describe en la presente descripción puede usarse para tratar o efectuar la profilaxis de una enfermedad asociada con tau.

La enfermedad puede ser una enfermedad neurológica, opcionalmente la enfermedad de Alzheimer.

La invención también proporciona un ácido nucleico o ácidos nucleicos que comprenden un segmento que codifica una región variable de la cadena pesada en donde el segmento tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 25 y un segmento que codifica una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 27.

En una realización, el anticuerpo como se describe en la presente descripción tiene una cadena pesada que comprende un dominio constante de IgG1 humano que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 29, siempre que la lisina C-terminal pueda estar ausente, y una cadena ligera del anticuerpo comprende una región constante kappa humana que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 32.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de experimentos diseñados para el(los) epítipo(s) unido(s) al anticuerpo monoclonal 16B5. Ensayos de inmunotransferencia que contienen Tau de longitud total o mutantes de delección de Tau Δ5-24 o Δ25-44 se tiñeron con anticuerpos 16B5 (panel izquierdo) o anticuerpos Tau46 (panel derecho). Los anticuerpos Tau46 se unen al terminal C del epítipo Tau.

La Figura 2 muestra los resultados de experimentos diseñados para el(los) epítipo(s) unido(s) al anticuerpo monoclonal 16B5. Análisis de inmunotransferencia que contienen Tau de longitud total o mutantes de delección de Tau se tiñeron con anticuerpos 16B5 (panel superior izquierdo) o anticuerpos Tau46 (panel derecho). En la parte inferior izquierda se muestra una exposición más larga a la tinción de transferencia con anticuerpos 16B5. Los mutantes de delección de Tau analizados en este experimento incluyen Δ25-44, Δ5-24, Δ23-32, Δ30-39 y Δ37-46.

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento de exploración de alanina diseñado para mapear el(los) epítipo(s) unido(s) por el anticuerpo monoclonal 16B5. Análisis de inmunotransferencia que contienen Tau de tipo salvaje (WT) o mutantes puntuales de alanina de Tau se tiñeron con anticuerpos 16B5 (panel izquierdo) o anticuerpos Tau46 (panel derecho). Los mutantes de alanina de Tau analizados en este experimento incluyen T30A, M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L y G42A.

La Figura 4 muestra las cantidades relativas de la proteína tau detectada en una fracción del tronco cerebral de ratones transgénicos insoluble en sarkosyl que expresan a la proteína tau humana. P301L. Los ratones fueron inmunizados

pasivamente con el anticuerpo 16B5 o el anticuerpo 6F10, un control de isotipo IgG1 no inmune. Se analizaron las muestras por análisis de inmunotransferencia, tinción de anticuerpos y cuantificación de la señal resultante. Los anticuerpos usados para detectar a tau incluyen anticuerpos específicos anti-fosfo-tau (AT8, panel superior izquierdo; AT100, panel inferior izquierdo; o 1F5, panel superior derecho) y un anticuerpo pan tau (HT7, panel inferior derecho).

La Figura 5 muestra la proporción de fosfo-tau en la proteína tau total (panel izquierdo) y una cantidad normalizada de tau total (panel derecho) detectado en totales del tronco cerebral homogeneizado de ratones transgénicos que expresan a la proteína tau humana P301L. Los ratones fueron inmunizados pasivamente con el anticuerpo 16B5 o el anticuerpo 6F10, un isotipo IgG1 de control no inmune. Las muestras fueron analizadas por inmunotransferencia, tinción de anticuerpos y cuantificación de la señal resultante. El anticuerpo AT8 se usó para detectar fosfo-tau y el anticuerpo HT7 se usó para detectar tau total. Un anticuerpo anti-GAPDH se usó para normalizar la cantidad de tau detectado en ratones tratados con el anticuerpo 16B5 versus el anticuerpo de control 6F10.

La Figura 6 representa las secciones de los núcleos cerebelosos de los ratones transgénicos que expresan la proteína tau humana P301L, inmunohistoquímicamente teñida usando el anticuerpo de anti-fosfo-tau AT8. Los ratones fueron inmunizados pasivamente con el anticuerpo 16B5 (panel izquierdo superior) o el anticuerpo 6F10 (panel inferior izquierdo), un isotipo IgG1 no inmune de control. La cuantificación de la cantidad de tau teñida detectada con el anticuerpo AT8 en el núcleo cerebeloso interpuesto, parte anterior y posterior, anexo núcleo cerebeloso lateral (IntA/P/LAT) y el núcleo subtalámico anexo a zona incerta (STH/ZI) de ratones inmunizados pasivamente con anticuerpos 16B5 o 6F10 se muestra en los paneles del gráfico de barras superiores. La cuantificación de la cantidad de fosfo-tau teñida detectada usando el AT100 anticuerpo anti fosfo-tau en secciones IntA/P/LAT and STH/ZI de ratones inmunizados pasivamente con anticuerpos 16B5 o 6F10 se muestra en los paneles inferiores del gráfico de barras. La significación estadística se evaluó mediante la prueba de t de Student, $p < 0,05$.

La Figura 7 muestra resultados de la inmunoprecipitación tau con anticuerpos 16B5 y anticuerpos humanizados 16B5 (versiones H1L2 y H1L3). Tau se inmunoprecipitó de fracciones solubles e insolubles de la corteza frontal post mortem, las muestras obtenidas de un paciente de la enfermedad de Alzheimer. La tau presente en inmunoprecipitados teñidos se detectó usando un anticuerpo policlonal anti-tau (tau pAb).

Definiciones.

Los anticuerpos monoclonales y otros agentes terapéuticos se encuentran normalmente en forma aislada. Esto significa que el agente está típicamente al menos 50% p/p puro de proteínas interferentes y otros contaminantes derivados de su producción o purificación, pero no excluye la posibilidad de que el agente se combine con un exceso de un(os) portador(es) farmacéutico(s) aceptable(s) u otro vehículo destinado a facilitar su uso. A veces los anticuerpos monoclonales (u otros agentes terapéuticos) son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% p/p puros de proteínas interferentes y contaminantes de producción o de purificación.

Los anticuerpos de la invención normalmente se unen a su objetivo designado con una constante de asociación de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o 10^{10} M^{-1} . Tal unión es una unión específica ya que es perceptible en mayor magnitud y distinguible desde una unión no específica que ocurre al menos a un objetivo no relacionado. La unión específica puede ser el resultado de la formación de vínculos entre grupos funcionales determinados o un ajuste espacial particular (*por ejemplo*, tipo de llave y cerradura) mientras que la unión no específica es generalmente el resultado de fuerzas de Van der Waals. La unión específica, sin embargo, no necesariamente implica que un anticuerpo monoclonal se una a uno y sólo un objetivo.

La unidad estructural básica del anticuerpo es un tetrámero de subunidades. Cada tetrámero incluye dos pares idénticos de cadenas polipéptidas, cada par tiene una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más secuencias de aminoácidos principalmente responsables para el reconocimiento del antígeno. Esta región variable se expresa inicialmente vinculado a una señalización péptida escindible. La región variable sin la señalización péptida se refiere a veces como una región variable madura. Así, por ejemplo, una región variable de la cadena ligera madura, significa una región variable de la cadena ligera sin la señalización péptida de la cadena ligera. La porción carboxiterminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable para la función efectora. Una región constante puede incluir cualquiera o todos de una región CH1, región bisagra, región CH2 y región CH3.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo IgG, IgM, IgA, del anticuerpo como IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de alrededor de 12 o más secuencias de aminoácidos, con la cadena pesada también se incluye una región "D" de alrededor de 10 más secuencias de aminoácidos. (Ver generalmente, *Fundamental Immunology* (Paul, w., ed., 2da ed. Raven, Press N.Y., 1989), Cap. 7).

Las regiones variables de cada par de cadenas pesadas/ligeras forman el sitio de enlace del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de enlace. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de

unión son los mismos. Todas las cadenas presentan la misma estructura general del marco de las regiones (FR) relativamente conservadas enlazadas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de la complementariedad (en lo sucesivo referido como "CDR"). Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por marco de las regiones, que permiten el enlace a un epítipo específico. Desde la terminal N a la terminal C, ambas cadenas ligera y pesada comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de secuencias de aminoácidos para cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 y 1991; Chothia, y otros, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia y otros, Nature 342:878-883 (1989). Asimismo, Kabat brinda una amplia convención de numeración (numeración de Kabat) en donde a los residuos correspondientes entre las diferentes cadenas pesadas o entre las diferentes cadenas ligeras se asigna al mismo número.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos intactos y sus fragmentos de unión. Por lo general, los fragmentos compiten con el anticuerpo intacto de la que se derivan para la unión específica al objetivo. Los fragmentos incluyen cadenas pesadas, cadenas ligeras Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, Fv y anticuerpos de dominio único separados. Los anticuerpos de dominio único (variable) incluyen regiones VH separadas de sus parejas VL (o viceversa) en anticuerpos convencionales (Ward y otros, 1989, Nature 341: 544-546), así como de las regiones VH (a veces conocidas como VHH) de especies como camélidos o peces cartilaginosos (por ejemplo, un tiburón nodriza) en la cual regiones VH no están asociadas con regiones de VL (véase, por ejemplo, WO 9404678). Anticuerpos de dominio único en el que una cadena se separa de sus socios naturales son conocidos a veces como lenguados y anticuerpos de dominio único de Caemelidae o peces cartilaginosos son a veces conocidos como nanocuerpos. Las regiones constantes o partes de regiones constantes pueden o pueden no estar presentes en anticuerpos de dominio único. Por ejemplo, los anticuerpos naturales sola región variable de camélidos incluyen una región variable del VHH y regiones constantes CH2 y CH3. Los anticuerpos de dominio único pueden ser tema de la humanización por enfoques análogos a los anticuerpos convencionales. El tipo de los anticuerpos Dabs se obtienen generalmente de anticuerpos de origen humano. Los anticuerpos tipo NANOBODY son de origen camélido o tiburón y pueden ser objeto de humanización. Los fragmentos se pueden producir por técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. El término "anticuerpo" también comprende un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo artificial híbrido con dos pares de cadenas pesadas/ligeras y dos sitios de unión diferentes (ver, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny y otros, J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Un epítipo puede formarse a partir de los aminoácidos contiguos o no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una o más proteínas. Los epítipos formados a partir de los aminoácidos contiguos se conservan normalmente en exposición a solventes la desnaturalización, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden en el tratamiento con disolventes que desnaturalizan. Un epítipo normalmente incluye por lo menos 3 y más generalmente, por lo menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Cuando se dice que un epítipo está dentro de una gama de residuos de aminoácidos en una proteína (por ejemplo, dentro de los residuos 25 a 44 de tau), la gama incluye los residuos que definen sus fronteras. Ciertos residuos dentro de la gama contribuyen al epítipo, mientras que otros no. Los residuos que forman el epítipo pueden o no ser contiguos uno con el otro. Del mismo modo, cuando un anticuerpo se une a un epítipo encontrado dentro de un rango determinado de aminoácidos, no es necesario que el anticuerpo entre en contacto con todos los residuos de aminoácidos dentro de la gama, y los residuos de los epítipos que son contactados por el anticuerpo pueden o no ser contiguos uno con el otro. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear 2-dimensional. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Los anticuerpos que reconocen los mismos epítipos o los superpuestos pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para competir con la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo. El epítipo de un anticuerpo puede definirse también por cristalografía de rayos x del anticuerpo unido a su antígeno para identificar residuos de contacto. Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión de la otra. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión de la otra. La invención incluye anticuerpos que compiten con 16B5 y/o que se unen al mismo epítipo en tau como en 16B5.

La competencia entre anticuerpos se determina por un ensayo en el que el anticuerpo sometido a prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, 16B5) para un antígeno común (ver, por ejemplo, Junghans y otros, Cancer Res. 50:1495, 1990). Una prueba de anticuerpo compite con un anticuerpo de referencia si un exceso de un anticuerpo de prueba (por ejemplo, al menos 2x, 5x, 10x, 20x o 100x) inhibe la unión del anticuerpo de referencia por al menos el 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o 99% según sea medido en un ensayo de unión competitiva. Los anticuerpos identificados por el ensayo de competencia (anticuerpos que compiten) incluyen anticuerpos de unión para el mismo epítipo como el anticuerpo de referencia y anticuerpos de unión a un epítipo adyacente suficientemente proximal para el epítipo el anticuerpo de referencia para que ocurra el impedimento estérico.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

Para efectos de la clasificación de sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrofóbicas): met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, su, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de cadena): gly, pro; y el Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones de conservadores implican sustituciones entre los aminoácidos de la misma clase. Las sustituciones de no conservadores constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases para un miembro de otra.

El porcentaje de identidad de secuencias se determina con secuencias de anticuerpos alineadas al máximo por la convención de numeración de Kabat. Después de la alineación, si una región del anticuerpo sujeto (por ejemplo, toda la región variable madura de una cadena pesada o ligera) se está comparando con la misma región de un anticuerpo de referencia, el porcentaje de identidad de secuencia entre las regiones de anticuerpo sujeto y de referencia es el número de posiciones ocupadas por el mismo aminoácido en las regiones del anticuerpo sujeto y el de referencia divididas por el número total de posiciones alineadas de las dos regiones, con interrupciones no contadas, multiplicados por 100 para convertir a porcentaje.

El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra en conjunto con un antígeno aumenta y/o se redirecciona la respuesta inmune al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmune contra el antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmune por varios mecanismos, incluyendo el reclutamiento de linfocitos, estimulación de células B y/o T y estimulación de los macrófagos.

Una enfermedad está asociada con tau si una población de pacientes con la enfermedad tiene niveles elevados de tau en el cerebro, o el aumento de la deposición o inclusiones del tau, o la presencia de ovillos de tau en el cerebro, o aumento de la fosforilación de tau en el cerebro (número promedio de grupos fosfato por molécula de tau) o transmisión intercelular o intracelular anómala de tau en comparación con una población de sujetos de los que no se sabe que tienen una enfermedad neurológica. Una enfermedad también se asocia con tau si los pacientes con una forma variante de un gen tau tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en relación a pacientes con un gen del tipo salvaje de tau (variante más frecuente en una población humana).

Un individuo está en mayor riesgo de contraer una enfermedad si el sujeto tiene al menos un factor de riesgo conocido (por ejemplo, genético, bioquímico, historial familiar, exposición situacional) colocando a los individuos con ese factor de riesgo en un riesgo estadísticamente significativo mayor de desarrollar la enfermedad que individuos sin el factor de riesgo.

El término "síntoma" se refiere a una evidencia subjetiva de una enfermedad, como la alteración de la marcha, percibida por el paciente. Un "signo" se refiere a evidencia objetiva de una enfermedad según lo observado por un médico. Significación estadística significa $p < 0,05$.

Descripción detallada de la divulgación

General

La invención proporciona anticuerpos que se unen a tau. La invención es como se expone en las reivindicaciones. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 23-46 de la SEQ ID NO. 1. Algunos anticuerpos se unen a tau independientemente del estado de fosforilación. Algunos anticuerpos de la invención sirven para inhibir o retrasar patologías asociadas de tau y el deterioro sintomático asociado. Aunque una comprensión del mecanismo no es necesaria para la práctica de la invención, una reducción en la toxicidad puede ocurrir como resultado de los anticuerpos que inducen la fagocitosis de tau, inhibiendo la agregación inter o intramolecular de tau, o de unirse a otras moléculas, mediante la estabilización de una conformación no tóxica, o inhibiendo la transmisión intercelular o intracelular de formas patógenas de tau, entre otros mecanismos. Los anticuerpos de la descripción o agentes que inducen tales anticuerpos se pueden usar en los métodos de tratamiento o para efectuar la profilaxis de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades asociadas con tau.

II. Tau

A menos que sea evidente por el contexto, la referencia a tau significa una forma humana natural de tau que incluye todas las isoformas independientes de si está presente la modificación postraducciona (por ejemplo, fosforilación, glicosilación o acetilación). Existen seis isoformas principales (variantes de corte y empalme) de tau presentes en el cerebro humano. La más larga de estas variantes tiene 441 aminoácidos, de los cuales el residuo met inicial se escinde. Los residuos se numeran según la isoforma 441. Así, por ejemplo, referencia a una fosforilación en la posición 404 significa posición 404 de la isoforma 441 o posición correspondiente de cualquier otra isoforma cuando está alineada al máximo con la isoforma 441. Las secuencias de aminoácidos de las isoformas y los números de Swiss-Prot se indican a continuación.

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
5	MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEAGIGD	TPSLEDEAAG
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
10	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKQANATR	IPAKTPPAPK
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
	TPPSSGEPK	SGDRSGYSS	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVR	TPPKSPSSAK
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
15	SRLQTAPVPM	PDLKXVSKI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
	PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGQVEVK	SEKLDKDRV	QSKIGSLDNI
	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
	THVPGGNKK	IETHKLTFR	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV
	<u>430</u>	<u>440</u>				
20	DSPQLATLAD	EVSASLAKQ	L			

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
25	MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
	SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVVTQARMV	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
	KIATPRGAAP	PGQKQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
30	SRTPSLPTPP	TREPKKVAV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
	PGGKQVQIIN	KLDLSNVQS	KCGSKDNIKH	VPGGGSVQIV	YKVDLSKVT	SKCGSLGNIH
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
	HKPGGQVEV	KSEKLDKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	
35	AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ	GL

P10636-6 (SEQ ID NO:3)

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
40	MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAREAGI	GDTPSLEDEA
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
	AGHVVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKQANA	TRIPAKTPPA
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
	PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
45	AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGKQVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
	HVPGGGSVQI	VYKVDLSKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGQVE	VKSEKLDKFD	RVQSKIGSLD
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
	NITHVPGGN	KKIETHKLTFR	RENAKAKTDH	GABIVYKSPV	VSGDTSPRHL	SNVSSTGSID
	<u>370</u>	<u>380</u>				
50	MVDSPQLATL	ADEVSASLAK	QGL			

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

	10	20	30	40	50	60
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
5	70	80	90	100	110	120
	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTIPEG	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG
	130	140	150	160	170	180
	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKQANATR	IPAKTPPAPK
	190	200	210	220	230	240
10	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSR	RTPSLTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK
	250	260	270	280	290	300
	SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK
	310	320	330	340	350	360

	PGGGQVEVKS	EKLDFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFRN	AKAKTDHGAE
15	370	380	390	400	410	
	IVYKSPVVSG	DTSRHLNSV	SSTGSIDMVD	SPQLATLAD	VSASLAKQGL	

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

	10	20	30	40	50	60
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG
	70	80	90	100	110	120
	SETSDAKSTP	TAAEEAGIG	DTPSLEDEEA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT
25	130	140	150	160	170	180
	KIATPRGAAP	PGQKQANAT	RIPAKTPPAP	KTPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR
	190	200	210	220	230	240
	SRTPSLTPPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ
	250	260	270	280	290	300
30	PGGGKVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDRV	QSKIGSLDNI
	310	320	330	340	350	360
	THVPGGGNKK	IETHKLTFR	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLNS	VSSTGSIDMV
	370	380				
	DSPQLATLAD	EVSASLAKQGL	L			

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

	10	20	30	40	50	60
	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA
40	70	80	90	100	110	120
	AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKQANA	TRIPAKTPPA
	130	140	150	160	170	180
45	PKTPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPT	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS
	190	200	210	220	230	240
	AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKPVLDLKV	SKCGSLGNIH
	250	260	270	280	290	300
50	HKPGGGQVEV	KSEKLDKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG
	310	320	330	340	350	
	AEIVYKSPVV	SGDTSRHLNS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVASLAKQGL	

La referencia a tau incluye variaciones naturales conocidas aproximadamente 30 de las cuales son enumeradas en la base de datos de Swiss-Pro y sus permutaciones, así como mutaciones asociadas con patologías de tau, tales como demencia, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear, etc. (véase, *por ejemplo*, la base de datos de Swiss-Pro y Poorkaj, y otros. Ann Neurol. 43:815-825 (1998)). Algunos ejemplos de mutaciones de la tau numeradas por la isoforma 441 son una mutación lisina a treonina en el residuo de aminoácido 257 (K257T), una mutación de isoleucina a valina en la posición de aminoácido 260 (I260V); una mutación de glicina a valina en la posición de aminoácido 272 (G272V); una mutación de asparagina a la lisina en la posición de aminoácidos 279 (N279K); una mutación de asparagina a histidina en la posición de aminoácido 296 (N296H); una mutación de prolina a serina en la posición de aminoácido 301 (P301S); una mutación de glicina a valina en la posición de aminoácido 303 (G303V); una mutación de serina a asparagina en la posición 305 (S305N); una mutación de glicina a serina en la posición de aminoácido 335 (G335S); una mutación de valina a metionina en la posición 337 (V337M); una mutación de ácido glutámico a valina en la posición 342 (E342V);

una mutación de lisina a isoleucina en la posición de aminoácido 369 (K369I); una mutación de glicina a arginina en la posición de aminoácido 389 (G389R); y una mutación de arginina a triptófano en la posición de aminoácido 406 (R406W).

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

10 III. Anticuerpo

A. Especificidad de unión y propiedades funcionales

15 La descripción proporciona anticuerpos que se unen a tau. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 23-46 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 25-44 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de 28-41 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 30-39 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 30-36 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 33-39 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 de la SEQ ID NO: 1. Algunos anticuerpos se unen a tau independientemente de su estado de fosforilación. Algunos anticuerpos se unen a un epítipo que no incluye un residuo objeto de fosforilación. Estos anticuerpos pueden obtenerse mediante la inmunización con un polipéptido de tau purificado a partir de una fuente natural o recombinantemente expresada. Los anticuerpos pueden ser examinados para la unión de tau en una forma no fosforilada, así como una forma en la que uno o más residuos susceptibles de fosforilación son fosforilados. Estos anticuerpos se unen preferiblemente con afinidades indistinguibles o al menos dentro de un factor de 1,5, 2 o 3 veces a tau fosforilada en comparación con tau no fosforilada (es decir, son "pan-específicas"). 16B5 es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal pan-específico. La invención también proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo como cualquiera de los anticuerpos anteriores, tales como, por ejemplo, el epítipo de 16B5. También se incluyen anticuerpos que compiten para unirse a tau con cualesquiera de los anticuerpos anteriores, tales como, por ejemplo, los que están compitiendo con 16B5.

Los anticuerpos mencionados anteriormente se pueden generar de nuevo mediante la inmunización con un péptido que incluye los residuos 23-46, 25-44, 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 de la SEQ ID NO:1 o mediante la inmunización con un polipéptido tau de longitud completa o un fragmento del mismo que comprende dichos residuos y la detección de la unión específica a un péptido que incluye dichos residuos. Estos péptidos se unen preferiblemente a una molécula conjugada heteróloga que ayuda a obtener una respuesta de anticuerpo al péptido. La unión puede ser directa o a través de un péptido o aminoácido espaciador. La cisteína se usa como un aminoácido espaciador porque su grupo SH libre facilita la unión de una molécula portadora. También puede usarse un enlazador de poliglicina (por ejemplo, 2-6 glicinas), con o sin un residuo de cisteína entre las glicinas y el péptido. La molécula portadora sirve para proporcionar un epítipo de célula T que ayuda a obtener una respuesta de anticuerpos contra el péptido. Comúnmente se usan varios portadores, especialmente la hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina y albúmina de suero bovino (BSA). Los espaciadores peptídicos se pueden añadir al inmunógeno peptídico como parte de la síntesis de péptidos en fase sólida. Los portadores se añaden típicamente por reticulación química. Algunos ejemplos de reticuladores químicos que pueden usarse incluyen éster de N-maleimido-6-aminocaproilo cruzado o éster de m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida (MBS) (véase, por ejemplo, Harlow, E. y otros, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia y otros, *Nature*, 336:778-780 (1988); Chicz y otros, *J. Exp. Med.*, 178:27-47 (1993); Hammer y otros, *Cell* 74:197-203 (1993); Falk K. y otros, *Immunogenetics*, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; and, Southwood y otros. *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998)). El portador y el espaciador, si están presentes, pueden unirse a cualquiera de los extremos del inmunógeno.

60 Un péptido con espaciador opcional y portador puede usarse para inmunizar animales de laboratorio o de células B como se describe en más detalle a continuación. Los sobrenadantes de hibridoma se pueden someter a pruebas para la verificar su capacidad de unirse a uno o más péptidos que incluyen los residuos 24-46, 25-44, 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-

39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 de la SEQ ID NO:1 y/o formas fosforiladas y no fosforiladas de tau, tales como, por ejemplo, una isoforma de longitud completa de tau con la posición 404 en forma fosforilada. El péptido puede unirse a un portador o a otra etiqueta para facilitar el ensayo de detección. En este caso, el portador o la etiqueta es preferiblemente diferente a la combinación de separador y la molécula de portador utilizada para la inmunización para eliminar los anticuerpos específicos para el espaciador o portador en lugar del péptido de tau. Puede usarse cualquiera de las isoformas de tau.

Los anticuerpos que tienen especificidad de unión de un anticuerpo murino seleccionado (por ejemplo, 16B5) también pueden ser producidos usando una variante del método de presentación de fagos. Ver Winter, WO 92/20791. Este método es particularmente adecuado para la producción de anticuerpos humanos. En este método, ya sea la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo murino seleccionado se usa como material de partida. Si, por ejemplo, una región variable de la cadena ligera es seleccionada como material de partida, se construye una biblioteca de fagos en la cual los miembros muestran la misma región variable de la cadena ligera (es decir, el material murino de partida) y una región variable de la cadena pesada diferente. Las regiones variables de cadena pesada pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de una biblioteca de regiones variables de cadena pesada humana reorganizadas. Un fago que muestra fuerte unión específica para el objetivo deseado (por ejemplo, un péptido tau) (por ejemplo, al menos 10^8 y preferiblemente al menos 10^9 M⁻¹) se selecciona. La región variable de la cadena pesada de este fago entonces sirve como un material de partida para la construcción de una biblioteca de fago adicional. En esta biblioteca, cada fago muestra la misma región variable de la cadena pesada (es decir, la región identificada a partir de la primera biblioteca de exhibición) y una región variable de la cadena ligera. Las regiones variables de cadena ligera pueden obtenerse por ejemplo de una biblioteca de las regiones de cadena ligera variable humana reorganizadas. Otra vez, se selecciona un fago que muestra una fuerte unión específica al objetivo deseado. Los anticuerpos resultantes tienen generalmente la misma o similar especificidad de epítipo que el material de partida murino.

Otros anticuerpos pueden obtenerse mediante mutagénesis del cDNA que codifican las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo ilustrativo, como 16B5. Anticuerpos monoclonales que son al menos 90%, 95% o 99% idénticos a 16B5 en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera maduras y mantienen sus propiedades funcionales y/o que difieren de los respectivos anticuerpos por un pequeño número de sustituciones de aminoácidos funcionalmente insignificantes (por ejemplo, sustituciones conservadoras), deleciones o inserciones se incluyen también en la invención. Los anticuerpos monoclonales que tienen al menos uno y preferiblemente las seis CDR definidas por Kabat que son 90%, 95%, 99% o 100% idénticas a las CDR correspondientes de 16B5 también se incluyen.

B. Anticuerpos no humanos

La producción de otros anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murino, conejillo de indias, primate, conejo o rata, contra un inmunógeno puede realizarse, por ejemplo, al inmunizar al animal con un inmunógeno, como se describió anteriormente. Ver Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) Un inmunógeno de este tipo puede obtenerse a partir de una fuente natural, por síntesis de péptidos o por la expresión recombinante.

Opcionalmente, el inmunógeno puede administrarse con un adyuvante. Varios tipos de adyuvantes pueden usarse como se describe a continuación. Se prefiere el adyuvante completo de Freund seguido de adyuvante incompleto para la inmunización de animales de laboratorio. Los conejos o conejillos de indias se usan típicamente para preparar anticuerpos policlonales. Los ratones se usan típicamente para la preparación de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se seleccionan para la unión específica para, opcionalmente, los anticuerpos son más investigados para la unión a una región específica de tau. Dicha selección puede lograrse mediante la determinación de la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes de deleción de tau y determinando cuales mutantes de deleción se unen al anticuerpo. La unión puede evaluarse, por ejemplo, mediante inmunotransferencia, FACS o ELISA.

C. Anticuerpos humanizados

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el cual las CDR de un anticuerpo no humano "donantes" (por ejemplo, 16B5) se injertan en secuencias de anticuerpo humano "aceptoras" (ver, por ejemplo, Queen, US 5,530,101 y 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557). Las secuencias de anticuerpo aceptoras pueden ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano maduro, un compuesto de dichas secuencias, una secuencia de consenso de secuencias de anticuerpos humanos o una secuencia de la región de línea germinal. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene algunas o todas las CDR total o sustancialmente de un anticuerpo donante y secuencias marco de región variable y regiones constantes, si están presentes, total o sustancialmente de secuencias de anticuerpos humanos. De manera similar, una cadena pesada humanizada tiene al menos una, dos y generalmente las tres CDR total o sustancialmente de una cadena pesada de anticuerpo donante, y una secuencia marco de región variable de la cadena pesada y región constante de la cadena pesada, si está presente, sustancialmente de secuencias marco de región variable de la cadena pesada humana de regiones constantes. De manera similar, una cadena ligera humanizada tiene al menos una, dos y usualmente las tres CDR total o sustancialmente de una cadena ligera de anticuerpo donante, y una secuencia marco de región variable de la cadena ligera y región constante de la cadena ligera, si está presente, sustancialmente de

secuencias marco de región variable de la cadena ligera humana y de regiones constantes. Además de nanocuerpos y dAbs, un anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada humanizada y una cadena ligera humanizada. Una CDR en un anticuerpo humanizado es sustancialmente de una CDR correspondiente en un anticuerpo no humano cuando al menos 85%, 90%, 95% o 100% de los residuos correspondientes (como se define por Kabat) son idénticos entre las respectivas CDR. Las secuencias marco de región variable de una cadena de anticuerpos o la región constante de una cadena de anticuerpos son sustancialmente de una secuencia marco de la región variable humana o región constante humana respectivamente cuando al menos 85, 90, 95 o 100% de los residuos correspondientes definidos por Kabat son idénticos.

Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (preferiblemente como lo define Kabat) de un anticuerpo de ratón, también pueden hacerse con menos CDR (por ejemplo, al menos, 3, 4 o 5) CDR de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, Pascalis y otros, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos y otros, *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi y otros, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura y otros, revista de Inmunología, 164:1432-1441, 2000).

En algunos anticuerpos sólo parte de las CDR, a saber, el subconjunto de residuos CDR requeridos para la unión, denominados SDR, son necesarios para conservar la unión de un anticuerpo humanizado. Los residuos CDR que no están en contacto con el antígeno en los SDR pueden identificarse partiendo de estudios anteriores (por ejemplo, los residuos H60-H65 en CDR H2 a menudo no son necesarios), de las regiones de los CDR de Kabat que están fuera de los bucles hipervariables de Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), por modelado molecular y/o empírico, o como se describe en Gonzales y otros, *Mol. Immunol.* 41 863, 2004. En dichos anticuerpos humanizados en las posiciones en las que uno o más residuos de CDR de donantes está ausente o donde todo el donante de CR se omite, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por la numeración de Kabat) en la secuencia de anticuerpo aceptora. El número de tales sustituciones del aceptor para aminoácidos donantes en las CDR refleja un equilibrio de las consideraciones de competencia. Tales sustituciones son potencialmente beneficiosas en la disminución del número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y en consecuencia la disminución potencial de la inmunogenicidad. Sin embargo, las sustituciones también pueden causar cambios de afinidad, y preferiblemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones de sustitución dentro de las CDR y aminoácidos para sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

Las secuencias del anticuerpo humano aceptor pueden seleccionarse opcionalmente entre las muchas secuencias de anticuerpo humano para proporcionar un alto grado en la secuencia de identidad (por ejemplo, 65-85% de identidad) entre los marcos de la región variable de la secuencia aceptora humana y los marcos de la región variable correspondiente de una cadena de anticuerpo donante.

Ciertos aminoácidos de los residuos marco de la región variable humana pueden seleccionarse para la sustitución con base en su posible influencia en la conformación de las CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de esas posibles influencias es por modelado, examen de las características de los aminoácidos en ciertas ubicaciones o de observación empírica de los efectos de sustitución o de mutagénesis de aminoácidos particulares.

Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo marco de la región variable murina y un residuo marco de la región variable humana seleccionada, el aminoácido marco humano puede ser sustituido por el aminoácido marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

se une de manera no covalente al antígeno directamente, es adyacente a una región CDR, interactúa de otra manera con una región CDR (por ejemplo, es de aproximadamente 6 Å de una región de CDR), (por ejemplo, identificado por modelado de la cadena ligera o pesada en la estructura resuelta de una cadena de inmunoglobulina homóloga conocida); y un residuo participando en la interfaz de VL-VH.

Los residuos del marco de las clases (1)-(3) según lo definido por Queen, US 5,530,101 a veces se les refiere alternativamente como residuos canónicos y vernier. El marco de los residuos que definen la clase canónica de los bucles de la CDR de donantes que determinan la conformación de un bucle de CDR a veces se les refieren como residuos canónicos (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin *J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996). Una capa de residuos del marco que soporta al bucle de unión a antígeno juega un papel en el ajuste fino de un anticuerpo al antígeno que a veces se denominan residuos vernier (Foote & Winter, 1992 *J Mol Bio.*224:487-499. Otros candidatos para la sustitución son residuos que crean un sitio de glicosilación potencial. Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos marco humanos aceptores que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos del marco humano aceptor que son inusuales para una inmunoglobulina humana en esa posición.

La descripción proporciona formas humanizadas del anticuerpo del ratón 16B5. El anticuerpo de ratón comprende de regiones variables de cadena pesada y ligera maduras con secuencias de aminoácidos que comprenden SEQ ID NOS.

10 y 16 respectivamente. La descripción proporciona un ejemplo humanizado de regiones variables (H1) de cadena pesada madura y tres ejemplificaciones humanizadas de región variable de la cadena ligera madura (L1, L2 y L3). La variante de H1L2 tiene la misma afinidad o mejor como una 16B5 quimérica y siete retromutaciones. H1L1 y H1L3 tienen una afinidad similar a 16B5 quimérico y seis retromutaciones

La descripción proporciona variantes del anticuerpo 16B5 humanizado H1L2 en los cuales que la región variable de la cadena pesada madura humanizada muestra al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a la SEQ ID NO: 15 y la región variable madura de la cadena ligera madura humanizada muestra al menos 90%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22. Preferiblemente, en tales anticuerpos en H1L2 conservan algunas o todas de las retromutaciones. En otras palabras, al menos 1, 2 o 3 de las posiciones de posición la H13 está ocupada por K, la posición H48 está ocupada por M y la posición H91 está ocupada por F. Preferiblemente al menos, 1, 2, 3 o las cuatro posiciones de la posición que L1 está ocupada por N, la posición L4 está ocupada por L, la posición L36 está ocupada por F y la posición L43 está ocupada por S. Las regiones CDR de dichos anticuerpos humanizados son preferiblemente idénticas o substancialmente idénticas a las regiones CDR de H1L2, que son las mismas que las del anticuerpo del ratón donante. Las regiones CDR pueden ser definidas por cualquier definición convencional (por ejemplo, Chothia) pero son preferiblemente definidas por Kabat.

Una posibilidad de variación adicional en variantes de 16B5 son retromutaciones adicionales en los marcos de la región variable. Muchos de los residuos marco no están en contacto con las CDR en el mAb humanizado pueden acomodar sustituciones de aminoácidos de las posiciones correspondientes del mAb donante de ratón e incluso muchos residuos potenciales de contacto con CDR también son susceptibles de sustitución o incluso aminoácidos dentro de las CDR pueden alterarse, por ejemplo, con residuos que se encuentran en la posición correspondiente de la secuencia humana aceptora utilizada para suministrar marcos de región variable. Además, se pueden usar secuenciasceptoras humanas alternativas, por ejemplo, para la cadena pesada y/o ligera. Si se usan diferentes secuenciasceptoras, una o más de las retromutaciones recomendadas más arriba no se pueden realizar debido a que los residuos del donante y aceptor correspondientes ya son los mismos sin la retromutación. Por ejemplo, cuando se usa una secuencia aceptora de cadena pesada en la cual la posición H13 está ocupada ya por K no es necesaria la retromutación.

La invención también incluye anticuerpos humanizados en los que las regiones variables de cadena ligera y pesada maduras muestran por lo menos 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con las regiones variables de cadena ligera y pesada maduras del anticuerpo humanizado 16B5 H1L1 (SEQ ID NOS: 21 y 15, respectivamente) o anticuerpo humanizado 16B5 H1L3 (SEQ ID NOS: 23 y 15, respectivamente).

D. Anticuerpos quiméricos y remodelados

La invención, además, proporciona formas de anticuerpos quiméricos y remodelados no humanos, particularmente el anticuerpo 16B5.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el cual las regiones variables de cadena ligera y pesada maduras de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un ratón) se combinan con regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas. Dichos anticuerpos substancial o completamente conservan la especificidad de unión del anticuerpo de ratón y son alrededor de dos tercios de la secuencia humana.

Un anticuerpo remodelado es un tipo de anticuerpo humanizado que conserva algunos y generalmente todas las CDR y algunos de los residuos de marco de región variable no humanos de un anticuerpo humano no, pero reemplaza otros residuos marco de región variable que pueden contribuir a epítopos de células T o B, por ejemplo, los residuos expuestos (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) con residuos de las posiciones correspondientes de una secuencia de anticuerpo humano. El resultado es un anticuerpo en los que las CDR que son completa o substancialmente de un anticuerpo no humano y los marcos de la región variable del anticuerpo no humano se hacen más como humanos por las sustituciones. La invención incluye formas revestidas de cualquiera de los dos anticuerpos 16B5.

E. Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos humanos contra tau son proporcionados por una variedad de técnicas que se describen a continuación. Los métodos para producir anticuerpos humanos incluyen el método de trioma de Oestberg y otros, Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, Patente US 4,634,664; y Engleman y otros, patente US 4,634,666, uso de ratones transgénicos incluyendo genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Lonberg y otros, WO93/12227 (1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) y métodos de exposición fago (ver, por ejemplo, Dower y otros, WO 91/17271 and McCafferty y otros, WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 y US 5,565,332.

F. Selección de la Región Constante

Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos quiméricos, humanizados (incluyendo remodelados), o

5 anticuerpos humanos pueden unirse con al menos una parte de una región constante humana. La elección de la región constante depende, en parte, si se desea un complemento dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad celular mediada por complemento. Por ejemplo, los isótopos humanos IgG1 e IgG3 tienen citotoxicidad medida por complemento mientras que los isotipos IgG2 e IgG4 humanos tienen poca o ninguna citotoxicidad medida por complemento. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. Los anticuerpos pueden ser expresados como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos pesadas, como cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, o como una cadena única anticuerpos de en la cual las regiones variables de la cadena pesada y la ligera están unidas por un espaciador.

10 Las regiones constantes humanas muestran variación alotípica y variación isoalotípica entre diferentes individuos, es decir, las regiones constantes pueden diferir en diferentes individuos en una o más posiciones polimórficas. Los isoalotipos difieren de los alotipos en que los sueros que reconocen un isoalotipo se unen a una región no polimórfica de uno o más isotipos diferentes. La referencia a una región constante humana incluye una región constante con cualquier alotipo natural o cualquier permutación de residuos que ocupan posiciones polimórficas en alotipos naturales o hasta 3, 5 o 10 sustituciones para reducir o aumentar la función efectora como se describe a continuación.

15 Uno o varios aminoácidos en el extremo amino o carboxi de la cadena ligera y / o pesada, como la lisina C terminal de la cadena pesada, pueden faltar o derivatizarse en una proporción o en todas las moléculas. Se pueden realizar sustituciones en las regiones constantes para reducir o aumentar la función efectora como la citotoxicidad mediada por complemento o ADCC (ver, por ejemplo, Winter y otros, Patente US No. 5,624,821; Tso al., Patente US No- 5,834,597; y Lazar y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), o para prolongar la vida media en humanos (ver, por ejemplo, Hinton y otros, J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). La sustitución ilustrativa incluye un Gln en la posición 250 y/o una Leu en la posición 428 (la numeración de EU se utiliza en este párrafo para la región constante) para aumentar la vida media de un anticuerpo. Sustitución en cualquiera o todas de las posiciones, 234, 235, 236 y 237 reducir afinidad para los receptores de Fcγ, particularmente el receptor FcγRI (ver, por ejemplo, U.S. 6,624,821). Una sustitución de alanina en las posiciones 234, 235 y 237 de la IgG1 humana se prefiere para reducir funciones efectoras. Opcionalmente, las posiciones 234, 236 y 237 del IgG2 humano son sustituidas con alanina y la posición 235 con glutamina. (Ver, por ejemplo, U.S. 5,624,821.)

30 G. Expresión de Anticuerpos Recombinantes

Los anticuerpos quiméricos, humanizados (incluyendo remodelados) y humanos son normalmente producidos por expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican a los anticuerpos pueden ser optimizado para codón para la expresión en el tipo de célula de deseada (por ejemplo, CHO o Sp2/0). Los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de 16B5 humanizado aquí divulgados tienen secuencias que comprenden o que consisten en, por ejemplo, SEQ ID NO: 25 (codificación Hu16B5 H1), SEQ ID NO: 26 (codificación Hu16B5 L1), SEQ ID NO: 27 (codificación Hu16B5 L2) o en SEQ ID NO: 28 (codificación Hu16B5 L3). Para regiones variables que incluyen señalización de péptidos tales como SEQ ID NO. 10 y 16, el ácido nucleico puede codificar la región variable con o sin la señalización del péptido. Los segmentos de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y ligera pueden estar presentes en la misma molécula contigua de ácido nucleico o en moléculas separadas. Las cadenas pesadas y ligeras se pueden expresar del mismo vector o de vectores diferentes. Los ácidos nucleicos normalmente se proporcionan en forma aislada.

45 Los ácidos nucleicos que codifican una región variable de la cadena pesada 16B5 humanizado puede unirse a un segmento de ácido nucleico que codifica una 1 región constante de IgG humana, por ejemplo, teniendo la secuencia SEQ ID NO: 30. Dichos ácidos nucleicos también pueden incluir un intrón situado entre los segmentos que codifican la región variable de la cadena pesada y la región constante de IgG1, es decir, 5' del segmento que codifica la región constante. Una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que codifica una región constante de IgG1 humana y tiene un intrón de ratón en su extremo 5' se muestra en SEQ ID NO: 31.

50 Los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena ligera 16B5 humanizado pueden estar unidas a un segmento de ácido nucleico que codifica una región constante kappa humana, por ejemplo, tienen la secuencia SEQ ID NO: 33. Dichos ácidos nucleicos también puede incluir un intrón entre los segmentos que codifican la región variable de la cadena ligera y la región constante de kappa (es decir, 5' a la región constante kappa). Una secuencia de ácido nucleico ilustrativa codifica una región constante kappa humana y tiene un intrón humano en su extremo 5' se muestra en SEQ ID NO: 34.

60 Los constructos de polinucleótido recombinante incluyen normalmente una secuencia de control de la expresión operativamente unida a las secuencias codificantes de cadenas de anticuerpos, incluyendo las regiones promotoras heterólogas o naturalmente asociadas. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas eucariotas promotoras en vectores capaces de transformar o transfectar las células eucariotas huéspedes. Una vez que el vector ha sido incorporado en el huésped adecuado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de nivel alto de las secuencias de nucleótidos y la recolección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada. El vector o vectores codificantes de las cadenas de anticuerpos también pueden contener un gen seleccionable, como dihidrofolato reductasa o glutamina sintasa, para permitir la amplificación del número de copias de

los ácidos nucleicos que codifican las cadenas del anticuerpo.

E. coli es un huésped procariota particularmente útil para expresar anticuerpos, particularmente fragmentos de anticuerpos. Los microbios, como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un huésped de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión, un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores inducibles de levadura incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Las células de mamíferos son un huésped favorito para expresar segmentos de nucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de éstas. Ver Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Un número de líneas de células huésped adecuado capaces de secretar proteínas heterólogas intactas se han desarrollado en la técnica e incluyen las líneas celulares CHO, varias líneas de células COS, células HeLa, células HEK293, células L y mielomas que no producen anticuerpos incluyendo Sp2/0 y NS0. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión de estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen y otros, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de expresión recomendadas son promotores derivados de genes endógenos, citomegalovirus, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino y similares. Ver Co y otros, *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Una vez que se han introducido los vectores que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos en el cultivo celular, los grupos de células pueden seleccionarse para determinar la productividad del crecimiento y la calidad del producto en medios sin suero. Los grupos de células de mayor producción se pueden someter a clonación unicelular basada en FACS para generar líneas monoclonales. Se prefieren productividades específicas por encima de 50 pg o 100 pg por célula por día, que corresponden a títulos de producto de más de 7,5 g/L de cultivo. Los anticuerpos producidos por clones unicelulares también pueden analizarse para determinar la turbidez, las propiedades de filtración, PAGE, IEF, escaneo UV, HP-SEC, mapeo de carbohidrato-oligosacárido, espectrometría de masas y ensayo de unión, como ELISA o Biacore. Un clon elegido puede almacenarse en múltiples viales y almacenarse congelado para su uso posterior.

Una vez expresados, los anticuerpos pueden ser purificados según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la captura de proteínas, cromatografía en columna (por ejemplo, la interacción hidrofóbica o el intercambio iónico), pH bajo para inactivación viral y similares (ver generalmente, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

Puede emplearse la metodología para la producción comercial de anticuerpos, incluyendo optimización de codón, selección de promotores, elementos de transcripción y terminadores, clonación unicelular libre de suero, bancos de células, uso de marcadores de selección para la amplificación del número de copia, terminador CHO, clonación unicelular libre de suero, mejora de los títulos de proteína (ver, por ejemplo, US 5,786,464, US 6,114,148, US 6,063,598, US 7,569,339, WO2004/050884, WO2008/012142, WO2008/012142 WO2005/019442, WO2008/107388 y WO2009/027471 y US 5,888,809).

IV. Inmunógenos activo

Un agente usado para la inmunización activa sirve para inducir en un paciente los mismos tipos de anticuerpos descritos en relación con la inmunización pasiva anterior. Los agentes usados para la inmunización activa pueden ser los mismos tipos de inmunógenos usados para la generación de anticuerpos monoclonales en animales de laboratorio, por ejemplo, un péptido de 3-15 o 3-12 o 5-12 o 5-8 aminoácidos contiguos de una región de tau correspondiente a los residuos 23-46, 25-44, 28-41 o 30-39 de SEQ ID NO. 1, tal como as, por ejemplo, un péptido que incluye los residuos 28-30, 28-31, 28-32, 28-33, 28-34, 28-35, 28-36, 28-37, 28-38, 28-39, 28-40, 28-41, 29-31, 29-32, 29-33, 29-34, 29-35, 29-36, 29-37, 29-38, 29-39, 29-40, 29-41, 30-32, 30-33, 30-34, 30-35, 30-36, 30-37, 30-38, 30-39, 30-40, 30-41, 31-33, 31-34, 31-35, 31-36, 31-37, 31-38, 31-39, 31-40, 31-41, 32-34, 32-35, 32-36, 32-37, 32-38, 32-39, 32-40, 32-41, 33-35, 33-36, 33-37, 33-38, 33-39, 33-40, 33-41, 34-36, 34-37, 34-38, 34-39, 34-40, 34-41, 35-37, 35-38, 35-39, 35-40, 35-41, 36-38, 36-39, 36-40, 36-41 de la SEQ ID NO: 1. Para inducir anticuerpos que se unen al mismo epítipo o que se superponen como 16B5, se puede mapear la especificidad del epítipo de estos anticuerpos (por ejemplo, probando la unión a una serie de péptidos superpuestos que abarcan tau. Un fragmento tau) que consiste en o incluyen empalman al epítipo puede usarse entonces como un inmunógeno. Dichos fragmentos se usan normalmente en forma no fosforilada.

El portador heterólogo y adyuvante, si se usa pueden ser el mismo usado para la generación de anticuerpos monoclonales, pero también pueden seleccionarse para mejor la idoneidad farmacéutica para el uso en seres humanos. Los portadores adecuados incluyen albúminas séricas, hemocianina de Lapa, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico o un toxoide de otras bacterias patógenas, como la difteria (por ejemplo, CRM197), *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado de la toxina atenuada. Los epítopos de células T son también moléculas portadoras adecuadas. Algunos conjugados pueden formarse mediante la unión de agentes de la invención a una molécula de polímero inmunoestimulantes (por ejemplo, tripalmitoil-S-glicerina cisteína (Pam₃Cys), manano (un

polímero de manosa) o glucano (un polímero β 12), citocinas (por ejemplo, IL-1, IL-1 alfa y péptidos β , IL-2, γ -INF, IL-10, GM-CSF) y quimiocinas (por ejemplo, MIP1- α y β y RANTES). Los inmunógenos pueden estar unidos a los portadores con o sin aminoácidos espaciadores (por ejemplo, gly-gly). Portadores adicionales incluyen partículas similares a virus. Las partículas similares a virus (VLP), también llamadas pseudovirions o partículas derivados de virus, representan estructuras de subunidad compuestas de múltiples copias de una cápside viral y/o proteína de envoltura capaz de autoensamblarse en VLP de simetría esférica definida in vivo. (Powilleit, y otros, (2007) PLoS ONE 2(5):e415.) Alternativamente, inmunógenos péptidos pueden unirse con al menos un epítipo de células T capaz artificial de unir una gran proporción de moléculas MHC Clase II, como el epítipo pan DR ("PADRE"). PADRE es descrito en US 5,736,142, WO 95/07707 y Alexander J y otros, Immunity, 1:751-761 (1994). Los inmunógenos activos pueden presentarse en forma multimérica en los que múltiples copias de un inmunógeno y/o su portador se presentan como una sola molécula covalente.

Los fragmentos se administran a menudo con adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El adyuvante aumenta el título de los anticuerpos inducidos y / o la afinidad de unión de los anticuerpos inducidos en relación con la situación si el péptido se usara solo. Una variedad de adyuvantes puede usarse en combinación con un fragmento inmunogénico de tau para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes preferibles aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afectan la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferibles incluyen las sales de aluminio, el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, 3 De-O-acilados monofosforil lípido A (MPLTM) (Ver GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, ahora forma parte de Corixa). StimulonTM QS-21 es un triterpeno glicósido o saponina aislada de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en América del Sur (Ver Kensil y otros, en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., Nueva York, NY). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (como el escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunes, tales como lípidos A monofosforil (Ver Stoute y otros, N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1997)), polímeros plurónicos y micobacterias muertas. Los adyuvantes Ribi son emulsiones de aceite en agua. Ribi contiene un aceite metabolizable (escualeno) emulsionado con solución salina que contiene Tween 80. Ribi también contiene productos de micobacterias refinadas que actúan como inmunoestimulantes y monofosforil de lípidos A bacteriano. Otro ayudante es CpG (WO 98/40100). Los adyuvantes pueden ser administrados como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o administrarse por separado, se pueden administrar antes, concurrentemente con o después de la administración del agente terapéutico.

También pueden usarse fragmentos análogos naturales de tau que inducen anticuerpos contra el tau. Por ejemplo, una o más o todos los aminoácidos L pueden ser sustituidos con aminoácidos D de estos péptidos. También el orden de los aminoácidos puede invertirse (péptido retro). Opcionalmente un péptido incluye todos los aminoácidos D en orden inverso (péptido retro inverso). Los péptidos y otros compuestos que no necesariamente tienen una similitud de secuencia de aminoácido significativa con los péptidos de tau, pero, sin embargo, sirven como miméticos para los péptidos de tau e inducen una respuesta inmune similar. También pueden usarse anticuerpos anti-idiotípicos contra anticuerpos monoclonales de tau como se describió anteriormente. Estos anticuerpos anti-Id imitan al antígeno y generan una respuesta inmune (ver Essential Immunology, Riouy ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA 6ta ed., p. 181).

Los péptidos (y opcionalmente un portador fusionado con el péptido) también pueden administrarse en forma de un ácido nucleico que codifica el péptido y expresarlo in situ en un paciente. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno esta típicamente unido a elementos reguladores, tal como un promotor y potenciador que permite expresión del segmento de ADN en las células objetivo de un paciente. Para la expresión en células de la sangre, como es deseable para la inducción de una respuesta inmune, los elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera o el promotor y potenciador temprano intermedio principal de CMV son adecuados para la expresión directa. Los elementos reguladores vinculados y las secuencias de codificación a menudo se clonan en un vector. Los anticuerpos también se pueden administrar en forma de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y / o ligeras del anticuerpo. Si están presentes tanto cadenas pesadas como ligeras, las cadenas se unen preferiblemente como un anticuerpo de cadena sencilla. Los anticuerpos para administración pasiva también se pueden preparar, por ejemplo, por cromatografía de afinidad a partir de sueros de pacientes tratados con inmunógenos péptídicos.

El ADN se puede entregar en forma desnuda (es decir, sin materiales coloidales o encapsulados). Alternativamente un número de sistemas de vectores virales se puede usar incluyendo sistemas retrovirales (ver, por ejemplo, Lawrie y Tumin, Cur. Opin. Genet Develop. 3, 102-109 (1993)); vectores adenoviral (ver, por ejemplo, Bett y otros, J. Virol. 67, 591 1 (1993)); vectores de virus adeno-asociados (ver, por ejemplo, Zhou y otros, J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela incluyendo el virus vaccinia y el virus de la viruela aviar, vectores virales del género virus alfa como los derivados de Sindbis y Semliki Forest virus (ver, por ejemplo, Dubensky y otros, J. Virol. 70, 508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (ver US 5,643,576) y rhabdovirus, como el virus de la estomatitis vesicular (véase WO 96/34625) y virus del papiloma (Ohe y otros, Human Gene Therapy 6, 325-333 (1995); Woo y otros, WO 94/12629 y Xiao y Brandsma, Nucleic acids. Res. 24, 2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunógeno o un vector que contiene el mismo puede ser empacado en liposomas. Los lípidos adecuados y análogos relacionados son descritos en US 5,208,036, US 5,264,618, US 5,279,833 y US 5,283,185. Los vectores y el ADN que codifican par un inmunógeno también pueden ser adsorbidos a o asociados con partículas portadoras, ejemplos de estos incluyen polímeros de metacrilato de polimetilo y polilactidas y poli(lactida-co-glicólidos), (ver, por ejemplo, McGee y otros, J. Micro truncado. 1996).

V. Métodos de selección

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

Los anticuerpos que tienen la especificidad de unión deseada pueden probarse entonces en modelos celulares y de animales. Las células utilizadas para la selección son preferiblemente células neuronales. Se ha informado que un modelo celular de la patología tau en el cual las células del neuroblastoma son transfectadas con un dominio de cuatro repeticiones de tau, opcionalmente con una mutación asociada con la patología de tau (por ejemplo, delta K280, ver Khlistunova, Current Alzheimer Research 4, 544-546 (2007)). En otro modelo, la tau es inducida en la línea de celular de neuroblastoma N2a por la adición de doxiciclina. Los modelos celulares permiten estudiar la toxicidad de las células tau en estado soluble o agregado, la aparición de agregados tau después cambiar la expresión del gen tau, la disolución de los agregados tau después de cambiar la expresión del gen nuevamente, y la eficacia de los anticuerpos para inhibir la formación de agregados tau o su desagregarlos.

Los anticuerpos o inmunógenos activos también pueden seleccionarse en modelos animales transgénicos de enfermedades asociadas con tau. Dichos animales transgénicos pueden incluir un transgen tau (por ejemplo, cualquiera de las isoformas humanas) y opcionalmente un transgen APP humano entre otros, tal como una quinasa que fosforila tau, ApoE, presenilina o alfa sinucleína. Tales animales transgénicos están dispuestos a desarrollar al menos un signo o síntoma de una enfermedad asociada con tau.

Un animal transgénico ilustrativo es la línea K3 de ratones (Itner y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(41):15997-6002 (2008)). Estos ratones tienen un transgen tau humano con una mutación K369 I (la mutación se asocia a enfermedad de Pick) y el promotor Thy 1.2. Este modelo muestra un curso rápido de neurodegeneración, déficit motor y degeneración de fibras aferentes y células granulosas cerebelosas. Otro animal ilustrativo es el ratón de la línea pR5. Estos ratones tienen un transgen tau humano con una mutación de P301L (la mutación está asociada con la demencia frontotemporal) y el promotor Thy 1.2 (Taconic, Germantown, NY, Lewis, et otros, Nat Genet. 25:402-405, (2000)). Estos ratones tienen un curso más gradual de neurodegeneración. Los ratones desarrollan ovillos neurofibrilares en varias regiones cerebrales y de la médula espinal. Este es un modelo excelente para estudiar las consecuencias del desarrollo de ovillos y para la selección de la terapia que puede inhibir la generación de estos agregados. Otra ventaja de estos animales es el inicio relativamente temprano de la patología. En la línea homocigótica, anormalidades del comportamiento asociadas con la patología de tau pueden observarse al menos tan temprano como 3 meses, pero los animales siguen estando relativamente sanos por lo menos hasta los 8 meses de edad. En otras palabras, a los 8 meses, los animales deambulan, se autoalimentan y pueden realizar las tareas conductuales suficientemente bien para permitir que el efecto del tratamiento sea monitoreado. La inmunización activa de estos ratones durante 6 a 13 meses con AI w/ KLH-PHF-1 generó títulos de aproximadamente 1000 y mostraron menos ovillos neurofibrilares, menos pSer422 y reducción de la pérdida de peso en comparación con ratones de control sin tratar.

La actividad de los anticuerpos o de agentes activos puede evaluarse por varios criterios, incluyendo la reducción en la cantidad total de tau o la fosforilización de tau, la reducción en otras características patológicas, tales como depósitos amiloide de A β e inhibición o retraso o de déficits conductuales. Los inmunógenos activos también pueden ser probados para la inducción de anticuerpos en los sueros. Los inmunógenos activos y pasivos pueden ser probados para el paso de anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica en el cerebro de un animal transgénico. Los anticuerpos o fragmentos que inducen a un anticuerpo pueden probarse también en primates no humanos que desarrollan síntomas de enfermedades de manera natural o mediante la inducción que se caracterizan por tau. Las pruebas en un anticuerpo o agente activo generalmente se realizan junto con un control en el que se realiza un experimento paralelo, excepto que el anticuerpo o agente activo está ausente (por ejemplo, reemplazado por vehículo). Reducción, retraso o inhibición de los signos o síntomas de la enfermedad atribuible a un anticuerpo o agente activo bajo prueba se puede evaluar en relación con el control.

VI. Pacientes susceptibles de tratamiento

La presencia de ovillos neurofibrilares se ha encontrado en varios tipos de enfermedades incluyendo la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, síndrome de Down, parkinsonismo postencefálico, demencia postraumática o demencia pugilística, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, parálisis supranuclear, demencia frontotemporal, degeneración lobular frontotemporal, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo, demencia de Guam y la parálisis supranuclear progresiva PSP. Los regímenes presentes también pueden usarse en el tratamiento o profilaxis

de cualquiera de estas enfermedades. Debido a la asociación generalizada entre enfermedades y afecciones neurológicas y tau, los presentes regímenes pueden usarse en el tratamiento o profilaxis de cualquier sujeto que muestra niveles elevados de tau o tau fosforilada (por ejemplo, en el CSF) en comparación con un valor medio en individuos sin enfermedad neurológica. Los presentes regímenes también pueden usarse en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad neurológica en individuos con una mutación en tau asociada con enfermedad neurológica. Los presentes métodos son particularmente adecuados para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer y especialmente en los pacientes.

Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad, pero que no muestra síntomas, así como pacientes que actualmente muestran síntomas. Los pacientes en riesgo de una enfermedad incluyen los que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad. Tales individuos incluyen los que tienen familiares que han sufrido esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo es determinado por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo incluyen mutaciones en tau, como las antes mencionadas, así como mutaciones en otros genes asociados con enfermedades neurológicas. Por ejemplo, el alelo ApoE4 en forma heterocigótica e incluso más homocigoto está asociado con el riesgo de enfermedad de Alzheimer. Otros marcadores de riesgo de contraer la enfermedad de Alzheimer incluyen las mutaciones en el gen APP, particularmente mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 que se refiere a las mutaciones de Hardy y Swedish respectivamente, mutaciones en los genes de la presenilina, PS1 y PS2, antecedentes familiares de AD, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden ser reconocidas por la exploración de imagen PET, de la demencia característica, así como la presencia de factores de riesgo descritos anteriormente. Además, una serie de pruebas de diagnóstico están disponibles para identificar individuos con AD. Estos incluyen la medición de los niveles de CSF tau o fosfo-tau y A β 42. El aumento de tau o fosfo-tau y la disminución de los niveles de A β 42 significan la presencia de AD. Algunas mutaciones asociadas con la enfermedad de Parkinson. Ala30Pro o Ala53, o mutaciones en otros genes asociados con la enfermedad de Parkinson, como la quinasa repetida rica en leucina, PARK8. Los individuos también pueden ser diagnosticados con cualquiera de las enfermedades neurológicas mencionadas anteriormente por los criterios del DSM IV TR.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzarse a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Generalmente, sin embargo, no es necesario iniciar el tratamiento hasta que un paciente llegue a los 40, 50, 60 o 70 años de edad. El tratamiento típicamente implica múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse por medio del análisis de los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo. Si la respuesta no es exitosa, se indica una dosis de refuerzo. En el caso de potenciales pacientes con síndrome de Down, el tratamiento puede comenzar en la etapa prenatal por administración de un agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, un anticuerpo o agente para inducir a un anticuerpo o una composición farmacéutica el mismo se administra a un paciente susceptible, o de otra forma con riesgo de una enfermedad (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer) en régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para reducir el riesgo, disminuir la severidad, o retrasar la aparición de al menos una señal o síntoma de la enfermedad. En particular, el régimen es preferiblemente efectivo para inhibir o retrasar tau o fosfo-tau y los filamentos apareados formados de ella en el cerebro, y/o inhibir o retrasar sus efectos tóxicos o inhibir y/o retrasar el desarrollo de déficits conductuales. En aplicaciones terapéuticas, un anticuerpo o un agente para inducir un anticuerpo se administra a un paciente que se sospecha de, o ya padece de una enfermedad (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) en un régimen (dosis, frecuencia y vía de administración) eficaz para mejorar o al menos inhibir aún más el deterioro de al menos una señal o síntoma de la enfermedad. En particular, el régimen es preferiblemente efectivo para reducir o al menos inhibir más el aumento de los niveles tau, fosfo-tau o filamentos apareados formados a partir de ella, toxicidades asociadas o déficits conductuales.

Un régimen se considera terapéutico o profiláctico eficaz si un paciente individual tratado logra un resultado más favorable que el resultado promedio en una población de control de pacientes comparables no tratados por métodos de la invención, o si un resultado más favorable es mostrado en pacientes tratados versus pacientes de control en un ensayo clínico controlado (por ejemplo, un ensayo fase II, fase II/III o fase III) a niveles $p < 0,05$ o $0,01$ o aún $0,001$.

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

Una gama de dosificación ilustrativa de anticuerpos es de aproximadamente $0,01$ a 5 mg/kg y más generalmente de $0,1$ a 3 mg/kg o $0,15$ - 2 mg/kg o $0,15$ - $1,5$ mg/kg, de peso corporal del paciente. El anticuerpo puede administrarse en estas dosis diariamente, en días alternos, semanal, quincenal, mensual, trimestral, o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por el análisis empírico. Un tratamiento ilustrativo implica la administración de dosis múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ilustrativos adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

65

La cantidad de un agente para la administración del activo varía entre 0,1-500 g por paciente y más generalmente de 1-100 o de 1-10 g por inyección para la administración humana. El programa de inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, una vez al año, a una vez cada década. Un régimen normal consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo en intervalos de tiempo, tales como intervalos de 6 semanas o dos meses. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen consiste en una inyección cada dos meses de vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de manera irregular según lo indicado por el monitoreo de la respuesta inmune.

Los anticuerpos o agentes para la inducción de anticuerpos preferiblemente se administran por una vía periférica (es decir, una en la cual el anticuerpo administrado o inducido atraviesa la barrera hematoencefálica para llegar a un sitio previsto en el cerebro. Las vías de administración incluyen tópica, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, intranasal o intramuscular. Las vías preferidas para la administración de anticuerpos son intravenosa y subcutánea. Las vías preferidas para la inmunización activa son subcutánea e intramuscular. Este tipo de inyección se realiza normalmente en los músculos del brazo o de la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde los depósitos se han acumulado, por ejemplo, inyección intracraneal.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral son preferiblemente estériles y substancialmente isotónicas y fabricadas bajo condiciones GMP. Las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse en forma de dosis unitaria (es decir, la dosis de una sola administración). Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o auxiliares fisiológicamente aceptables. La formulación depende de la vía de administración elegida. Para la inyección, los anticuerpos pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer o la solución salina fisiológica o tampón de acetato (para reducir las molestias en el sitio de inyección). La solución puede contener a agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente los anticuerpos pueden estar en forma liofilizada para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógeno, antes de su uso.

Los presentes regímenes pueden administrarse en combinación con otro agente eficaz en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad tratada. Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, los presentes regímenes pueden combinarse con inmunoterapia contra A β (WO/2000/072880), inhibidores de la colinesterasa o la memantina o en el caso de inmunoterapia de la enfermedad de Parkinson contra alfa sinucleína WO/2008/103472, Levodopa, agonistas dopaminérgicos, inhibidores de COMT, inhibidores de MAO-B, amantadina o agentes anticolinérgicos.

VIII. Imagen in vivo, Métodos de Diagnóstico e Inmunoterapia de Optimización

La invención proporciona métodos de imágenes in vivo de depósitos de la proteína tau (por ejemplo, ovillos neurofibrilares e inclusiones tau) en un paciente. Los métodos trabajan mediante la administración de un reactivo, tal como anticuerpo que se une a tau (por ejemplo, anticuerpo quimérico, humanizado o remodelado 16B5 de ratón), al paciente y luego detectar al agente después de la unión. Se prefieren los anticuerpos que se unen a un epítipo de tau dentro de los aminoácidos 24 a 46. En algunos métodos, el anticuerpo se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 25 a 44, o dentro de los aminoácidos 30 a 39. Una respuesta clara a los anticuerpos administrados puede evitarse o reducirse mediante el uso de fragmentos de anticuerpos que carecen una región constante de longitud completa, tales como Fabs. En algunos métodos, el mismo anticuerpo puede servir como reactivo de diagnóstico y tratamiento.

Los reactivos de diagnóstico pueden administrarse por inyección intravenosa en el cuerpo del paciente, o directamente en el cerebro por inyección intracraneal o por la perforación de un orificio en el cráneo. La dosificación del reactivo debe estar dentro de los mismos rangos que para los métodos de tratamiento. Normalmente, el reactivo es etiquetado, aunque en algunos métodos, el reactivo primario con afinidad por tau no se etiqueta y se usa un agente secundario etiquetado para unirse al reactivo principal. La elección de la etiqueta depende de los medios de detección. Por ejemplo, una etiqueta fluorescente es adecuada para la detección óptica. El uso de etiquetas paramagnéticas es adecuado para detección tomográfica sin intervención quirúrgica. Las etiquetas radiactivas también pueden ser detectadas mediante PET o SPECT.

Los métodos de imagen in vivo de los depósitos de proteína tau son útiles para diagnosticar o confirmar el diagnóstico de una tauopatía, tales como la enfermedad de Alzheimer, la degeneración lobular frontotemporal, parálisis supranuclear progresiva y enfermedad de Pick o susceptibilidad a dicha enfermedad. Por ejemplo, los métodos pueden usarse en un paciente que presenta síntomas de demencia. Si el paciente tiene ovillos neurofibrilares anormales, entonces el paciente probablemente está sufriendo de la enfermedad de Alzheimer. Alternativamente, si el paciente tiene inclusiones tau anormales, entonces dependiendo de la ubicación de las inclusiones, el paciente puede estar sufriendo de degeneración lobular frontotemporal. Los métodos pueden usarse también en pacientes asintomáticos. La presencia de depósitos de proteína tau anormales indica susceptibilidad a la enfermedad sintomática futura. Los métodos también son útiles para monitorear la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en pacientes que han sido previamente diagnosticados con una enfermedad relacionada con tau.

5 El diagnóstico se puede realizar comparando el número, tamaño y/o intensidad de loci etiquetados, correspondientes a valores de referencia. Los valores de referencia pueden representar el nivel medio en una población de individuos no enfermos. Los valores de referencia también pueden representar los niveles anteriores en el mismo paciente. Por ejemplo, los valores de referencia se pueden determinar en un paciente antes de iniciar el tratamiento de inmunoterapia tau y los valores medidos después de eso en comparación con los valores de referencia. Una disminución en los valores en relación con la referencia indica una respuesta positiva al tratamiento.

10 En algunos pacientes, el diagnóstico de una tauopatía puede ser asistida mediante la realización de una tomografía por emisión de positrones (exploración PET). Una exploración PET puede realizarse usando, por ejemplo, un generador de imágenes PET convencional y equipos auxiliares. La exploración incluye normalmente una o más regiones del cerebro que en general se sabe están asociadas con los depósitos de proteína tau y una o más regiones en las que pocos depósitos, si los hay, están generalmente presentes para servir como controles.

15 La señal detectada en una exploración PET puede ser representada como una imagen multidimensional. La imagen multidimensional puede ser en dos dimensiones que representan una sección transversal del cerebro, en tres dimensiones, representando el cerebro tridimensional o en cuatro dimensiones que representan cambios en las tres dimensiones cerebrales con el tiempo. Una escala de color puede usarse con diversos colores indicando diferentes cantidades de etiquetas y, probablemente, el depósito de la proteína tau detectada. Los resultados de la exploración también pueden presentarse numéricamente, con números relativos a la cantidad de etiquetas detectadas y en consecuencia de depósitos de la proteína tau. La etiqueta presente en una región del cerebro conocida por estar asociada con los depósitos para un tauopatía particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) puede compararse con la etiqueta presente en una región conocida por no estar asociada con los depósitos para proporcionar una relación indicativa del grado de depósitos dentro de la región anterior. Para el mismo ligando radiomarcado, estas relaciones proporcionan una medida comparable de depósitos de la proteína tau y los cambios de los mismos entre diferentes
25 pacientes.

30 En algunos métodos, una exploración PET se realiza simultánea o en la misma visita del paciente como Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) o una Tomografía Axial Computarizada (exploración CAT). Una MRI o una exploración CAT proporciona más detalles anatómicos del cerebro que una exploración PET. Sin embargo, la imagen de una exploración PET puede ser superpuesta a una MRI o una exploración CAT indicando con más precisión la ubicación del ligando PET y probablemente los depósitos de tau en relación con las estructuras anatómicas en el cerebro. Algunas máquinas pueden realizar tanto exploraciones PET como MRI o CAT sin que el paciente cambie de posiciones entre las exploraciones facilitando la superposición de imágenes.

35 Los ligandos PET adecuados incluyen anticuerpos radiomarcados de la descripción (por ejemplo, un anticuerpo 16B5 de ratón, quimérico, humanizado o remodelado). El radioisótopo utilizado puede ser, por ejemplo, C¹¹, N¹³, O¹⁵, F¹⁸ o ¹²³I. El intervalo entre la administración del ligando PET y la realización de la exploración puede depender del ligando PET y particularmente su tasa de absorción y compensación en el cerebro y la vida media de su radiomarcaje.

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

50 Las exploraciones profilácticas pueden realizarse a intervalos, por ejemplo, de entre seis meses y diez años, preferiblemente entre 1-5 años. En algunos pacientes, las exploraciones profilácticas se realizan anualmente. Si una exploración PET realizada como medida profiláctica indica niveles anormalmente altos de depósitos de proteína tau, la inmunoterapia puede ser iniciada y posteriores exploraciones PET realizadas en pacientes diagnosticados con una tauopatía. Si se realizó una exploración PET como medida profiláctica e indica niveles de depósitos de la proteína tau dentro de niveles normales, más exploraciones PET pueden realizarse a intervalos de entre seis meses y 10 años y preferiblemente entre 1 a 5 años, como antes, o en respuesta a la aparición de señales y síntomas de tauopatía o deterioro cognitivo leve. Mediante la combinación de exploraciones profilácticas con la administración de inmunoterapia dirigida en caso de que se detecte un nivel de depósitos de proteína tau por encima de lo normal, los niveles de depósitos de proteína tau se pueden reducir o estar más cerca de los niveles normales, o al menos inhibir su aumento, y el paciente puede permanecer libre de la tauopatía por un período más prolongado que si no recibe exámenes profilácticos e inmunoterapia dirigida por tau (por ejemplo, al menos 5, 10, 15 o 20 años, o por el resto de la vida del
60 paciente).

65 Los niveles normales de los depósitos de la proteína tau pueden determinarse por la cantidad de ovillos neurofibrilares o inclusiones de tau en el cerebro de una muestra representativa de individuos en la población general que no han sido diagnosticados con una tauopatía particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) y no se consideran en riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad (por ejemplo, una muestra representativa de individuos libres de la enfermedad menores de 50 años de edad). Alternativamente, se puede reconocer un nivel normal en un paciente

individual si la señal PET según los métodos presentes en una región del cerebro en el cual los depósitos de la proteína tau se sabe que su desarrollo no es diferente (dentro de la precisión de medición) de la señal de una región del cerebro donde se sabe que tales depósitos no se desarrollan normalmente. Un nivel elevado en un individuo puede ser reconocido por comparación a los niveles normales (por ejemplo, fuera de media y variación de una desviación estándar) o simplemente de una señal elevada más allá del error experimental en una región del cerebro asociada con los depósitos de la proteína tau en comparación con una región no conocida por estar asociada con los depósitos. Para efectos de comparación de los niveles de los depósitos de la proteína tau en un individuo y en la población, los depósitos de la proteína tau deben preferiblemente determinarse en las mismas regiones del cerebro, estas regiones incluyendo por lo menos una región en la cual los depósitos de la proteína tau asociados a una tauopatía particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) se sabe que forman. Un paciente que tiene un nivel elevado de depósitos de la proteína tau es un candidato para comenzar la inmunoterapia.

Después de comenzar la inmunoterapia, una disminución en el nivel de depósitos de la proteína tau puede verse primero como una indicación de que el tratamiento está teniendo el efecto deseado. Por ejemplo, puede ser la disminución observada en el rango de 1-100%, 1-50% o 1-25% del valor de referencia. Estos efectos pueden medirse en una o más regiones del cerebro en las cuales se sabe que los depósitos forman o pueden medirse desde un promedio de dichas regiones. El efecto total del tratamiento se puede aproximar mediante la adición del porcentaje de reducción en relación a la línea basal para el aumento en los depósitos de la proteína tau que ocurriría lo contrario en un paciente promedio no tratado.

El mantenimiento de los depósitos de la proteína tau en un nivel aproximadamente constante o incluso un pequeño aumento en los depósitos de la proteína tau también puede ser un indicio de respuesta al tratamiento, aunque una respuesta subóptima. Estas respuestas pueden compararse con un tiempo de curso de los niveles de depósitos de la proteína tau en pacientes con una tauopatía particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) que no recibieron tratamiento, para determinar si la inmunoterapia está teniendo un efecto en la inhibición de nuevos aumentos de los depósitos de proteína tau.

El monitoreo de los cambios en los depósitos de la proteína tau permite el ajuste de la inmunoterapia u otro régimen de tratamiento en respuesta al tratamiento. El monitoreo por PET proporciona una indicación de la naturaleza y el grado de respuesta al tratamiento. Entonces es posible una determinación si se va a ajustar el tratamiento y si el tratamiento deseado puede ajustarse en respuesta al monitoreo de PET. El monitoreo de PET, permite inmunoterapia dirigida a tau o de otro régimen de tratamiento para ajustarse antes de otros biomarcadores, MRI o medidas cognitivas perceptibles que han respondido. Un cambio significativo significa que la comparación del valor de un parámetro después de tratamiento con respecto a la referencia proporciona alguna evidencia de que el tratamiento tiene o no ha dado lugar a un efecto beneficioso. En algunos casos, un cambio de valores de un parámetro en un paciente proporciona evidencia de que el tratamiento tiene o no ha dado lugar a un efecto beneficioso. En otros casos, el cambio de valores, si hubiera, en un paciente, se compara con el cambio de valores, si hubiera, de una población control representativa de pacientes no son sometidos a inmunoterapia. Una diferencia en la respuesta en un paciente particular de la respuesta normal en el paciente de control (por ejemplo, media más varianza de una desviación estándar) puede también proporcionar evidencia de que un régimen de inmunoterapia logra o no un efecto beneficioso en un paciente.

En algunos pacientes, el monitoreo indica una declinación perceptible en los depósitos de la proteína tau, pero que el nivel de depósitos de las proteínas tau se mantiene por encima de lo normal. En tales pacientes, si no hay efectos secundarios inaceptables, el régimen de tratamiento puede ser continuado o incluso aumentado en la frecuencia de administración y/o dosis si no es ya la dosis máxima recomendada.

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

En otros pacientes, el monitoreo puede indicar que la inmunoterapia está teniendo algún efecto beneficioso, pero un efecto subóptimo. Un efecto óptimo se puede definir como un porcentaje de reducción en el nivel de depósitos de la proteína tau en la mitad superior o cuartil del cambio en los depósitos de la proteína tau (medidos o calculados sobre el total del cerebro o regiones representativas del mismo en las que se saben que se forman los depósitos de las proteínas tau) experimentado por un representante de muestra de pacientes de tauopatía sometidos a la inmunoterapia en un momento dado después de comenzar terapia. Un paciente que experimenta una caída más pequeña o un paciente cuyos depósitos de proteína tau permanecen constantes o incluso aumenta, pero en menor medida de lo esperado en ausencia de inmunoterapia (por ejemplo, como se deduce de un grupo control de pacientes a los que no se les ha administrado inmunoterapia) se puede clasificar como que experimenta una respuesta positiva, pero subóptima. Tales pacientes pueden ser sometidos a un ajuste del régimen en el que se aumenta la dosis o frecuencia de administración de un agente.

En algunos pacientes, los depósitos de proteína tau pueden aumentar de manera similar o superior a los depósitos de

tau en pacientes que no recibieron inmunoterapia. Si estos incrementos persisten durante un período de tiempo, por ejemplo 18 meses o 2 años, incluso después de cualquier aumento en la frecuencia o dosis de los agentes, la inmunoterapia, si se desea, puede suspenderse en favor de otros tratamientos.

5 La descripción anterior de diagnóstico, monitoreo y tratamiento de ajuste para tauopatías se ha centrado en gran parte sobre el uso de exploraciones PET. Sin embargo, cualquier otra técnica para visualizar y/o medir los depósitos de la proteína tau que es sensible al uso de los anticuerpos tau de la invención (por ejemplo, anticuerpos 16B5 de un ratón, quimérico, humanizado o remodelado) pueden usarse en lugar de las exploraciones PET para realizar tales métodos.

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos 16B5

15 El anticuerpo pan 16B5, que reconoce si tau es o no es fosforilada, surgió para tau purificada y se seleccionó con base en sus propiedades de captura de alta afinidad en un ensayo de ELISA.

Ejemplo 2: Clonación y secuenciación de anticuerpos 16B5

20 Se extrajeron ARN de células peletizadas que expresan el anticuerpo 16B5 usando Trizol LS (Invitrogen). Se midieron las concentraciones del ARN con el kit Quant-IT (Invitrogen).

Se usó 5'-RACE para amplificar el extremo 5' del mRNA de IgG usando el kit Smart RACE (Clontech). Aproximadamente 1 µg del ARN se usó para la reacción RT y los grupos de cADN se amplificaron más usando el cebador Universal suministrado con el kit Smart RACE y cebadores específicos del gen (GSP) diseñados en ExonBIO.

25 Secuencias de cebador:

Cebador Universal: CTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID NO: 7)

30 GSP:

IgG1 e IgG2a: CTC AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC (SEQ ID NO: 8)

IgG2b: CTC AAG TTT TTT GTC CAC CGT GGT GC (SEQ ID NO: 9)

35 Los productos PCR se purificaron en gel y se clonaron en el vector de pSUPER-blunt (Adexon, www.adexonbiotech.com). Para la cadena pesada, 15 colonias fueron mini-preparadas y secuenciadas. Para la cadena ligera, se realizó una PCR de colonias para distinguir la cadena ligera aberrante endógena, y solo se secuenciaron los clones que no se amplificaron de la PCR de colonias. Los resultados de la secuencia se analizaron en el vector NTI. Las secuencias del cebador adaptador y GSP se marcaron en el mapa. Las regiones entre el adaptador y las secuencias GSP son secuencias de cadena pesada de IgG que incluyen líder, péptido señal y región V, y parte de la región constante. Los ORF fueron marcados en el mapa.

45 Ejemplo 3. Mapeo epítipo de anticuerpos 16B5

Identificación de epítipo por análisis del fragmento del péptido. La secuencia tau humana con 4 repeticiones de unión de microtúbulos y sin insertos N-terminales, y que contiene una mutación P301L (rTau), se expresó en E. coli y se purificó. Esta forma de tau tiene la secuencia SEQ ID NO: 3, con la sustitución de leucina por prolina en la posición 243 (que corresponde a P301L usando la convención de numeración con base en la isoforma más larga de tau). Las digestiones enzimáticas de 200 µg de tau se llevaron a cabo con una de cuatro proteasas diferentes: tripsina (que escinde en el extremo carboxilo de la arginina y lisina), quimotripsina (que principalmente se escinde en el extremo carboxilo de la tirosina, triptófano, fenilalanina y leucina), LysC (que se escinde en el extremo carboxilo de la lisina) o GluC (que se escinde después de residuos de glutamato y rara vez residuos de aspartato). Todas las proteasas obtenidas de Thermo Scientific, y las digestiones fueron realizados por 16h a 37°C. Los fragmentos de péptidos resultantes se incubaron con 10 µg de 16B5 y precipitó usando perlas magnéticas de proteína G (NEB). Los precipitados se lavaron minuciosamente en PBS conteniendo 300mM de NaCl y 0,5% NP-40, y luego se eluyeron con 1 M de NaCl en glicina 100 mM, pH 2,8. Los eluatos se secaron al vacío y se resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Los eluatos resuspendidos se cargaron en una columna C18 de 4,6x50 mm, luego se fraccionaron por HPLC (sistema Agilent 1260 Infinity) usando un gradiente lineal de acetonitrilo con TFA al 0,075%. Las fracciones pico se recolectaron, se secaron y se resuspendieron en agua destilada. Las masas e identidades peptídicas se determinaron mediante MALDI-TOF/TOF. Un pico correspondiente a los residuos 25-44 SEQ ID NO: 1 se identificó en el espectro MS de LysC. Los picos correspondientes a los residuos SEQ ID NO: 1 de 25-44 y 24-44 se identificaron en el espectro MS de tripsina. No se obtuvo ninguna señal de las digestiones de quimotripsina y GluC, lo que sugiere que algunos epítipos pueden comprender el residuo 29 de la SEQ ID NO: 1 o el residuo 37 de la SEQ ID NO: 1.

65

Identificación del epítipo por análisis de mutación. Usando los resultados determinados por análisis del fragmento del péptido (descrito anteriormente), la mutagénesis de la delección de rTau se llevó a cabo por la amplificación del plásmido completo mediante métodos de biología molecular estándar. La proteína se expresó en pequeños volúmenes de cultivo bacteriano, y volúmenes iguales de lisado bacteriano clarificado se sometieron a electroforesis, se mancharon y se tiñeron con el anticuerpo 16B5. Para controlar la carga de la muestra, se usó Tau46, un anticuerpo con especificidad para la región C-terminal de tau (epítipo C-terminal), para teñir las transferencias duplicadas. Ambos anticuerpos se usaron en una concentración de 0,2 µg/mL. Se capturaron imágenes usando un escáner fluorescente Licor Odyssey. Los siguientes mutantes de delección de tau se prepararon y analizaron de la siguiente manera: 5-24, 23-32, 25-44, 30-39 y Δ37-46. Como se muestra en las figuras 1 y 2, los mutantes de delección Δ25-44 y Δ30-39 de tau no se detectaron por el anticuerpo 16B5, proporcionando evidencia que un epítipo reconocido por 16B5 se encuentra dentro de los residuos. El mutante de delección Δ37-46 de tau fue sólo ligeramente detectable con 16B5, proporcionando evidencia que algunos de los residuos dentro de 37-46 (por ejemplo, los residuos 37) pueden desempeñar un papel en la unión de 16B5 a tau. El anticuerpo 16B5 tiñó el mutante de delección Δ23-32 de tau en un grado menor a Δ5-24 y en mayor medida a los mutantes de delección Δ25-44 y Δ30-39, proporcionando evidencia de que 16B5 también puede unirse a un péptido que comprende los residuos 33-36, 30-36, 33-37, 30-37 o 33-39. Tomados en su conjunto, los datos obtenidos de los mutantes de delección de tau sugieren que un epítipo reconocido por 16B5 puede comprender algunos o todos los residuos 23-32 de la SEQ ID NO: 1 y algunos o todos los residuos 37-46 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, 16B5 puede reconocer un epítipo dentro de los residuos 32-38 28-41 de la SEQ ID NO: 1.

Identificación del epítipo por exploración de alanina. Los residuos individuales dentro de la región de tau que abarcan los residuos 30-42 se mutaron luego a alanina usando mutagénesis por PCR. Las proteínas mutadas se expresaron, y los lisados se resolvieron mediante electroforesis y se transfirieron con el anticuerpo 16B5 o el anticuerpo Tau46, como se describió anteriormente. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 3. Los mutantes de punto específico analizados, incluyendo T30A M31A, H32A, Q33A, D34A, Q35A, E36A, G37A, D38A, T39A, D40A, A41L y G42A, son mencionados arriba de las transferencias. Los residuos de interés particular están encerrados en cuadros de cada transferencia. La unión detectable de 16B5 se eliminó por completo por el mutante Q33A de tau y se redujo sustancialmente por el mutante G37A de tau, proporcionando evidencia de que los residuos 33, y en menor medida los residuos 37, pueden ser componentes importantes de un epítipo reconocido por 16B5. Otros residuos pueden ser componentes importantes de un epítipo reconocido por 16B5 en un análisis de Biacore.

Ejemplo 4. Inmunización pasiva en el modelo de tauopatía de ratón transgénico hTau. P301L.

Inmunización. Ratones hembras hTau.P301L-T de 3 meses de edad en el fondo genético FVB/N se usaron para este estudio. La administración de 10mg/kg de anticuerpos de prueba y de control se realizaron por vía intraperitoneal, una vez por semana. La duración del tratamiento fue de 5 meses aproximadamente. Después de 23 inyecciones, el estudio terminó con el sacrificio de los ratones. La Tabla 1 describe los anticuerpos de prueba y de control administrados en este estudio.

Tabla 1		
Esquema de Dosificación		
	Grupo K	Grupo M
Anticuerpo	16B5	6F10
Especificidad de unión de	Dentro de 23-46 (ver Ejemplo3)	Isotipo de control IgG no inmune
N	22	22
Tratamiento	N2	N3
Dosis	10 mg/kg semanal	10 mg/kg semanal
Volumen de la dosis	1,724 ml/kg	2,381 ml/kg

La muerte prematura es un fenotipo observado en modelos de tauopatía de murino transgénico. El modelo específico utilizado en este estudio desarrolla Tau hiperfosforilada a la edad de 6 meses, aunque con una alta variabilidad de aparición. Los ratones también sufren defectos motores como rigidez de extremidades posteriores y movilidad general reducida y muerte prematura a la edad de 8 a 11 meses (reMYND datos inéditos, Terwel y otros, 2005). Los ratones que desarrollaron síntomas de enfermedad en fase final, caracterizados por la presencia del fenotipo de rigidez y pérdida de peso, fueron sacrificados. Un alto número inesperado de ratones murió prematuramente sin presencia de estos síntomas. Se considera que la causa de la muerte en tales casos no está relacionada con la tauopatía en etapa tardía o el anticuerpo de prueba, y en cambio se cree que está relacionada con los antecedentes endogámicos de FVB/ N. La Tabla 2 muestra un resumen de la supervivencia global de todos los ratones durante el curso del estudio.

Tabla 2

Supervivencia durante el tratamiento (todas las causas deceso)

		N al inicio del estudio	N vivo en el sacrificio	% de supervivencia
Grupo K	N2	22(23)*	11	50(47)
Grupo M	N3	22	13	53

*Un ratón en el Grupo K se reemplazó al inicio del estudio. Los datos pueden analizarse con o sin remplazo del ratón.

Después del sacrificio, se diseccionaron los ratones y se homogeneizaron los cerebros y el mesencéfalo utilizando un homogeneizador mecánico tipo pottert (VOS 14 S40, velocidad 750 rpm; VWR) en 10 volúmenes en peso de tampón inhibidor de Tris- proteinasa-fosfatasa (tampón de TPPI) que contiene: 20 mM Tris-HCl (pH 8,1); 150 mM NaCl; 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Merck); 1 mM de ácido de etilenglicol tetraacético (EGTA, Sigma-Aldrich); 5 mM de pirofosfato de sodio (Sigma); 30 mM de fluoruro de sodio (Sigma-Aldrich); 1 mM de PMSF (Sigma); 2 mM de vanadato de sodio (Sigma); 10 mM de 1,10-orto-fenantrolinamonohidrato (Sigma-Aldrich); 5 µg/ml de inhibidor de tripsina de frijol de soja; 5 µg/ml de pepstatina; y un cóctel de inhibidores de la proteinasa (CPI, Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Los volúmenes fijos 140 µl y 100 µl de los tallos cerebrales y mesencéfalos homogeneizados (TotH), respectivamente, (aproximadamente la mitad de los volúmenes totales) se centrifugaron a 136000xg, durante 60 min a 4°C (rotor TLA-55, OptimaTMTLX Ultracentrifuge, Beckman Coulter) para generar una fracción soluble en Tris (SF), con el resto de los homogeneizados totales almacenados a -80°C. Debido a un número limitado de soportes de centrifuga (N = 12), las muestras se aleatorizaron para equilibrar la centrifuga y dividir los diferentes grupos de tratamiento en las diferentes sesiones de centrifugación.

El sobrenadante (S1, también conocido como "fracción soluble" o "SF") se separó del gránulo (P1), se alicuotó y almacenó a -80°C. El gránulo de P1 se solubilizó en 10 volúmenes de peso de una solución de sal (0,85 M de NaCl que contiene el tampón TPPI) y se centrifugó a 20000xg, durante 30 min a 4°C. El gránulo resultante con alto contenido de sal (P2) se almacenó a -80°C. El sobrenadante (S2) se llevó a 1% de Sarkosyl con una décima parte del 10% de Sarkosyl y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos en una mezcladora rotativa superior en la parte superior, luego se centrifugó a 136000xg, por 60 min a 4°C. El sobrenadante soluble Sarkosyl (S3) se almacenó a -80°C y el precipitado insoluble Sarkosyl (P3, también conocido como "fracción insoluble" o "IF") fue resuspendido en un tampón TPPI de 30 µl y alicuotado. Las fracciones del tronco encefálico homogenato total (TotH), soluble en Tris (SF) e insoluble en Sarkosyl (IF) generadas por el protocolo de fraccionamiento descrito anteriormente se usaron en posteriores electroforesis en gel de poli-acrilamida y análisis de transferencia Western.

Electroforesis en gel de poli-acrilamida e inmunotransferencia de Western. Para aplicación de SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western convencionales, las muestras fueron desnaturizadas y reducidas por incubación a 95°C por 10 min, luego separadas en geles de Tris-HCl 7,5% (Criterion XT Precast Gel, peine de 26 pocillos, 15 µl, 1,0 mm; BioRad). Después de la electrottransferencia seca (iBlot™ Invitrogen) a membranas de PVDF (iBlot™ Gel Transfer Sacks, PVDF, Regular, Invitrogen), las membranas se lavaron en 0,4% PFA por 30 min y luego se lavaron con solución salina tamponada con Tris. A continuación, las membranas se incubaron en solución salina tamponada con Tris (TBS, pH 7,6) que contiene 5% (p/v) leche en polvo sin grasa y 0,1% (v/v) de Tween 20 durante 1 hora. Las transferencias se incubaron con varios anticuerpos primarios anti-tau durante la noche, a las concentraciones de trabajo que se muestran en la Tabla 3. Después del lavado y la incubación con un anticuerpo secundario HRP-conjugado anti ratón o anti-conejo (IgG de cabra-anti-ratón o cabra-anti-conejo, DAKO), las transferencias se desarrollaron mediante el sistema de detección ECL (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, producto 34096, Thermo Scientific). Las imágenes se registraron digitalmente (VisionWorks Acquisition, UVP) con diferentes tiempos de exposición y un programa diseñado especialmente (VisionWorks Analysis, UVP) se usó para el análisis de las transferencias. Para la comparación, un gel de referencia inter-gel se ejecutó con alicuotas de cuatro fracciones que se ejecutaron en cada gel para comparar. Los anticuerpos monoclonales primarios anti-tau usados para la detección incluyeron AT100 (fosfo-Tau, Thermo Scientific; dilución 1:250), AT8 (fosfo-Tau, Thermo Scientific; dilución 1:500), HT7 (pan Tau, Pierce; dilución 1:1000) y 1F5 (epítipo desconocido a las Instalaciones de Pruebas, Neotope, dilución 3:500). Las transferencias se volvieron a probar con anti-GAPDH (Abcam 9485; dilución 1: 2500) como control de carga. Los anticuerpos Pan Tau no son específicos para fosfo-Tau.

Tabla 3				
Resumen de anticuerpos utilizados para análisis bioquímico				
mAb	Proveedor	Especificidad (humana)	Concentración de sol. madre	Concentración de Trabajo
AT100	Thermo Scientific	Fosfo-PHF-tau pSer 212/Thr214	200 µg/ml	0,8 µg/ml
AT8	Thermo Scientific	Fosfo-PHF-tau pSer 202/Thr205	200 µg/ml	0,4 µg/ml
HT7	Pierce	Entre resicuos 159 y 163	200 µg/ml	0,2 µg/ml
1F5*	Neotope	pS ⁴⁰⁴	1 mg/ml	6 µg/ml
GAPDH	Abcam	Humana	1 mg/ml	0,4 µg/ml
*Isotipo IgG2b, hibridoma JH131-1F5.4.1, lote#NB-0081				

Como se muestra en la Figura 4, se observó una reducción estadísticamente significativa en la cantidad de tau en fracciones insolubles de tallo cerebral en sarkosyl de animales tratados con el anticuerpo 16B5, en comparación con animales tratados con el anticuerpo de control 6F10. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student, $p < 0,05$. Esta reducción se observó con ambos anticuerpos específicos fosfo-tau (AT8, panel superior izquierdo; AT100, panel inferior izquierdo; 1F5, panel superior derecho) y anticuerpos pan tau (HT7, panel inferior derecho). Western Blot del total homogeneizado también indicó una reducción significativa en la proporción de fosfo-tau al tau total en los animales tratados con 16B5 en relación con los animales de control tratados con el anticuerpo 6F10, cuando se detectó con un anticuerpo específico de fosfo. Ver Figura 5, panel izquierdo (muestra la señal detectado con el anticuerpo de anti-fosfo-tau AT8 dividido por la señal detectada con el anticuerpo de tau HT7 pan). En contraste, no hubo ningún cambio significativo en la proporción de tau total a niveles GAPDH en los totales homogeneizados de los animales tratados con 16B5 en comparación con los animales de control tratados con el anticuerpo 6F10. Ver Figura 5, panel de la derecha (que muestra la señal detectada con el anticuerpo de tau pan HT7 dividido por la señal detectada con el anticuerpo GAPDH). Estos datos proporcionan evidencia que el nivel de fosfo-Tau, pero no el de tau total, se redujo en los homogeneizados.

Análisis Histológico. El análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-fosfo-tau se realizó en el núcleo subtalámico anexo a una zona incerta (STH/ZI) y el núcleo interpuesto del cerebelo, partes anterior y posterior, anexo al núcleo lateral cerebeloso (IntA/P/LAT). Las secciones de vibratoma sagital (40 mm) se almacenaron en PBS con azida de sodio al 0,1% a 4 °C hasta su uso. Ocho secciones por ratón, en bregma indicado, se tiñeron flotando libremente con mAbs AT8, AT100 o 1F5. Las secciones se seleccionaron para la tinción con los anticuerpos indicados como se enumeran en la Tabla 4 a continuación. Las secciones de todos los animales seleccionados para una tinción particular se aleatorizaron para la tinción y la cuantificación a ciegas.

Las secciones de flotación libre se incubaron en Netwells™. Las secciones se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante 20 minutos en peróxido de hidrógeno al 1,5% en PBS y metanol (1:1) para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Después de lavar las secciones tres veces en PBS con un 0,1% de Tritón X 100 (PBST), las secciones se bloquearon por 30 min en 10% Suero Fetal de ternero (FCS) en PBST seguido por una incubación de toda la noche con anticuerpos primarios AT8, AT100 (Thermo Scientific), usando unas concentraciones de 0,4 µg/ml y 0,05 µg/ml, respectivamente, en PBST con 10% de FCS. Después de enjuagar, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario (DAKO, 1/500 en PBST, 10% FCS) de peroxidasa etiquetado de cabra anti-ratón (GAMPO) y la señal se desarrolló con 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB, 1 tableta por cada 10 ml de Tris-HCl con 3 µl de H₂O₂ por 10 ml). Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Mayer, deshidratadas en cinco etapas (50, 70, 95 y 2 x 100%) en etanol y xileno (Merck Eurolab) y montadas en Depex (medio de montaje Depex, Laboratorio BDH).

Tabla 4					
Resumen de anticuerpos utilizados para el análisis inmunohistolquímico					
mAb	Proveedor	Especificidad	Huésped	Concentración de sol. madre	Concentración de Trabajo
AT8	Thermo	Humana	Ratón	200 µg/ml	0,4 µg/ml
AT100	Thermo	Humana	Ratón	200 µg/ml	0,05

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Olympus BX41 equipado con una cámara Color view Olympus II y analizadas con un ordenador mediante un programa AnalySIS Five – Cell^{AD}. La configuración de intensidad de luz y del condensador del microscopio se mantuvieron constantes durante todo el proceso de adquisición de imagen. Todas las imágenes adquiridas se sometieron a las mismas subrutinas del ordenador para minimizar el riesgo atribuible al investigador. El umbral de corte de densidad se aplicó de manera uniforme durante todo el análisis.

La región de interés tal como se define a continuación fue seleccionada para la cuantificación automática de la(s) señal(es) de tinción. El núcleo subtalámico y la zona incerta se delinearón por el pedúnculo cerebral de manera ventral y por la materia blanca de manera dorsal, respectivamente, así como con base en las diferencias en la densidad celular (bregma de secciones sagitales cerebelosas 1,32-1,92). El núcleo interpuesto del cerebelo, las partes anterior y posterior y el núcleo cerebeloso lateral se delinearón por la materia blanca y los cambios en densidad celular y del tercer ventrículo (bregma de secciones cerebelosas sagitales, 1,92-2,64 para LAT y 0,84-1,8 para IntA/P). Para cada tinción, en el análisis se incluyeron 6 secciones del cerebro conteniendo el STH/ZI y 16 secciones conteniendo el IntA/P/LAT por ratón.

Tal como se muestra en la FIG. 6, la cantidad de fosfo-tau detectada en los núcleos cerebelosos y la región subtalámica de animales tratados con el anticuerpo 16B5 se redujo significativamente en comparación con la cantidad de fosfo-tau detectada en las mismas estructuras de los animales de control tratados con el anticuerpo 6F10. La significación estadística se evaluó mediante la prueba t de Student, $p < 0,05$.

Ejemplo 5: Humanización de 16B5

Los análisis de la secuencia muestran que el anticuerpo 16B5 tiene un dominio variable kappa (Vk) que tiene la secuencia SEQ ID NO: 16, que pertenece al subgrupo 1 de ratón de Kabat y corresponde al subgrupo 4 de humano de Kabat. Se resaltan las CDR de Kabat. El dominio variable pesado (Vh) del anticuerpo 16B5 tiene la secuencia SEQ ID NO: 10, que pertenece al subgrupo 2b de ratón de Kabat y corresponde al subgrupo I de humano de Kabat (Kabat y otros. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición; NIH Publicación No. 91-3242). Se resaltan los CDR de Kabat.

El dominio 16B5 Vk incluye una secuencia CDR-L1 de 17 residuos (KSSQSLLSRTRKNYLA, SEQ ID NO: 17), una secuencia CDR-L2 de 7 residuos (WASTRES, SEQ ID NO: 18) y una CDR-L3 de 8 residuos (KQSYTLRT, SEQ ID NO: 19). La secuencia CDR-L1 pertenece a la clase canónica 3, y las secuencias CDR-L2 y CDR-L3 pertenecen a la clase 1 (Martin y Thornton (1996), J. Mol. Biol. 263: 800-15).

El dominio 16B5 Vh incluye una secuencia CDR-H1 de 5 residuos (YHGMD, SEQ ID NO: 11) con base en la numeración de Kabat o una secuencia CDR-H1 de 10 de residuos (GYPFTYHGMD, SEQ ID NO: 24) con base en la numeración Kabat y Chothia, una secuencia CDR-H2 de 17 residuos (WINTYSGVPTYADDFKG, SEQ ID NO: 12) y una secuencia CDR-H3 de 8 residuos (RRDFTMDF, SEQ ID NO: 13). La secuencia CDR-H1 pertenece a la clase canónica 1 y la secuencia CDR-H2 pertenece a la clase 2 (Martin & Thornton (1996), J. Mol. Biol. 263:800-15). La secuencia CDR-H3 no tiene ninguna clase canónica, pero probablemente tiene una base curva según las reglas de Shirai y otros. (1999), FEBS Lett. 455:188-97.

Los residuos en la interfaz entre los dominios de Vk y Vh son residuos habituales para estas posiciones en ratones.

Se realizó una búsqueda sobre las secuencias de la proteína en la base de datos PDB (Deshpande y otros. (2011) J. Virol. 85:1820-33) para encontrar estructuras que proporcionaran un modelo estructural aproximado del anticuerpo 16B5. La estructura del fragmento Fab del anticuerpo anti-toxina del cólera Te33 (código pdb 1ZEA_H) se usó para el VL con una resolución de 1,78 Å. Conservó la misma estructura canónica de los bucles como 16B5. La estructura cristalina Fab en el complejo Dsbb-Fab (código pdb 2ZUQ_B) se usó para modelar el dominio VH de 16B5. Se resolvió a una resolución de 3.3 Å y contenía las mismas estructuras canónicas para CDR-H1 y CDR-H2, y también la misma longitud de CDR-H3 con una base retorcida. Se usó el programa BioLuminate para modelar una estructura aproximada de 16B5 Fv.

Una búsqueda de la base de secuencia de proteínas no redundantes de NCBI con una secuencia de CDR^Xed 16B5 Fv permitió una selección de marcos humanos adecuados en los cuales injertar las CDR murinas. Por Vk, una cadena ligera kappa humana con código de acceso de NCBI ACJ71718.pro se seleccionó (SEQ ID NO: 20). Esta secuencia de la cadena ligera kappa humana tiene las mismas clases canónicas para CDR-L2 y L3. Para Vh, cadena pesada de Ig humana BAC02002.1 se seleccionó (SEQ ID NO: 14). Esta comparte la forma canónica de 16B5 CDR-H1 y H2, y H3 tiene 8 residuos de largo con una base retorcida prevista.

La cadena pesada humanizada y los diseños de cadena ligera y las retromutaciones con base en estos marcos humanos se muestran en las Tablas 5 y 6, respectivamente.

Se diseñó una cadena pesada variable humanizada 16B5 (H1) con la secuencia SEQ ID NO: 15. Los diseños incluyen tres retromutaciones: R13K; V48M; y Y98F. Se seleccionó la K en la posición 13 porque es más frecuente que R en

ES 2 766 762 T3

humanos. La M en la posición 48 se seleccionó debido a que esta es más frecuente que V en humanos. La F en la posición 98 se seleccionó debido a que se encuentra en una interfaz, lo que hace deseable guardar los residuos del ratón.

5 Se diseñaron tres secuencias de cadena ligera variable humanizada 16B5:

10 La versión 1 (L1) tiene la secuencia SEQ ID NO: 21 e incluye tres retromutaciones: D1N; M4L; y Y36F. La N en la posición 1 se seleccionó debido a que constituye un enlace de hidrógeno potencial con N61 en HCDR2. La L en la posición 4 se seleccionó debido a que contacta con K96, Q97 y S98 en LCDR3; asimismo, contacta con F104, una interfaz de residuo. La F en la posición 36 se seleccionó debido a que Y puede crear un enlace de hidrógeno con D106 en HCDR3, mientras que F no puede. El enlace de hidrógeno constituiría una interacción extra que puede afectar a la función HCDR3 y, por lo tanto, preferiblemente se evita.

15 La versión 2 (L2) tiene la secuencia SEQ ID NO: 22 e incluye cuatro retromutaciones: D1N; M4L; Y36F; y P43S. La justificación para la D1N M4L y Y36F es la misma que la versión 1. La S en la posición 43 se seleccionó debido a que S forma un enlace de hidrógeno con Q110 en VH, el cual está cerca de HCDR3.

20 La versión 3 (L3) tiene la secuencia SEQ ID NO: 23 e incluye tres retromutaciones: M4L; Y36F; y P43S. La justificación para cada una de estas mutaciones es la misma que para las versiones 1 y 2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 5					
Secuencias para la humanización de la cadena pesada 16B5					
Residuo de Kabat No.	Residuo lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:10	FR Aceptor VH Hu B2 SEQ ID NO: 14	Diseño Humanizado v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO: 15
1	1	Fr1	Q	Q	Q
2	2	Fr1	I	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L
5	5	Fr1	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:10	FR Aceptor VH Hu B2 SEQ ID NO: 14	Diseño Humanizado v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO: 15
8	8	Fr1	G	G	G
9	9	Fr1	P	S	S
10	10	Fr1	E	E	E
11	11	Fr1	L	L	L
12	12	Fr1	K	K	K
13	13	Fr1	K	R	K
14	14	Fr1	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G
16	16	Fr1	E	A	A
17	17	Fr1	T	S	S
18	18	Fr1	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K
20	20	Fr1	I	V	V
21	21	Fr1	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y
28	28	Fr1	P	S	T
29	29	Fr1	F	F	F
30	30	Fr1	T	T	T
31	31	CDR-H1	Y	S	Y
32	32	CDR-H1	H	Y	H
33	33	CDR-H1	G	A	G
34	34	CDR-H1	M	V	M
35	35	CDR-H1	D	N	D
35A		CDR-H1			

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:10	FR Aceptor VH Hu B2 SEQ ID NO: 14	Diseño Humanizado v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO: 15
35B		CDR-H1			
36	36	Fr2	W	W	W
37	37	Fr2	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q
40	40	Fr2	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P
42	42	Fr2	W	G	G
43	43	Fr2	G	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W
48	48	Fr2	M	V	M
49	49	Fr2	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	W	W
51	51	CDR-H2	I	I	I
52	52	CDR-H2	N	N	N
52A	53	CDR-H2	T	T	T
52B	54	CDR-H2	Y	N	Y
52C	55	CDR-H2	S	T	S
52D	56	CDR-H2	G	G	G
52E	57	CDR-H2	V	N	V
52F	58	CDR-H2	P	P	P
53	59	CDR-H2	T	T	T
54	60	CDR-H2	Y	Y	Y

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:10	FR Aceptor VH Hu B2 SEQ ID NO: 14	Diseño Humanizado v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO: 15
55	61	CDR-H2	A	A	A
56	62	CDR-H2	D	Q	D
57	63	CDR-H2	D	G	D
58	64	CDR-H2	F	F	F
59	65	CDR-H2	K	T	K
60	66	CDR-H2	G	G	G
66	67	Fr3	R	R	R
67	68	Fr3	F	F	F
68	69	Fr3	A	V	V
69	70	Fr3	F	F	F
70	71	Fr3	S	S	S
71	72	Fr3	L	L	L
72	73	Fr3	E	D	D
73	74	Fr3	T	T	T
74	75	Fr3	S	S	S
75	76	Fr3	V	V	V
76	77	Fr3	G	S	S
77	78	Fr3	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A
79	83	Fr3	Y	Y	Y
80	84	Fr3	L	L	L
81	85	Fr3	Q	Q	Q
82	86	Fr3	I	I	I
82A	87	Fr3	N	S	S
82B	88	Fr3	N	S	S
82C	89	Fr3	L	L	L
83	90	Fr3	K	K	K
84	91	Fr3	N	A	A
85	92	Fr3	E	A	E
86	93	Fr3	D	D	D

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:10	FR Aceptor VH Hu B2 SEQ ID NO: 14	Diseño Humanizado v1 (R13K, V48M, Y91F) SEQ ID NO: 15
87	94	Fr3	T	T	T
88	95	Fr3	A	A	A
89	96	Fr3	T	V	V
90	97	Fr3	Y	Y	Y
91	98	Fr3	F	Y	F
92	99	Fr3	C	C	C
93	100	Fr3	A	A	A
94	101	Fr3	R	R	R
95	102	CDR H3	R	A	R
96	103	CDR H3	R	R	R
97	104	CDR H3	D	G	D
98	105	CDR H3	F	Q	F
99	106	CDR H3	T	N	T
100	107	CDR H3	M	G	M
100A	CDR H3	M			
100B					
100C					
100D					
100E					
100F					
100G					
100H					
100I					
100J					
100K					
101	108	CDR H3	D	D	D
102	109	CDR H3	F	V	F
103	110	Fr4	W	W	W
104	111	Fr4	G	G	G
105	112	Fr4	Q	Q	Q
106	113	Fr4	G	G	G
107	114	Fr4	T	T	T
108	115	Fr4	S	T	T
109	116	Fr4	V	V	V
110	117	Fr4	T	T	T
111	118	Fr4	V	V	V
112	119	Fr4	S	S	S
113	120	Fr4	S	S	S

Tabla 6							
Secuencias de regiones variables de cadena ligera 16B5 humanizado							
Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:16	FR Aceptor VL Hu B2 SEQ ID NO: 20	Diseño Humanizado v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO: 21	Diseño Humanizado v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Diseño Humanizado v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
1	1	Fr1	N	D	N	N	D
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	D	D	D
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S
15	15	Fr1	P	L	L	L	L
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E	E	E

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo o Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:16	FR Aceptor VL Hu B2 SEQ ID NO: 20	Diseño Humanizado v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO: 21	Diseño Humanizado v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Diseño Humanizado v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
18	18	Fr1	K	R	R	R	R
19	19	Fr1	V	A	A	A	A
20	20	Fr1	T	T	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	N	N	N	N
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	N	Y	N	N	N
27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	S
27F	33	CDR-L1	R	S	R	R	R
28	34	CDR-L1	T	N	T	T	T
29	35	CDR-L1	R	N	R	R	R
30	36	CDR-L1	K	K	K	K	K
31	37	CDR L1	N	N	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L	L	L

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:16	FR Aceptor VL Hu B2 SEQ ID NO: 20	Diseño Humanizado v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO: 21	Diseño Humanizado v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Diseño Humanizado v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
34	40	CDR-L1	A	A	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W	W	W
36	42	Fr2	F	Y	F	F	F
37	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P	P	P
41	47	Fr2	G	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	P	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L	L
48	54	Fr2	I	I	I	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T	T
54	60	CDR-L2	R	R	R	R	R
55	61	CDR-L2	E	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V	V
59	65	Fr3	P	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	D	D	D	D

ES 2 766 762 T3

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:16	FR Aceptor VL Hu B2 SEQ ID NO: 20	Diseño Humanizado v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO: 21	Diseño Humanizado v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Diseño Humanizado v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	V	L	L	L	L
79	85	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A
85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	K	Q	K	K	K
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	97	CDR-L3	S	Y	S	S	S

Residuo de Kabat No.	Residuo Lineal No.	FR o CDR	mAb de ratón parental SEQ ID NO:16	FR Aceptor VL Hu B2 SEQ ID NO: 20	Diseño Humanizado v1 (D1N, M4L, Y36F) SEQ ID NO: 21	Diseño Humanizado v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:22	Diseño Humanizado v3 (M4L, Y36F, P43S) SEQ ID NO:23
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	T	S	T	T	T
94	100	CDR-L3	L	T	L	L	L
95		CDR-L3					
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E	95E	CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	101	CDR-L3	R	Q	R	R	R
97	102	CDR-L3	T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G	G	G	G	G
101	106	Fr4	G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T	T	T	T	T
103	108	Fr4	N	K	K	K	K
104	109	Fr4	L	V	V	V	V
105	110	Fr4	E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I	I	I	I	I
106A	112	Fr4	K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R	R	R	R	R

45

Ejemplo 6. Afinidad de Tau de los Anticuerpos 16B5 Humanizados

Los datos de unión para los anticuerpos 16B5 humanizado con un diseño H1L1 o H1L2 se muestran en la Tabla 7, a continuación. Para la comparación, también se muestran los datos de unión para 16B5 quimérico. Los datos se generaron usando un instrumento Biacore. Se concluyó que la versión H1L2 tiene la afinidad más fuerte – esencialmente igual a la de 16B5 quimérico. Las versiones H1L1 y H1L3 de 16B5 humanizado también tenían afinidad adecuada.

Las mediciones de resonancia de plasmón superficial se realizaron utilizando un Biacore T200 (GE Lifesciences). Todos los experimentos se realizaron utilizando una fase móvil de HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,05% a 30 µl/min, sobre un chip sensor CM5 preparado mediante acoplamiento de amina con un anticuerpo de captura anti-ratón o anti-humano. El 16B5 (forma quimérica o humanizada) estaba unido al anticuerpo de captura inmovilizado y concentraciones variadas de hTau-P301L recombinante purificado se aplicaron al complejo del anticuerpo en iteraciones sucesivas. Las etapas iterativas se separaron con etapas de regeneración con alto contenido de sal o pH bajo. Los experimentos se repitieron con diferentes preparaciones de anticuerpo y antígeno. El análisis se realizó con el software Biacore incorporado.

65

Tabla 7					
Datos Biacore					
	K_D (M)	$K_{on}(1/Ms)$	K_{on} Error	$K_{off}(1/s)$	K_{off} Error
Chi16B5	232 pM	1.43×10^7	1.5×10^5	3.33×10^{-3}	3.5×10^{-5}
Hu16B5H1L1	617 pM	3.5×10^6	1.5×10^4	2.15×10^{-3}	8.2×10^{-6}
Hu16B5H1L2	286 pM	1.2×10^7	4.6×10^4	3.42×10^{-3}	1.1×10^{-5}
Hu16B5H1L3	320 pM	1.25×10^7	6.2×10^4	3.98×10^{-3}	1.8×10^{-5}

Ejemplo 7. Detección de la inmunoprecipitación de Tau con Anticuerpos 16B5 Humanizados

Se extrajo secuencialmente una muestra postmortem de corteza frontal de un paciente con enfermedad de Alzheimer con un puntaje de Braak de 6 en tampones de mayor fuerza de solubilización, en el siguiente orden: (i) Tampón de alta concentración de sal (20 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM TDT, 10% de sacarosa, 7500 mM de NaCl pH 7,4), (ii) Tampón de Tritón (20 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% de sacarosa, 1% Tritón X 100, 500 mM NaCl pH 7,4) y (iii) Tampón de Sarkosyl (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% de sacarosa, 500 mM NaCl, 1% Sarkosyl pH 7,4).

Para cada muestra, 200 microgramos de las fracciones altamente solubles en sal, o 20 microgramos de las fracciones insolubles en sarkosyl, se diluyeron en 400 microlitros de tampón de inmunoprecipitación (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Tritón X 100, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, pH 7,4). Las muestras se depuraron previamente con perlas magnéticas de proteína G (New England Biolabs) y se agregaron 5 microgramos de anticuerpo a cada tubo. Los anticuerpos usados incluyen: 1) anticuerpo de IgG de ratón no inmune (mlgG), como control; 2) anticuerpo de IgG humano no inmune (hlgG), como control; 3) anticuerpo 16B5 quimérico (Chi16B5); 4) 16B5 humanizado, versión H1L2 (h16B6-H1L2); y 16B5 humanizado, versión H1L3 (h16B6-H1L3). Los anticuerpos y lisados purificados previamente se incubaron 2 horas a 4°C. Los complejos de anticuerpo/antígeno se precipitaron usando perlas magnéticas de proteína G, y los precipitados se lavaron minuciosamente con PBS/350 mM NaCl. Después de la elución usando un tampón de Laemmli, los eluatos se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron usando un anticuerpo policlonal tau (DAKO).

Como se muestra en la figura 7, el 16B5 quimérico y el 16B5 H1L2 y H1L3 humanizado reconocieron a tau en fracciones tanto solubles como insolubles del cerebro de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 8. Caracterización inmunohistoquímica de anticuerpos tau 16B5 murinos y humanizados en el cerebro afectado por la Enfermedad de Alzheimer

El anticuerpo monoclonal murino de anti-tau 16B5 y sus dos variantes humanizadas, h16B5-H1L2 y h16B5-N1D, también se examinaron inmunohistoquímicamente en secciones frescas congeladas de corteza cerebral humana de donantes de la enfermedad de Alzheimer y de no enfermos, con controles de edad.

Métodos:

Tejidos del Cerebro Humano

Las cortezas frontales se obtuvieron del Sun Health Research Institute. Los casos incluyeron a seis pacientes (media de edad $86,8 \pm 0,40$ SEM) diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer y confirmado en la evaluación neuropatológica post mortem y tres no enfermos de edad control (media de edad $77 \pm 9,7$ SEM). Los datos demográficos de los casos se enumeran en la Tabla 8 a continuación. La inmunohistoquímica se realizó en criosecciones montadas en portaobjetos de 10 um ligeramente fijadas en acetona.

Tabla 8				
Demografía para casos examinados inmunohistoquímicamente				
Caso	Diagnóstico	Edad cumplida (años)	Sexo	Intervalo post-mortem (h)
11-21	AD	88	F	2.28
03-34	AD	88	F	3.3
08-06	AD	86	M	2.66
03-52	AD	86	M	2.2
01-16	AD	87	M	3
01-18	AD	86	M	3
10-63	Control	79	M	3
10-39	Control	93	M	3
10-22	Control	59	F	3.2

Inmunohistoquímica

El método de inmunoperoxidasa fue el principal sistema de detección, que consistió en un polímero marcado con peroxidasa conjugado con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra (Polímero marcado con En Vision + System HRP; Dako K4001) o un sistema de amplificación Vector ABC para anticuerpos humanizados biotinilados directamente (ABC Elite Standard; PK-6100; Vector Laboratories). La tinción se visualizó con un cromógeno DAB (Liquid DAB+sistema cromógeno-sustarto; Dako K3468), que produjo un depósito marrón.

- 5 El control negativo consistió en realizar el procedimiento inmunohistoquímico completo en secciones adyacentes con un anticuerpo de control de isotipo IgG o una omisión del anticuerpo primario.

Etiquetado inmunofluorescente

- 10 La doble tinción inmunofluorescente se realizó para determinar la relación entre las variantes murinas y humanizadas del anticuerpo, otros anticuerpos de tau que reconocen diferentes epítomos fosforilados y amiloides beta. Las secciones de tejidos se tiñeron en paralelo con un cóctel de anticuerpos que contiene variantes 16B5 humanizadas etiquetadas FITC o biotiniladas (1 ug/mL) y un anticuerpo murino (ya sea 16B5 monoclonal (1 ug/mL), AT8 (1:1000), AT100 (1:1000), o 3D6 (1 ug/mL). Los anticuerpos murinos se detectaron con un secundario anti-ratón de cabra conjugado con un fluoróforo 488 o 635 (Invitrogen). Los anticuerpos humanizados biotinilados se detectaron con una estreptavidina 635.

Preabsorciones

- 20 Para evaluar la especificidad de los anticuerpos contra sus antígenos objetivo, se preabsorbieron 1 µg / ml de anticuerpos 16B5 con 50 µg / ml de tau P301L humana purificada o sinucleína de tipo salvaje (una proteína irrelevante) durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos se aplicaron luego al tejido y el procedimiento de inmunohistoquímica se realizó como se describe anteriormente.

- 25 Análisis de Imagen

Los portaobjetos se fotografiaron con un microscopio Olympus BX61, Olympus Nanozoomer 2.0HT o un sistema confocal espectral Leica SPE. Se obtuvieron imágenes como archivos TIFF.

- 30 Resultados

Como se muestra en la Tabla 9, a continuación, el anticuerpo monoclonal de ratón 16B5 y ambas variantes humanizadas mostraron reactividad en el tejido de la enfermedad de Alzheimer, tiñendo de manera prominente los hilos del neuropilo, algunos ovillos neurofibrilares (mayormente globosos) y algunas placas neuríticas tau-positivas. La

mayoría de la patología de 16B5 AD-fibrilar se limitó a la materia gris, pero también se detectó cierta reactividad en la blanca. En contraste el tejido de control de los no enfermos, mostró reactividad de fondo difuso, pero fue negativo para cualquiera de las patologías encontradas en el tejido AD.

5 Los experimentos de doble etiquetado se realizaron con la versión monoclonal de murino de 16B5 y con (1) ambas variantes humanizadas, (2) anticuerpos que reconocen a tau en varios epítomos fosforilados y (3) beta amiloide para caracterizar las patologías reconocidas por las variantes de los anticuerpos.

10 Tanto h16B5-H1L2 como h16B5-N1D se colocaron con anticuerpo monoclonal 16B5 con alta congruencia en estructuras patológicas fibrilares AD. H16B5-H1L2 también detectó patologías que se demostró que eran inmunoreactivas a los diferentes epítomos de tau fosforilados, incluyendo serina202 y treonina205 (AT8), serina212 y treonina214 (AT100) y serina396 (anticuerpo patentado interno, 20H1). Finalmente, el doble marcado con un anticuerpo beta amiloide que reconoce la secuencia de aminoácidos N-terminal (3D6; aa 1-5) y 16B5 mostró muy poca colocalización entre Aβ y las estructuras 16B5 inmunoreactivas en placas de amiloides.

15 Cuando la inmunoreactividad de 16B5 se comparó con un anticuerpo monoclonal anti-tau bien caracterizado disponible comercialmente (Dako), ambos tiñeron en la patología AD fibrilar que incluyó placas neuríticas tau-positivas, hilos del neurópilo y ovillos neurofibrilares.

20 La especificidad del anticuerpo se evaluó mediante preabsorciones con tau P301L recombinante purificada. Se observó una disminución en la tinción cuando 16B5 se preabsorbió con P301L tau, pero la tinción no se vio afectada cuando los anticuerpos se preabsorbieron con una proteína irrelevante (sinucleína de tipo salvaje) a las mismas concentraciones molares.

25 Tanto el anticuerpo de control de isotipo IgG como las secciones de omisión de anticuerpo primario fueron negativas para la tinción en todos los tejidos analizados.

30

Tabla 9			
Anticuerpos 16B5 caracterizados inmunohistoquímicamente			
Anticuerpo	Lote No.	Tinción del tejido AD	Concentración
16B5 murino	NB-0174A	Si	1 ug/mL
16B5 quimérico	061512	Si	1 ug/mL
h16B5-H1L2	NB-0248	Si	1 ug/mL
H16B5-N1D	011113	Si	1 ug/mL

45 Listado de secuencias

SEQ ID NO:1 TAU P10636-8

50 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT TEDGSEEPG
 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHEIPEG TTAEAEAGIGD PSLEDEAAG
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR PAKTPPAPK
 55 TPPSSGEPK SDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPPT REPKKVAVVR PPKSPSSAK
 SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK GSKDNIKHV
 PGGGSVQIVY KPVDLSKVT S KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV SKIGSLDNI
 THVPGGGNKK IETHKLTFR E NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN SSTGSIDMV
 60 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

65

ES 2 766 762 T3

SEQ ID NO:2 TAU P10636-7

5 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT TEDGSEEPG
SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KAKGADGKT
KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEP KSGDRSGYSS GSPGTPGSR
SRTPSLPTPP TREP KKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS GSTENLKHQ
10 PGGGKVQIIN KKLDSLNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT KCGSLGNIH
HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR NAKAKTDHG
AEIVYKSPVV SGGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

SEQ ID NO:3 TAU P10636-6

15 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAEAGI DTPSLEDEA
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA RIPAKTPPA
PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREP KKVAVV RTPPKSPSS
20 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDSLNVQ KCGSKDNIK
HVPGGGSVQI VYKPVDLSKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDKDR VQSKIGSLD
NITHVPGGGN KKIETHKLTFR RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGTSPRHLS NVSSTGSID
25 MVDSPQLATL ADEVASLAK QGL

SEQ ID NO:4 TAU P10636-5

30 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT TEDGSEEPG
SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIEPEG TTAEAEAGIGD PSLEDEAAG
HVTQARMVSK SKDGTGSDD KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR PAKTPPAPK
TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR RTPSLPTPPT REP KKVAVVR PPKSPSSAK
35 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVT SK GSLGNIHHK
PGGGQVEVKS EKLDKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFR EN KAKTDHGAE
IVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

SEQ ID NO:5 TAU P10636-4

40 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT TEDGSEEPG
SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KAKGADGKT
45 KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEP KSGDRSGYSS GSPGTPGSR
SRTPSLPTPP TREP KKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS GSTENLKHQ
PGGGKVQIVY KPVDLSKVT KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV SKIGSLDNI
THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN SSTGSIDMV
50 DSPQLATLAD EVSASLAKQ L

SEQ ID NO:6 TAU P10636-2

55 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAEAGI GDTPSLEDE
AAGHVTQARM VSKSKDGTGS DDKKAKGADG KTKIATPRGA APPGQKGQAN ATRIPAKTP
PAPKTPPSSG EPPKSGDRSG YSSPGSPGTP GSRRTPSLP TPPTREP KKV AVVRTPPKS
PSSAKSRLQT APVMPDLKN VKSKIGSTEN LKHQPGGGKV QIVYKPVDLS KVT SKCGSL
60 GNIHHKPGGG QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKA
KTDHGAEIVY KSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

65

ES 2 766 762 T3

SEQ ID NO:7

CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C

SEQ ID NO:8

CTC AAT TTT CTT GTC CAC CTT GGT GC

SEQ ID NO: 9

CTC AAG TTT TTT GTC CAC CGT GGT GC

SEQ ID NO: 10 – 16B5-HC

MDWVWNLLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYPF^YYHGMDWVKQAPWGGL
EWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSVGTAYLQINNLNKNETATYFCARRRDF^TMD^FWGQ
GTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP
LQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPAS

SEQ ID NO: 11 – 16B5 CDR-H1 (numeración de Kabat)
YHGMD

SEQ ID NO: 12 – 16B5 CDR-H2
WINTYSGVPTYADDFKG

SEQ ID NO: 13 – 16B5 CDR-H3
RRDFTMDF

SEQ ID NO: 14 – FR Acceptor VH Hu (No. accesoBAC02002.1)

QVQLVQSGSELKRPASVQVSKASGYSFTSYAVNWVRQAPGQGLEWVWINTNTGNPTYAQGF
TGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAADTAVYYCARARGQNGMDVWGQGT^TTV^VSS

SEQ ID NO: 15 – 16B5 Humanizado de Cadena Pesada Diseño v1 (R13K, V48M, Y91F)

QVQLVQSGSELKPKPGASVQVSKASGYTFTYHGMDWVRQAPGQGLEWGWINTYSGVPTYADDF
KGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARRRDF^TMD^FWGQGT^TTV^VSS

SEQ ID NO: 16 – 16B5-LC

MDSQAQVLILLLLWVSGTCGNIVLSQSPSSLAVSPGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRKKNYLAWFQQ
KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF^TLT^ISSVQAEDLAVYYCKQSYTLR^TFGGGTN
LEIKRADAAPT^VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN^NFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQD
SKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSP^I

SEQ ID NO: 17 – 16B5-LC CDR-L1
KSSQSLNLSRTRKKNYLA

SEQ ID NO: 18 – 16B5-LC CDR-L2
WASTRES

ES 2 766 762 T3

SEQ ID NO: 19 – 16B5-LC CDR-L3
KQSYTLRT

5 SEQ ID NO: 20 – FR acceptor VL Hu (No. accesoACJ71718.1)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYSTPQTFGGGTKVEIKR

10 SEQ ID NO: 21 – 16B5 Humanizado de cadena ligera Diseño v1 (D1N, M4L, Y36F)

15 NIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYTLRTFGGGGTKVEIKR

20 SEQ ID NO: 22 - 16B5 Humanizado de cadena ligera Diseño v2 (D1N, M4L, Y36F, P43S)

25 NIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWFQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYTLRTFGGGGTKVEIKR

SEQ ID NO: 23 - 16B5 Humanizado de cadena ligera Diseño v3 (M4L, Y36F, P43S)

30 DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWFQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYTLRTFGGGGTKVEIKR

35 SEQ ID NO: 24 - 16B5 CDR-H1 (numeración de Kabat y Chothia combinado)

GYPFTYHGMD

SEQ ID NO: 25 – Ácido nucleido que codifica 16B5 humanizado de cadena pesada v1

40 CAGgTCCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCCGTCAAGgtgTCCT
GCAAGGCTTCTGGGTATCCCTTCACATAACCATGGAATGGACTGGGTGcgtCAGGCTCCTggtca
GGGTttaGAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACTCTGGAGTGCCAACATATGCTGATGACTTC
45 AAGGGACGATTTGtgTTCTCTTTGGAcACCTCTGTctctACTGCCTATTTGCAGATctcttctC
TCAAAGccGAGGACacgGCCgtgTATTTTTGTGCAAGACGGCGTGATTTTACAATGGACTTCTG
GGGTCAAGGAACCACCGTGACCGTCTCCTCA

50 SEQ ID NO: 26 - Ácido nucleido que codifica 16B5 humanizado de cadena ligera v1

55 AACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCA
ACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCAGGACCAGGAAGA ACTACCTGGCCTGGTTCCA
GCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGGAGAGCGGCGTG
CCC GATAGGTT CAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGG
CCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACACCCTGAGAACCTTCGGCGGCGGCAC
CAAGGTGGA AATTAACGT

ES 2 766 762 T3

SEQ ID NO: 27 - Ácido nucleico que codifica 16B5 humanizado de cadena ligera diseño v2

5 AACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCA
ACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCAGGACCAGGAAGAAGTACCTGGCCTGGTTCCA
GCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGGAGAGCGGCGTG
10 CCGATAGGTTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGG
CCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACACCCTGAGAACCTTCGGCGGCGGCAC
CAAGGTGGAAATTAAACGT

SEQ ID NO: 28 - Ácido nucleico que codifica 16B5 humanizado de cadena ligera diseño v3

15 GACATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGAGAGCCACCATCA
ACTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCAGGACCAGGAAGAAGTACCTGGCCTGGTTCCA
20 GCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGGAGAGCGGCGTG
CCCGATAGGTTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGG
CCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACACCCTGAGAACCTTCGGCGGCGGCAC
25 CAAGGTGGAAATTAAACGT

SEQ ID NO: 29 – Región constante de IgG1 humano (la lisina C-terminal puede omitirse)

30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
35 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 30 – cADN de región constante de IgG1 humana

40 GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCA
CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATC
45 AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCA
CACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCA
50 AAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA
GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGGTCCTCACCGTCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
55 CCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGC
CTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
60 GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

65

ES 2 766 762 T3

SEQ ID NO: 31 – cADN de región constante de IgG1 humana con el intrón 5'

5 GGTGAGTGGATCCGCGGCCGCTAAACTCTGAGGGGGTCCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAA
AGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTC
CAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAACATCA
AGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTG
10 TCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAACAACACACCCCAAGGGCAGAACTTTGTTACT
TAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTT
CCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
15 GCTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCT
TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG
AGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTG
GGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCC
20 CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA
CGTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTACGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA
25 GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG
GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
CTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG
30 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 32 – Región constante kappa humana

35 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40 SEQ ID NO: 33 – cADN de Región constante kappa humana

45 ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGA
TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
TACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
50 GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 34 – cADN de Región constante kappa humana con el intrón 5'

55

60

65

ES 2 766 762 T3

5 CGTGAGTGGATCCGCGGCCGCTAAACTCTGAGGGGGTCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCTAA
AGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCTC
CAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAACATCA
AGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTG
10 TCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACT
TAAACACCATCCTGTTTGCTTCTTTCCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG
AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
15 AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC
CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

20

25

30

35

40

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que es humanizado, quimérico o remodelado y se une a tau, en el que el anticuerpo comprende CDR-L1 de SEQ ID NO: 17, CDR-L2 de SEQ ID NO: 18, CDR-L3 de SEQ ID NO: 19 y CDR -H1 de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 24, CDR-H2 de SEQ ID NO: 12 y CDR-H3 de SEQ ID NO: 13
- 10 2. Un anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera madura al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 22
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 2, siempre que al menos una de las posiciones H13, H48 y H91 esté ocupada por K, M y F respectivamente y al menos una de las posiciones L1, L4, L36 y L43 esté ocupada por N, L, F y S respectivamente o las posiciones provistas H13, H48 y H91 están ocupadas por K, M y F respectivamente y al menos dos de las posiciones L1, L4, L36 y L43 están ocupadas por N, L, F y S respectivamente, o las posiciones provistas H13, H48 y H91 están ocupadas por K, M y F respectivamente, y al menos tres de las posiciones L1, L4, L36 y L43 están ocupadas por N, L, F y S respectivamente, o, siempre que las posiciones H13, H48 y H91 estén ocupadas por K, M y F respectivamente, y las posiciones L1, L4, L36 y L43 están ocupadas por N, L, F y S, respectivamente, en donde las posiciones son las definidas por Kabat.
- 20 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, que comprende una región variable de la cadena pesada madura que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 15 y una región variable de la cadena ligera madura al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 22.
- 25 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la región variable de la cadena pesada madura está fusionada a una región constante de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera madura está fusionada a una región constante de la cadena ligera, opcionalmente, en el que la región constante de la cadena pesada es un forma mutante de la región constante humana natural que tiene una unión reducida a un receptor Fcγ en relación con la región constante humana natural o en la que la región constante de la cadena pesada es del isotipo IgG1.
- 30 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que la región variable de la cadena pesada madura tiene una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena ligera madura tiene una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 22.
- 35 7. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región variable de la cadena pesada madura está codificada por la SEQ ID NO: 25 y la región variable de la cadena ligera madura está codificada por la SEQ ID NO: 27.
- 40 8. Un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo como se describe en las reivindicaciones 2-7.
- 45 9. Un método para humanizar un anticuerpo, que comprende:
determinar las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo de ratón;
sintetizar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada humanizada que comprende las CDR de la cadena pesada de anticuerpo de ratón y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera humanizada que comprende las CDR de la cadena ligera de anticuerpo de ratón;
y
expresar los ácidos nucleicos en una célula huésped para producir un anticuerpo humanizado,
en el que las CDR son como se definen en la reivindicación 1, y
en el que el anticuerpo de ratón se caracteriza por una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 16.
- 50 10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 11. EL anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad asociada con tau.
- 60 12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la enfermedad es una enfermedad neurológica, opcionalmente la enfermedad de Alzheimer.
- 65 13. Un ácido nucleico o ácidos nucleicos que comprenden un segmento que codifica una región variable de la cadena pesada en el que el segmento tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 25 y un segmento que codifica una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 27.
14. Anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que una cadena pesada del anticuerpo comprende

ES 2 766 762 T3

un dominio constante de IgG1 humano que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 29, siempre que pueda faltar la lisina C-terminal, y una cadena ligera del anticuerpo comprende una región constante kappa humana que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 32

Figura 1

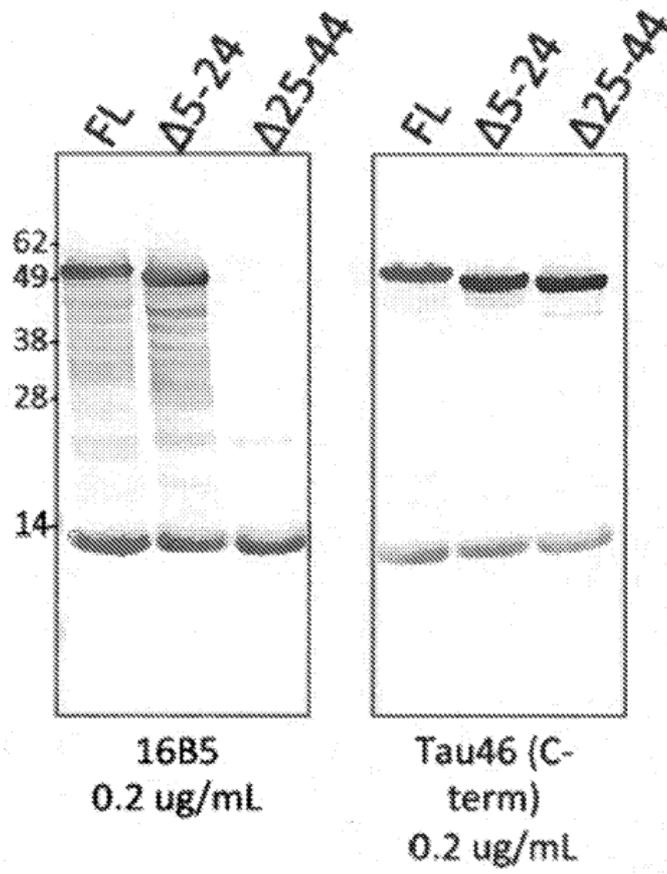


Figura 2

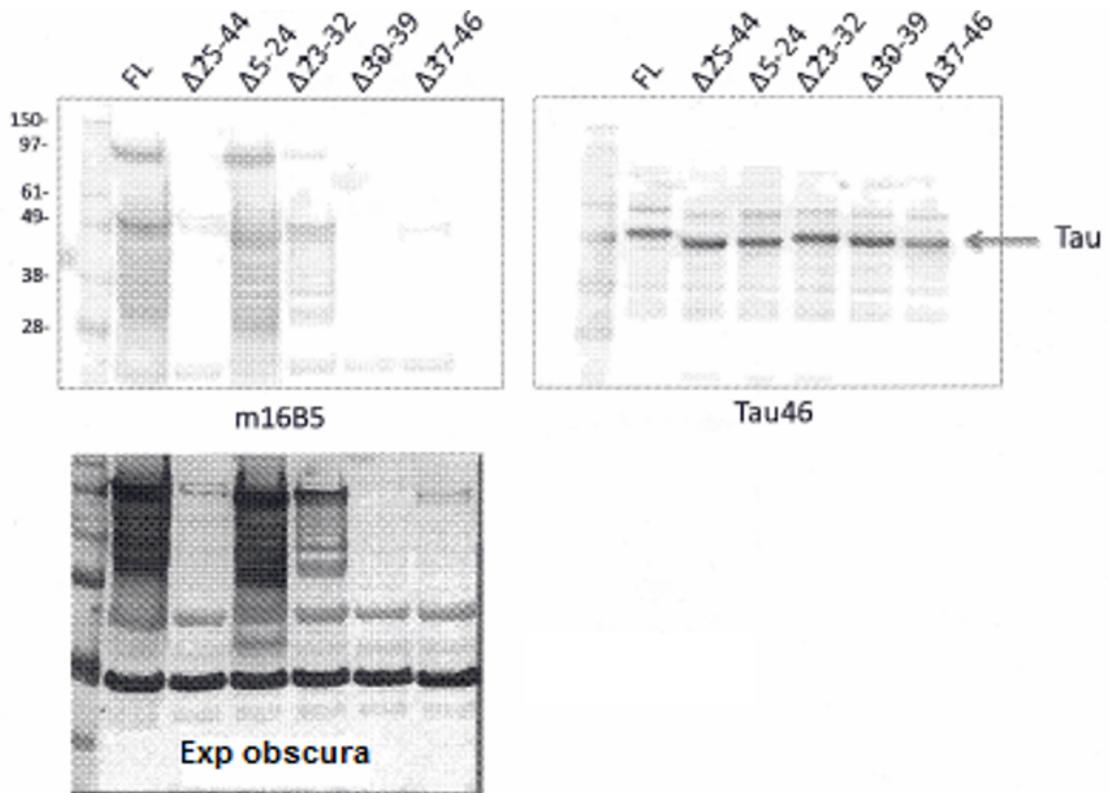


Figura 3

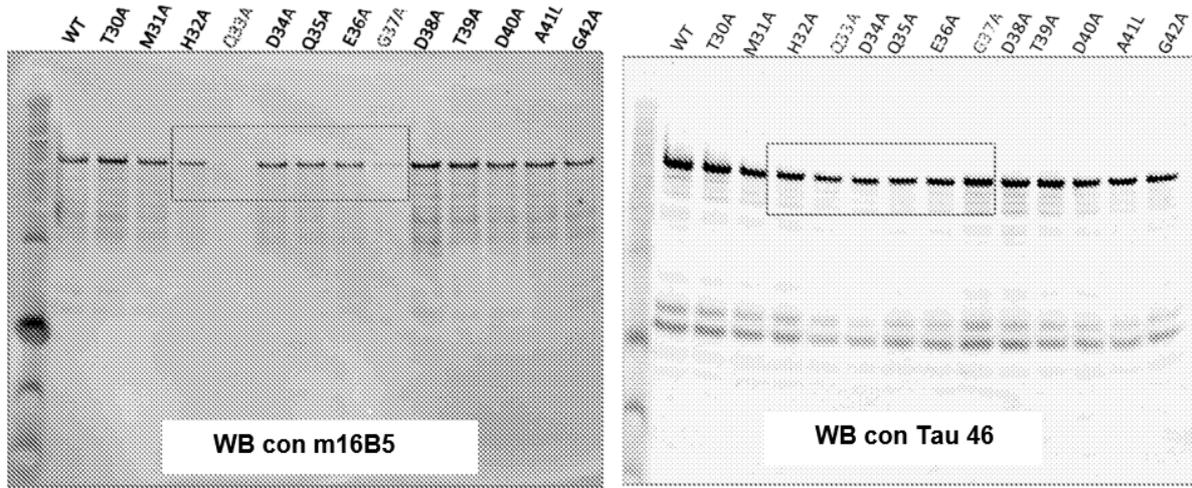


Figura 4

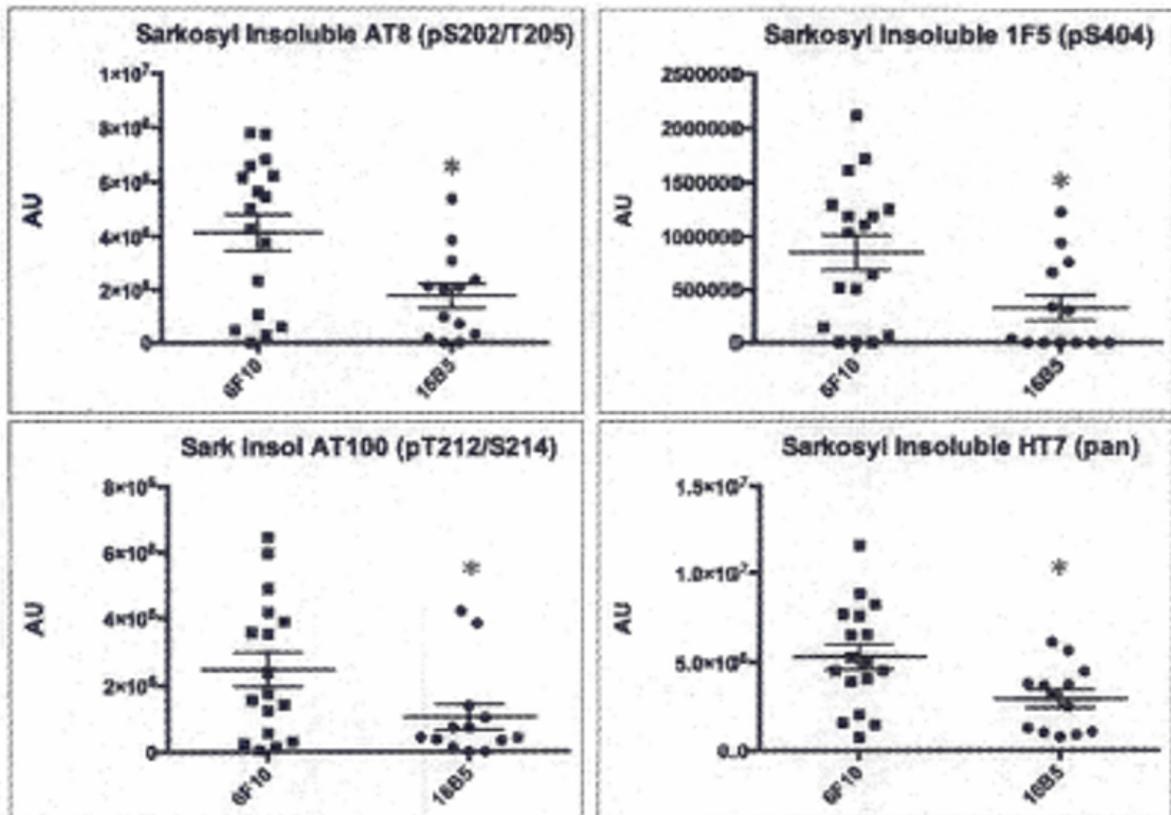


Figura 5

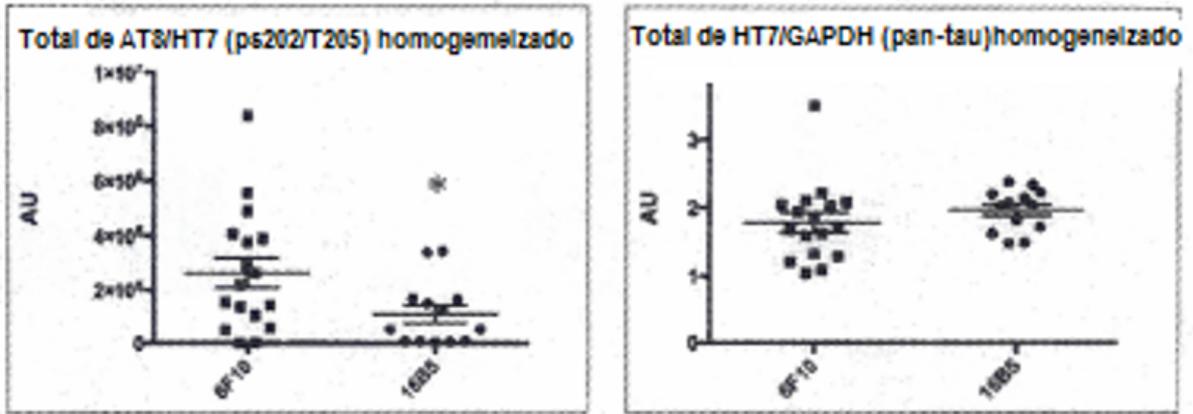


Figura 6

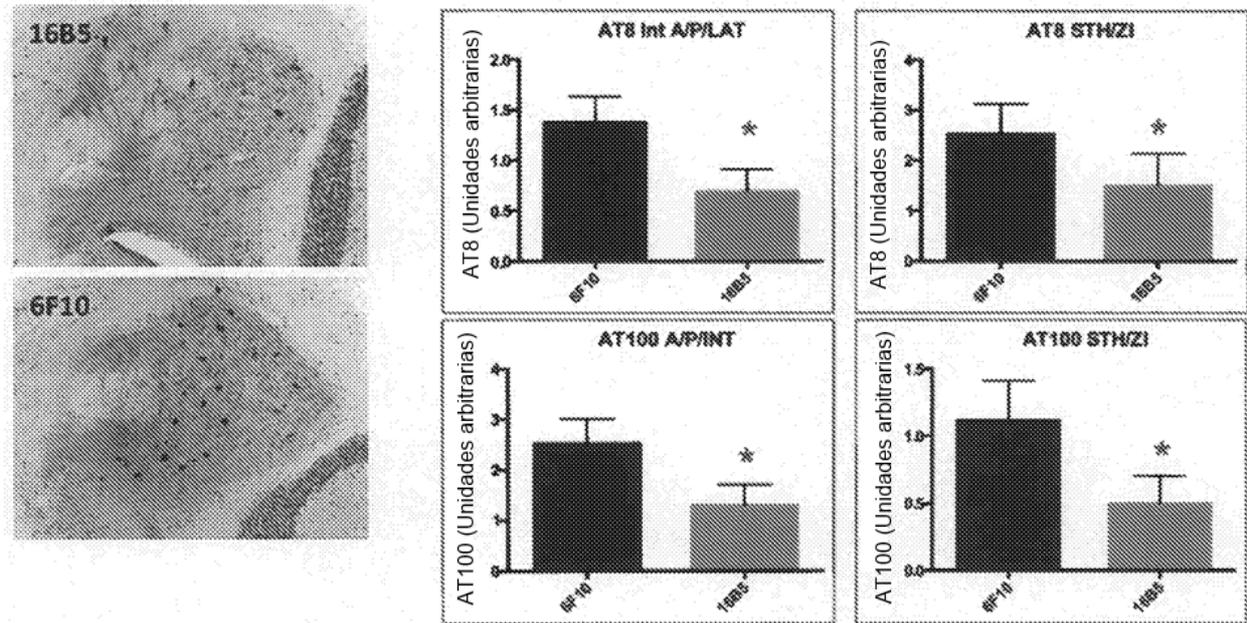


Figura 7

