

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 070**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2013** **E 19207405 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023** **EP 3662931**

54 Título: **Agente terapéutico o agente profiláctico para la demencia**

30 Prioridad:

31.05.2012 JP 2012124336

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY PUBLIC CORPORATION OSAKA
(50.0%)
2-7-601, Asahimachi 1-chome Abeno-ku
Osaka City 545-0051, JP y
TEIJIN PHARMA LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

MORI, HIROSHI;
TOMIYAMA, TAKAMI;
MATSUMOTO, YOICHI;
EGUCHI, HIROSHI y
KUNORI, YUICHI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 973 070 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

Agente terapéutico o agente profiláctico para la demencia

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere de manera general a un agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos. Más específicamente, la invención se refiere a un nuevo anticuerpo monoclonal anti-proteína o péptido fosforilados que tiene un excelente efecto para mejorar la función cognitiva, y a un agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos que comprende un anticuerpo anti-tau fosforilada.

[Técnica anterior]

10 Un trastorno cognitivo es un estado en el que la inteligencia desarrollada se deteriora debido a alguna causa adquirida, lo que constituye un obstáculo para la adaptación social. Los trastornos cognitivos se clasifican en enfermedades neurodegenerativas, trastornos cognitivos vasculares, enfermedades priónicas, enfermedades infecciosas, trastornos metabólicos/endocrinos, trastornos traumáticos y cerebrales y trastornos tóxicos (NPL 1). A partir de 2010, actualmente hay aproximadamente 2,1 millones de pacientes con trastornos cognitivos en Japón, con una tasa de prevalencia de morbilidad de aproximadamente 8-10%, o incluso más de 10%, entre los ancianos mayores de 65 años, y esto se ha reconocido como un problema grave en la sociedad mundial en envejecimiento (NPL 2). Los datos sobre las enfermedades subyacentes de los trastornos cognitivos indican que la mayoría son enfermedades neurodegenerativas tales como EA y DLFT, con aproximadamente 35% de enfermedad de Alzheimer (EA), aproximadamente 15% de una combinación de EA y enfermedad cerebrovascular, y 5% de enfermedades neurodegenerativas tales como Degeneración Lobular FrontoTemporal (DLFT) (NPL 2). El trastorno cognitivo debido a la enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por un inicio insidioso de deterioro de la memoria y/o cambios de personalidad que progresa durante un período de al menos 6 meses o más. Un factor constante en los procesos neurodegenerativos que muestran un alto grado de correlación con el grado de deterioro de la función cognitiva es la presencia de ovillos neurofibrilares (NFT) (NPL 3).

25 Tau (proteína) es una proteína codificada por el gen MAPT ubicado en el cromosoma 17 (17q21) en seres humanos, y es una de las proteínas de unión a microtúbulos que se expresan abundantemente en el sistema nervioso central. Se ha descubierto que Tau es una proteína constituyente principal en los filamentos helicoidales y en los filamentos rectos emparejados que forman NFT en la EA, una de las enfermedades neurodegenerativas más prominentes, y su acumulación intracelular se ha demostrado en una variedad de afecciones neuropatológicas. Las enfermedades causadas por la acumulación intracelular de tau se denominan colectivamente "taupatías" (NPL 4). Las enfermedades neurodegenerativas incluidas entre las taupatías son la enfermedad de Alzheimer (EA), la degeneración de los ganglios corticales basales (CBD o CBS), la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick (demencia de granos argirófilos (enfermedad de granos argirófilos), la taupatía multisistémica con demencia (MSTD), demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17), demencia por ovillos neurofibrilares, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNFC), taupatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares (WMT-GGI) y degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para Tau (DLFT-tau), pero también se incluyen entre las taupatías las enfermedades no neurodegenerativas, incluidas las enfermedades infecciosas tales como la enfermedad de Parkinson postencefálica de von Economo y la panencefalitis esclerosante subaguda, y las afecciones inducidas por traumas tales como la encefalopatía del boxeador (NPL 4).

40 Se ha encontrado que la estructura del gen MAPT en el genoma es una proteína que consiste en 13 exones, con múltiples isoformas debido al empalme alternativo (NPL 4). Una característica de la estructura de tau es que comprende un dominio ácido N-terminal que contiene 0-2 secuencias repetitivas (N) de 29 aminoácidos dependientes del empalme alternativo del exón 2 y el exón 3 (N0-N2), un dominio intermedio rico en prolina y un dominio de unión a microtúbulos C-terminal (codificado por los exones 9 a 12) que contiene 3 (3R) o 4 (4R) secuencias repetitivas (R) que contribuyen a la unión de microtúbulos (NPL 3 y 4). Por lo tanto, tau tiene 6 isoformas representativas, 3R0N (352 aminoácidos) · 3R1N (381 aminoácidos) · 3R2N (410 aminoácidos) · 4R0N (383 aminoácidos) · 4R1N (412 aminoácidos) y 4R2N (441 aminoácidos), dependiendo del número de secuencias repetitivas de 29 aminoácidos (N) y secuencias repetitivas de unión a microtúbulos (R) que contiene. De estos isotipos, solo 3R0N está presente en el cerebro embrionario, mientras que los 6 isotipos están presentes en el cerebro humano adulto, siendo el tipo 4R el más abundante (NPL 3). La diferencia entre los isotipos 3R y 4R es si el exón 10 se elimina mediante empalme alternativo (3R) o está presente (4R). Existen, por lo tanto, varias isoformas de tau, pero el número de aminoácidos (1-441) de la isoforma más larga 4R2N (SEQ ID NO: 1) está representado para la identificación del número de aminoácidos en las posiciones correspondientes. Por ejemplo, la designación "Ser413" indica la serina que es el 413^º residuo de aminoácido en 4R2N (SEQ ID NO: 1), aunque esta serina es el 384^º residuo de aminoácido en 4R1N (SEQ ID NO: 2), el 355^º en 4R0N (SEQ ID NO: 3), el 382 en 3R2N (SEQ ID NO: 4), el 353 en 3R1N (SEQ ID NO: 5) y el 324 en 3R0N (SEQ ID NO: 6).

Con respecto al papel de tau en las enfermedades neurodegenerativas, se descubrió por primera vez que existe una relación entre la mutación del gen MAPT y la acumulación de tau en la demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17), habiéndose referido más de 40 mutaciones genéticas diferentes en el gen MAPT en FTDP-17 (NPL 4). Se ha sugerido que tales mutaciones genéticas pueden conducir a alteraciones en la proporción

de isoformas de tau y cambiar la interacción de tau mutante con los microtúbulos, contribuyendo así al establecimiento de la patología. Sin embargo, a diferencia de las enfermedades neurodegenerativas familiares, las mutaciones en MAPT generalmente no se encuentran en enfermedades neurodegenerativas esporádicas como la EA. Además, una de las características de la acumulación de tau en enfermedades neurodegenerativas es un alto grado de modificación por fosforilación. Por otra parte, en pacientes que presentan un deterioro leve de la función cognitiva (DCL), se observa una correlación entre los niveles de tau fosforilada en el líquido cefalorraquídeo y la atrofia pituitaria, lo que sugiere que la tau fosforilada es un biomarcador altamente confiable para la neurodegeneración en pacientes con taupatías (NPL 5). Por esta razón, se ha intentado utilizar inhibidores enzimáticos contra las quinasas, y particularmente beta GSK-3, como enzimas involucradas en la fosforilación, para inhibir la fosforilación excesiva de tau, y el desarrollo ha progresado en esta área (NPL 5). Sin embargo, debido a que las quinasas tales como GSK-3 beta son enzimas que están implicadas no solo en la enfermedad sino también en el control de la función en los procesos fisiológicos normales, los efectos secundarios han sido motivo de preocupación. De hecho, dado que algunos de los sitios donde tau está fosforilada por GSK-3 beta coinciden con los sitios de fosforilación de tau observados en los cerebros fetales y humanos normales (NPL 3), existen posibilidades de que afecten a la función de tau normal.

La sabiduría convencional ha sostenido que la tau extracelular escapa de la célula como consecuencia de la muerte celular de las neuronas degeneradas, pero investigaciones recientes han sugerido que después de una fosforilación intracelular excesiva, la tau se procesa y se secreta activamente fuera de la célula. Se cree que la tau fosforilada secretada fuera de la célula se desfosforila en ciertos sitios de fosforilación, actuando posteriormente sobre los receptores muscarínicos M1 y M3 de las células circundantes, promoviendo así la fosforilación intracelular de tau y contribuyendo a provocar la muerte celular (NPL 6, NPL 7). A medida que se construye el consenso de que la tau funciona como un factor con actividad extracelular, cada vez se presta más atención a sus posibilidades en los agentes terapéuticos, utilizando componentes de fármacos que son macromoléculas, tales como anticuerpos, que no pueden hacer que muestren fácilmente actividad intracelular. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la tau secretada extracelularmente se puede procesar parcialmente y se puede desfosforilar, pudiendo sufrir modificaciones adicionales más allá de la información estructural para la tau excesivamente fosforilada que se ha elegido como diana en el pasado. También se ha sugerido que los fármacos que actúan sobre porciones de tau desfosforilada pueden afectar la función de la tau normal. Cuando la tau asociada a la patología debe ser elegida como diana con anticuerpos o similares, es aún más importante seleccionar la entidad que actuará en un sitio específico de la patología, es decir, el epítipo de fosforilación de tau, y la selección del epítipo se vuelve aún más difícil debido a la complejidad de esta información.

Se han referido invenciones relacionadas con la inmunoterapia para taupatías con proteína tau como diana, cuyo objetivo es ejecutar acciones específicas contra tau (NPL 5, PTL 1, PTL 2, PTL 3). La inmunoterapia se realiza con el propósito de provocar la producción de anticuerpos específicos mediante la administración de vacunas peptídicas y similares, y se espera que tenga efectos secundarios reducidos debido a su alta especificidad para dirigirse a proteínas o péptidos. Se ha informado de que la función motora mejora en modelos animales que expresan tau mutante, mediante inmunización de los animales modelo mediante vacunación utilizando péptidos parciales de tau fosforilada (que tienen los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser396 y Ser404 fosforilados, y que tienen el residuo de aminoácido correspondiente a Ser262 fosforilado). Sin embargo, estos informes son estudios que utilizan ratones transgénicos (ratones Tg) con mutaciones genéticas inducidas tales como P301L (una mutación de prolina a leucina en el residuo de aminoácido 301^o de tau), y aunque tales ratones Tg sirven como modelos de mutación genética para FTDP- 17, un tipo de enfermedad neurodegenerativa familiar, no representan la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas entre taupatías que no están acompañadas por mutaciones del gen tau, y particularmente enfermedades neurodegenerativas esporádicas. Además, dado que los ratones P301Lt_g son modelos de deterioro de la función motora y no modelos que representan el deterioro de la función cognitiva, que es el problema en los trastornos cognitivos humanos (NPL 8), es difícil saber si los resultados en estos modelos animales se pueden aplicar a tratamiento de trastornos cognitivos humanos. En PTL 4, se examina el efecto del tratamiento de taupatía, administrando un anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo con el péptido tau que tiene fosforilada la Ser409. Sin embargo, las vacunas peptídicas son costosas, requieren altas dosis totales y requieren largos períodos para exhibir sus efectos. Además, los efectos de las vacunas peptídicas y la reactividad de la respuesta inmunitaria en los seres humanos y animales que reciben la administración difieren de acuerdo con los antecedentes genéticos, y no siempre se puede generar una producción eficaz de anticuerpos en cada individuo. Por lo tanto, mientras que la inmunoterapia mediante inmunización pasiva con anticuerpos tiene potencial, una gran cantidad de sitios están fosforilados en tau, y prácticamente no existe información sobre qué anticuerpos para qué sitios de fosforilación se utilizan eficazmente. Además, no se puede considerar que los anticuerpos disponibles actualmente tengan una función suficiente para su uso en terapia, en función de sus efectos en modelos animales.

Además, cuando un anticuerpo se va a utilizar como compuesto base para un agente terapéutico o agente profiláctico, es necesario considerar también la cantidad de anticuerpo utilizado para el tratamiento, con el fin de evitar efectos secundarios y minimizar los problemas de coste médico, y esto es especialmente importante en relación con las dosis para enfermedades crónicas o enfermedades genéticas. Por ejemplo, la dosis para el tratamiento con Actemra[®] (tocilizumab), que es un anticuerpo humano anti-IL-6R, es de 8 mg por 1 kg de peso corporal durante 1 a 4 semanas, y la dosis para el tratamiento con Soliris[®] (eculizumab), que es un anticuerpo anti-C5 del complemento humanizado, es de 600-900 mg por adulto por administración, durante 2 a 4 semanas. Estos son anticuerpos superiores desarrollados por selección entre una gran cantidad de anticuerpos, pero sus dosis son relativamente grandes en comparación con los fármacos de anticuerpos utilizados actualmente. Por lo tanto, se debe mostrar un efecto con

5 dosis iguales o menores que éstas, para los fármacos de anticuerpos que se desarrollarán en el futuro. Además, aunque el cerebro es el órgano a tratar en trastornos cognitivos tales como la EA, se cree generalmente que la administración sistémica por vía intravenosa o subcutánea produce una baja tasa de migración de anticuerpos de la sangre al cerebro, debido a la presencia de la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, se espera que los anticuerpos utilizados para el tratamiento de los trastornos cognitivos tengan efectos farmacológicos más bajos en comparación con el tratamiento de enfermedades que involucran otros órganos, y esto ha constituido un problema importante.

10 Los principales síntomas en los trastornos cognitivos humanos son el deterioro de la memoria y el deterioro de la función cognitiva, y dado que la función cognitiva es especialmente importante para mostrar el juicio, la comunicación y el rendimiento basados en la memoria, los síntomas de los trastornos cognitivos son de gran importancia. La función motora, por otro lado, aunque es un síntoma que se encuentra en la demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17) y la enfermedad de Alzheimer en etapa terminal, no es necesariamente un síntoma principal mostrado en los trastornos cognitivos. En consecuencia, el problema principal a considerar para tratar los trastornos cognitivos es la mejora de la función cognitiva. En la actualidad, sin embargo, no hay forma de obtener un agente terapéutico o profiláctico para los trastornos cognitivos que muestre una mejora superior en la función cognitiva, utilizando modelos animales adecuados para el deterioro de la función cognitiva asociada a la taupatía que son necesarios para resolver el problema esbozado más arriba, tampoco existe ningún agente terapéutico o agente profiláctico para los trastornos cognitivos que muestre un efecto específico y superior contra los trastornos cognitivos.

15 El documento WO2010/144711 describe un péptido correspondiente a los residuos 398-416 de tau en donde las Ser en las posiciones 412 y 413 están fosforiladas. También se describen anticuerpos que se unen al péptido.

20 El documento US2002/0086009 describe una serie de péptidos que se solapan parcialmente a la región 410-421 de tau. Estos péptidos están fosforilados en las posiciones 412 y/o 413 y se utilizan para generar anticuerpos para detectar la enfermedad de Alzheimer.

Boutanjagout et al. 2011 describen el uso del anticuerpo PHF1, que se dirige a tau que está fosforilada en los aminoácidos serina 396 y/o 404, para la inmunización pasiva de un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer.

25 A la luz de estas circunstancias, por lo tanto, existe una demanda de un agente terapéutico o un agente profiláctico con un poderoso efecto para mejorar la función cognitiva.

Lista de referencias

Bibliografía relacionada con patentes

[PTL 1] US8012936

30 [PTL 2] WO2010/142423

[PTL 3] WO2010/144711

Bibliografía no relacionada con patentes

[NPL 1] Kishimoto, T., Takahashi, S., STEP Series Seishinka, 2ª Edición, pág. 103-104, Kaibashobo, 2008

35 [NPL 2] Asada, T., Igaku no Ayumi, volumen complementario, "Cognitive disorders", pág. 5-10, Ishiyaku Publishing, 2011

[NPL 3] Alistair Burns, John O'Brien and David Ames, Dementia. 3ª Edición, pág. 408-464, 2005

[NPL 4] Arai, T., Shinkei Naika, Vol.72, número especial, (Supl. 6), pág. 46-51, 2010

[NPL 5] Wendy Noble et al., Expert Opin. Drug Discov., Vol. 6, Núm. 8, pág. 797-810, 2011

[NPL 6] Miguel Díaz-Hernandes et al., Journal of Biological Chemistry Vol. 285, pág. 32539-32548, 2010

40 [NPL 7] Venessa Plouffe et al., PLoS ONE Vol. 7, p36873, 2012

[NPL 8] Alistair Burns, John O'Brien y David Ames, Dementia. 3ª Edición, pág. 459, 2005

Descripción de la invención

Problemas que va a resolver la invención

45 Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos, centrándose en la fosforilación de tau en las taupatías.

Otro objeto de la invención es proporcionar un agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos que comprende como ingrediente activo un anticuerpo que participa en una reacción antígeno-anticuerpo específica para

tau fosforilada en un residuo de aminoácido correspondiente a las proximidades de Ser413.

Otro objeto más de la invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que tenga un alto efecto de mejora de la función cognitiva, y un método para preparar un anticuerpo que sea aún más adecuado para el tratamiento del trastorno cognitivo, tal como un anticuerpo humanizado, basado en el análisis de la estructura del anticuerpo monoclonal.

Medios para resolver los problemas

La presente invención se describe a continuación. La proteína tau de la invención incluye no solo 4R2N, sino los 6 tipos de isoformas. Por conveniencia, las posiciones de los residuos de aminoácidos según la invención se identifican basándose en SEQ ID NO: 1, y por ejemplo, si se menciona el residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, esto se refiere a la serina 413^a de SEQ ID NO: 1 (4R2N), o la serina que es el residuo de aminoácido 384^o de SEQ ID NO: 2 (4R1N), el 355^o de SEQ ID NO: 3 (4R0N), el 382^o de SEQ ID NO: 4 (3R2N), el 353^o de SEQ ID NO: 5 (3R1N) o el 324^o de SEQ ID NO: 6 (3R0N).

La invención proporciona un agente terapéutico o agente profiláctico para usar en el tratamiento de taupatías que comprende, como ingrediente activo, un anticuerpo monoclonal que participa en la reacción antígeno-anticuerpo con al menos 8 aminoácidos contiguos entre los residuos aminoácidos correspondientes a las posiciones 410 a 421 de la proteína tau representada por SEQ ID NO: 1, incluyendo el aminoácido en la posición 413 de, que está fosforilado.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico o el agente profiláctico para trastornos cognitivos es un anticuerpo que incluye una VH que consiste en la secuencia de aminoácidos enumerada como SEQ ID NO: 20 y una VL que consiste en el aminoácido secuencia enumerada como SEQ ID NO: 26.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico o el agente profiláctico para trastornos cognitivos es un anticuerpo que comprende una secuencia de CDR en la cadena H representada por SEQ ID NO: 7 a 13, una secuencia de CDR en la cadena H representada por al menos uno de SEQ ID NO: 7 a 13 o una secuencia de CDR en la cadena H que tiene al menos 85% de homología con al menos una secuencia de CDR en la cadena H representada por SEQ ID NO: 7 a 13, y/o una secuencia de CDR en la cadena L representada por SEQ ID NO: 14 a 17, una secuencia de CDR en la cadena L representada por al menos uno de SEQ ID NO: 14 a 17 o una secuencia de CDR en la cadena L que tiene al menos 85% de homología con al menos una secuencia de CDR en la cadena L representada por SEQ ID NO: 14 a 17.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico o el agente profiláctico para trastornos cognitivos es un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena H representada por cualquiera de SEQ ID NO: 18 a 24 o una cadena H región variable que contiene una secuencia que tiene al menos 85% de homología con cualquiera de SEQ ID NO: 18 a 24, y/o una región variable de la cadena L representada por una cualquiera de SEQ ID NO: 25 a 30 o una región variable de la cadena L que contiene una secuencia que tiene al menos 85% de homología con cualquiera de SEQ ID NO: 25 a 30.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico o el agente profiláctico para trastornos cognitivos es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En algunas realizaciones, la taupatía es la enfermedad de Alzheimer, la degeneración de los ganglios corticales basales, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick, la demencia de grano argirófilo (enfermedad de grano argirófilo), la taupatía multisistémica con demencia (MSTD), la demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17), la demencia de ovillos neurofibrilares, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNTC), la taupatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares (WMT-GGI) o la degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para Tau (DLFT-tau).

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal para uso en un método de tratamiento o prevención de una taupatía, en donde el anticuerpo participa en la reacción antígeno-anticuerpo con un péptido que comprende una secuencia de al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos que consiste en los números de aminoácidos 410-421 de SEQ ID NO: 1, estando fosforilado el residuo de aminoácido correspondientes a Ser413 de SEQ ID NO: 1 en el péptido.

Efecto de la invención

La presente invención puede proporcionar un agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos, por contener como ingrediente activo un anticuerpo monoclonal que participa en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con tau fosforilada en el residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1. El anticuerpo monoclonal tiene un alto efecto de mejora de la función cognitiva. Se puede preparar un anticuerpo que es aún más adecuado para el tratamiento del trastorno cognitivo, tal como un anticuerpo humanizado, basándose en el análisis de la estructura del anticuerpo monoclonal.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una lista de las porciones iniciales de las secuencias de aminoácidos de isoformas de la proteína

tau humana, alineadas utilizando ClustalW.

La Fig. 2 es una lista de las últimas porciones de las secuencias de aminoácidos de isoformas de la proteína tau humana, alineadas utilizando ClustalW.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la especificidad del anticuerpo policlonal de conejo para el péptido pSer413.

5 La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de un Ensayo de prueba en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo policlonal de conejo que reconoce pSer413.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de un Prueba de sonda en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo policlonal de conejo que reconoce pSer413.

10 La Fig. 6 es un gráfico lineal que muestra los resultados de un Ensayo de campo abierto en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo policlonal de conejo que reconoce pSer413.

La Fig. 7 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un Ensayo de campo abierto en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo policlonal de conejo que reconoce pSer413.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra los resultados de un Ensayo de prueba en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer413 (Ta1505).

15 La Fig. 9 es un gráfico que muestra los resultados de un Prueba de sonda en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer413 (Ta1505).

La Fig. 10 es un gráfico lineal que muestra los resultados de un Ensayo de campo abierto en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer413 (Ta1505).

20 La Fig. 11 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un Ensayo de campo abierto en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer413 (Ta1505).

La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados de un Ensayo de prueba en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer396 (Ta9).

La Fig. 13 es un gráfico que muestra los resultados de un Prueba de sonda en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer396 (Ta9).

25 La Fig. 14 es un gráfico lineal que muestra los resultados de un Ensayo de campo abierto en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer396 (Ta9).

La Fig. 15 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un Ensayo de campo abierto en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer396 (Ta9).

30 La Fig. 16 es un gráfico de barras que muestra los niveles de sinaptofisina del hipocampo en ratones modelo a los que se ha administrado anticuerpo Ta1505.

La Fig. 17 es un diagrama que representa un fragmento de gen que contiene el gen tau.

La Fig. 18 es un gráfico que muestra los resultados de un Ensayo de prueba de laberinto de agua en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado anticuerpo Ta1505.

35 La Fig. 19 es un gráfico que muestra los resultados de un Prueba de sonda de laberinto de agua en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado anticuerpo Ta1505.

La Fig. 20 es un gráfico que muestra los resultados de un Ensayo de prueba de laberinto de agua en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado anticuerpo Ta9.

La Fig. 21 es un gráfico que muestra los resultados de una Prueba de sonda de laberinto de agua en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado anticuerpo Ta9.

40 La Fig. 22 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la región CA3 del hipocampo y la región CA23 con el anticuerpo Ta1505 en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado IgG control (1 mg/cabeza) o anticuerpo Ta1505 (1 mg/cabeza).

45 La Fig. 23 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la región del giro parahipocampal con Ta1505 en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado IgG de control (1 mg/cabeza).

La Fig. 24 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la región del giro parahipocampal con el anticuerpo Ta1505 en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado

anticuerpo Ta1505 (1 mg/cabeza).

La Fig. 25 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la región CA3 del hipocampo y la región CA23 con AT8 en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado IgG de control (1 mg/cabeza) o anticuerpo Ta1505 (1 mg/cabeza).

5 La Fig. 26 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la región del giro parahipocampal con AT8 en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado IgG de control (1 mg/cabeza).

10 La Fig. 27 es una fotografía que muestra la tinción inmunohistoquímica de la región del giro parahipocampal con AT8 en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado Ta1505 (1 mg/cabeza).

La Fig. 28 es un gráfico que muestra la cantidad de tau reactiva con G2, AT8, PHF1 y Ta1505 en la fracción de cerebro soluble en TBS en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado Ta1505 (1 mg/cabeza).

15 La Fig. 29 es un gráfico que muestra la cantidad de tau reactiva con G2, AT8, PHF1 y Ta1505 en la fracción de cerebro soluble en sarcosilo en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg) a los que se ha administrado Ta1505 (1 mg/cabeza).

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Los autores de la presente invención han preparado anticuerpos que participan en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con tau que ha sido fosforilada en el residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, que es el sitio específicamente fosforilado en la EA, lo han administrado a ratones Tg que muestran un deterioro de la función cognitiva asociado con la maduración, y han encontrado que la función cognitiva se puede recuperar aproximadamente al mismo nivel que un grupo de control. Por otro lado, no se observó una mejora adecuada de la función cognitiva utilizando, en comparación, una concentración comparable de anticuerpo para tau que se haya fosforilado en el residuo de aminoácido correspondiente a Ser396 de SEQ ID NO: 1, que tiene una mayor afinidad por el antígeno equivalente que el anticuerpo de la invención. La porción en las proximidades del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1 es una región para la cual no se conoce información particular en términos de la relación entre la estructura y la función de tau, y fue un resultado completamente inesperado encontrar que un anticuerpo que participaba en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con esta porción tiene un efecto mejorador tan poderoso sobre la función cognitiva. Por lo tanto, el sitio de las proximidades del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, que hasta ahora no había sido un foco de interés, ha sido determinado primero por la presente invención como un sitio importante para el inicio del deterioro de la función cognitiva en taupatías, y se ha completado la invención.

[Anticuerpo anti-tau fosforilada]

Para el propósito de la invención, Tau (proteína), incluye no solo la proteína tau humana representada por SEQ ID NO: 1-6, sino también mutantes genéticos de la misma. Como se explicó anteriormente en Técnica anterior, se conocen más de 40 mutaciones en FTDP-17, una enfermedad neurodegenerativa familiar asociada con el trastorno cognitivo, pero los sitios de mutación no están necesariamente limitados a la misma. Además, las proteínas con mutaciones en los aminoácidos de las ubicaciones 1 a 50, preferiblemente las ubicaciones 1 a 30 y más preferiblemente las ubicaciones 1 a 10, como el número de mutaciones en SEQ ID NO: 1-6, también se tratan como tau para el propósito de la invención. Además, también se incluyen proteínas que muestran al menos 80% de homología (identidad) con la proteína tau humana enumerada como SEQ ID NO: 1 según el método BLAST (condiciones predeterminadas para NCBI PBLAST) y sus isoformas. Tales proteínas también incluyen tau de especies distintas de los seres humanos, tales como chimpancés, monos rhesus, caballos, cerdos, perros, ratones, conejos y ratas, y se pueden utilizar para preparar agentes terapéuticos o agentes profilácticos que se dirigen a esas proteínas tau, con el fin de mejorar la función cognitiva en esos animales.

Los números de aminoácidos de acuerdo con la invención, es decir, las posiciones de los residuos de aminoácidos, se designan basándose en la secuencia enumerada como SEQ ID NO: 1, por conveniencia. Así, por ejemplo, si se menciona el residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, esto se refiere a la serina que es el 413º residuo de aminoácido de SEQ ID NO: 1 (4R2N), el 384º de SEQ ID NO: 2 (4R1N), el 355º de SEQ ID NO: 3 (4R0N), el 382º de SEQ ID NO: 4 (3R2N), el 353º de SEQ ID NO: 5 (3R1N) o el 324º de SEQ ID NO: 6 (3R0N). La Tabla 1 muestra las posiciones de los residuos de aminoácidos que están en las mismas posiciones mutuas, para cada isoforma. En la Tabla 1, las posiciones de los residuos de aminoácidos para cada isoforma se muestran correspondientes a 410-421 de SEQ ID NO: 1, y las relaciones posicionales mutuas de los residuos de aminoácidos en otras posiciones se entenderán fácilmente basándose en la Fig. 1 y la Fig. 2, por ejemplo.

[Tabla 1]

Isoforma	4R2N	4R1N	4R0N	3R2N	3R1N	3R0N
Seq. ID	Seq. ID: No.1	Seq. ID: No.2	Seq. ID: No.3	Seq. ID: No.4	Seq. ID: No.5	Seq. ID: No.6
Residuo de Aminoácido	Posición del Residuo de Aminoácido					
Asn	410	381	352	379	350	321
Val	411	382	353	380	351	322
Ser	412	383	354	381	352	323
Ser	413	384	355	382	353	324
Thr	414	385	356	383	354	325
Gly	415	386	357	384	355	326
Ser	416	387	358	385	356	327
Ile	417	388	359	386	357	328
Asp	418	389	360	387	358	329
Met	419	390	361	388	359	330
Val	420	391	362	389	360	331
Asp	421	392	363	390	361	332

El término "anticuerpo anti-tau fosforilada" se refiere a un anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo con tau que ha sido fosforilada en un residuo de aminoácido en una o más ubicaciones de la secuencia de aminoácidos de tau mencionada anteriormente. Los residuos de aminoácidos fosforilados pueden ser serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr) o similares. Además, el sitio en tau fosforilada en el que un anticuerpo anti-tau fosforilada participa en la reacción antígeno-anticuerpo es preferiblemente el sitio que se fosforila específicamente en enfermedades neurodegenerativas tales como la EA. Además, otro modo para el sitio de la tau fosforilada en el que el anticuerpo anti-tau fosforilada participa en la reacción antígeno-anticuerpo, es un anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo con tau que ha sido fosforilada en uno o más sitios seleccionados entre los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1. Un anticuerpo puede participar en la reacción antígeno-anticuerpo con tau que ha sido fosforilada en un residuo de aminoácido correspondiente a Ser412 o Ser413 de SEQ ID NO: 1, o ambos sitios. El anticuerpo de la invención participa en una reacción antígeno-anticuerpo con tau que ha sido fosforilada en el sitio del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1. Aquí, un residuo de aminoácido correspondiente a Ser412, Ser413, Thr414 o Ser416 de SEQ ID NO: 1 se refiere al sitio correspondiente al número de aminoácidos en tau 4R2N humana (SEQ ID NO: 1), y como se explica en la Técnica anterior, el sitio correspondiente en las isoformas, o el sitio correspondiente en homólogos no humanos, se trata de la misma manera, independientemente del número de aminoácidos asignado a partir de esa secuencia de aminoácidos. Los sitios correspondientes en isoformas u homólogos pueden ser determinados por experto en la técnica a través del análisis apropiado mediante un método de Alineamiento de Secuencia por Pares, tal como el método de Needleman-Wunsch o el método de Smith-Waterman, o por Alineamiento de Secuencia Múltiple, tal como el método ClustalW o el Método PRRP. Un ejemplo de un método de análisis de un sitio correspondiente se muestra en la Fig. 1 y la Fig. 2, con las secuencias de aminoácidos (representación de una letra) de 6 isoformas diferentes en seres humanos alineadas utilizando ClustalW. Como se observa aquí, la estructura en las proximidades de los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1 se conserva en las 6 isoformas, y se puede discernir fácilmente cuáles son los aminoácidos correspondientes.

Un anticuerpo anti-tau fosforilada que se puede utilizar en un agente terapéutico o agente profiláctico según la invención es un anticuerpo monoclonal que participa en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con proteína tau que ha sido fosforilada en el sitio Ser413. Específicamente, el anticuerpo se une a al menos 8 aminoácidos entre los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 410 a 421 de la SEQ ID NO: 1, donde la proteína tau que ha sido fosforilada en el sitio del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, o en el sitio correspondiente, incluyendo los isotipos de seres humanos u otras especies, como se mencionó anteriormente, pero más preferiblemente es la proteína tau humana, y aún más preferiblemente es cualquiera de las 6 isoformas en seres humanos.

Con respecto a la proteína Tau que ha sido fosforilada en al menos un residuo de aminoácido correspondiente a las posiciones 410 a 421 de SEQ ID NO: 1, la proteína tau que ha sido fosforilada en uno o más sitios seleccionados entre los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1, o la proteína tau que ha sido fosforilada en el sitio del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, estas proteínas tau fosforiladas incluyen péptidos que tienen homología completa con porciones de las secuencias de aminoácidos de los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 410 a 421 de la proteína tau, u

homología con al menos 80% de las secuencias, y están fosforiladas en estos residuos de aminoácidos. Un anticuerpo monoclonal que participa en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con un péptido que corresponde a las posiciones 410 a 421 de la SEC ID NO: 1 es un anticuerpo anti-tau fosforilada según la invención.

Como se describe en el presente documento, "participa en la reacción antígeno-anticuerpo" representa la unión con la proteína tau que ha sido fosforilada en al menos un residuo de aminoácido correspondiente a las posiciones 410 a 421 de la SEC ID NO: 1, la proteína tau que ha sido fosforilada en uno o más sitios seleccionados entre los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1 y/o la proteína tau que ha sido fosforilada en el sitio del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, con una afinidad representada por una constante de disociación de equilibrio (KD) de al menos 1×10^{-6} M, preferiblemente la unión con una afinidad representada por una constante de disociación de equilibrio de al menos 1×10^{-7} M, e incluso más preferiblemente, la unión con una afinidad representada por una constante de disociación de equilibrio de al menos 1×10^{-8} M.

El término "específicamente" significa que la unión con la proteína tau que ha sido fosforilada en al menos un residuo de aminoácido correspondiente a las posiciones 410 a 421 de SEQ ID NO: 1, la proteína tau que ha sido fosforilada en uno o más sitios seleccionados entre los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1, y/o la proteína tau que ha sido fosforilada en el sitio del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, está en un estado que es al menos 10 veces más fuerte, más preferiblemente al menos 30 veces más fuerte e incluso más preferiblemente al menos 100 veces más fuerte, que la unión con la proteína tau que no ha sido fosforilada en ese sitio (incluyendo los péptidos que tienen homología completa con una porción de la secuencia de aminoácidos de la proteína tau, o que tiene homología con al menos 80% de la secuencia).

Además, "se une competitivamente" con un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos de VH es SEQ ID NO: 20 y cuya secuencia de aminoácidos de VL es SEQ ID NO: 26 (anticuerpo 1505) significa un fenómeno en el que, cuando otro anticuerpo se presenta simultáneamente con el anticuerpo monoclonal durante la unión al antígeno, se inhibe la unión del anticuerpo monoclonal y, en términos generales, esto se puede medir midiendo la cantidad de adición (concentración) a la que se reduce la cantidad de unión del anticuerpo monoclonal al antígeno cuando se añade un anticuerpo diferente en cantidad (concentración) variable con respecto a una cantidad (concentración) fija del anticuerpo monoclonal, expresándose el grado de inhibición como el valor CI_{50} o Ki . Un anticuerpo que se une competitivamente con un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos de VH es SEQ ID NO: 20 y cuya secuencia de VL es SEQ ID NO: 26 (anticuerpo 1505) según la invención es uno que tiene un valor CI_{50} inferior a $1 \mu M$, más preferiblemente inferior a 100 nM e incluso más preferiblemente inferior a 10 nM, cuando se ha detectado la unión antígeno-anticuerpo utilizando 10 nM del anticuerpo monoclonal.

La unión antígeno-anticuerpo de tal anticuerpo con la proteína tau fosforilada se puede determinar mediante una medición de la unión apropiada por parte de un experto en la técnica utilizando un sistema de fase sólida o fase líquida, con un método tal como ELISA, EIA, resonancia de plasmón superficial, FRET, LRET o similares, aunque no hay limitación para estos. Cuando se mide dicha unión antígeno-anticuerpo, el anticuerpo y/o antígeno (proteína tau fosforilada o proteína tau) se marcan con una enzima, sustancia fluorescente, sustancia luminiscente, isótopo radiactivo o similar, y se utiliza un método de medición adecuado para las propiedades físicas y/o químicas de la sustancia marcada para permitir la detección de la reacción antígeno-anticuerpo.

El anticuerpo anti-tau fosforilada de la invención también incluye un anticuerpo en el que la región variable de la cadena H contiene las secuencias de aminoácidos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, que consisten en una combinación de SEQ ID NO: 7 u 8 como la secuencia de aminoácidos de CDR-H1, cualquiera seleccionada entre SEQ ID NO: 9, 10, 11 y 12 como la secuencia de aminoácidos de CDR-H2 y SEQ ID NO: 13 como la secuencia de aminoácidos de CDR-H3, y la región variable de la cadena L contiene las secuencias de aminoácidos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, que consisten en una combinación de SEQ ID NO: 14 o 15 como la secuencia de aminoácidos de CDR-L1, SEQ ID NO: 16 como la secuencia de aminoácidos de CDR-L2 y SEQ ID NO: 17 como la secuencia de aminoácidos de CDR-L3. Preferiblemente, es un anticuerpo en donde el conjunto de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 en la región variable de la cadena H se selecciona entre las combinaciones: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13; y SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, el conjunto de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en la región variable de la cadena L es SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17; o SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, y más preferiblemente es un anticuerpo en donde la combinación del conjunto de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 en la región variable de la cadena H y el conjunto de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 en la región variable de la cadena L se selecciona entre las combinaciones: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17; y SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. El anticuerpo de la invención también incluye aquellos en donde al menos una de las secuencias de CDR correspondientes entre las secuencias de aminoácidos de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 es una secuencia que muestra al menos 85% de homología (identidad) y preferiblemente al menos 90% de homología, con cualquiera de SEQ ID NO: 7 a 17, según el método BLAST (condiciones predeterminadas para NCBI PBLAST).

El método para identificar la secuencia de CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 o CDR-L3 en el anticuerpo puede ser, por ejemplo, el método de Kabat o el método de Chothia, y un experto en la materia puede identificar la secuencia de la porción correspondiente a cada CDR, los métodos de Kabat (Kabat, E.A. y Wu, T.T., J. Immunol., 147, 1709-1719, 1991) y Chothia (Al-Lazikani, B., Lesk, A.M. y Chothia, C., J. Mol. Biol., 273,927-948, 1997) siendo un conocimiento técnico común para los expertos en el campo relevante, y sus resúmenes se pueden encontrar en el sitio web del Dr. Andrew C.R. Martin's Group (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>), por ejemplo.

Una forma diferente del anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H (VH) es una seleccionada entre SEQ ID NO: 18 a 24 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L (VL) es uno seleccionado entre SEQ ID NO: 25 a 30, y preferiblemente un anticuerpo en el que la combinación de secuencias de aminoácidos de VH y VL se selecciona entre las combinaciones: SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 29, y SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 30. El anticuerpo de la invención incluye aquellos en los que al menos una de las secuencias de aminoácidos de VH y VL es cualquier secuencia de aminoácidos de VH enumerada como SEQ ID NO: 18 a 24 o cualquier secuencia de aminoácidos de VL enumerada como SEQ ID NO: 25 a 30, y secuencias que muestran al menos 85% de homología (identidad) y preferiblemente al menos 90% de homología con SEQ ID NO: 18 a 30 basándose en el método BLAST (condiciones predeterminadas para NCBI PBLAST).

Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes en dichos anticuerpos se seleccionan entre los subtipos de mamífero IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, o sus variantes.

Un experto en la técnica puede diseñar anticuerpos recombinantes adecuados para la administración para el tratamiento de las especies de interés, tales como anticuerpos humanizados, basándose en la información para las secuencias de aminoácidos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y/o las secuencias de nucleótidos de los genes que las codifican, o las secuencias de aminoácidos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 y/o las secuencias de nucleótidos de los genes que las codifican, y un experto en la técnica también puede diseñar anticuerpos quiméricos de acuerdo con el propósito, basándose en la información para la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H y/o la secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica, o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L y/o la secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica. Además, un experto en la técnica puede utilizar apropiadamente tecnología conocida para la creación de anticuerpos de bajo peso molecular o anticuerpos de armazón, basándose en la información para las secuencias de aminoácidos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y/o las secuencias de nucleótidos de los genes que las codifican, o las secuencias de aminoácidos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 y/o las secuencias de nucleótidos de los genes que las codifican, o basándose en la información de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena H y/o la secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica, o la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena L y/o la secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo compuesto por dos cadenas H y dos cadenas L, o puede ser un anticuerpo compuesto solamente por dos cadenas H. Asimismo, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento de anticuerpo, incluyendo los ejemplos de fragmentos de anticuerpo las estructuras F(ab')₂, Fab y Fv.

El anticuerpo de la invención se puede obtener utilizando mecanismos conocidos por los expertos en la técnica. El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal (Milstein et al., Nature (Inglaterra), 6 de octubre de 1983, Vol. 305, Núm. 55934, pág. 537-540). El anticuerpo policlonal se puede obtener utilizando como antígeno la proteína tau que ha sido fosforilada en al menos un residuo de aminoácido correspondiente a las posiciones 410 a 421 de la SEC ID NO: 1, proteína tau que ha sido fosforilada en uno o más sitios seleccionados entre Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1, proteína tau que ha sido fosforilada en el sitio Ser413 de SEQ ID NO: 1, o un péptido que tiene homología completa con al menos una porción de la secuencia de aminoácidos de las posiciones 410 a 421 de la proteína tau de SEQ ID NO: 1, u homología con al menos 80% de la secuencia, y que ha sido fosforilado en estos residuos de aminoácido, para sensibilizar a un mamífero, y se puede recuperar el anticuerpo del suero del animal. Cuando el péptido se va a utilizar como antígeno, el antígeno se puede utilizar en una forma conjugada con una proteína portadora tal como BSA o KLH, o con polilisina. Los ejemplos específicos de péptidos que se van a utilizar como antígenos incluyen los péptidos de SEQ ID NO: 31 o 32 que han sido fosforilados en el sitio correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1, como se describe en los Ejemplos 1 y 2, pero no hay limitación para estos. Para un anticuerpo monoclonal según la invención, se puede clonar un híbridoma establecido utilizando inmunocitos de un mamífero sensibilizado con el antígeno y fusionándolos con células de mieloma o similares, y el anticuerpo se puede recuperar del cultivo. En el Ejemplo 2 se describe un método para obtener tales anticuerpos monoclonales, y los anticuerpos monoclonales obtenidos de ese modo pueden ser anticuerpos monoclonales que contienen las secuencias de aminoácidos de VH de SEQ ID NO: 18 a 24 y las secuencias de VL de SEQ ID NO: 25 a 30 (Ta1501, 1502, 1505-1509), pero no hay ninguna limitación al respecto.

Para el anticuerpo monoclonal obtenido, es posible obtener una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia génica que codifica los aminoácidos de la proteína del anticuerpo, y es posible preparar el anticuerpo mediante mecanismos de ingeniería genética utilizando dicha molécula de ácido nucleico. La introducción de modificaciones para aumentar la capacidad de unión o la especificidad de un anticuerpo, utilizando información genética del anticuerpo, tal como la información de la cadena H, la cadena L o sus regiones variables o secuencias de CDR, y la

preparación de anticuerpos que tengan una estructura adecuada para su uso en el tratamiento modificando un anticuerpo de un animal, tal como un ratón, contra un anticuerpo de tipo humano, son mecanismos que los expertos en la técnica conocen bien. Además, mediante el uso de animales transgénicos no humanos en los que se ha transferido un gen de anticuerpo humano, como animales para la sensibilización con antígeno, es posible obtener anticuerpos monoclonales de tipo humano. Además, un experto en la técnica puede llevar a cabo apropiadamente mecanismos en los que se utiliza una biblioteca de fagos que expresan la región de unión a antígeno de un anticuerpo humano o una porción del mismo (presentación en fagos de anticuerpos humanos) para obtener anticuerpos que se unen específicamente al antígeno correspondiente, o un clon de fago que comprende una secuencia de aminoácidos específica, para preparar anticuerpos humanos a partir de esa información, como un método que no requiere la sensibilización de los animales. Taketo Tanaka et al., Keio J. Med., Vol. 60, pág. 37-46, por ejemplo).

Por otra parte, como en el método de producción de anticuerpos monoclonales anteriormente mencionado, se puede cultivar una hibridoma que produce el anticuerpo que se va a obtener y el anticuerpo se puede purificar y obtener mediante métodos comunes a partir del sobrenadante de cultivo resultante. Como un método de producción diferente, se puede obtener un gen que codifica un anticuerpo, y más específicamente un gen que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de inmunoglobulina, a partir de un hibridoma que produce el anticuerpo de interés, o de un clon de fagos o similar obtenido por medio de presentación en fagos de anticuerpos humanos, y un vector para la expresión del gen preparado y transferido a células anfitrionas (células de mamífero, células de insecto, microbios o similares) para producir el anticuerpo. Durante este procedimiento, un experto en la técnica puede llevar a cabo técnicas conocidas públicamente para la modificación génica del gen que codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de la inmunoglobulina, para la introducción de los rasgos deseados, o puede crear un anticuerpo de tipo humano, un anticuerpo para proteína quimera, un anticuerpo de bajo peso molecular o un anticuerpo armazón, utilizando información estructural para la región variable o CDR de la cadena pesada y/o cadena ligera de la inmunoglobulina. Además, para mejorar el rendimiento del anticuerpo o evitar efectos secundarios, se pueden emplear adecuadamente mecanismos bien conocidos por los expertos en la técnica para introducir modificaciones en la estructura de la región constante del anticuerpo, o modificar sus porciones de la cadena de azúcar.

[Péptido fosforilado con secuencia de aminoácidos derivada de tau]

En esta memoria se describen péptidos que contienen porciones de la secuencia de aminoácidos de tau y que han sido fosforilados en uno o más residuos de aminoácido. Un residuo de aminoácido "fosforilado" es uno que está unido por un éster a un grupo fosfato en una cadena lateral del residuo de aminoácido, siendo los residuos de aminoácido fosforilados típicos serina, treonina y tirosina. El péptido fosforilado es un péptido con una longitud de al menos 8 aminoácidos que contiene al menos 3 aminoácidos contiguos entre la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos correspondientes a los números de aminoácidos 410-421 de la SEQ ID NO: 1, preferiblemente un péptido con una longitud de al menos 8 aminoácidos que contiene al menos 5 aminoácidos contiguos, y más preferiblemente un péptido con una longitud de al menos 8 aminoácidos que contiene al menos 8 aminoácidos contiguos. Además, los residuos de aminoácidos fosforilados en los péptidos fosforilados pueden ser cualquiera de los residuos de aminoácidos correspondientes a los números de aminoácidos 410-421 de la SEQ ID NO: 1, preferiblemente cualquiera de los residuos de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1, y más preferiblemente el residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1. Un ejemplo típico de dicho péptido fosforilado es el péptido fosforilado utilizado para la preparación de anticuerpos en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO: 31), pero no hay limitación para este.

Se puede utilizar un péptido fosforilado que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de tau en un agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos que comprenden antígeno para la preparación del anticuerpo anti-tau fosforilada de acuerdo con la invención, o el propio péptido. El péptido fosforilado también se puede modificar con sustancias que proporcionan otras funciones, de acuerdo con el propósito, en el extremo N y/o C de la secuencia. Por ejemplo, puede tener un residuo de metionina, acetilo o ácido piroglutámico añadidos al extremo N del péptido fosforilado, o se puede modificar con una sustancia fluorescente o similar. Las sustancias utilizadas para modificar el extremo N-terminal y/o C-terminal del péptido fosforilado también pueden ser péptidos o proteínas, ejemplos de los cuales incluyen péptidos con secuencias de aminoácidos de secuencias de etiqueta apropiadas (típicamente etiqueta de histidina o etiqueta FLAG), secuencias de reconocimiento de receptores de células T (TCR) o antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y proteínas virales o bacterianas, o péptidos con secuencias derivadas de los mismos, añadidas al extremo N-terminal o C-terminal. El péptido fosforilado de la invención también incluye aquellos modificados con compuestos o péptidos en uno o más residuos de aminoácidos distintos del extremo N o el extremo C. Dicha modificación del péptido fosforilado se puede lograr utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como el método descrito por Hermanson et al. (Bioconjugate techniques, EE. UU., 1996, Academic Press).

El péptido fosforilado de la invención puede ser producido por un experto en la técnica utilizando métodos apropiados de síntesis o ingeniería genética. Los ejemplos de métodos para producir péptidos fosforilados por medio de síntesis incluyen métodos Boc (Wakamiya T. et al., Chemistry Letters, Vol. 22 pág.1401, 1993), Métodos Fmoc (PERICH, J. W., International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 40, pág. 134-140, 1992), y el método descrito en la Patente Japonesa Núm. 3587390, aunque otros métodos apropiados pueden ser implementados por un experto en la técnica. Asimismo, los métodos de producción por ingeniería genética pueden implicar la preparación de material genético (ADN, ARN) que tenga una secuencia de nucleótidos que codifique el péptido que se vaya a producir o su

precursor, y la inserción en un vector de expresión apropiado con la adición de una secuencia promotora y similares, para la introducción en un anfitrión adecuado para la expresión, o la producción utilizando un sistema de síntesis de proteínas sin células. En este caso, el péptido fosforilado que ha sido fosforilado en el sitio de interés se puede producir mediante una reacción de fosforilación apropiada en un anfitrión por medio de una quinasa que está en el anfitrión o inducida mediante expresión genéticamente modificada, o el péptido de interés se puede recoger primero y luego hacerlo reaccionar con quinasa o similar *in vitro* para la reacción de fosforilación. Para tal reacción de fosforilación *in vitro*, la enzima utilizada puede ser una cuya función en la reacción de fosforilación de tau para péptidos de interés sea conocida, tal como GSK3 o CDK5. Para obtener péptidos con los residuos de aminoácidos de interés fosforilados, entre los péptidos fosforilados que se han fosforilado de esta manera en un anfitrión o *in vitro*, se pueden utilizar métodos para la recuperación de péptidos fosforilados unidos específicamente al anticuerpo en la reacción antígeno-anticuerpo utilizando los anticuerpos anti-tau fosforilada mencionados anteriormente.

[Agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos que comprenden anticuerpo anti-tau fosforilada o péptido tau fosforilado]

El término "trastornos cognitivos" para seres humanos significa una condición de deterioro en la función intelectual que se ha desarrollado o adquirido, y se considera un tipo de trastorno intelectual (Kamijima, K., Niwa, S., Nankodo's Essential Well - Advanced Series, New Seishin Igaku, pág. 69-70, 2008) y, en un sentido más amplio, se consideran enfermedades que presentan alteraciones intelectuales y/o alteraciones de la memoria. En las enfermedades neurodegenerativas tales como la EA, la "neurodegeneración" se puede determinar confirmando la presencia de ovillos neurofibrilares (NFT) mediante análisis histológico post mortem, pero un médico puede realizar un diagnóstico de conducta de la enfermedad neurodegenerativa mediante la Escala de Demencia de Hasegawa - Revisado (HDS-R) o Mini-Examen del estado mental (MMSE), basándose en el interrogatorio como parte del examen neuropsicológico, mediante el Índice Clínico de Demencia (CDR) o Escala de Evaluación Funcional (FAST) basándose en la observación, mediante el aumento de la abundancia de tau o tau fosforilada o el aumento de la abundancia de A β en el líquido cefalorraquídeo, como examen bioquímico, o basándose en la información obtenida de la TC craneal, la MRI craneal, SPECT o PET, SPECT o PET, como examen de imágenes, para diagnosticar trastornos cognitivos y específicamente enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, el agente terapéutico o el agente profiláctico para los trastornos cognitivos de la invención se administran a un paciente diagnosticado de trastorno cognitivo por un médico, y tiene un efecto de mejora en comparación con el momento previo a la administración, al menos para un elemento de diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa, o un efecto de inhibición de la progresión de los síntomas o el mantenimiento o la recuperación del estado antes de la administración.

Los pacientes a los que se administrará el agente terapéutico o el agente profiláctico para trastornos cognitivos de la invención son pacientes con trastornos cognitivos, y especialmente pacientes con taupatías, que incluyen pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), degeneración de los ganglios corticales basales (CBD o CBS), parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, demencia de grano argirófilo (enfermedad de grano argirófilo), taupatía multisistémica con demencia (MSTD), demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17), demencia de ovillos neurofibrilares, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNTC), taupatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares (WMT-GGI), degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para tau (DLFT-tau), enfermedad de Parkinson postencefálica de Economo, panencefalitis esclerosante subaguda o encefalopatía de boxeador. Por lo tanto, el agente terapéutico para trastornos cognitivos de la invención es un agente terapéutico o un agente profiláctico para las taupatías, y desde un punto de vista diferente, se puede considerar un agente terapéutico o un agente profiláctico para la enfermedad de Alzheimer (EA), la degeneración de los ganglios corticales basales (CBD o CBS), la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick, la demencia de grano argirófilo (enfermedad de grano argirófilo), la taupatía multisistémica con demencia (MSTD), demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17), demencia por ovillos neurofibrilares, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNTC), taupatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares (WMT-GGI), degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para tau (DLFT-tau), enfermedad de Parkinson postencefálica de Economo, panencefalitis esclerosante subaguda o encefalopatía de boxeador.

También se puede considerar que el agente terapéutico o el agente profiláctico para los trastornos cognitivos de la invención tienen un efecto de mejora de la función cognitiva o de inhibición de la pérdida o mantenimiento de la función cognitiva en animales no humanos. Tales animales no humanos incluyen animales tales como chimpancés, monos rhesus, caballos, cerdos, perros, ratones, conejos, ratas, gatos y similares que expresan tau con alta homología con la tau humana, sin limitación de los mismos.

[Modelos animales de trastorno cognitivo]

Los animales para investigación sobre el agente terapéutico o el agente profiláctico para trastornos cognitivos de la invención incluyen modelos animales para trastornos cognitivos, entre los cuales se pueden mencionar en particular modelos animales de taupatías. Los modelos animales para taupatías son animales que expresan tau de tipo normal o con mutación genética en el cerebro, y particularmente modelos animales que muestran un deterioro de la función cognitiva. Tales animales que expresan tau de tipo normal o con mutación genética en el cerebro se pueden preparar mediante ingeniería genética, siendo un ejemplo típico los ratones transgénicos (ratones Tg). Los modelos animales tales como los ratones Tg que expresan tau con mutación genética son útiles como modelos de taupatías familiares genéticas, pero para el examen del efecto de un agente terapéutico o agente profiláctico para taupatías esporádicas

que constituyen la mayoría de los casos entre los seres humanos, preferiblemente muestran un efecto en ratones Tg que expresan tau de tipo normal. Los más adecuados como ratones Tg que expresan tau de tipo normal son los ratones preparados en los ejemplos de producción de la presente invención, pero también se pueden utilizar los ratones Tg referidos por Kambe et al. (Neurobiology of Disease, Vol. 42, pág. 404-414, 2011) y Kimura et al. (The EMBO J. vol. 26, pág. 5143-5152, 2007). Sin embargo, aunque se observa deterioro de la función cognitiva en los ratones de Kambe et al. y Kimura et al., éste aparece después de los 14 meses de edad y los 20 meses de edad, respectivamente, y por lo tanto, el inicio de la senescencia y los efectos del envejecimiento también pueden ser factores que contribuyen, mientras que también son un problema los efectos y el trabajo de la cría a largo plazo. Por el contrario, los ratones preparados en los ejemplos de producción de la presente invención expresan tau de tipo normal humana y muestran un inicio del deterioro de la función cognitiva en una etapa relativamente temprana de aproximadamente 6 meses de edad, y por lo tanto son más adecuados como modelos de trastorno cognitivo para los cuales se pueden excluir factores tales como el envejecimiento, y el uso de tales modelos permite una evaluación más precisa de los agentes terapéuticos o agentes profilácticos para los trastornos cognitivos que tienen mejores efectos sobre la función cognitiva.

El método preferido para examinar el efecto de un agente terapéutico o agente profiláctico para los trastornos cognitivos según la invención en un modelo animal es un método de prueba de la función cognitiva, tal como una prueba de aprendizaje de memoria. Tal método puede ser una prueba de laberinto de agua de Morris, una prueba de aprendizaje etapa a etapa o una nueva prueba de reconocimiento de objetos, pero preferiblemente es una combinación de pruebas de medición del comportamiento, tal como una Prueba de Campo Abierto, para tener en cuenta las condiciones de cantidad de comportamiento y ansiedad animal.

Como métodos para examinar el efecto de un agente terapéutico o un agente profiláctico para los trastornos cognitivos según la invención, es posible utilizar métodos para examinar los niveles de proteína tau o tau fosforilada en el tejido cerebral, durante la administración a un modelo animal de trastorno cognitivo. En la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, los niveles de expresión de la proteína tau o el aumento de la tau fosforilada anormal están asociados con la patología (Khalid Iqbal et al., Curr. Alzheimer Res., Vol. 7, pág. 654-664, 2010). También es bien sabido que la reducción de la expresión de tau y de los niveles anormales de tau fosforilada en algunos animales modelo patológicos produce una mejora en la función cognitiva y la función motora (K. Santa Cruz et al., Science, 30, Vol. 9, pág. 476-481, 2005; Sylvie Le Corre et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 10, Vol. 3, pág. 9673-9678, 2006). Como un método para examinar los cambios en la proteína tau o tau fosforilada, esto se puede lograr mediante un método tal como la transferencia Western utilizando un producto homogeneizado de tejido cerebral, como se describe en los ejemplos, pero un experto en la técnica puede seleccionar otro método apropiado, tal como ELISA (Xiyun Chai et al., J. Biol. Chem., Vol. 286, pág. 34457-34467, 2011) o un método inmunohistoquímico (David J. Irwin et al., BRAIN, Vol. 135, pág. 807-818, 2012).

El efecto de un agente terapéutico o agente profiláctico para los trastornos cognitivos descritos en esta memoria en un modelo animal se puede utilizar como datos del efecto farmacológico para el desarrollo de un agente terapéutico o un agente profiláctico en seres humanos.

[Agente terapéutico o agente profiláctico para trastornos cognitivos]

Una forma del agente terapéutico o el agente profiláctico para los trastornos cognitivos de la invención es una que comprende un anticuerpo anti-tau fosforilada, y preferiblemente un anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con la proteína tau que se ha fosforilado en al menos un residuo de aminoácido correspondiente a las posiciones 410 a 421 de SEQ ID NO: 1 en la proteína tau, o un anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo con la proteína tau que se ha fosforilado en uno o más sitios seleccionados entre los residuos de aminoácidos correspondientes a Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1, o un anticuerpo que se une competitivamente con un anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos de VH es SEQ ID NO: 20 y cuya secuencia de aminoácidos de VL es SEQ ID NO: 26 (1505).

El anticuerpo de la invención participa en la reacción antígeno-anticuerpo con la proteína tau que se ha fosforilado en el sitio del residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1. Tales anticuerpos se explicaron anteriormente bajo el título [Anticuerpo anti-tau fosforilada].

Otra forma del agente terapéutico o el agente profiláctico para los trastornos cognitivos descritos en esta memoria es una que contiene un péptido que incluye una porción de la secuencia de tau y que ha sido fosforilada en uno o más residuos de aminoácidos, el péptido es un péptido fosforilado que es un péptido con una longitud de al menos 8 aminoácidos que contiene al menos 3 aminoácidos contiguos entre la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos correspondientes a los números de aminoácidos 410-421 de la SEQ ID NO: 1, o un péptido con una longitud de al menos 8 aminoácidos que contiene al menos 5 aminoácidos contiguos, o un péptido con una longitud de al menos 8 aminoácidos que contiene al menos 8 aminoácidos contiguos. Asimismo, los residuos de aminoácidos fosforilados en los péptidos fosforilados pueden ser cualquiera de los residuos de aminoácidos correspondientes a los números de aminoácidos 410-421 de SEQ ID NO: 1, preferiblemente cualquiera de los residuos de aminoácidos correspondientes a los aminoácidos Ser412, Ser413, Thr414 y Ser416 de SEQ ID NO: 1 y más preferiblemente el residuo de aminoácido correspondiente a Ser413 de SEQ ID NO: 1. Tales péptidos se explicaron anteriormente bajo el título [Péptido fosforilado con secuencia de aminoácidos derivada de tau].

El agente terapéutico o el agente profiláctico para los trastornos cognitivos de la invención también pueden contener aditivos farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones que utilizan aditivos farmacéuticamente aceptables se pueden preparar mediante el método descrito en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, University of the Sciences in Philadelphia, Williams & Wilkins, 15 de diciembre, 2000". Una forma para tal agente terapéutico o agente profiláctico es un fármaco líquido preparado por disolución, suspensión o emulsificación en una solución acuosa o solución oleosa asépticas. Los disolventes para esto incluyen agua destilada para inyectables y solución salina fisiológica, para soluciones acuosas, con adición de un agente osmorregulador (por ejemplo, D-glucosa, D-sorbitol, D-manitol, cloruro de sodio y similares), a menudo utilizadas combinadas con un auxiliar de disolución adecuado, tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol o polietilenglicol), o un tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80 o aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 50). Las soluciones oleosas también se utilizan a veces como disolventes, incluyendo los ejemplos de tales soluciones oleosas aceite de sésamo y aceite de soja, que a menudo se utilizan combinados con benzoato de bencilo, alcohol bencílico o similares como auxiliares de disolución. En tales fármacos líquidos, a menudo se utilizan aditivos apropiados tales como agentes tamponadores (por ejemplo, agentes tamponadores de fosfato y agentes tamponadores de acetato), agentes calmantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio e hidrocloreto de procaína), estabilizadores (por ejemplo, albúmina sérica humana y polietilenglicol), conservantes (por ejemplo, ácido ascórbico, ácido eritórico y sus sales), agentes colorantes (por ejemplo, clorofila de cobre-β-caroteno, rojo núm. 2 y azul núm. 1), agentes antisépticos (por ejemplo, ésteres de ácido paraoxibenzoico, fenol, cloruro de benzetonio y cloruro de benzalconio), espesantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa y sus sales), estabilizadores (por ejemplo, albúmina sérica humana, manitol y sorbitol) y correctores del olor (por ejemplo, mentol y aromas cítricos). Las diferentes formas de agentes terapéuticos o agentes profilácticos incluyen formulaciones sólidas tales como polvos, comprimidos, gránulos, cápsulas, píldoras, supositorios, pastillas y similares. Para que una formulación sólida que se vaya a administrar en forma oral, se pueden utilizar aditivos tales como excipientes (por ejemplo, celulosa cristalina, lactosa y almidón), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio y talco), aglutinantes (hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, macrogol y similares) y disgregantes (por ejemplo, almidón y sal de calcio de carboximetilcelulosa). Si es necesario, se pueden utilizar aditivos tales como agentes antisépticos (por ejemplo, alcohol bencílico, clorobutanol, paraoxibenzoato de metilo y paraoxibenzoato de propilo), antioxidantes, agentes colorantes, edulcorantes y similares. Otras formas alternativas incluyen agentes terapéuticos o agentes profilácticos para la aplicación sobre las membranas mucosas, conteniendo a menudo tales formulaciones aditivos tales como adhesivos sensibles a la presión, potenciadores sensibles a la presión, reguladores de la viscosidad, agentes espesantes y similares (por ejemplo, mucina, agar, gelatina, pectina, carragenano, alginato de sodio, goma de algarrobo, goma de xantano, goma de tragacanto, goma arábiga, quitosano, pululano, almidón céreo, sucralfato, celulosa y sus derivados (tales como hidroxipropilmetilcelulosa), ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, copolímeros de ácido acrílico-(met)acrilato de alquilo, o sus sales y ésteres de ácidos grasos de poliglicerol), principalmente con el propósito de conferir propiedades de adsorción o retención a la mucosa. Sin embargo, la forma, el disolvente y los aditivos para el agente terapéutico o el agente profiláctico que se administrará al organismo no se limitan a estas, y un experto en la técnica puede realizar una selección adecuada.

El agente terapéutico o profiláctico para trastornos cognitivos de acuerdo con la invención también abarca el concepto de un agente terapéutico o un agente profiláctico que comprenden sustancias existentes con efectos de inhibición del desarrollo del trastorno cognitivo, además del anticuerpo anti-tau fosforilada o péptido fosforilado mencionados anteriormente. Asimismo, el agente terapéutico o profiláctico para trastornos cognitivos según la invención puede ser parte de un kit para el uso combinado de un agente terapéutico o un agente profiláctico que contienen el anticuerpo anti-fosforilación o péptido fosforilado y un agente terapéutico o un agente profiláctico que contienen una sustancia existente con efectos de inhibición del desarrollo del trastorno cognitivo. Los ejemplos de sustancias que inhiben el desarrollo del trastorno cognitivo incluyen, pero no se limitan a, donepezilo, galantamina, memantina y rivastigmina. La dosificación de la sustancia con el efecto de inhibición del desarrollo del trastorno cognitivo que se va a añadir, o el agente terapéutico o el agente profiláctico que contienen la sustancia con el efecto de inhibición del desarrollo del trastorno cognitivo, puede ser una dosificación comúnmente utilizada para el tratamiento, que puede variar según las condiciones.

Asimismo, aunque los resultados de los ejemplos demuestran que el anticuerpo que se va a utilizar para llevar a cabo la invención muestra el efecto de un fármaco al actuar sobre el cerebro a través de la barrera hematoencefálica, incluso cuando se administra periféricamente por administración intraperitoneal, es posible preparar una formulación que suministra eficazmente un anticuerpo anti-tau fosforilada, que también se puede utilizar como un agente terapéutico o profiláctico para el trastorno cognitivo de la invención, al tejido cerebral, y tales formulaciones también están incluidas en el agente terapéutico o profiláctico para trastornos cognitivos según la invención. Se conocen métodos para suministrar eficazmente anticuerpos o péptidos al tejido cerebral a través de la barrera hematoencefálica, tales como los métodos para añadir sustancias de direccionamiento o los métodos para la encapsulación en liposomas o nanopartículas. Las sustancias que se van a utilizar para el direccionamiento incluyen aquellas que experimentan un cambio total o parcial en las características de carga mediante la unión con anticuerpos, péptidos, proteínas u otros compuestos que tienen la propiedad de unirse con un receptor o transportador específicos. Los ejemplos de péptidos, proteínas u otros compuestos que tienen una propiedad de unión con un receptor o proteína de membrana específicos incluyen ligandos que se unen a ligandos de receptores o proteínas de membrana, y sus análogos, y anticuerpos, compuestos agonistas/compuestos antagonistas/moduladores alostéricos que se unen a los ligandos de receptor o proteínas de membrana, y sus compuestos análogos. Los ejemplos de ligandos de receptores o proteínas de membrana como dianas para un péptido, proteína u otro compuesto que tienen la propiedad de unirse a un receptor

o transportador específico incluyen el receptor de transferrina (TfR), el receptor de insulina (IR), el receptor de factor de crecimiento de tipo insulínico (IGFR), la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP) y el receptor de toxina diftérica (HB-EGF), sin ninguna limitación particular para estos (Angela R. Jones et al., Pharm. Res., Vol. 24, pág. 1759-1771, 2007). Se puede añadir químicamente al anticuerpo una sustancia de direccionamiento para su uso como agente terapéutico o profiláctico para trastornos cognitivos de acuerdo con la invención, siendo el método uno que pueda ser llevado a cabo apropiadamente por un experto en la técnica con referencia a un método conocido tal como describen, por ejemplo, Hermanson et al., en Bioconjugate techniques, EE. UU 1996, Academic Press. La sustancia de direccionamiento también puede estar unida a liposomas o nanopartículas que encapsulan el anticuerpo o péptido (Sonu Bhaskar et al., Particle and Fibre Toxicology, Vol. 7, Núm. 3, 2010). Además, cuando la sustancia de direccionamiento es un péptido o proteína, un experto en la técnica la puede producir como una proteína de fusión apropiada utilizando técnicas de ingeniería genética, o bien produciendo un péptido de fusión mediante síntesis química de péptidos, o bien combinando un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos para el anticuerpo o péptido que se vaya a utilizar.

Se puede administrar un agente para el tratamiento o la prevención según la invención por vía oral o parenteral, con el fin de mejorar los síntomas. Para la administración oral, se puede seleccionar una forma de dosificación tal como gránulos, polvo, comprimidos, cápsulas, fármacos líquidos, jarabe, emulsión, agente de suspensión o elixir. Para la administración parenteral, se puede preparar un agente transnasal, y se puede seleccionar un fármaco líquido, suspensión o formulación sólida. Se puede preparar un inyectable como una forma diferente de administración parenteral, seleccionándose la inyección como inyección hipodérmica, inyección intravenosa, inyección por goteo, inyección intramuscular, inyección intracerebroventricular o inyección intraperitoneal. Otras formulaciones utilizadas para la administración parenteral incluyen supositorios, agentes sublinguales, agentes percutáneos y agentes de administración transmucosa distintos de los agentes transnasales. Además, la administración local intravascular es posible mediante un modo de adición o recubrimiento sobre un estent u obturador intravascular.

La dosis para un agente para tratamiento o prevención según la invención diferirá dependiendo de la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y los síntomas, el efecto terapéutico, el método de administración, el tiempo de tratamiento o los tipos de ingredientes activos en composición médica, pero normalmente se puede administrar en el intervalo de 0,1 mg a 1 g y preferiblemente en el intervalo de 0,5 mg a 200 mg de compuesto activo por administración para adultos. Sin embargo, dado que la dosis variará dependiendo de una variedad de condiciones, pueden ser suficientes dosis más bajas que las mencionadas anteriormente, o pueden ser necesarias dosis que excedan estos intervalos.

El agente para tratamiento o prevención de acuerdo con la invención puede mostrar un efecto dentro de un corto período de administración.

[Ejemplos]

La presente invención se explicará a continuación con mayor detalle por medio de ejemplos, entendiendo que los ejemplos no son limitantes de la invención de ninguna manera. Los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Experimentación Animal de la Universidad de la Ciudad de Osaka, Campus Abeno.

[Ejemplo 1] Preparación de anticuerpo policlonal de conejo para el péptido pSer413

El antígeno utilizado para preparar el anticuerpo para el péptido pSer413 fue un péptido sintético (SEQ ID NO: 31, sintetizado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. [MBL]) que tenía una Cys unida en el sitio C-terminal de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región de la Asn 410^a a la Ser 416^a de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para la proteína tau humana, fosforilada en la Ser correspondiente a la posición 413 (este péptido se denominará en adelante péptido pSer413 (S)).

Péptido pSer413(S): N-AsnValSer(pSer)ThrGlySerCys-C (SEQ ID NO: 31)

Después de la síntesis, el péptido pSer413(S) se purificó con HPLC y se unió covalentemente a KLH (Hemocianina de Lapa Californiana). El producto conjugado obtenido se utilizó para la inmunización con 0,1 mg por dosis por conejo. Para la primera inmunización, se mezclaron 0,2 mL de solución de producto conjugado (concentración de producto conjugado: 0,5 mg/mL) con una cantidad igual de coadyuvante completo de Freund, y se inyectaron por vía intradérmica, en el área dorsal de un conejo blanco japonés afeitado, en 8 lugares, 50 µL cada uno. Para la segunda y posteriores inmunizaciones, se utilizó el coadyuvante incompleto de Freund para dos inmunizaciones más similares cada 2 semanas. A las 2 semanas de la inmunización final, se tomó una muestra de sangre y se confirmó el título de anticuerpos del suero mediante ELISA utilizando producto conjugado de péptido inmunizado, y el animal se sacrificó después de 1 semana y se extrajo sangre completa. El suero se preparó a partir de la sangre obtenida, y los anticuerpos se purificaron del suero empleando una columna de afinidad del péptido pSer413(Af) (SEQ ID NO: 32).

El título de suero se confirmó por el siguiente método. El péptido pSer413(S) se diluyó a 5 µg/mL con PBS, y a continuación se dispensó en una placa a 100 µL/pocillo y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Después de retirar la solución, se dispensó el tampón de bloqueo (MBL Co.) a 250 µL/pocillo, y se dejó reposar la placa durante la noche a 4°C. La serie de diluciones para el suero de conejo previo a la inmunización y el suero de conejo posterior a la inmunización fue de 1:100, 1:500, 1:2.500, 1:12.500 y 1:62.500 veces, con una muestra diluida con PBS añadida a

100 µL/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos. Después de enjuagar, se añadió anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa (producto de MBL) diluida 8.000 veces con Tampón (MBL) a 100 µL/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos. Después de enjuagar, se añadió solución colorante (MBL) a 100 µL/pocillo para coloración durante 3 a 10 minutos, y a continuación se añadió ácido sulfúrico 2N a 100 µL/pocillo para terminar la reacción. Después de que terminara la reacción, se midió la absorbancia a una longitud de onda de medición de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620 nm.

La reactividad de anticuerpo del anticuerpo purificado se confirmó mediante el siguiente método. El péptido pSer413(L) [péptido pSer413 (S) (subrayado) extendido adicionalmente en las direcciones N-terminal y C-terminal (SEQ ID NO: 33, sintetizado por Biosynthesis Co.): N-ProArgHisLeuSerAsnValSer(pSer)ThrGlySerIleAspMetValAsp-C] o péptido NoP(L) que tenía la misma secuencia de aminoácidos pero sin fosforilar en el sitio correspondiente a Ser413 (SEQ ID NO: 34, sintetizado por Biosynthesis Co.) se diluyó a 1 µg/mL con PBS y a continuación se dispensó en una placa a 50 µL/pocillo, y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Después de retirar la solución, se dispensó el tampón de bloqueo (BSA-PBS al 3%) a 250 µL/pocillo, y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 1 hora o más. El anticuerpo purificado diluido con PBS y diluido seriadamente se añadió a 50 µL/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 90 minutos. Después de enjuagar, se diluyó anti-IgG de conejo de cabra marcada con fosfatasa alcalina (Bioscience) 2.000 veces con tampón de dilución (BSA-PBS al 3%) y se añadió a 50 µL/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos. Después de enjuagar, se añadió solución colorante (MgCl₂ 2,5 mM que contenía una solución tampón de dietanolamina 0,1 M, con 1 mg/mL de PNPP [fosfato de para-nitrofenilo] añadido a pH 9,8) a 100 µL/pocillo para la coloración durante 30 minutos, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm y una longitud de onda de referencia de 550 nm.

<Resultados>

Como se muestra en la Fig. 3, el anticuerpo purificado tenía una alta especificidad para el péptido pSer413(L), mientras que prácticamente no se observó reacción con el péptido no P(L). Por lo tanto, el anticuerpo es un anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo específicamente con pSer413(L) (a lo largo de toda la presente memoria descriptiva, también se puede denominar "anticuerpo policlonal de conejo marcado con pSer413" o "pS413AB").

[Ejemplo 2] Preparación de anticuerpo monoclonal para el péptido pSer413 (Serie Ta15)

El antígeno utilizado fue el péptido sintético pSer413 (Im) (SEQ ID NO: 35), que tenía GlyCysSerGly anclado al extremo N de la secuencia correspondiente a la región de la Thr 403^a a la Pro423^a, fosforilada en el residuo de aminoácido correspondiente a la Ser de la posición 413 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tau humana representada por SEQ ID NO: 1. Después de la síntesis, el péptido pSer413(Im) se purificó con HPLC y se unió covalentemente con KLH (Hemocianina de Lapa Californiana). El producto conjugado obtenido se utilizó para la inmunización con 0,04 mg por dosis por ratón. La inmunización se realizó mediante inyección intraperitoneal en 10 ratones a 200 µL de cada uno de una mezcla de 0,4 mL de solución de producto conjugado (1,1 mg/mL en términos de péptido), 0,7 mL de solución salina y 1,1 mL de coadyuvante completo de Freund. Se realizaron tres inmunizaciones similares más (con la misma ubicación de inmunización y dosis de antígeno, utilizando coadyuvante incompleto de Freund) cada 2 semanas. Un mes después de la inmunización final, se inyectaron 100 µL de una solución de antígeno de 0,5 mg/mL (disuelta en solución salina) en términos de péptido, en la vena caudal de un ratón entre los diez en los que había aumentado el título de anticuerpos en suero para el antígeno, y al tercer día se sacrificaron los animales y se recuperaron los bazos. Se emplearon dos agujas de inyección 18G para romper los bazos, y a continuación los bazos rotos se machacaron suavemente con la superficie de un tapón de goma. Los esplenocitos triturados se suspendieron en aproximadamente 10 mL de medio RPMI 1640 frío, el sobrenadante se filtró con un filtro de células de 40 µm, y el producto filtrado se recogió en un tubo de 50 mL. Los restos de las células del bazo se trituraron adicionalmente con la superficie de un tapón de goma, y se suspendieron de manera similar en medio RPMI 1640 frío, se filtraron y se recogió el producto filtrado. Se añadió medio RPMI 1640 frío (o PBS frío) a un volumen final de 40 mL para la suspensión de células de bazo. La concentración de linfocitos en la suspensión se midió con un hemocitómetro y linfocitos, en una cantidad final correspondiente a 2×10^7 células se transfirieron a un tubo de 50 mL. A esto se le añadió un equivalente de 4×10^7 células de la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8-U1 (P3-U1) en la etapa de crecimiento logarítmico, que se habían cultivado en la solución de cultivo B (RPMI 1640 + suero bovino fetal al 10% + glutamina 2 mM + 100 µg/mL de estreptomycin + 100 unidades/mL de penicilina), y después de centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se dispersó completamente golpeando ligeramente el tubo. A esto se le añadieron 0,5 mL de una solución de polietilenglicol (compuesta por RPMI 1640 (2,3 mL) + polietilenglicol 2000 (1,4 mL) + dimetilsulfóxido (0,3 mL), abreviada a continuación como "solución de PEG"), y las células se suspendieron suavemente. Después de 1 minuto, se añadieron lentamente 0,5 mL de solución de PEG gota a gota durante un período de 1 minuto, se añadieron lentamente 1,0 mL de RPMI 1640 gota a gota durante un período de 1 minuto, y después se añadieron lentamente 2 mL de RPMI 1640 gota a gota durante un período de 2 minutos. A continuación, se añadieron gota a gota a lo largo de un período de 2 minutos, 4 mL de solución de cultivo HAT/GIT (medio GIT [Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.] + suero bovino fetal al 5% + 100 µg/mL de estreptomycin + penicilina 100 unidades/mL + hipoxantina 95 µM + aminopterina 0,4 µM + timidina 16 µM), y a continuación se añadieron gota a gota 4 mL de solución de cultivo HAT/GIT durante un período de 2 minutos. Finalmente, se añadió solución de cultivo HAT/GIT para obtener de 40 a 50 mL de suspensión celular. Después de la incubación en un baño termostático a 37°C durante 30 minutos, la suspensión se sembró en 7 placas de cultivo (96 pocillos). Las placas de cultivo utilizadas fueron placas de 96 pocillos (placas alimentadoras) en las que se habían cultivado los macrófagos de la cavidad abdominal del ratón

(ICR) (células alimentadoras) durante varios días ($> 1 \times 10^5$ /pocillo). Las placas se cultivaron durante 7 a 10 días a 37°C, con 5% de CO₂.

La mitad de la solución de cultivo se reemplazó por una solución de cultivo HT (solución de cultivo HAT/GIT sin aminopterina) una vez por semana, y se obtuvieron hibridomas.

- 5 El escrutinio de anticuerpos se realizó mediante el siguiente método. El péptido pSer413(L) se diluyó a 1 µg/mL con PBS, y después se dispensó en una placa de 96 pocillos a 50 µL/pocillo y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Después de retirar la solución, se dispensó el tampón de bloqueo (BSA-PBS al 3%) a 250 µL/pocillo, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Se aspiró el tampón de bloqueo (BSA-PBS al 3%), se añadió el sobrenadante de hibridoma a 30-50 µL/pocillo y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos.
- 10 Después de enjuagar con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween20 al 0,05% (PBS-Tween), se añadió un anticuerpo secundario (una solución que contenía anticuerpo anti-IgG-Fc de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina [SouthernBiotech], diluido 2000 veces con tampón de bloqueo) en 100 µL/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos. Después de enjuagar, se añadió solución de sustrato (MgCl₂ 2,5 mM, que contenía tampón de dietanolamina 0,1 M, con 0,7 a 1,2 mg/mL de PNPP [fosfato de para-nitrofenilo] añadido a pH 9,8)
- 15 a 100 µL/pocillo para la coloración a 25°C durante 60 minutos, después de lo cual se midió la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm.

- En este escrutinio, las células se recuperaron de los pocillos positivos y se contaron con un hemocitómetro, y después se sembraron en una placa de 96 pocillos (la placa de alimentación anterior) a 1-3 células/pocillo, para la clonación por el método de dilución limitante (Ta1501, Ta1502, Ta1505-1509). Para el análisis posterior, los clones se cultivaron en masa y el anticuerpo se purificó con una columna de proteína G. Ta1505 es lo mismo que Ta1505-2. Los isotipos se determinaron utilizando un kit de AbD Serotec.
- 20

El anticuerpo purificado se hizo reaccionar con una placa de ELISA recubierta con un péptido parcial correspondiente a los diferentes sitios de fosforilación de tau, para determinar la especificidad del grupo fosfato. El método fue el siguiente.

- 25 Una solución de DMSO al 10% de cada péptido tau (pS46 [SEQ ID NO: 36], pS199 [SEQ ID NO: 37], pS202 [SEQ ID NO: 38], pT212 [SEQ ID NO: 39], pS214 [SEQ ID NO: 40], pT212/pS214 [SEQ ID NO: 41], pT217 [SEQ ID NO: 42], pS413 [SEQ ID NO: 33], no pS413 [SEQ ID NO: 34]), o una solución en PBS del péptido conjugado con BSA (pS400 [SEQ ID NO: 43]-BSA, pS412 [SEQ ID NO: 44]-BSA) se diluyeron a 1 µg/mL con PBS (pH 7) y se añadieron a una placa de 96 pocillos (MaxiSorp:Nunc) a 50 µL/pocillo, y después se incubaron durante la noche a 4°C para la inmovilización. A continuación, la solución de péptido se retiró y se enjuagó 3 veces con TBS que contenía Tween20 al 0,05%, después de lo cual se añadió BSA/PBS al 3% a 280 µL/pocillo y se realizó el bloqueo a 37°C durante 1 hora.
- 30

- La solución de bloqueo se aspiró, se enjuagó 3 veces con TBS que contenía Tween20 al 0,05%, y después se añadió 1 µg/mL de cada solución de anticuerpo monoclonal de la serie Ta15 en BSA-PBS al 3% a 50 µL/pocillo, y se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de enjuagar 3 veces con TBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadieron 50 µL de anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra marcado con fosfatasa alcalina (ThermoScience) diluido 2000 veces con PBS que contenía BSA al 3%, y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de enjuagar 3 veces con TBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadieron 100 µL de una solución de PNPP (fosfato de para-nitrofenilo) de 1 mg/mL disuelta en dietanolamina 0,1 M (pH 10), la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora, y se midió la absorbancia a 405 nm. Los resultados de la evaluación de reactividad de cada anticuerpo para cada péptido se muestran en la Tabla 2. La reactividad se evaluó en una escala de 3 niveles.
- 35
- 40

+: Reactividad, -: Sin reactividad, ±: Reactividad leve pero muy débil

[Tabla 2]

Especificidad de reacción de los respectivos grupos fosfato de tau
para el anticuerpo obtenido

MAb \ pTau	1501	1502	1505	1506	1507	1508	1509
pS46	—	—	—	—	—	—	—
pS199	—	—	—	—	—	—	—
pS202	—	—	—	—	—	—	—
pT212	—	—	—	—	—	—	—
pS214	—	—	—	—	—	—	—
pT212/pS214	—	—	—	—	—	—	—
pT217	—	—	—	—	—	—	—
pS400-BSA	—	—	—	—	—	—	—
pS412-BSA	—	—	—	—	—	—	—
pS413	+	+	+	+	+	+	+
No pS413	—	±	±	—	±	±	—

- 5 Estos anticuerpos (en lo sucesivo denominados "Serie Ta15") reaccionaron solamente con pSer413 entre los péptidos examinados, y la especificidad del grupo fosfato fue extremadamente alta.

[Ejemplo 3] Medición de la afinidad de unión del anticuerpo de la serie Ta15

- 10 Para evaluar la afinidad de unión entre los anticuerpos de la serie Ta15 y el péptido antigénico (péptido pSer413 (1m): véase el Ejemplo 2), se utilizaron un sistema de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) Biacore (BIACORE3000, código núm. BR-1100-45, de GE Healthcare, Japón) y cada producto Biacore para la medición de acuerdo con el manual del fabricante. Un método de medición utilizado fue un método de inmovilización (código núm. BR-1006-33) de anti-anticuerpo de ratón (código núm. BR-1008-38) sobre un chip CM5 (chip formado por capas de carboximetildextrano, código núm. BR-1100-14) mediante enlace covalente a través de la reacción de acoplamiento de amina, uniendo el anticuerpo de la Serie Ta15 al anti-anticuerpo de ratón inmovilizado y midiendo el comportamiento de unión del péptido antigénico al anticuerpo de la Serie Ta15 unido.

- 15 La mezcla de reacción de unión específica se utilizó con tampón HBS-EP (código núm. BR-T-1001-88), y el chip CM5 se activó mediante una solución mixta de hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Se hizo reaccionar una solución de anti-anticuerpo de ratón diluido a 0,001 mg/mL con tampón acetato de sodio 10 mM a pH 5,0 con 4 células de flujo en el chip, y después de unir covalentemente el anti-anticuerpo de ratón al chip CM5, se sometió a bloqueo con etanolamina. De las 4 células de flujo que inmovilizaban el anti-anticuerpo de ratón, una atrapó el anticuerpo negativo (control de isotipo IgG2a de ratón, código núm. MAB003, de R&D Systems), mientras que las otras células de flujo atraparon el anticuerpo de la Serie Ta15, a una densidad de aproximadamente 1000 UR cada una. El tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005% v/v) con NaCl 1 M añadido se hizo reaccionar durante 3 minutos y el anticuerpo adsorbido no específico se eliminó, y a continuación se hizo reaccionar el tampón HBS-EP durante 10 minutos a una velocidad de flujo de 50 µL/min para estabilizar el valor de referencia. El péptido se diluyó en serie con tampón HBS-EP desde una concentración de 100 pM a 5 mM (cerca de la constante de disociación de unión estimada [KD]), las soluciones de péptido obtenidas (5 concentraciones) se hicieron reaccionar durante 4 minutos y 6 minutos (uniforme) a intervalos de 6 minutos cada uno continuamente desde el extremo de baja concentración, y se midieron los comportamientos de unión.

- 20 En cuanto a los datos de comportamiento de unión específica para el péptido antigénico, los datos de comportamiento de unión se obtuvieron para un péptido no fosforilado (péptido no pSer413) como un péptido negativo, y esto se sustrajo de los datos de comportamiento de unión para el péptido antigénico, con el fin de eliminar los efectos del ruido producido por el procedimiento. No se observó unión del péptido no fosforilado al anticuerpo a las concentraciones de

medición. Los datos de comportamiento de unión específica se ajustaron con Single Cycle Kinetics 1:1, Modelo de unión con deriva, utilizando el soporte lógico de análisis Biacore (evaluación BIA: Single Cycle Kinetics Analysis, código núm. AP-4000-01) y la tasa de asociación cinética (K_a) y la tasa de disociación (K_d) se obtuvieron simultáneamente (Karlsson, R., Katsamba, P. S., Nordin, H., Pol, E. y Myszk, D. G. (2006). "Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors". *Anal Biochem.* 349(1):136-47). El valor de la constante de disociación de equilibrio (K_D), como la medida de afinidad para los anticuerpos de la serie Ta15, se calculó como K_d/K_a .

<Resultados>

[Tabla 3]

	K_a ($M s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
1501	$5,64 \times 10^4$	$1,05 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-8}$
1502	$1,12 \times 10^5$	$4,70 \times 10^{-4}$	$4,20 \times 10^{-9}$
1505	$1,29 \times 10^5$	$4,99 \times 10^{-4}$	$3,87 \times 10^{-9}$
1506	$1,99 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{-3}$	$9,75 \times 10^{-9}$
1507	$1,27 \times 10^5$	$5,33 \times 10^{-4}$	$4,20 \times 10^{-9}$
1508	$1,45 \times 10^5$	$9,80 \times 10^{-4}$	$6,76 \times 10^{-9}$
1509	$8,71 \times 10^4$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,44 \times 10^{-8}$

De los anticuerpos de la serie Ta15, el anticuerpo Ta1505 con la mayor afinidad por el péptido antigénico se utilizó en una prueba de comportamiento utilizando ratones con problemas de memoria.

[Ejemplo 4] Preparación de anticuerpo monoclonal que reconoce el péptido pSer396 y/o pSer404

Como antígeno se utilizó un péptido sintético (SEQ ID NO: 47, sintetizado por Biosynthesis Co.) que tenía GlyCys anclado al sitio N-terminal de la secuencia desde la Arg 379^a hasta la Leu 408^a y fosforilado en los residuos de aminoácidos correspondientes a las Ser de las posiciones 396 y 404 de la secuencia de aminoácidos de la proteína tau humana representada por SEQ ID NO: 1 (en lo sucesivo, será referido por tener el "péptido pSer396/pSer404").

Péptido pSer396/pSer404: N-GlyCys-ArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGlyAlaGluIleValTyrLys(pSer)ProValValSerGlyAspThr(pSer)ProArgHisLeu-C (SEQ ID NO: 47)

Después de la síntesis del péptido pSer396/pSer404, éste se purificó por HPLC y se unió covalentemente a KLH (Hemocianina de Lapa Californiana) activada con maleimida (Thermo Scientific). El producto conjugado obtenido se utilizó para la inmunización de ratones Balb/c con aproximadamente 0,04 mg por dosis por ratón. La inmunización se realizó mediante inyección intraperitoneal en 4 ratones a 100 μ L cada uno de una mezcla de 0,3 mL de solución de producto conjugado (0,77 mg/mL en términos de péptido) y 0,3 mL de coadyuvante completo de Freund. Dos de los ratones fueron inmunizados por inmunización intraperitoneal (con la misma cantidad de antígeno, utilizando adyuvante incompleto de Freund) e inmunización de la planta del pie (antígeno + coadyuvante Titer Max), mientras que los otros dos fueron inmunizados solo por inmunización intraperitoneal, y esto se repitió dos veces a intervalos de 2 semanas. Los ratones inmunizados por inmunización intraperitoneal e inmunización de la planta del pie, que presentaban un aumento de los títulos de anticuerpo en suero para el antígeno, recibieron inyecciones de solución de antígeno (disuelto en solución salina) a través de la vena caudal 15 días después de la inmunización final, y después de 3 días se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazo. Se utilizaron dos agujas de inyección 18G para romper los bazo, y a continuación los bazo rotos se machacaron suavemente con la superficie de un tapón de goma. Los esplenocitos triturados se suspendieron en aproximadamente 10 mL de medio RPMI 1640 frío, el sobrenadante se filtró con un filtro de células de 40 μ m, y el producto filtrado se recogió en un tubo de 50 mL. Los restos de las células del bazo se trituraron adicionalmente con la superficie de un tapón de goma, y se suspendieron de manera similar en medio RPMI 1640 frío, se filtraron y se recogió el producto filtrado. Se añadió medio RPMI 1640 frío (o PBS frío) a un volumen final de 40 mL para la suspensión de las células de bazo. La concentración de linfocitos en la suspensión se midió con un hemocitómetro y los linfocitos, en una cantidad final correspondiente a 2×10^7 células, se transfirieron a un tubo de 50 mL. A esto se le añadió un equivalente de 4×10^7 células de la línea celular de mieloma de ratón P3-U1 en la etapa de crecimiento logarítmico, que se habían cultivado en la solución de cultivo B (RPMI 1640 + suero bovino fetal al 10% + glutamina 2 mM + 100 μ g/mL de estreptomina + 100 unidades/mL de penicilina), y después de centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se dispersó completamente golpeando ligeramente el tubo de ensayo. A esto se le añadió una solución de 0,5 mL de PEG y las células se suspendieron suavemente. Después de 1 minuto, se añadieron lentamente 0,5 mL de solución de PEG gota a gota durante un período de 1 minuto, se añadieron lentamente 1,0 mL de RPMI 1640 gota a gota durante un período de 1 minuto, y después se añadieron lentamente 2 mL de RPMI 1640 gota a gota durante un período de 2 minutos. A continuación, 4 mL de solución de cultivo HAT/GIT (medio GIT [Nihon Pharmaceutical Co., Ltd.] + suero bovino fetal

al 5% + 100 µg/mL de estreptomicina + 100 unidades/mL de penicilina + hipoxantina 95 µM + aminopterin 0,4 µM + timidina 16 µM) se añadió gota a gota durante un período de 2 minutos, y a continuación se añadieron gota a gota 4 mL de solución de cultivo HAT/GIT durante un período de 2 minutos. Finalmente, se añadió solución de cultivo HAT/GIT para obtener de 40 a 50 mL de suspensión celular. Después de la incubación en un baño termostático a 37°C durante 30 minutos, la suspensión se sembró en 7 placas de cultivo (96 pocillos). Las placas de cultivo utilizadas fueron placas de 96 pocillos (placas alimentadoras) en las que se habían cultivado los macrófagos de la cavidad abdominal del ratón (ICR) (células alimentadoras) habían sido cultivados durante varios días ($> 1 \times 10^5$ /pocillo). Las placas se cultivaron después durante 7 a 10 días a 37°C, con 5% de CO₂.

La mitad de la solución de cultivo se reemplazó por solución de cultivo HT (solución de cultivo HAT/GIT sin aminopterin) una vez por semana, y se obtuvieron hibridomas.

El escrutinio de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo de la siguiente manera. Los antígenos de escrutinio utilizados fueron péptido pSer396/pSer404-BSA, que tenía BSA conjugada con la Cys N-terminal del péptido pSer396/pSer404 (N-GlyCys-ArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGlyAlaGluIleValTyrLys(pSer)ProValValSerGlyAspThr(pSer)ProArgHisLeu-C) (SEQ ID NO: 47), y péptido no fosforilado-BSA, que tenía BSA conjugada con la Cys N-terminal de un péptido no fosforilado (N-GlyCys-ArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGlyAlaGluIleValTyrLysSerProValValSerGlyAspThrSerProArgHisLeu-C) (SEQ ID NO: 48). El péptido no fosforilado-BSA o el péptido pSer396/pSer404-BSA se diluyeron a 1 µg/mL con PBS, y después se dispensaron en una placa de 96 pocillos a 50 µL/pocillo y se dejaron reposar durante la noche a 4°C. Después de retirar la solución, se dispensó tampón de bloqueo (BSA-PBS al 3%) a 250 µL/pocillo, y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora o más. Se aspiró el tampón de bloqueo (BSA-PBS al 3%), se añadió el sobrenadante de hibridoma a 30-50 µL/pocillo y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos. Después de enjuagar con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween20 al 0,05% (PBS-Tween), se añadió un reactivo de detección (una solución que contenía proteína A marcada con fosfatasa alcalina, diluida 2000 veces con tampón de bloqueo) a 100 µL/pocillo, y la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 60 minutos. Después de enjuagar, se añadió solución de sustrato (tampón de dietanolamina 0,1 M que contenía MgCl₂ 2,5 mM, con 0,7 a 1,2 mg/mL de PNPP [fosfato de para-nitrofenilo] añadido a pH 9,8) a 100 µL/pocillo para la coloración a 25°C durante 60 minutos, después de lo cual se midió la absorbancia a una longitud de onda de medición de 405 nm.

Las células se recuperaron de los pocillos que tenían baja reactividad con el péptido no fosforilado-BSA y alta reactividad con el péptido pSer396/pSer404-BSA, y se sembraron en una placa de 96 pocillos (la placa de alimentación anterior) a 1-3 células/pocillo, para la clonación por el método de dilución limitante. Los clones que producían el anticuerpo Ta9 (IgG3/k) se seleccionaron de entre estos. Para el análisis posterior, los clones se cultivaron en masa y el anticuerpo se purificó con una columna de proteína G.

Tras medir el valor de KD del anticuerpo Ta9 para el péptido pSer396/pSer404 por el método descrito en el Ejemplo 3, se encontró que era $1,08 \times 10^{-10}$, con una afinidad por el péptido que era mayor que la de los anticuerpos de la serie Ta15.

[Ejemplo 5] Prueba de comportamiento: Efecto de los anticuerpos obtenidos en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria

Se examinaron los efectos de administrar los siguientes tres anticuerpos en ratones con deterioro de aprendizaje de memoria (Tau-Tg).

- (1) Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce pSer413: ratones Tau-Tg (línea 609) o ratones no Tg (control normal), 9-11 meses de edad, n = 9-10/grupo
- (2) Ta1505 (anticuerpo monoclonal que reconoce pSer413): ratones Tau-Tg (línea 784) o ratones no Tg, 14 meses de edad, n = 9-10/grupo
- (3) Ta9 (anticuerpo monoclonal que reconoce pSer396): ratones Tau-Tg (línea 609) o ratones no Tg, 14 meses de edad, n = 9-10/grupo

Para el experimento, se utilizaron ratones Tau-Tg heteromutantes macho (línea 609 o línea 784) y compañeros de camada no Tg, de 9 a 14 meses de edad. Los grupos se dividieron de manera que no hubiera diferencia en el peso promedio entre los grupos. Los ratones heteromutantes Tau-Tg recibieron anticuerpo diluido con PBS o tampón citrato (pH 5), una vez por semana, durante un total de 5 veces, en la cavidad abdominal a 1 mg por ratón por administración. Como grupo de control negativo, se administraron el tampón utilizado para preparar el anticuerpo, o el anticuerpo monoclonal IgG de ratón sin reactividad para tau, en la cavidad abdominal a la misma dosificación. Como control positivo, a los compañeros de camada que no eran Tg se les administró el tampón empleado para preparar el anticuerpo, en la cavidad abdominal a la misma dosis.

Las estructuras para los grupos (1) a (3) se muestran a continuación.

(1) <Ratones empleados>: Mutante Tau-Tg (línea 609), de 9 a 11 meses de edad,

<Estructura del grupo>

Grupo de anticuerpos de evaluación: 1,6 mg/mL de anticuerpo policlonal de conejo anti-tau pSer413 en PBS (n = 10)

Grupo de anticuerpos de control: PBS (n = 9)

5 Grupo no Tg: PBS (n = 9)

(2) <Ratones empleados>: Mutante Tau-Tg (línea 784), 14 meses de edad.

<Estructura del grupo>

Grupo de anticuerpos de evaluación: 3,84 mg/mL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-tau pSer413 Ta1505 en tampón de citrato 0,1 M (pH 5) (n = 10)

10 Grupo de anticuerpos de control: 4,28 mg/mL de anticuerpo monoclonal de ratón *anti-Pseudomonas aeruginosa* 4C10F4 en tampón de citrato 0,1 M (pH 5) (n = 9)

Grupo no Tg: tampón de citrato 0,1 M (pH 5) (n = 9)

(3) <Ratones empleados>: Mutante Tau-Tg (línea 609), 14 meses de edad.

<Estructura del grupo>

15 Grupo de anticuerpos de evaluación: 2,66 mg/mL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-tau pSer396 Ta9 en tampón de citrato 0,02 M (pH 6) (n = 10)

Grupo de anticuerpos de control: 4,50 mg/mL de anticuerpo monoclonal *anti-Pseudomonas aeruginosa* 6F11 en tampón de citrato 0,02 M (pH 6) (n = 9)

Grupo no Tg: tampón de citrato 0,02 M (pH 6) (n = 9)

20 Desde el lunes de la semana siguiente a la administración final, se realizó una prueba de memoria de referencia espacial utilizando un laberinto de agua de Morris (prueba de laberinto de agua). El día siguiente a la finalización de la prueba del laberinto de agua, se utilizó un aparato de campo abierto para medir la cantidad de movimiento activo de los ratones (Prueba de Campo Abierto).

<Prueba de laberinto de agua: Igual para los grupos (1) a (3)>

25 Preparación: Una piscina de color negro con un diámetro interno de 100 cm y una altura de 45 cm se llenó con agua hasta una profundidad de 16 cm. La temperatura del agua se ajustó a 21-23 grados, manteniendo una transparencia incolora sin coloración con óxido de titanio o similar. No se añadió cloro, y después de cada día de prueba se eliminaron las heces y se reemplazaron aproximadamente 10 L de agua.

30 Prueba de estudio (Adquisición): Se sumergió una plataforma transparente de 15 cm de altura en una posición a 20 cm de la pared (30 cm del centro). Con la partición en 4 cuadrantes, incluida la ubicación donde se sumergió la plataforma, los ratones se introdujeron aleatoriamente desde uno de los 3 cuadrantes sin la plataforma. El límite para cada prueba fue de 60 segundos, realizándose 5 pruebas por día. El intervalo entre las pruebas fue de aproximadamente 5 minutos. El "tiempo de escape" para llegar a la plataforma se registró como dato. Los ratones que no escaparon en 60 segundos fueron dirigidos a la plataforma por la mano del operario, y el tiempo de escape se trató como 60 segundos. El ratón sobre la plataforma se retiró de la piscina después de 10 segundos y se dejó que se comportara libremente hasta la siguiente prueba, secando su cuerpo. Los resultados para cada ratón en cada día se registraron como el número promedio de segundos para los tiempos de escape de las 5 pruebas.

La prueba de adquisición se completó cuando los resultados para el grupo de control (no Tg) se estabilizaron, y se realizó una prueba de sonda al día siguiente.

40 Prueba de sonda: el día siguiente al último día, se retiró la plataforma de la piscina y se fotografió la natación libre con una cámara de video durante 60 segundos. Se observó el video fotografiado y se midió el tiempo durante el cual los ratones que nadaban libremente nadaban en el cuadrante que había contenido la plataforma (cuadrante diana) entre los 4 cuadrantes, y se expresó como un porcentaje de los 60 segundos. Durante este tiempo, también se analizó la natación hasta 30 segundos después de la introducción en la piscina.

45 La prueba significativa para el estudio (adquisición) se realizó mediante medición repetida y PLSD de Fisher, y la prueba significativa para la prueba de sonda por PLSD de Fisher.

<Prueba de Campo Abierto: igual para los grupos (1) a (3)>

Aparato: Se utilizó un tablero acrílico transparente de 5 mm de espesor para crear una caja cuadrada de 30 x 30 x 30 cm, y se almacenó en un entorno insonorizado. Se colocó una lámpara incandescente de 40 W sobre el entorno de almacenamiento y la superficie del piso se irradió con una iluminancia de 110 lux.

5 Cantidad de comportamiento: (i) Se establecieron haces infrarrojos en el exterior de los lados de la caja acrílica en ubicaciones a 1,5 cm de la superficie del piso, a una distancia de 10 cm. Cuando el ratón bloqueaba continuamente 2 haces, se detectaba la locomoción y se contaba.

(ii) Se proporcionaron superficies de haz infrarrojo en ubicaciones de dos lados opuestos, a 3,5 cm de la superficie del piso. Cuando el ratón bloqueaba una porción de la superficie del haz, se detectaba la posición erguida y se contaba.

10 Prueba: Cada ratón se sometió a una única sesión de 20 minutos. El ratón se introdujo en la sección central de la caja acrílica y, al cerrar rápidamente la puerta para crear un ambiente insonorizado, se inició la sesión.

Los primeros 10 minutos de la sesión fueron de actividad libre bajo condiciones de luz, mientras que durante los últimos 10 minutos, la iluminación cesó para determinar actividad libre bajo condiciones de oscuridad.

15 Análisis: La cantidad de comportamiento de cada ratón cada minuto se indicó en un gráfico lineal, para la locomoción y la posición erguida.

La percepción visual normal se definió como la reacción al cambio del entorno a las condiciones oscuras 10 minutos después del inicio de la sesión, por lo que el ratón mostraba un cambio en la cantidad de comportamiento.

La cantidad de cada comportamiento en condiciones de luz y oscuridad, y la cantidad de comportamiento total durante 20 minutos, se representaron en un gráfico de barras.

20 Se realizó una prueba significativa entre los grupos para determinar la cantidad de comportamiento total de locomoción y de posición erguida.

La locomoción representa una gran cantidad de comportamiento esencialmente espontáneo, mientras que la posición erguida representa un comportamiento esencialmente exploratorio, pero de hecho ambos indicadores tienen influencia mutua (ejemplo: incluso cuando la locomoción parece reducirse, si la posición erguida aumenta durante ese tiempo, no se puede decir que la cantidad de comportamiento se haya reducido).

<Prueba inmunohistoquímica: solamente para el grupo (2)>

Al finalizar la prueba de comportamiento, se seleccionaron 5 ratones de cada grupo y se fijaron por perfusión con formalina. Después de la inclusión en parafina, se preparó una rebanada delgada del cerebro utilizando un microtomo y se trató 4 veces con xileno y etanol cada 10 minutos, como tratamiento de desparafinación. A continuación se hirvió durante 30 minutos en tampón de ácido cítrico (pH 6) (tratamiento de activación de antígeno) y se hizo volver a la temperatura ambiente, después de lo cual se enjuagó dos veces con solución salina fisiológica tamponada con Tris (TS) durante 10 minutos. Después de bloquear durante 60 minutos a temperatura ambiente con TS que contenía suero bovino al 20%, se montó el anticuerpo anti-sinaptofisina humana de ratón (SVP-38 diluido 200 veces con TS que contenía suero bovino al 10%, de Sigma) y se realizó el tratamiento durante la noche a 4°C. Después de enjuagar dos veces con TS durante 10 minutos, se montó el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC (el anticuerpo diluido 20 veces con TS que contenía suero bovino al 10%, de Vector), y se realizó el tratamiento a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de enjuagar dos veces con TS durante 10 minutos, se montó VECTASHIELD (Vector) y se realizó la observación con un microscopio. La intensidad de fluorescencia se cuantificó y digitalizó con NIH imageJ, y se expresó en unidades arbitrarias.

<Resultados>

1. Efectos de cada administración de anticuerpo sobre el deterioro de la memoria

(1) Anticuerpo policlonal de conejo contra pSer413

Los resultados para (1-1) a (1-3) se muestran en la Fig. 4 a la Fig. 7. Para resumir, la inmunización pasiva con anticuerpo policlonal anti-pSer413 mejoró notablemente el deterioro de la memoria en los ratones modelo (Tau-Tg) al mismo nivel que los no Tg. En (1-3), no se observaron diferencias significativas en el movimiento activo y la percepción visual entre los grupos.

(2) Anticuerpo monoclonal de ratón contra pSer413 (anticuerpo 1505)

Los resultados para (2-1) a (2-3) se muestran en la Fig. 8 a la Fig. 11. Para resumir, la inmunización pasiva con anticuerpo monoclonal anti-pSer413 mejoró notablemente el deterioro de la memoria en los ratones modelo al mismo nivel que los no Tg. En (2-3), no se observaron diferencias significativas en el movimiento activo y la percepción visual entre los grupos.

Basándose en los resultados de (2-1) y (2-2), se concluyó que el epítipo pSer413 era un epítipo satisfactorio como diana para la terapia de inmunización pasiva, tanto para anticuerpos policlonales como para anticuerpos monoclonales.

(3) Anticuerpo monoclonal de ratón contra pSer396 (anticuerpo Ta9)

Los resultados para (3-1) a (3-3) se muestran en la Fig. 12 a la Fig. 15. Para resumir, la administración de Ta9 mejoró significativamente el deterioro de la memoria al mismo nivel que en los no Tg. En (3-3), no se observaron diferencias significativas en el movimiento activo y la percepción visual entre los grupos.

Sin embargo, cuando se comparó Ta9 con Ta1505, se descubrió que su efecto farmacológico era más débil. Aunque la afinidad del antígeno fue Ta9 > Ta1505 (véanse los Ejemplos 2 y 3), el efecto del fármaco fue Ta9 < Ta1505 (Ejemplo 5), lo que sugiere una diferencia significativa en el efecto del fármaco debido a diferencias en el epítipo de fosforilación.

[Ejemplo 6] Efectos de la administración de anticuerpo Ta1505 sobre la función neural

Los efectos de la administración del anticuerpo Ta1505 sobre los niveles de sinaptofisina, conocido como marcador que refleja la función neural, se examinaron mediante inmunotinción del anticuerpo anti-sinaptofisina en la región del hipocampo CA3, que es un centro de memoria. La intensidad de fluorescencia se cuantificó mediante NIH-Image J.

Los resultados se muestran en la Fig. 16. Con la administración del anticuerpo Ta1505 se observó una recuperación en los niveles de sinaptofisina del hipocampo, aunque no en un grado significativo.

[Ejemplo 7] Secuenciación de nucleótidos del ADNc del anticuerpo monoclonal de la serie Ta15

(1) Purificación del ARN total del hibridoma

Se cultivaron hibridomas que producían diferentes anticuerpos monoclonales, y se utilizó 1 ml de ISOGEN por pocillo de una placa de 6 pocillos para lisar las células. Después de añadir 0,2 mL de cloroformo al producto lisado y mezclar con un vórtice, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. La centrifugación se realizó a 12.000 rpm, 4°C durante 10 minutos, y la capa superior se transfirió a un nuevo tubo. Después de añadir 0,5 mL de alcohol isopropílico y mezclar, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se centrifugó a 15.000 rpm, 4°C durante 15 minutos para precipitar el ARN total. Después de añadir 1 mL de etanol del 75% al sedimento y mezclar completamente, se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C durante 5 minutos. El sedimento se secó al aire, se disolvió en agua libre de ADNasa/ARNasa y se almacenó a -80°C.

(2) Obtención de ADNc de la cadena H y la cadena L por 5'-RACE y 3'-RACE y secuenciación de nucleótidos de estos ADNc

Los cebadores se sintetizaron para 5'-RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc) y 3'-RACE, basándose en las secuencias de ADNc conocidas de las regiones constantes de las cadenas H de IgG2a e IgG2b de ratón. Los cebadores se sintetizaron de manera similar para 5'-RACE (Amplificación Rápida de Extremos de ADNc) y 3'-RACE, basándose en la secuencia de ADNc de la región constante de la cadena L de ratón.

Por separado, se utilizó 1 µg de ARN total obtenido de los hibridomas para la síntesis de ADNc para 5'-RACE y 3'-RACE utilizando un kit SMART-RACE (producto de Clontech), y se llevaron a cabo 5'-RACE y 3'-RACE. La reacción de PCR se realizó utilizando Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los productos de PCR obtenidos por 5'-RACE y 3'-RACE se sometieron a electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN amplificado principal se cortó del gel de agarosa, se insertó en un vector de clonación TA (Invitrogen) y se empleó para transformar *E. coli*, obteniendo varios clones. Los plásmidos se prepararon a partir de los transformantes mediante un método establecido, y se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN insertado.

(3) Obtención de ADNc completo de la cadena H y la cadena L y secuenciación de nucleótidos de estos ADNc

Las secuencias de ADNc que codificaban el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la cadena H y la cadena L se determinaron basándose en la información de la secuencia de nucleótidos, y los cebadores directo e inverso se diseñaron para la amplificación de la secuencia completa. Estos cebadores se utilizaron para la amplificación de las longitudes completas de la cadena H y la cadena L empleando Prime STAR MaxPCR (TaKaRa), y los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pEF4. Esto se utilizó para la determinación final de las secuencias de ADNc completas.

La traducción a las secuencias de aminoácidos se realizó basándose en la información obtenida de la secuencia de nucleótidos, y se utilizó IgBLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) para identificar las regiones CDR por el método de Kabat (Kabat, E.A. y Wu, T.T., J. Immunol., 147, 1709-1719, 1991).

Las secuencias de las regiones CDR obtenidas se enumeran a partir de SEQ ID NO: 14 en adelante.

La información relacionada con las secuencias de CDR de los anticuerpos que reconocen específicamente pSer413 se obtuvo de la homología con estas secuencias (Tablas 4 a 6).

[Tabla 4]

Secuencias de aminoácidos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del anticuerpo monoclonal

Clon de anticuerpos monoclonales	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
Ta1501	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
Ta1502	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
Ta1505	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13
Ta1506	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13
Ta1507	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
Ta1508	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 13
Ta1509	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 13

[Tabla 5]

5 Anticuerpos monoclonales CDR-L1, CDR-L2 y secuencias de aminoácidos CDR-L3

Clon de anticuerpos monoclonales	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
Ta1501	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1502	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1505	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1506	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1507	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1508	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
Ta1509	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17

[Tabla 6]

Secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo monoclonal

Clon de anticuerpos monoclonales	VH	VL
Ta1501	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 25
Ta1502	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 26
Ta1505	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 26
Ta1506	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 27
Ta1507	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 28
Ta1508	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 29
Ta1509	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 30

10 **[Ejemplo 8] Prueba de comportamiento: Efecto de los anticuerpos obtenidos sobre ratones con deterioro de aprendizaje de memoria**

Se examinó el efecto de la administración de los siguientes dos anticuerpos sobre ratones con deterioro de aprendizaje de memoria, con una dosis de 0,1 mg.

15 (4) Ta1505 (anticuerpo monoclonal que reconoce pSer413): ratones Tau-Tg (línea 784) o ratones no Tg, 10 meses de edad, n = 9-10/grupo

(5) Ta9 (anticuerpo monoclonal que reconoce pSer396): ratones Tau-Tg (línea 784) o ratones no Tg, 11 meses de edad, n = 8-10/grupo

Para el experimento se utilizaron ratones Tau-Tg heteromutantes macho (línea 784) y sus compañeros de camada no Tg, de 10-11 meses de edad. Los grupos se dividieron para que no hubiera diferencia en el peso promedio entre los grupos. A los ratones Tau-Tg heteromutantes se les administró anticuerpo diluido con PBS, una vez por semana, durante un total de 5 veces, en la cavidad abdominal a 0,1 mg por ratón por administración. Como grupo de control negativo, se administraron el PBS utilizado para preparar el anticuerpo, o el anticuerpo monoclonal IgG de ratón sin reactividad para tau, en la cavidad abdominal a la misma dosis. Como control positivo, a los compañeros de camada no Tg se les administró el PBS utilizado para preparar el anticuerpo, en la cavidad abdominal a la misma dosis.

Las estructuras para los grupos (4) a (5) se muestran a continuación.

(4) <Ratones utilizados>: Mutante Tau-Tg (línea 784), 10 meses de edad.

<Estructura del grupo>

Grupo de anticuerpos de evaluación: 0,25 mg/mL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-tau pSer413 Ta1505 en PBS (n = 10)

Grupo de anticuerpos de control: 0,25 mg/mL de anticuerpo monoclonal de ratón *anti-Pseudomonas aeruginosa* 4C10F4 en PBS (n = 10)

Grupo no Tg: PBS (n = 9)

(5) <Ratones utilizados>: Mutante Tau-Tg (línea 784), 11 meses de edad.

<Estructura del grupo>

Grupo de anticuerpos de evaluación: 0,25 mg/mL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-tau pSer396 Ta9 en PBS (n = 10)

Grupo de anticuerpos de control: 0,25 mg/mL de anticuerpo monoclonal *anti-Pseudomonas aeruginosa* 6F11 en PBS (n = 8)

Grupo no Tg: PBS (n = 8)

Desde el lunes de la semana siguiente a la administración final, se realizó una prueba de memoria de referencia espacial utilizando un laberinto de agua de Morris (prueba de laberinto de agua). La prueba del laberinto de agua se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 5.

<Resultados>

1. Efectos de cada administración de anticuerpo sobre el deterioro de la memoria.

(4) Anticuerpo monoclonal de ratón contra pSer413 (anticuerpo 1505)

Los resultados para la Prueba de estudio (4-1) y la Prueba de sonda (4-2) se muestran en las Fig. 18 y Fig. 19. Para resumir, la inmunización pasiva con anticuerpo monoclonal anti-pSer413 mejoró el deterioro de la memoria en los ratones modelo un nivel de 50% o más en comparación con los no Tg.

Los resultados de (4-1) y (4-2) confirmaron un efecto del fármaco para el anticuerpo monoclonal para el epítipo pSer413 incluso a una dosis de 0,1 mg.

(5) Anticuerpo monoclonal de ratón contra pSer396 (anticuerpo Ta9)

Los resultados para la Prueba de estudio (5-1) y la Prueba de sonda (5-2) se muestran en las Fig. 20 y Fig. 21. Para resumir, el deterioro de la memoria no mejoró con la administración de Ta9 a una dosis de 0,1 mg.

Estas pruebas sugieren aún más claramente una diferencia en el efecto del fármaco a una dosis de 0,1 mg, debido a las diferencias en el epítipo de fosforilación.

La administración de anticuerpo a 0,1 mg por ratón corresponde a la administración a una dosis de aproximadamente 2,5 mg/kg.

[Ejemplo 9] Cambio en el nivel de Tau fosforilada en el cerebro por la administración de anticuerpo Ta1505

El efecto de la administración del anticuerpo Ta1505 sobre los niveles de Tau fosforilada en los cerebros de ratones Tau-Tg se examinó mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpo Ta1505 que reconoce pSer413 y anticuerpo AT8 (epítipo pSer202/pThr205 que reconoce PHF), en la región del hipocampo, que son centros de memoria.

Al finalizar la prueba de comportamiento, se seleccionaron 5 ratones de cada grupo y se fijaron por perfusión con paraformaldehído/PBS al 4%. Se extrajeron los cerebros y se incluyeron en parafina, y se prepararon rodajas delgadas

de 5 µm con un microtomo. Después del tratamiento 4 veces con xileno y etanol durante 10 minutos cada vez, se realizó un tratamiento de desparafinación y las rodajas se sometieron a un tratamiento de ebullición (tratamiento de activación de antígeno) durante 10 minutos a pH 2, temperatura ambiente. Después de la restauración a temperatura ambiente, se enjuagaron dos veces con solución salina fisiológica Tris-HCl (TS) durante 10 minutos. Luego se realizó el bloqueo durante 60 minutos a temperatura ambiente utilizando TS que contenía suero bovino al 20%.

Los anticuerpos anti-tau (Ta1505, AT8) diluidos a 1 µg/mL con suero bovino al 10% que contenía TS, se montaron para el tratamiento durante la noche a 4°C. Después de enjuagar dos veces con TS durante 10 minutos, se montó el anti-anticuerpo de ratón marcado con biotina (Vector Co.) diluido 500 veces con TS que contenía suero bovino al 10%, para el tratamiento a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Después de enjuagar dos veces con TS durante 10 minutos, se montó una solución ABC marcada con HRP (Vector Co.) para la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después de enjuagar adicionalmente, se realizó la coloración con diaminobencidina (DAB). Esto fue encapsulado con Entellan (Merck) y observado y fotografiado.

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica con Ta1505 se muestran en la Fig. 22 a la Fig. 24.

Como se ve en la Fig. 22, se observó una tinción de Tau positiva para Ta1505 en la región del hipocampo CA3 (primera columna desde la izquierda) y la región del hipocampo CA23 (segunda columna desde la izquierda) en 5 individuos del grupo de control al que se había administrado IgG, pero los niveles de tinción en la región del hipocampo CA3 (tercera columna desde la izquierda) y la región del hipocampo CA23 (cuarta columna desde la izquierda) en 5 individuos del grupo al que se había administrado Ta1505 fueron claramente más bajos que en el grupo al que se había administrado IgG de control. Esto confirmó que la administración de Ta1505 reducía la Tau positiva para Ta1505, es decir, Tau fosforilada con Ser413, en la región del hipocampo CA3 y la región del hipocampo CA23. Más específicamente, el grupo con IgG de control mostró puntos marrones finos acumulados, que se tiñeron en una línea gruesa de izquierda a derecha en CA3. Con CA23, una curva gruesa se tiñó desde la parte superior derecha hacia el lado izquierdo. El grupo al que se había administrado Ta1505 tenía puntos marrones delgados muy finos, con una línea de tinción gruesa desde la parte superior izquierda hacia la parte inferior derecha en CA3. Con CA23, una curva gruesa se tiñó desde la parte superior derecha hacia el lado izquierdo. Prácticamente no se observó tinción en cuatro regiones CA3 y tres regiones CA23.

En las Fig. 23 y 24, se observó tinción de Tau positiva para AT8 en las regiones de la corteza (Corteza Perirrinal (primera columna desde la izquierda en la Fig. 23), la Corteza Entorrinal Lateral (segunda columna desde la izquierda en la Fig. 23) y Corteza Entorrinal Media (tercera columna desde la izquierda en la figura 23)), para cinco individuos en el grupo al que se había administrado IgG de control (Tinción como manchas marrones en la Fig. 23.)

Los niveles de tinción en las regiones de la corteza (Corteza Perirrinal (primera columna desde la izquierda en la Fig. 24), Corteza Entorrinal Lateral (segunda columna desde la izquierda en la Fig. 24) y Corteza Entorrinal Media (tercera columna desde la izquierda en la Fig. 24)), se redujeron claramente por debajo de los del grupo al que se había administrado IgG de control, para cinco individuos en el grupo al que se había administrado Ta1505, a un nivel que no mostró tinción.

Esto confirmó que la administración de Ta1505 redujo la Tau positiva para Ta1505, es decir, la Tau fosforilada en Ser413, en las regiones de la corteza (Corteza Perirrinal, Corteza Entorrinal Lateral, Corteza Entorrinal Medial).

La tinción en manchas marrones está presente en la Fig. 23, pero prácticamente no se puede ver la mancha marrón en la Fig. 24.

Se confirmó que la administración de anticuerpo Ta1505 reducía los niveles de Tau fosforilada en Ser413 en el cerebro (= región del hipocampo CA3, región del hipocampo CA23, PRh, Ent (Lateral, Media)).

PRh = Corteza Perirrinal

Ent = Corteza Entorrinal

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica con AT8 se muestran en la Fig. 25 a la Fig. 27.

Como se ve en la Fig. 25, se observó tinción de Tau positiva para AT8 en la región CA3 del hipocampo (primera columna desde la izquierda) y la región CA23 del hipocampo (segunda columna desde la izquierda) en 5 individuos del grupo de control a los que se había administrado IgG, pero los niveles de tinción en la región del hipocampo CA3 (tercera columna desde la izquierda) y la región del hipocampo CA23 (cuarta columna desde la izquierda) en 5 individuos del grupo al que se había administrado Ta1505 fueron claramente más bajos que en el grupo al que se había administrado IgG de control. Esto confirmó que la administración de Ta1505 reducía la Tau positiva para AT8, es decir, Tau fosforilada en Ser202/Thr205, en la región del hipocampo CA3 y la región del hipocampo CA23. Más específicamente, en la Fig. 25, el grupo con IgG de control mostraba puntos marrones finos acumulados, que se teñían en una línea gruesa desde la parte superior izquierda a la parte inferior derecha, con CA3. Con CA23, una curva gruesa se teñía desde la parte superior derecha hacia el lado izquierdo. El grupo al que se había administrado Ta1505 tenía puntos marrones finos muy finos, con una línea de tinción gruesa desde la parte superior izquierda hacia la parte

inferior derecha con CA3. Con CA23, una curva gruesa se teñía desde la parte superior derecha hacia el lado izquierdo.

En la Fig. 26, se observa una tinción de Tau positiva para AT8 en las regiones de la corteza (Corteza Perirrinal (primera columna desde la izquierda en la Figura 26), Corteza Entorrinal Lateral (segunda columna desde la izquierda en la Figura 26) y Corteza Entorrinal Media (tercera columna de la izquierda en la Fig. 26)), para cinco individuos en el grupo de control al que se había administrado IgG. (Tinción como manchas marrones en la Fig. 26).

En la Fig. 27, los niveles de tinción en las regiones de la corteza (Corteza Perirrinal (primera columna desde la izquierda en la Fig. 27), Corteza Entorrinal Lateral (segunda columna desde la izquierda en la Fig. 27) y Corteza Entorrinal Media (tercera columna desde la izquierda en la Fig. 27)) se reducen claramente por debajo de los del grupo al que se había administrado IgG de control, para cinco individuos en el grupo al que se había administrado Ta1505. (Tinción como manchas marrones finas en la Fig. 27).

Esto confirmó que la administración de Ta1505 reducía la Tau positiva para AT8, es decir, la Tau fosforilada en Ser202/Thr205, en las regiones de la corteza (Corteza Perirrinal, Corteza Entorrinal Lateral, Corteza Entorrinal Media).

Se confirmó que la administración del anticuerpo Ta1505 tendía a reducir los niveles de Tau fosforilada en Ser202/Thr205 que reconoce AT8 en el cerebro (= región del hipocampo CA3, región del hipocampo CA23, PRh, Ent (Lateral, Media)).

Este resultado respalda que la administración de anticuerpos mejora la patología en el cerebro y tiene un mejor efecto para el deterioro de la memoria. Los resultados indican que el anticuerpo administrado por vía intraperitoneal actúa en el cerebro.

[Ejemplo 10] Efecto de la administración de anticuerpo Ta1505 sobre los niveles de Tau en el cerebro

Utilizando los anticuerpos AT8, que se cree que reconoce la Tau hiperfosforilada presente en PHF (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer202/pThr205, Innax Co.), G2 (anti-anticuerpo humano que reconoce la región N-terminal específica: anticuerpo policlonal de conejo), PHF1 (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce pSer396/pSer404, se cree que reconoce Tau hiperfosforilada presente en PHF) y Ta1505, se examinó el efecto de la administración de anticuerpo 1505 sobre los niveles de Tau y Tau hiperfosforilada en productos homogeneizados cerebrales mediante transferencia Western utilizando productos homogeneizados cerebrales de ratones Tau-Tg a los que se había administrado anticuerpo.

Se llevó a cabo sonicación en 100 a 200 mg de hemisferio cerebral de ratón en una cantidad de 5 veces de TBS (que contenía cóctel inhibidor de proteasa y cóctel inhibidor de fosfatasa). Esto se centrifugó a 100.000 g durante 15 minutos a 4°C, y el sobrenadante se recogió como la fracción soluble de TBS.

El producto precipitado se suspendió en sarcosilo/TBS al 1% (que contenía cóctel inhibidor de proteasa y cóctel inhibidor de fosfatasa), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Esto se centrifugó a 100.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, y el sobrenadante se utilizó como la fracción soluble de sarcosilo.

La fracción soluble de TBS y la fracción soluble de sarcosilo se sometieron a electroforesis con gel de Tris-Acetato al 7% y se separaron, se transfirieron a una membrana de PVDF y se sometieron a bloqueo durante la noche a temperatura ambiente con BSA al 1% /Leche Desnatada al 3%/Tween20 al 0,05%/TBS. A continuación, la solución de anticuerpo se hizo reaccionar utilizando anticuerpo conjugado con HRP como anticuerpo secundario, la reacción se llevó a cabo mediante el método ECL y el análisis se realizó con un analizador de imagen LAS3000 para la cuantificación.

Los resultados se muestran en la Fig. 28 y la Fig. 29.

Para la fracción soluble en TBS, se confirmó que la administración del anticuerpo Ta1505 reducía significativamente la Tau humana (reconocida por el anticuerpo G2), la Tau hiperfosforilada (reconocida por AT8 (epítipo pS202/pT205) y PHF1 (epítipo pS396/pS404)) y pS413Tau (reconocida por Ta1505) en el cerebro de ratones Tau-Tg.

Para la fracción soluble en sarcosilo, se confirmó que la administración del anticuerpo Ta1505 reducía significativamente la Tau hiperfosforilada (reconocida por AT8) en el cerebro de ratones Tau-Tg.

Este resultado respalda que la administración de anticuerpos mejora la patología en el cerebro y tiene un mejor efecto para el deterioro de la memoria. Los resultados también indican que el anticuerpo administrado por vía intraperitoneal actúa en el cerebro.

[Ejemplo de producción 1] Ratones Tg que expresan tau de tipo normal humana (ratones Tau-Tg), como modelo de deterioro de la función cognitiva

El efecto farmacológico de los anticuerpos de la invención sobre la mejora de la función cognitiva se examinó utilizando ratones Tg que tenían la característica de expresar tau de tipo normal humana, y particularmente el mismo patrón de expresión que en la ontogénesis en seres humanos, que es la expresión de tau de tipo 3R solamente durante la fase de embrión y ambos de tipos tau 3R y 4R con crecimiento continuo, y mostraban un inicio de deterioro de la función cognitiva

aproximadamente 6 meses después del nacimiento. Los ratones Tg se prepararon mediante el siguiente método.

La estructura génica utilizada para la preparación de los ratones Tg fue ácido nucleico que confería el gen tau que tiene la estructura mostrada en la Fig. 17, que comprende el intrón 5' del virus de Simio 40 (SV40) (0,3 kb), el gen tau (Tau; 7,3 kb), el intrón 3' de SV40 (0,8 kb) y la señal poliA de SV40 (0,3 kb) en ese orden, aguas abajo del promotor de α -calmodulina quinasa II α (CaMKII) (8,5 kb). El gen tau utilizado se obtuvo por el mismo método descrito por Yamashita T. et al. (FEBS Letters, Vol. 579, pág. 241-244, 2005), como un gen de 7,3 kb de longitud que comprendía la secuencia de nucleótidos de la porción correspondiente a los exones 1 a 9 del ADNc que codificaba la tau humana, una secuencia de nucleótidos que incluía la porción de los primeros 18 nucleótidos y los últimos 3 kb del intrón 9, el secuencia de nucleótidos del exón 10, la porción de los primeros 3 kb y los últimos 38 nucleótidos del intrón 10 (sustituyendo la citosina por timina en la base número 16 del extremo 5' del intrón 10) y la secuencia de nucleótidos del ADNc correspondiente a los exones 11 a 13. El gen tau se clonó en el sitio de la enzima de restricción EcoRV de pNN265, un vector que incluía la secuencia señal el intrón 5' y el intrón 3' y la señal poli(A) de SV40 (Choi T et al., Mol. Cell. Biol. vol.11, pág. 3070-3074, 1991). Se cortó un fragmento de ADN que contenía el intrón 5' de SV40, el gen tau, el intrón 3' de SV40 y la secuencia señal poli(A) de los plásmidos obtenidos con las enzimas de restricción XhoI y NotI, y el fragmento de ADN se clonó en el vector pMM403 que incluía el promotor CaMKII (Mayford M et al., Cell vol. 81 pág. 891-904, 1995). Asimismo, un fragmento del gen que tenía la estructura que se muestra en la Fig. 17, que contenía el gen tau, se cortó de los plásmidos obtenidos con la enzima de restricción SfiI (17,2 kb), se aisló por electroforesis en agarosa y se purificó de la región de gel correspondiente utilizando QIAGEN (R) Kit de Extracción en Gel QIAquick (Núm. de Cat. 28704). El fragmento del gen (ADN) obtenido se incubó con embriones en fase pronuclear obtenidos al reproducir ratones C57BL/6 macho/hembra, de acuerdo con un método conocido [Hogan, B et al., "Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1986)]. Éstos se implantaron en los tubos uterinos de ratones C57BL hembra que se convirtieron en pseudopreñadas mediante inyección. Se amputaron porciones de las colas de los ratones nacidos, se realizó una PCR para confirmar si el gen introducido se había transferido, y los ratones hembra o macho con el gen transferido se criaron con ratones hembra o macho normales para establecer ratones Tg hetero para el gen tau transferido, que se utilizaron para la experimentación. Los ratones Tau-Tg mencionados en la línea 609 y la línea 784 de los ejemplos son ratones producidos por el mismo método y que muestran rasgos equivalentes (posiblemente eliminan la referencia a las líneas en los ejemplos).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal para su uso en un método de tratamiento o prevención de una taupatía, en donde el anticuerpo se une al menos a 8 aminoácidos contiguos entre los 410-421 de la SEQ ID NO: 1, incluyendo el aminoácido en posición 413, donde dicho aminoácido está fosforilado.

5 2. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en donde la taupatía es la enfermedad de Alzheimer.

3. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en donde la taupatía es degeneración de los ganglios corticales basales, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, demencia de granos argirófilos (enfermedad de granos argirófilos), taupatía multisistémica con demencia (MSTD), demencia frontotemporal ligada al cromosoma 17 con parkinsonismo (FTDP-17), demencia por ovillos neurofibrilares, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación (DNTC), taupatía de la sustancia blanca con inclusiones gliales globulares (WMT-GGI) o degeneración lobular frontotemporal con inclusiones positivas para Tau (DLFT-tau).

10

4. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en donde la taupatía es enfermedad de Parkinson postencefálica de von Economo, panencefalitis esclerosante subaguda o encefalopatía del boxeador.

5. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo comprende:

15 una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR-H1 que tiene una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 7 u 8; una CDR-H2 que tiene una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 9, 10, 11 o 12; y una CDR-H3 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 13; y

una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR-L1 que tiene una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 14 o 15; una CDR-L2 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 16; y una CDR-L3 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 17.

20

6. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo comprende:

una VH que comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 8; una CDR-H2 que tiene una secuencia al menos 90% idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 9; y una CDR-H3 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 13; y

25 una VL que comprende una CDR-L1 que tiene una secuencia al menos 90% idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 14; una CDR-L2 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 16; y una CDR-L3 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 17.

7. El anticuerpo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo comprende:

30 una VH que comprende una CDR-H1 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 8; una CDR-H2 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 9; y una CDR-H3 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 13; y

una VL que comprende una CDR-L1 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 14; una CDR-L2 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 16; y una CDR-L3 que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 17.

35

8. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo comprende:

una VH que tiene una secuencia al menos 85% idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 20; y

una VL que tiene una secuencia al menos 85% idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 26.

9. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo comprende:

40 una VH que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 20; y

una VL que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 26.

10. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

FIG. 1

Programa: CLUSTALW

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html

Isoforma Tau

```

      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
3R0N (Seq. ID:6) MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK----- 44
3R1N (Seq. ID:5) MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG 60
3R2N (Seq. ID:4) MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG 60
4R0N (Seq. ID:3) MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLK----- 44
4R1N (Seq. ID:2) MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG 60
4R2N (Seq. ID:1) MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG 60
*****
Prim. cons.      MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGSEEPG

      70      80      90     100     110     120
      |      |      |      |      |      |
3R0N (Seq. ID:6) -----AEEAGIGDTPSLEDEAAG 62
3R1N (Seq. ID:5) SETSDAKSTPTAE-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG 91
3R2N (Seq. ID:4) SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG 120
4R0N (Seq. ID:3) -----AEEAGIGDTPSLEDEAAG 62
4R1N (Seq. ID:2) SETSDAKSTPTAE-----AEEAGIGDTPSLEDEAAG 91
4R2N (Seq. ID:1) SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG 120
*****
Prim. cons.      SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
3R0N (Seq. ID:6) HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK 122
3R1N (Seq. ID:5) HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK 151
3R2N (Seq. ID:4) HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK 180
4R0N (Seq. ID:3) HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK 122
4R1N (Seq. ID:2) HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK 151
4R2N (Seq. ID:1) HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK 180
*****
Prim. cons.      HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTTPPAPK

      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
3R0N (Seq. ID:6) TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK 182
3R1N (Seq. ID:5) TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK 211
3R2N (Seq. ID:4) TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK 240
4R0N (Seq. ID:3) TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK 182
4R1N (Seq. ID:2) TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK 211
4R2N (Seq. ID:1) TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK 240
*****
Prim. cons.      TPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK

```

FIG. 2

	250	260	270	280	290	300	
3R0N (Seq. ID:6)	SRLQTAPVPM	PD LKNVKS	IGSTENLKH	QPGGGK	-----	216	
3R1N (Seq. ID:5)	SRLQTAPVPM	PD LKNVKS	IGSTENLKH	QPGGGK	-----	245	
3R2N (Seq. ID:4)	SRLQTAPVPM	PD LKNVKS	IGSTENLKH	QPGGGK	-----	274	
4R0N (Seq. ID:3)	SRLQTAPVPM	PD LKNVKS	IGSTENLKH	QPGGGKVQI	IN KKL DLSNV	QSKCGSKDNI	242
4R1N (Seq. ID:2)	SRLQTAPVPM	PD LKNVKS	IGSTENLKH	QPGGGKVQI	IN KKL DLSNV	QSKCGSKDNI	271
4R2N (Seq. ID:1)	SRLQTAPVPM	PD LKNVKS	IGSTENLKH	QPGGGKVQI	IN KKL DLSNV	QSKCGSKDNI	300

Prim. cons.	SRLQTAPVPM						QSKCGSKDNI
	310	320	330	340	350	360	
3R0N (Seq. ID:6)	-----VQIVYK	PV DLSKVT	SKCGSLGN	IHHKPGGGQ	VEVKSEKLD	FKDRVQSKI	271
3R1N (Seq. ID:5)	-----VQIVYK	PV DLSKVT	SKCGSLGN	IHHKPGGGQ	VEVKSEKLD	FKDRVQSKI	300
3R2N (Seq. ID:4)	-----VQIVYK	PV DLSKVT	SKCGSLGN	IHHKPGGGQ	VEVKSEKLD	FKDRVQSKI	329
4R0N (Seq. ID:3)	PGGGSVQIVYK	PV DLSKVT	SKCGSLGN	IHHKPGGGQ	VEVKSEKLD	FKDRVQSKI	302
4R1N (Seq. ID:2)	PGGGSVQIVYK	PV DLSKVT	SKCGSLGN	IHHKPGGGQ	VEVKSEKLD	FKDRVQSKI	331
4R2N (Seq. ID:1)	PGGGSVQIVYK	PV DLSKVT	SKCGSLGN	IHHKPGGGQ	VEVKSEKLD	FKDRVQSKI	360

Prim. cons.	PGGGSVQIVYK						FKDRVQSKI
	370	380	390	400	410	420	
3R0N (Seq. ID:6)	THVPGGGNKKI	ETHKLT	FR ENAKAKT	DHGAEIVYK	SPVVS	SGDTS	331
3R1N (Seq. ID:5)	THVPGGGNKKI	ETHKLT	FR ENAKAKT	DHGAEIVYK	SPVVS	SGDTS	360
3R2N (Seq. ID:4)	THVPGGGNKKI	ETHKLT	FR ENAKAKT	DHGAEIVYK	SPVVS	SGDTS	389
4R0N (Seq. ID:3)	THVPGGGNKKI	ETHKLT	FR ENAKAKT	DHGAEIVYK	SPVVS	SGDTS	362
4R1N (Seq. ID:2)	THVPGGGNKKI	ETHKLT	FR ENAKAKT	DHGAEIVYK	SPVVS	SGDTS	391
4R2N (Seq. ID:1)	THVPGGGNKKI	ETHKLT	FR ENAKAKT	DHGAEIVYK	SPVVS	SGDTS	420

Prim. cons.	THVPGGGNKKI						SGDTS
	430	440					
3R0N (Seq. ID:1)	DSPQLATLA	DEV SASLA	QGL				352
3R1N (Seq. ID:1)	DSPQLATLA	DEV SASLA	QGL				381
3R2N (Seq. ID:1)	DSPQLATLA	DEV SASLA	QGL				410
4R0N (Seq. ID:1)	DSPQLATLA	DEV SASLA	QGL				383
4R1N (Seq. ID:1)	DSPQLATLA	DEV SASLA	QGL				412
4R2N (Seq. ID:1)	DSPQLATLA	DEV SASLA	QGL				441

Prim. cons.	DSPQLATLA						QGL

FIG. 3

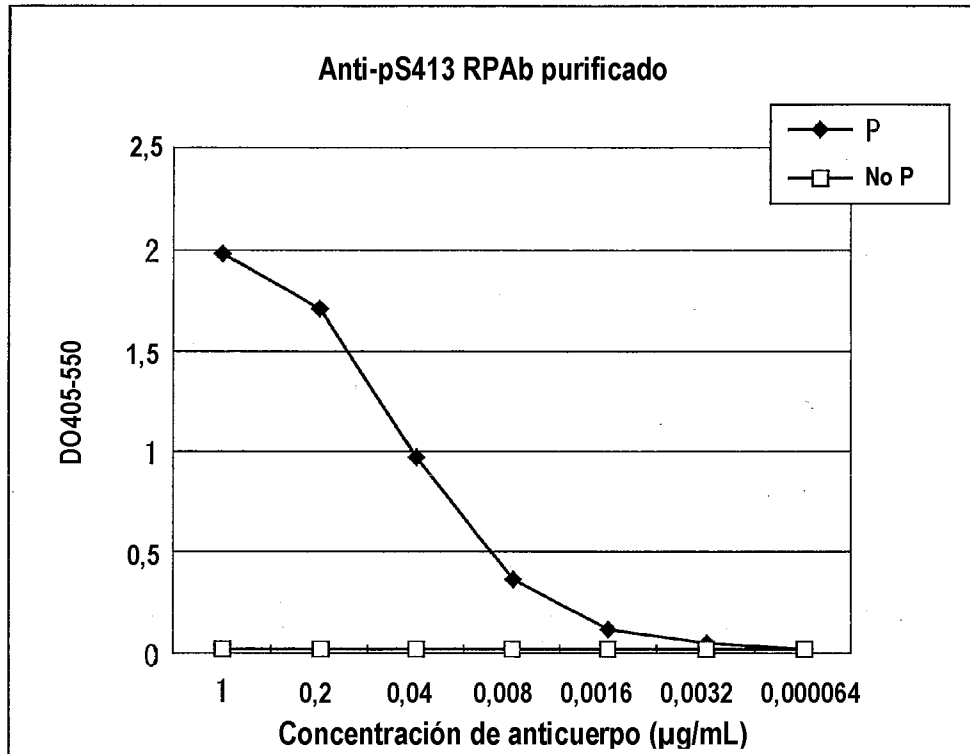
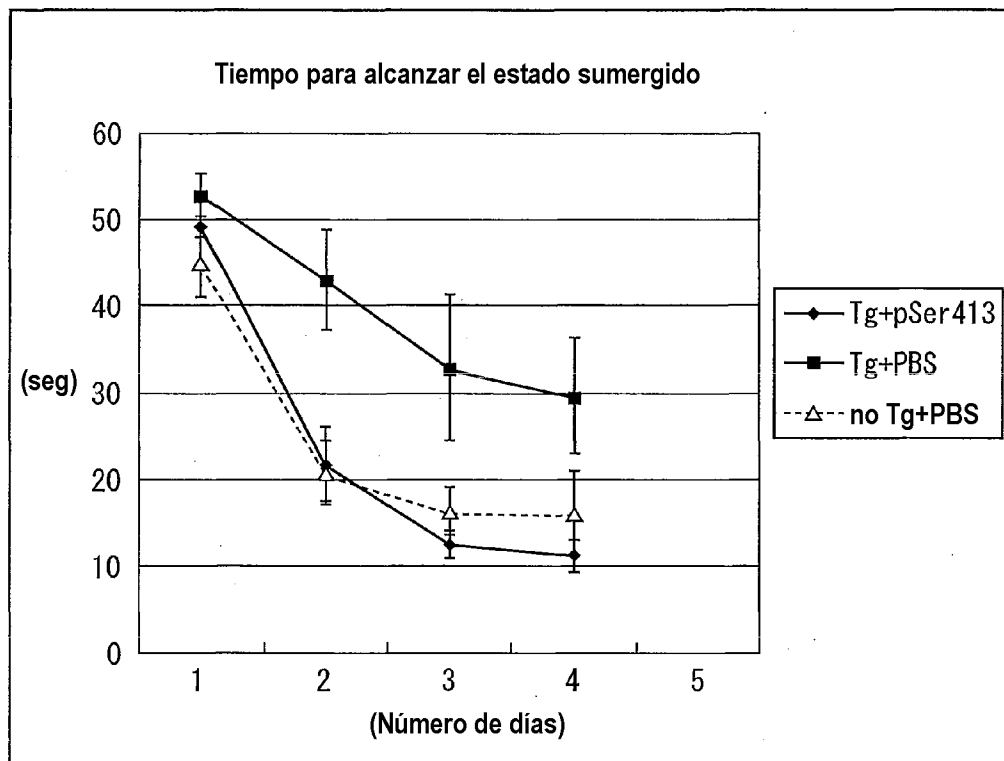


FIG. 4

(1-1) Prueba de estudio



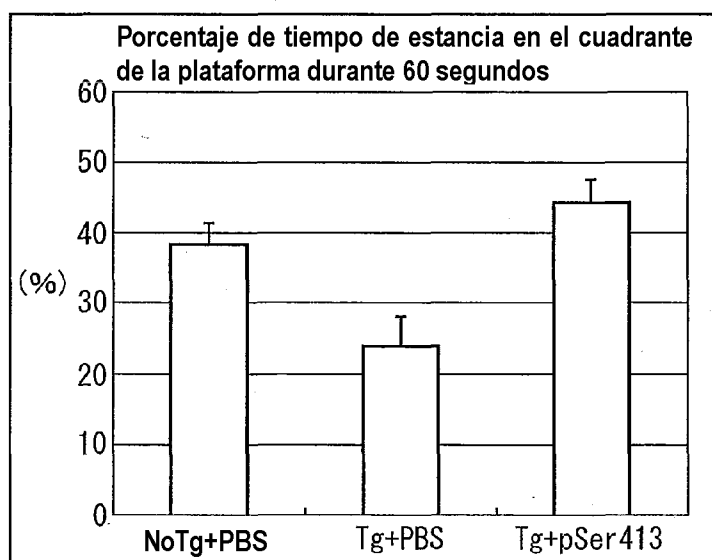
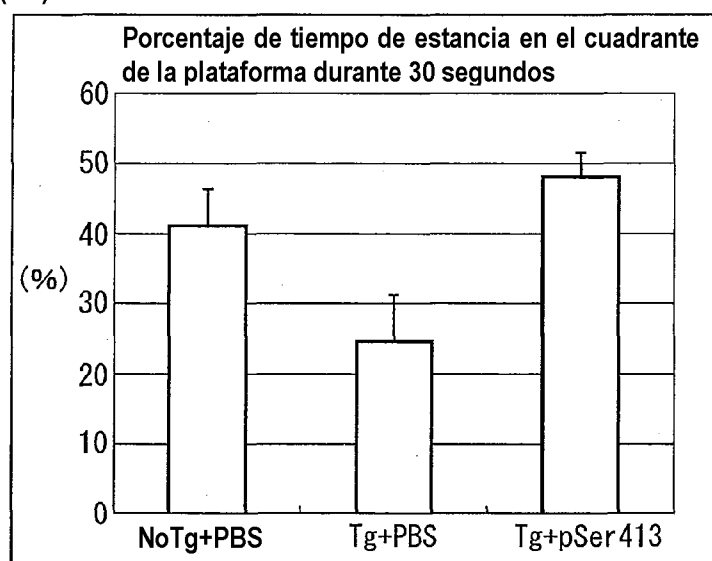
Diferencia significativa

no Tg vs Tg : $p = 0,0071$

Tg vs Tg Inmunizado : $p = 0,0029$

FIG. 5

(1-2) Prueba de sonda



Diferencia significativa

Análisis 30 seg Fov:

No Tg vs Tg : $p = 0,403$

Tg vs Tg Inmunizado : $p = 0,00321$

Análisis 60 seg Fov:

No Tg vs Tg : $p = 0,0085$

Tg vs Tg Inmunizado : $p = 0,0003$

FIG. 6

(1-3) Prueba de Campo Abierto

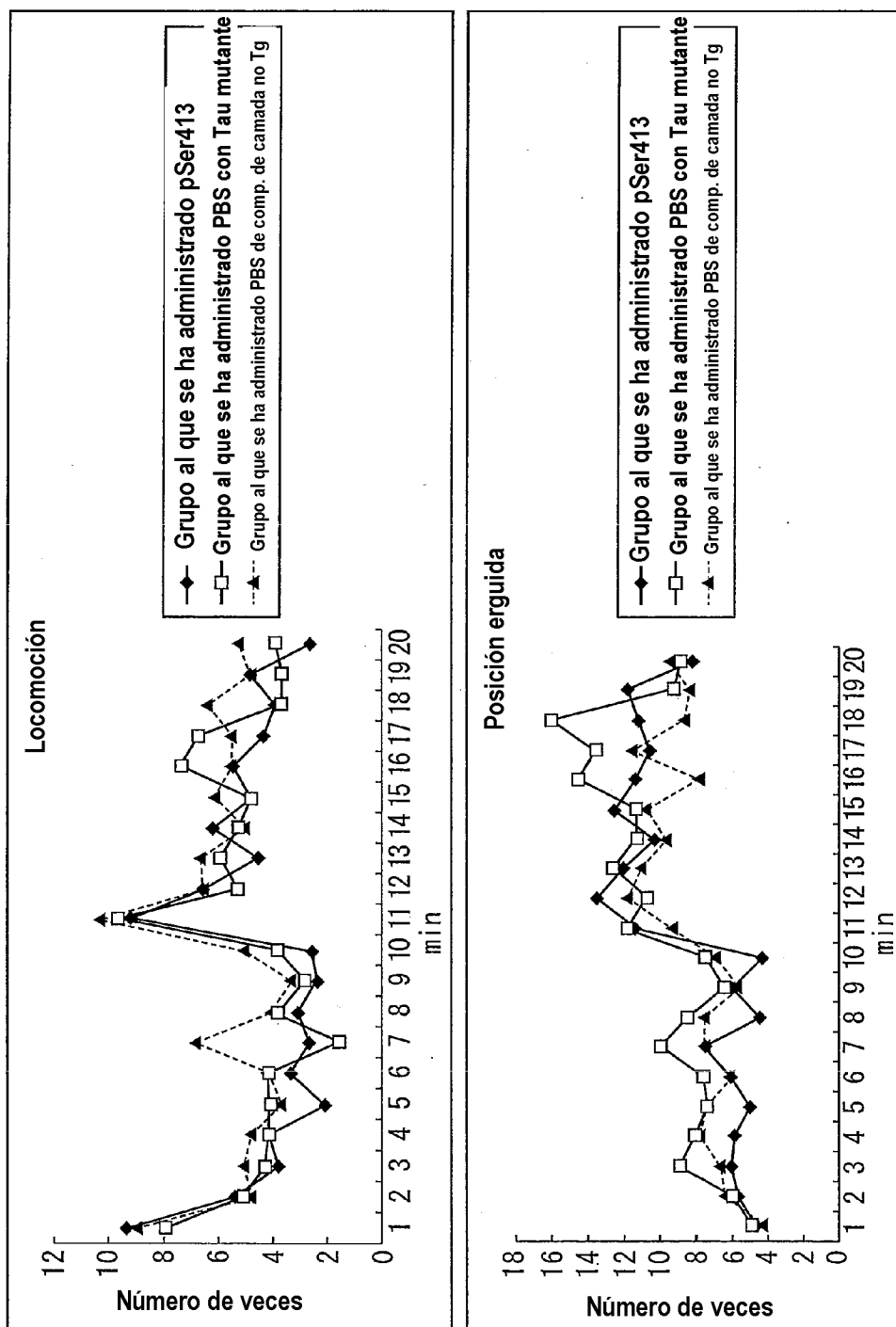


FIG. 7

(1-3) Prueba de Campo Abierto

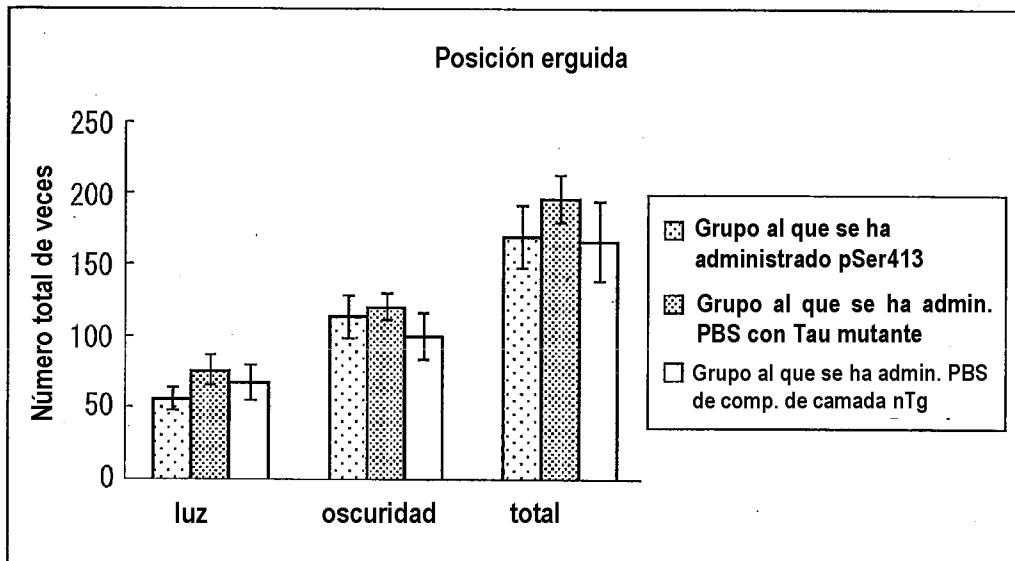
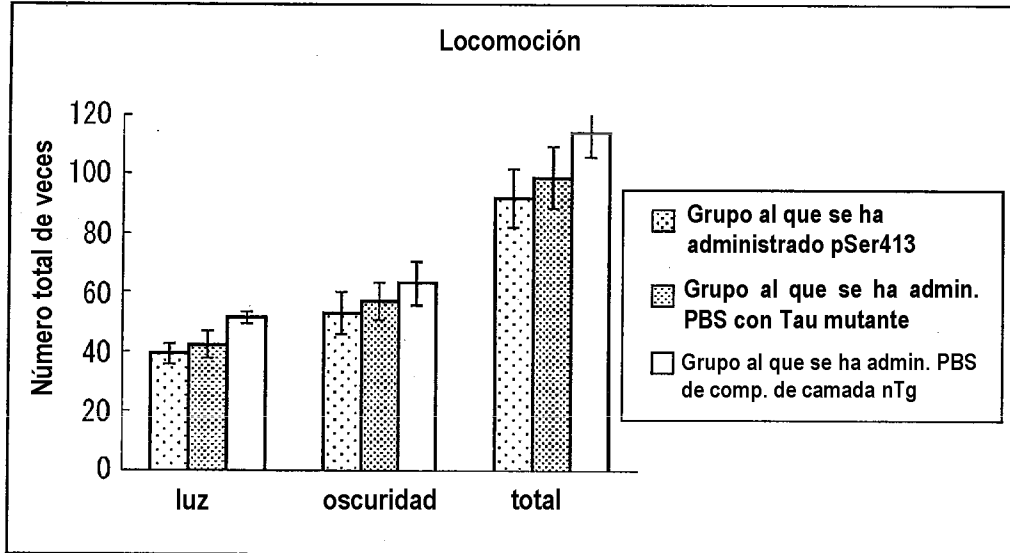
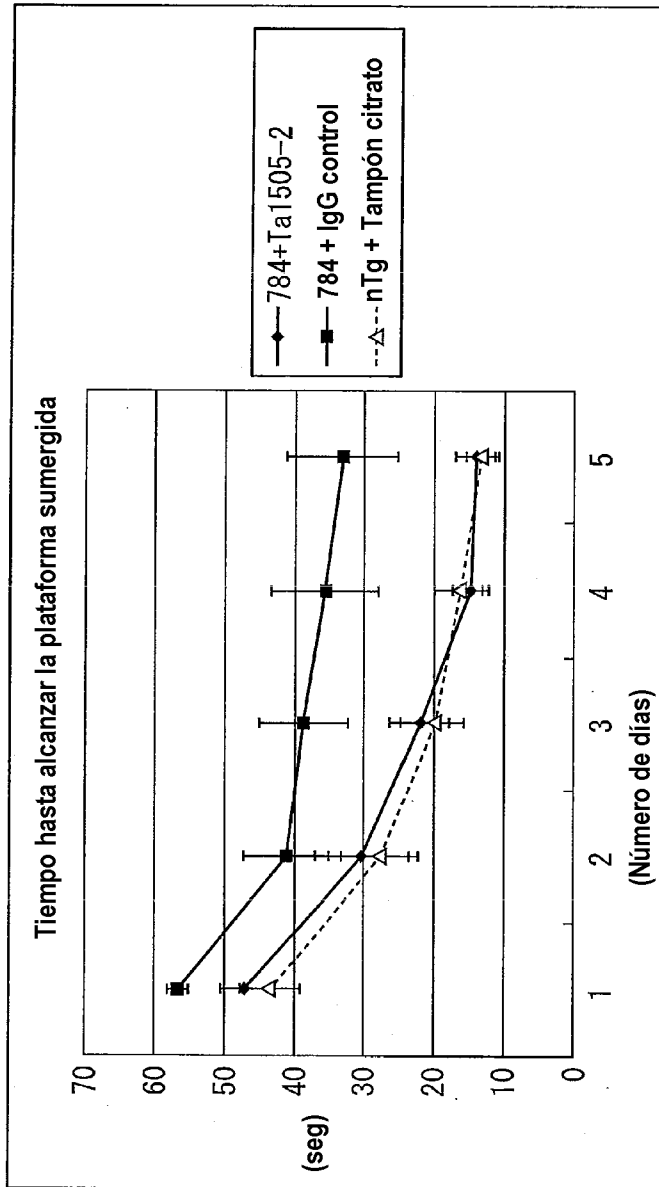


FIG. 8

(2-1) Prueba de estudio



Diferencia significativa

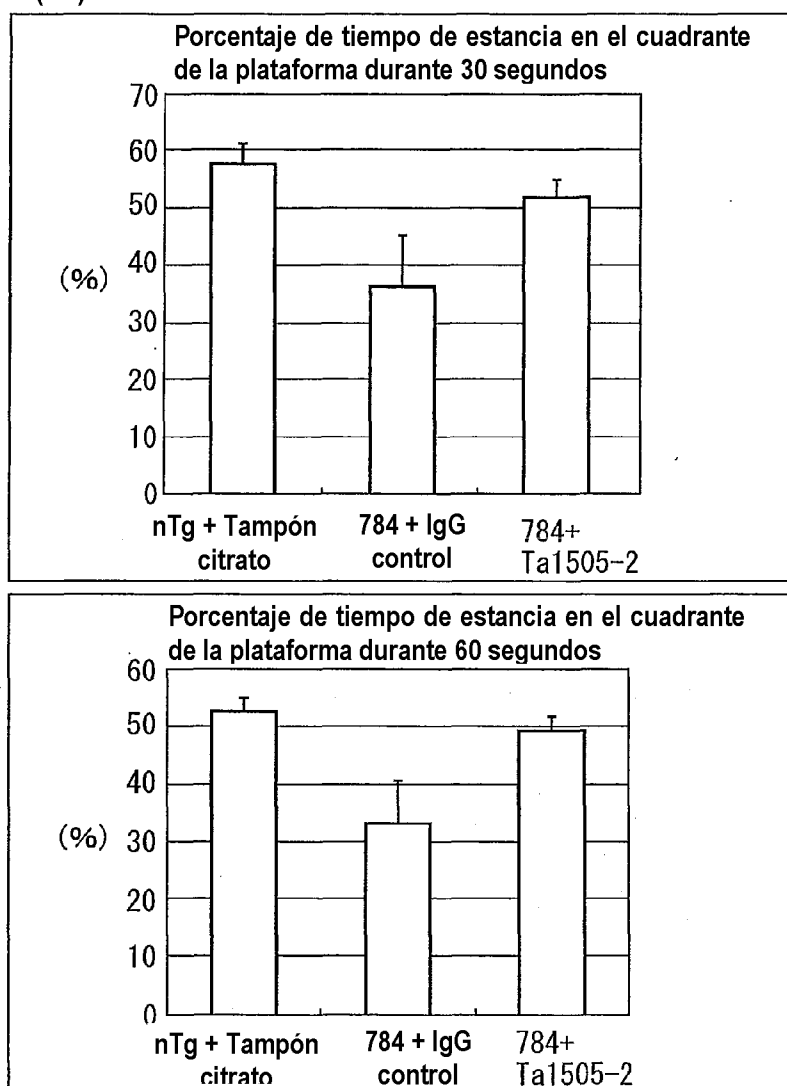
no Tg vs Tg (IgG control) : $p = 0,0110$

no Tg vs Tg (Ta1505-2) : $p = 0,8259$ (Diferencia no significativa)

Tg (Ta1505-2) vs Tg (IgG control) : $p = 0,01152$

FIG. 9

(2-2) Prueba de sonda



Diferencia significativa

Análisis 30 segundos Fov :

no Tq vs Tq (IgG control) : $p = 0,0199$ no Tq vs Tq (Ta1505-2) : $p = 0,5106$ (Diferencia no significativa)Tq (Ta1505-2) vs Tq (IgG control) : $p = 0,0713$ (Diferencia no significativa)

Análisis 60 segundos Fov :

no Tq vs Tq (IgG control) : $p = 0,0120$ no Tg vs Tg (Ta1505-2) : $p = 0,6639$ (Diferencia no significativa)Tg (Ta1505-2) vs Tg (IgG control) : $p = 0,273$

FIG. 10

(2-3) Prueba de Campo abierto

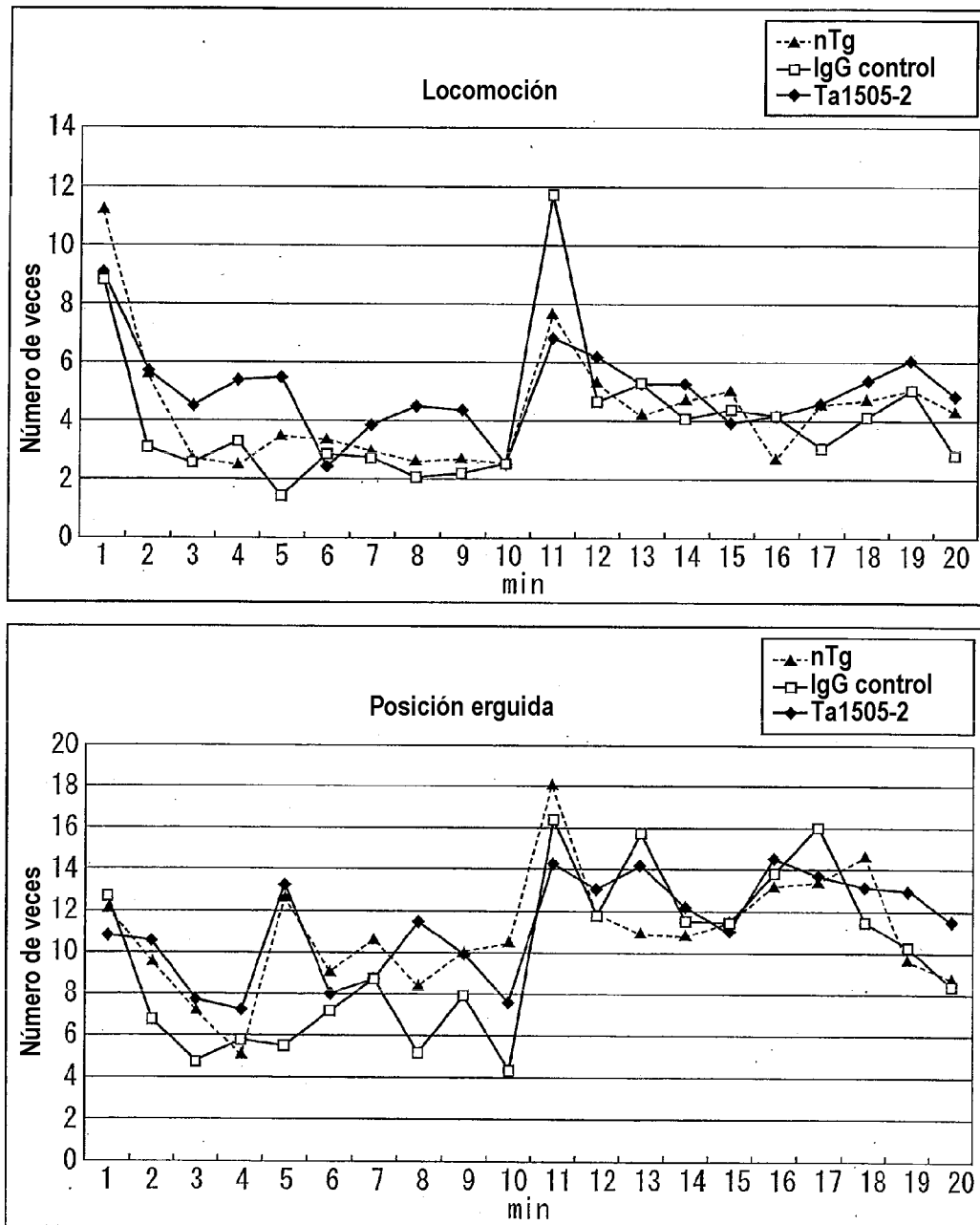


FIG. 11

(2-3) Prueba de Campo abierto

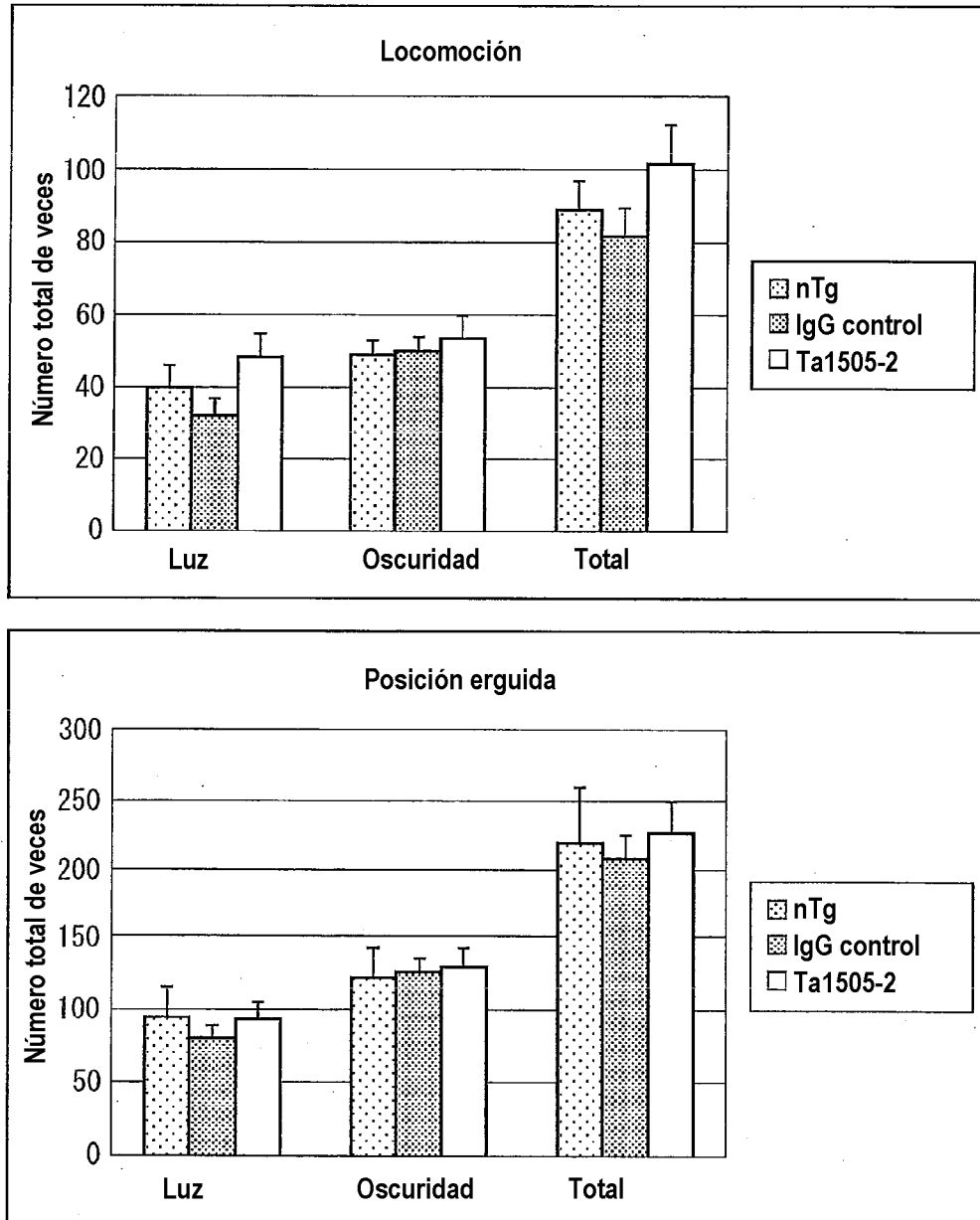
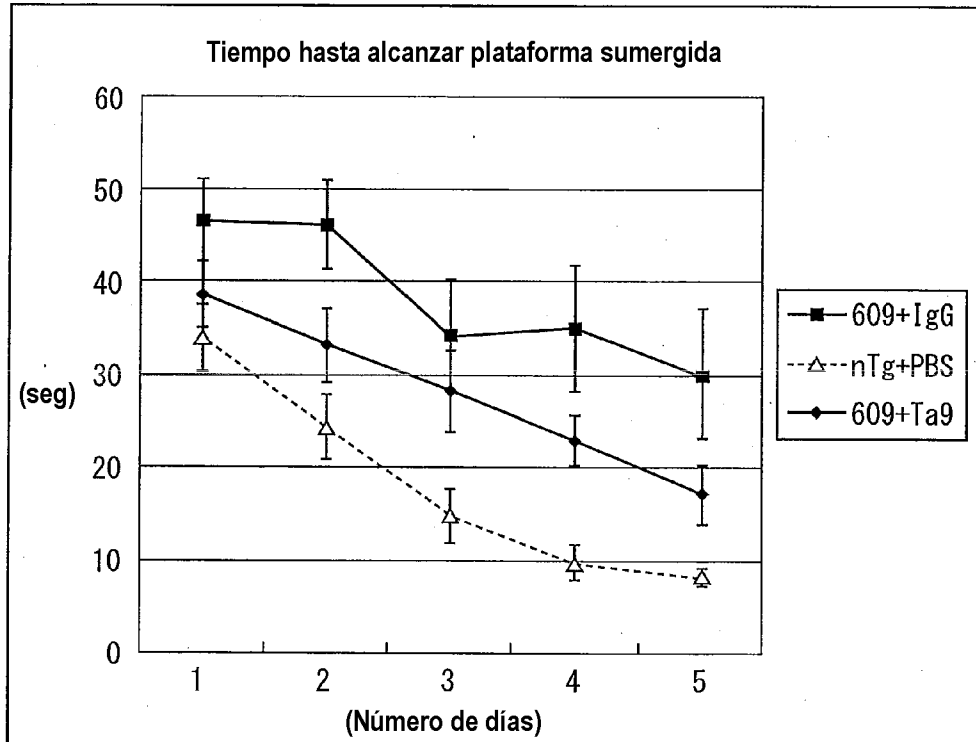


FIG. 12

(3-1) Prueba de estudio



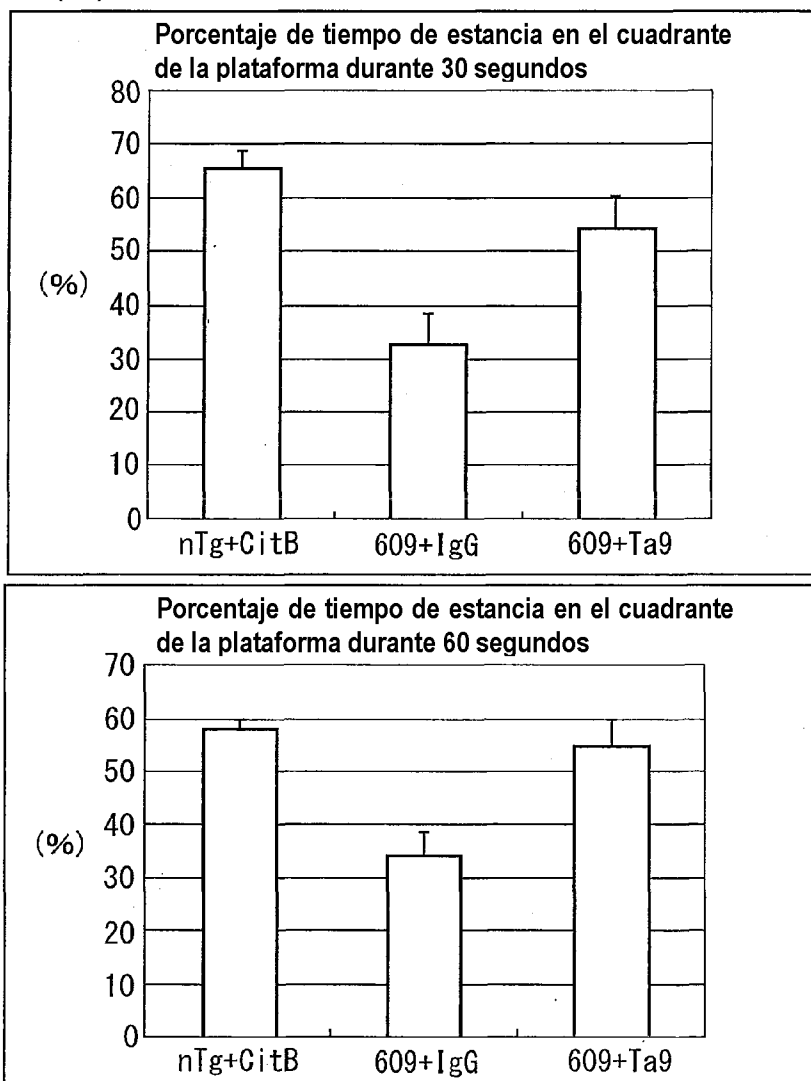
Diferencia significativa

nTg vs Tg+pSer396 : $p = 0,0460$

Tg+IgG control vs Tg+pSer396 : $p = 0,0402$

FIG. 13

(3-2) Prueba de sonda



Diferencia significativa

Análisis 30 segundos Fov :

Ta9 vs IgG : $p = 0,0015$

Ta9 vs No Tg : $p = 0,8330$ (Diferencia no significativa)

IgG vs No Tg : $p = 0,0007$

Análisis 60 segundos Fov :

Ta9 vs IgG : $p = 0,0061$

Ta9 vs No Tg : $p = 0,1637$ (Diferencia no significativa)

IgG vs No Tg : $p = 0,0001$

FIG. 14

(3-3) Prueba de Campo abierto

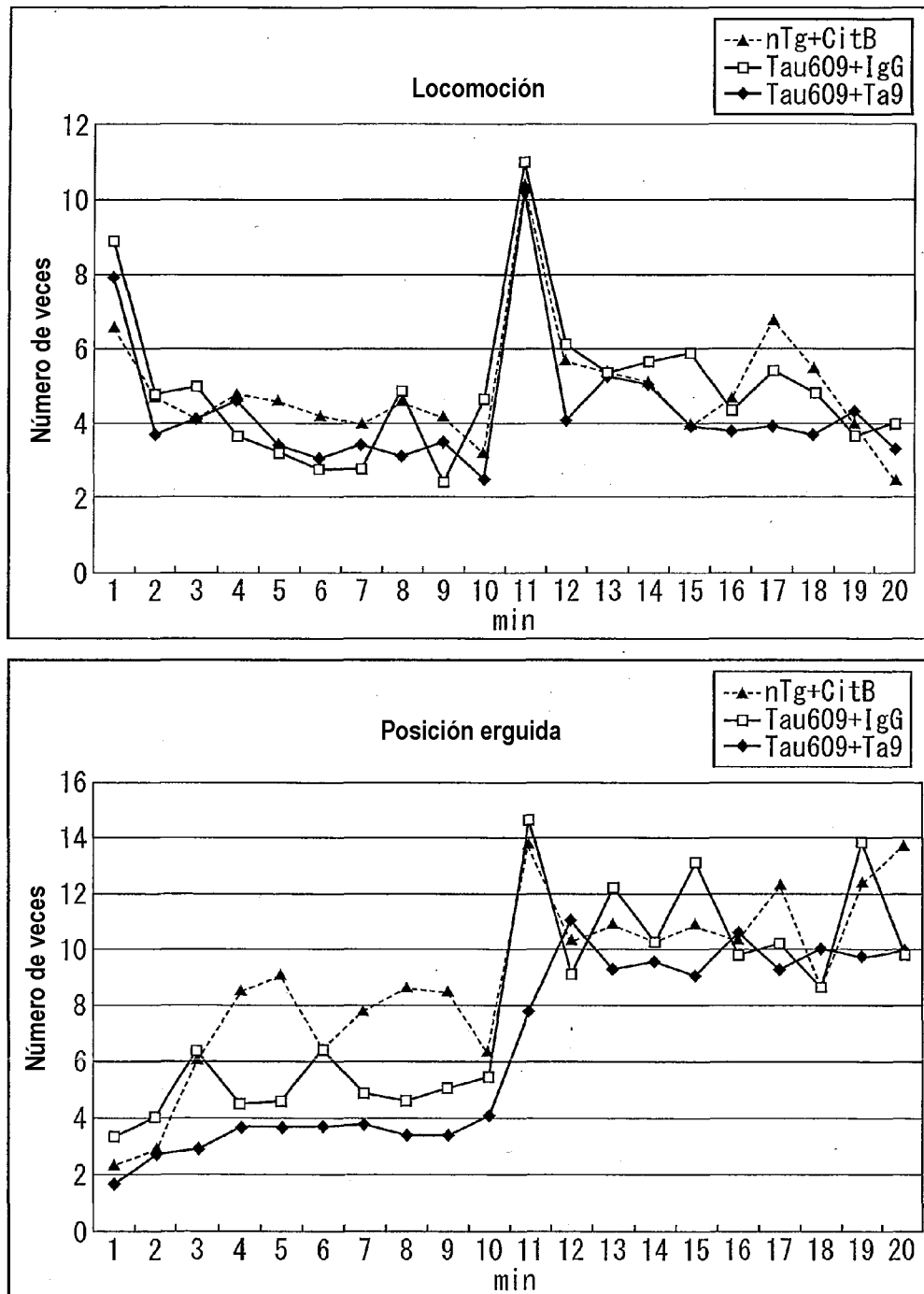


FIG. 15

(3-3) Prueba de Campo abierto

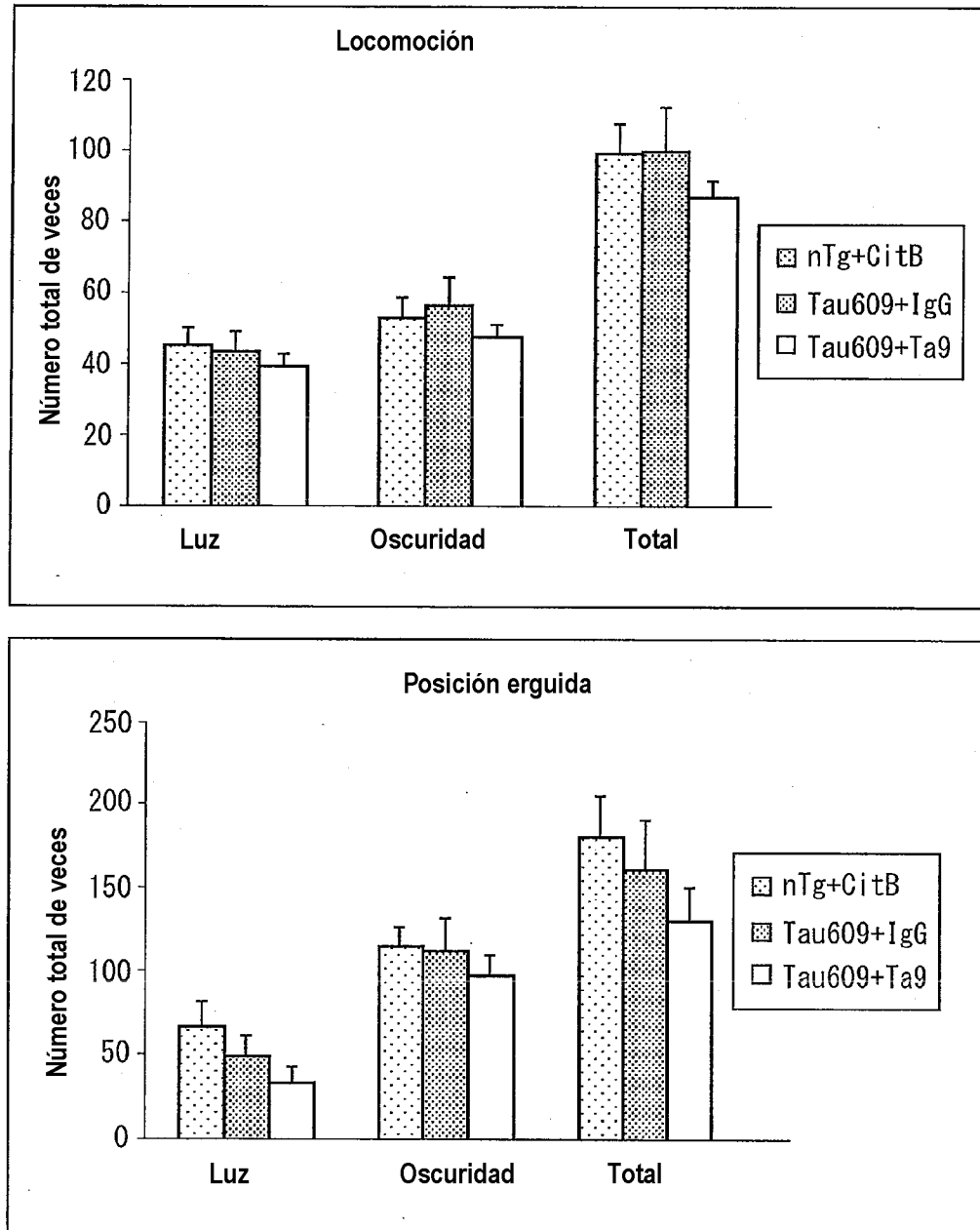
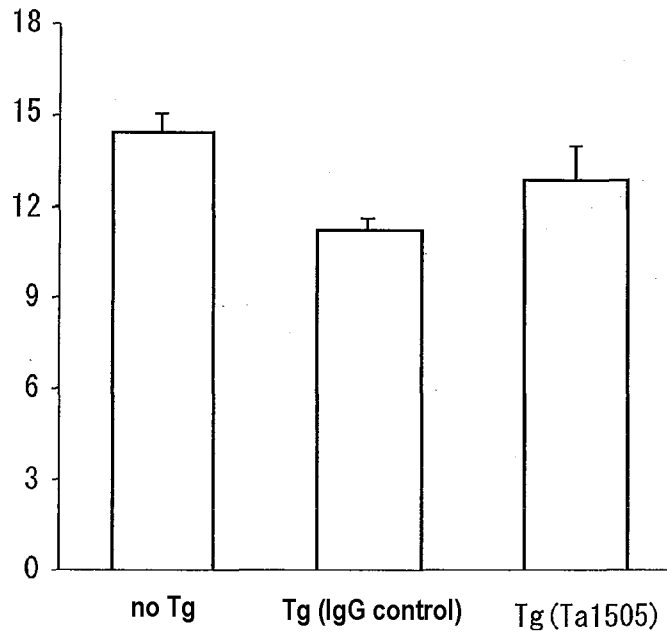


FIG. 16



El eje vertical representa la sinaptofisis en la fluorescencia en la región CA3 del hipocampo (unidades arbitrarias)

Diferencia significativa

No Tg vs Tg (control) : $p = 0,0138$

No Tg vs Tg (Ta1505) : $p = 0,1806$ (Diferencia no significativa)

Tg (Ta1505) vs Tg (IgG control) : $p = 0,1696$

(Diferencia no significativa)

FIG. 17

Estructura nucleica que confiere Tau

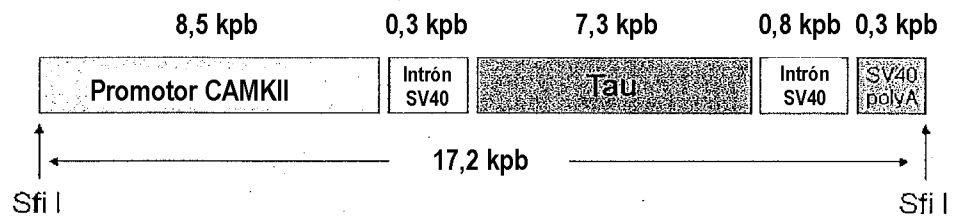
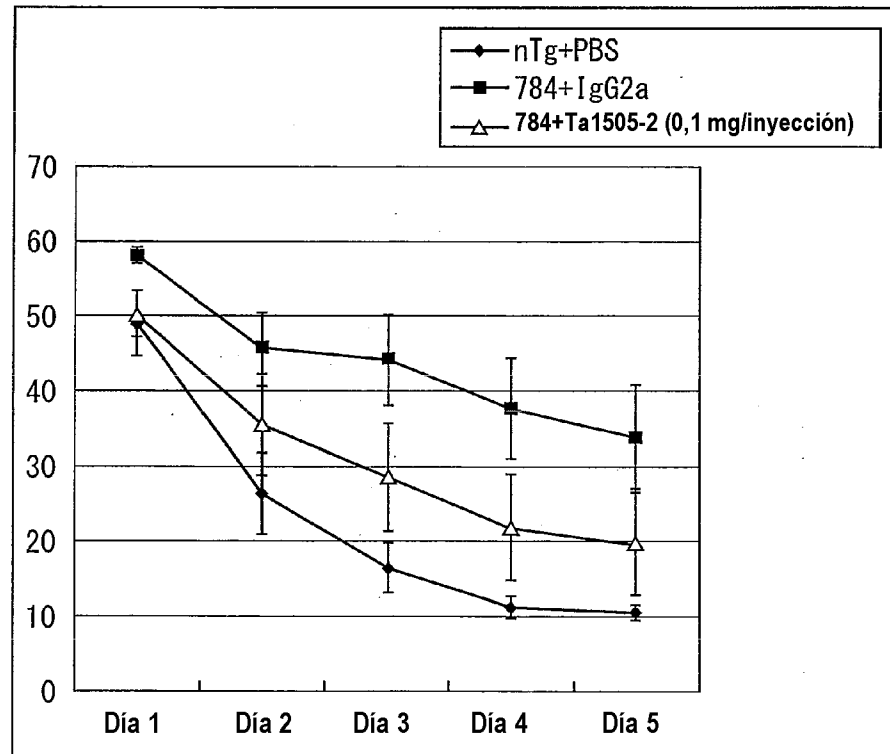


FIG. 18

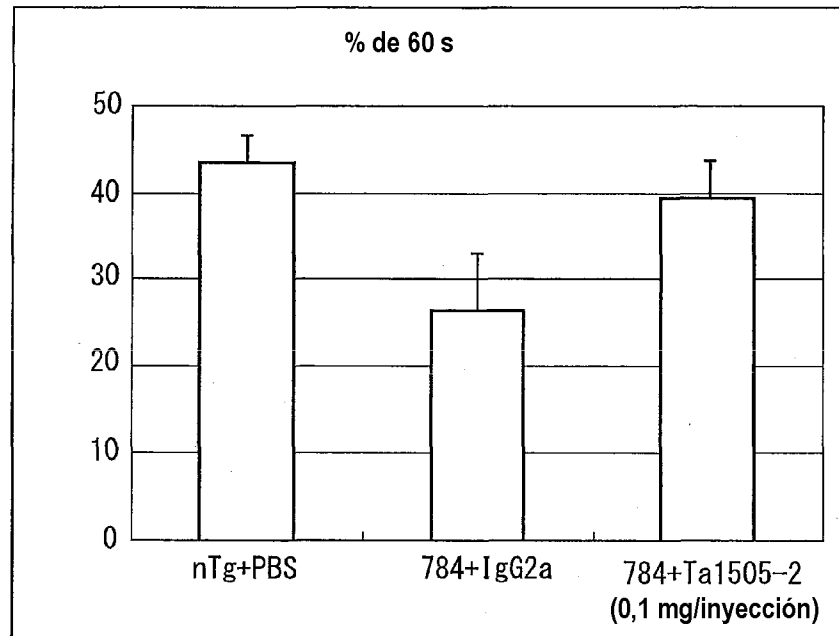
(4-1) Prueba de estudio



No Tg vs Tg (IgG control) $p = 0,0025$
 No Tg vs Tg (Ta1505) $p = 0,1926$ (Diferencia no significativa)
 Tg (Ta1505) vs Tg (IgG control) $p = 0,0493$

FIG. 19

(4-2) Prueba de sonda



No Tg vs Tg (IgG control)

p = 0,0240

No Tg vs Tg (Ta1505)

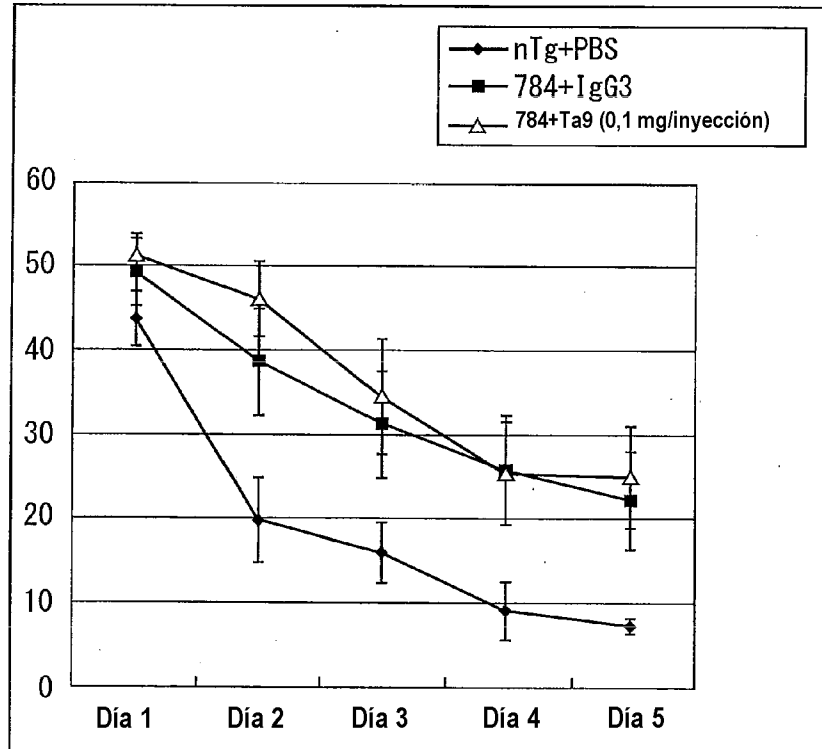
p = 0,5783 (Diferencia no significativa)

Tg (Ta1505) vs Tg (IgG control)

p = 0,0708 (Diferencia no significativa)

FIG. 20

(5-1) Prueba de estudio



No Tg vs Tg (IgG control)

$p = 0,0065$

No Tg vs Tg (Ta9)

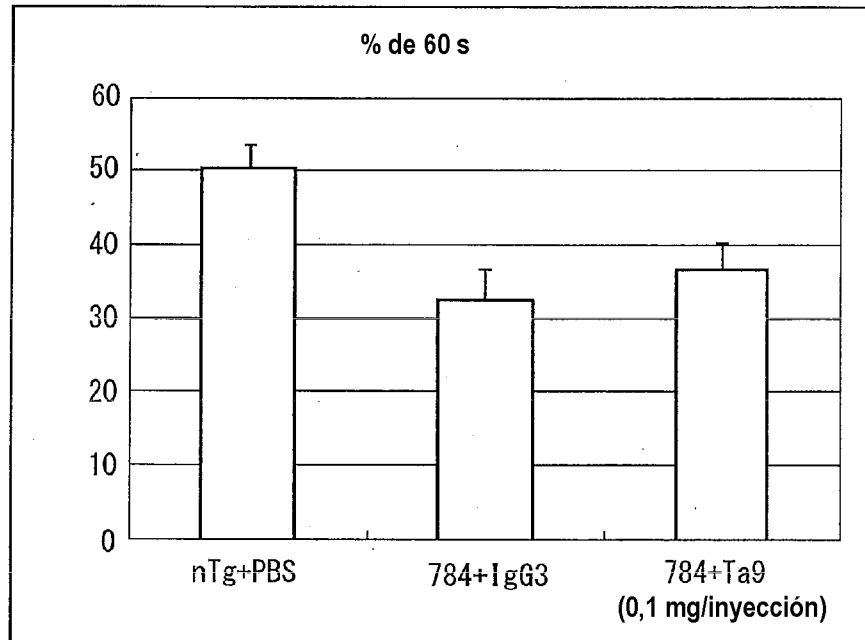
$p = 0,0044$

Tg (Ta9) vs Tg (IgG control)

$p = 0,8635$ (Diferencia no significativa)

FIG. 21

(5-2) Prueba de sonda



No Tg vs Tg (IgG control)

$p = 0,0033$

No Tg vs Tg (Ta9)

$p = 0,0100$

Tg (Ta9) vs Tg (IgG control)

$p = 0,5226$ (Diferencia no significativa)

FIG. 22

Inmunotinción de la región del hipocampo (tinción Ta1505)

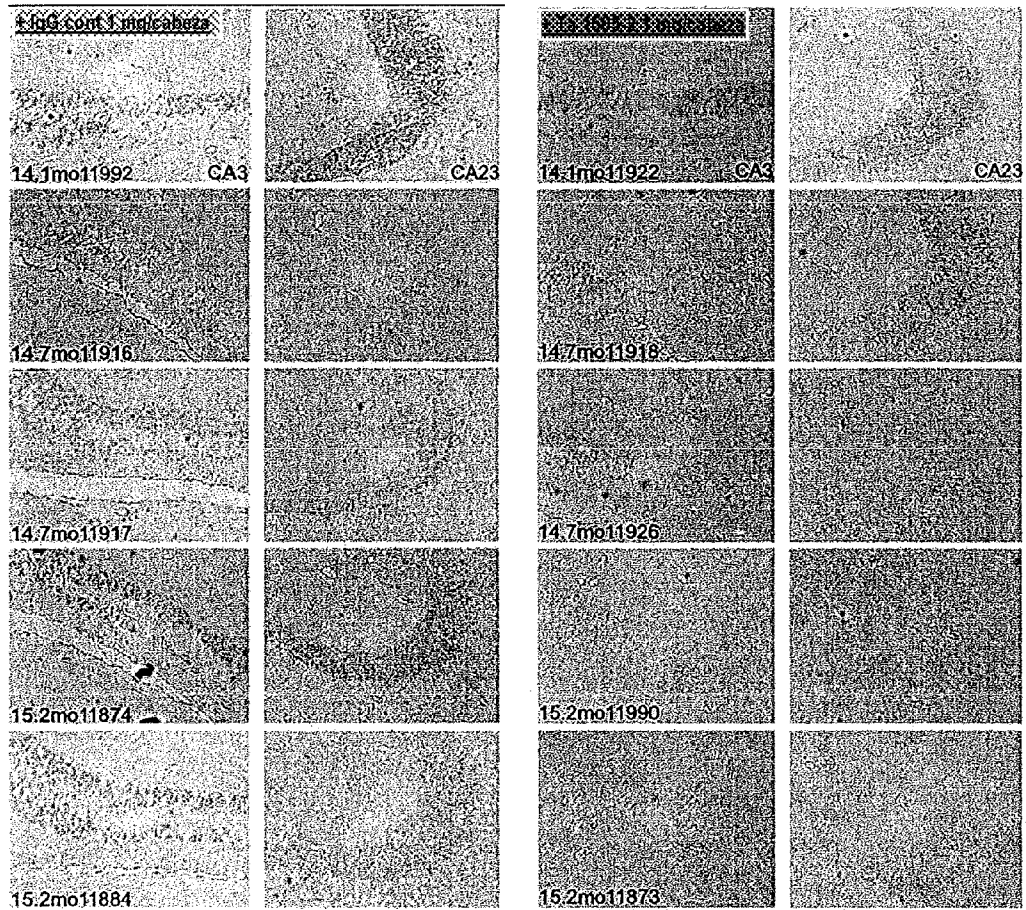


FIG. 23

Inmunotinción de la región de la corteza (tinción Ta1505)
IgG control (1 mg/cabeza)

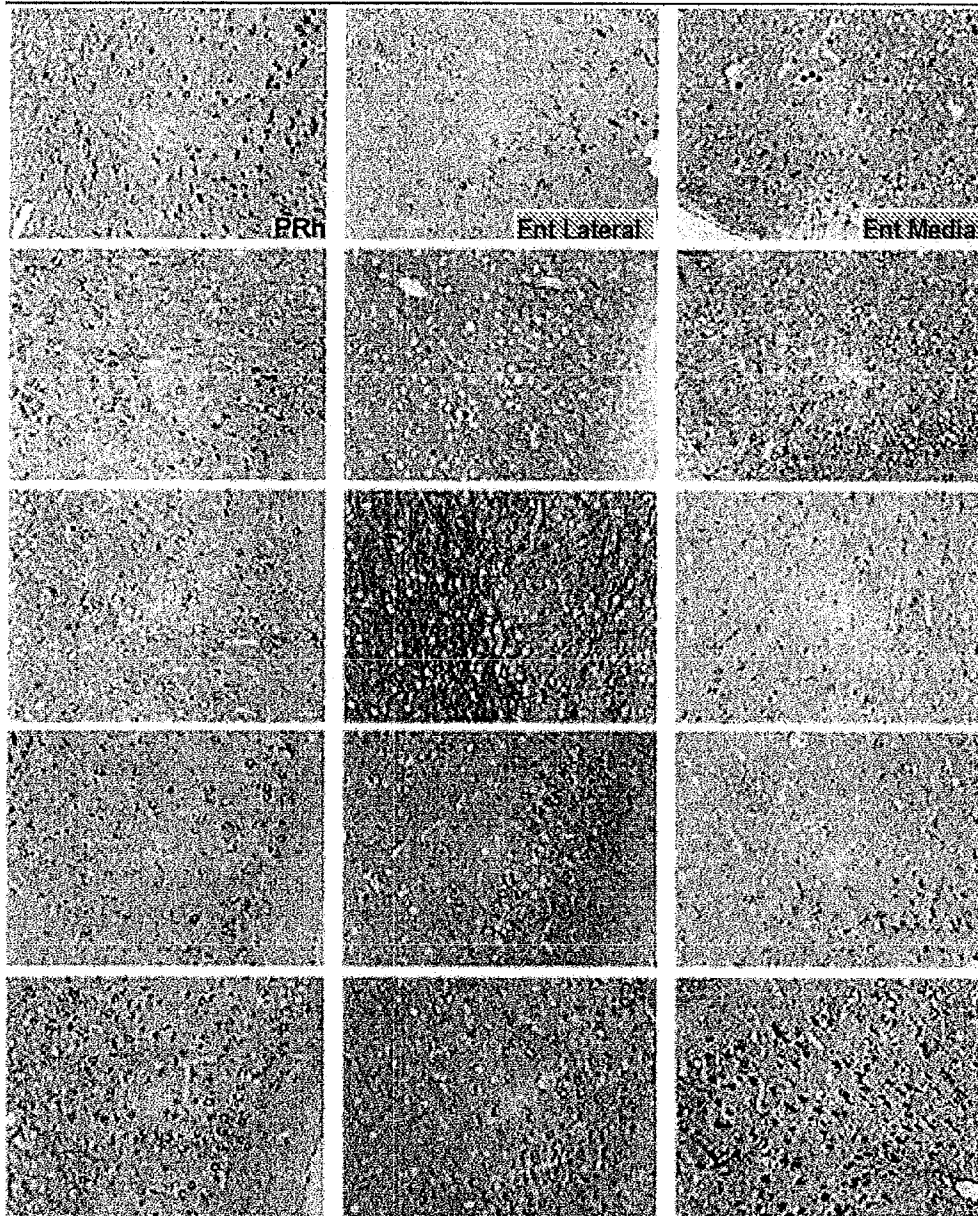


FIG. 24

Administración Ta1505 (1 mg/cabeza)

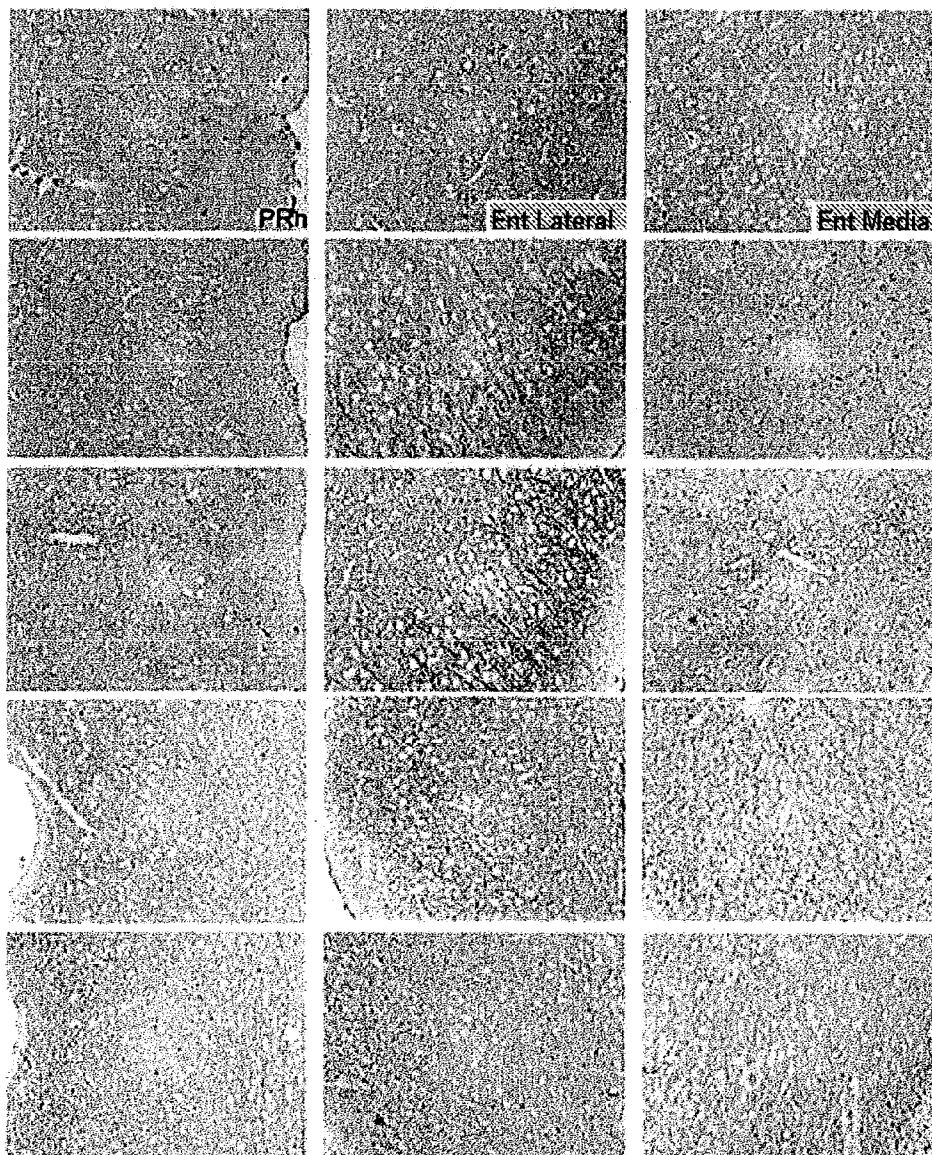


FIG. 25

Inmunotinción de la región del hipocampo (tinción AT8)

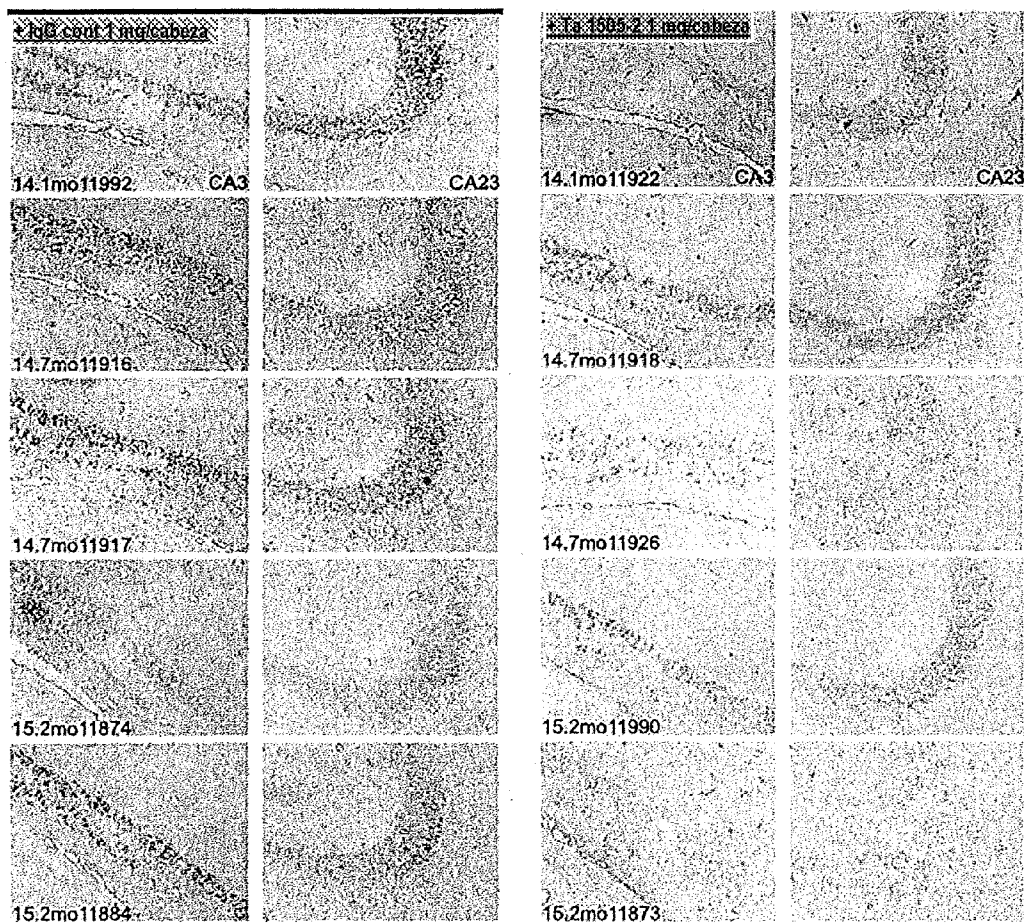


FIG. 26

Inmunotinción de la región de la corteza (tinción TA8)
IgG control (1 mg/cabeza)

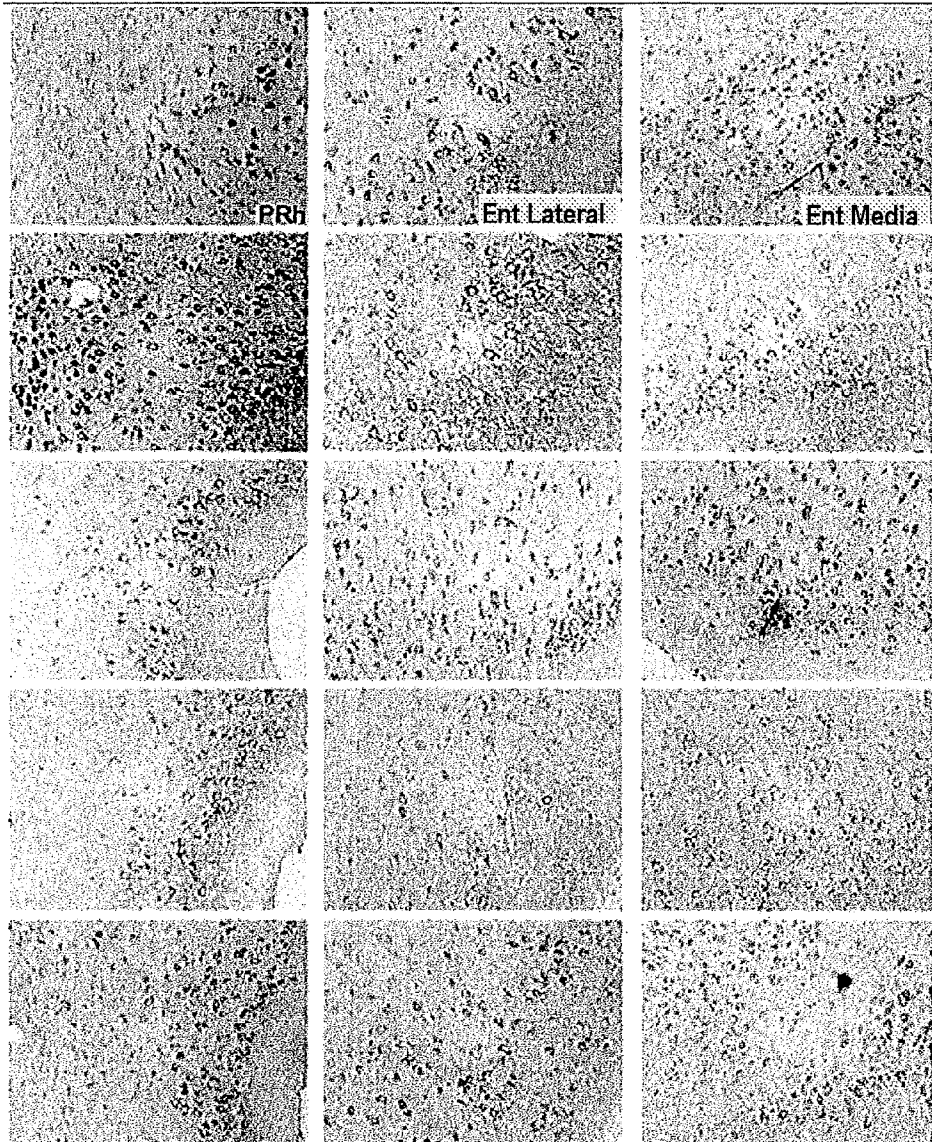


FIG. 27

Administración Ta1505 (1 mg/cabeza)

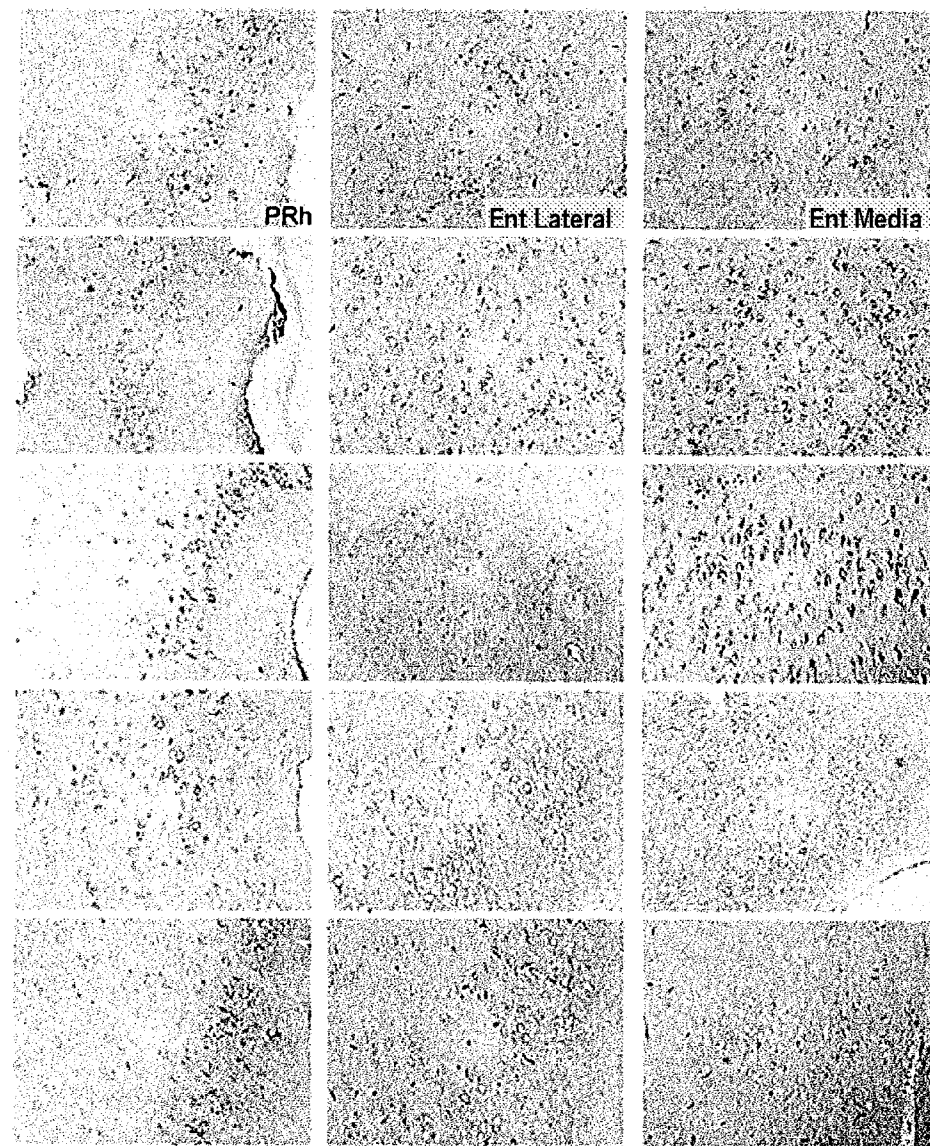
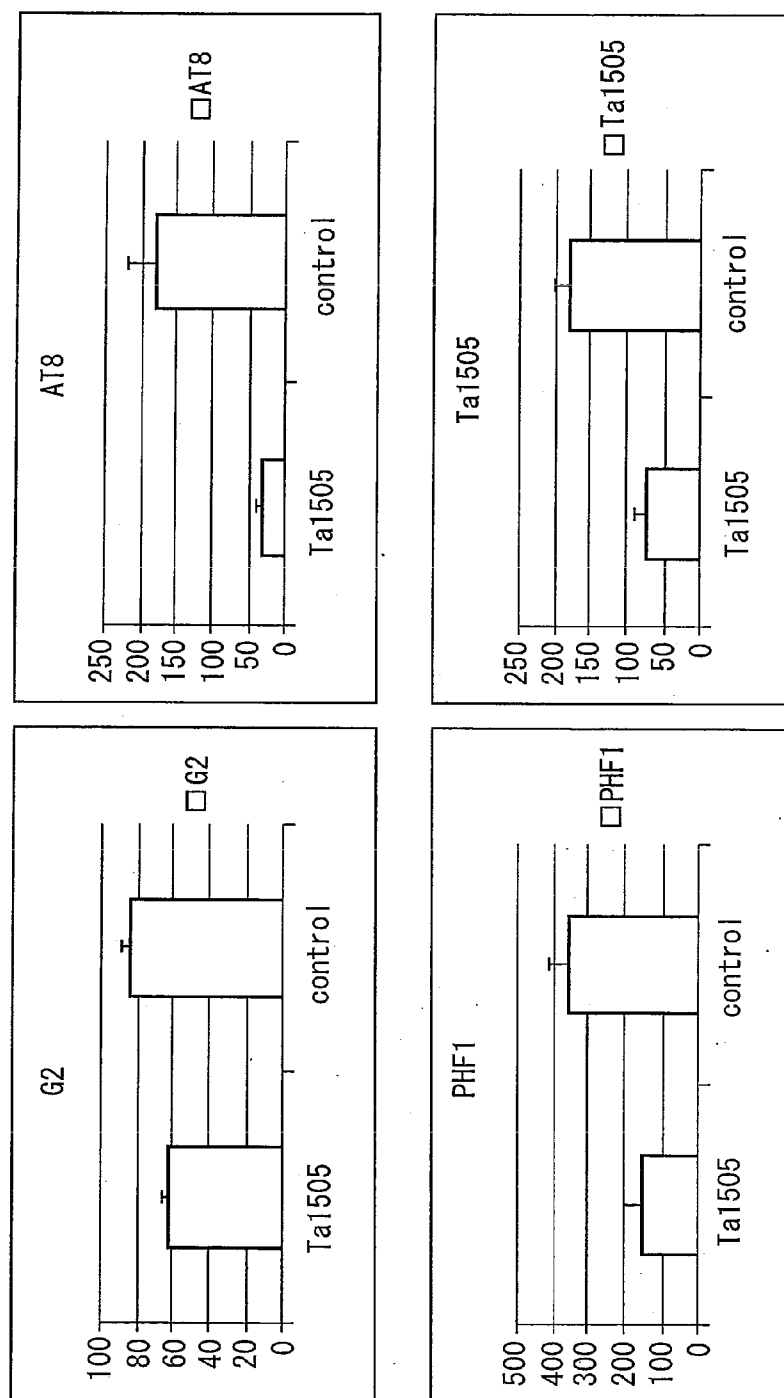


FIG. 28

Fracción soluble TBS



Prueba T

G2 : Ta1505 vs Control $p = 0.013276$

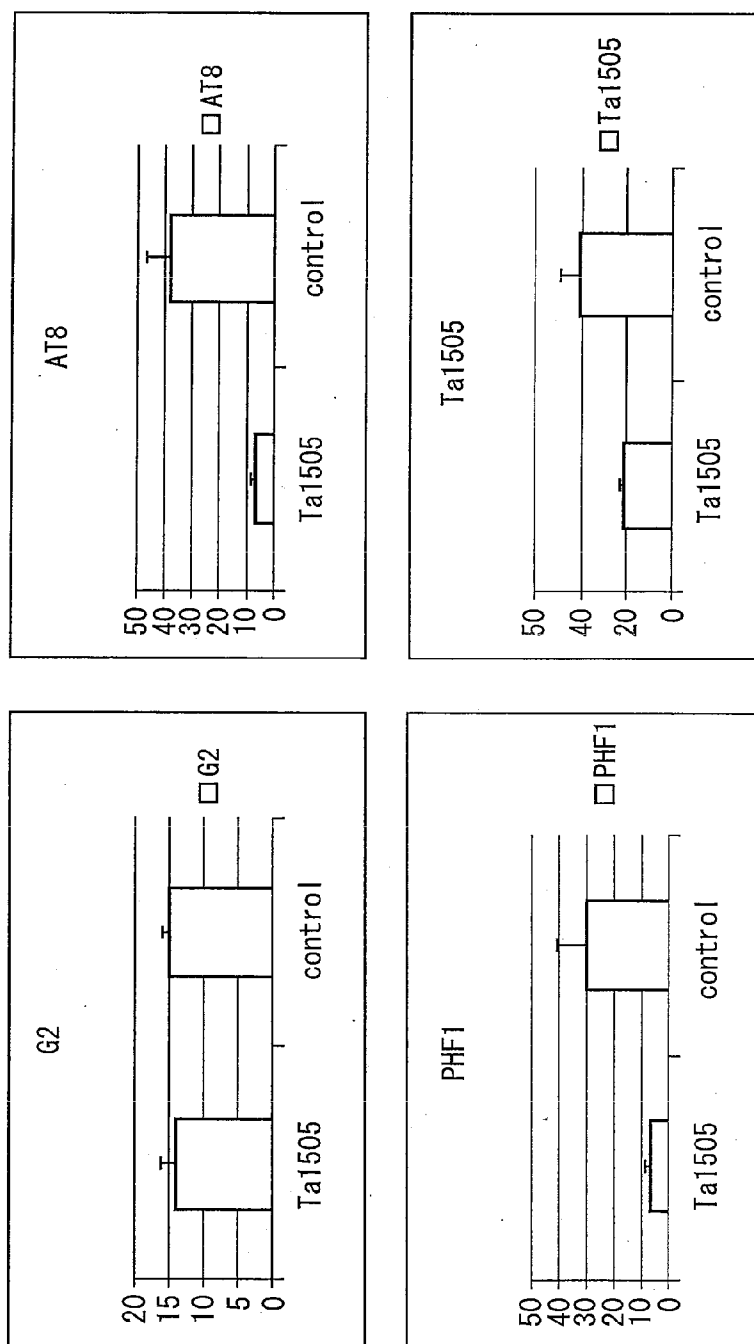
AT8 : Ta1505 vs Control $p = 0.016866$

PHF1 : Ta1505 vs Control $p = 0.021157$

Ta1505 : Ta1505 vs Control $p = 0.006104$

FIG. 29

Fracción soluble Sarcosilo



Prueba T

G2 : Ta1505 vs Control $p = 0.804878$ (Diferencia no significativa) $\times e)$
 AT8 : Ta1505 vs Control $p = 0.012585$
 PHF1 : Ta1505 vs Control $p = 0.06155$ (Disminuye)
 Ta1505 : Ta1505 vs Control $p = 0.063603$ (Disminuye)