

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 805**

51 Int. Cl.:

**A61P 25/28** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2015 PCT/US2015/039205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16007414**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2015 E 15818480 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3166688**

54 Título: **Ligandos de formación de imágenes de Tau y sus usos en el diagnóstico y el tratamiento de tauopatías**

30 Prioridad:

**08.07.2014 US 201462021897 P**

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

**07.11.2024**

73 Titular/es:

**NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)  
70 Washington Square South  
New York City, NY 10012, US**

72 Inventor/es:

**SIGURDSSON, EINAR M.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

### Observaciones:

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

ES 2 985 805 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

Ligandos de formación de imágenes de Tau y sus usos en el diagnóstico y el tratamiento de tauopatías

## 5 Campo de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere a sondas a base de anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos de dominio único, moléculas de scFv, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, diacuerpos y los dominios de unión a epítipo de los mismos) que son capaces de unirse  
 10 inmuno-específica y selectivamente al epítipo que contiene fosfo-serina de Tau, tal como, por ejemplo, el péptido Tau-fosfo-serina 396/404. Dichos ligandos de formación de imágenes son útiles para detectar el conformero patológico de la proteína Tau si está presente en una muestra biológica, especialmente junto con el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía, y proporcionar de este modo un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y otras patologías de Tau. Las moléculas de scFv de la presente invención tienen utilidad como marcadores de diagnóstico  
 15 para la enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas, y como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dichas afecciones.

## Antecedentes de la invención

20 La enfermedad de Alzheimer es la forma más frecuente de demencia que afecta a más de 20 millones de personas en todo el mundo.

El diagnóstico de la enfermedad, en particular en un momento temprano, es problemático y difícil, y existe la necesidad de un diagnóstico preciso de tauopatías tales como la enfermedad de Alzheimer. La detección por anticuerpos de Tau  
 25 anormal en el líquido cefalorraquídeo se ha mostrado prometedora (Blennow *et al.* "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease" *Nat. Rev. Neurol.* 6, 131-144 (2010) y Weiner *et al.* "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception" *Alzheimers. Dement.* 9, e111-e194 (2013)).

A lo largo de los años, la detección por anticuerpos de la proteína fosfo-Tau en el líquido cefalorraquídeo ha mostrado  
 30 cierta utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ((Blennow *et al.* "Cerebrospinal Fluid And Plasma Biomarkers In Alzheimer Disease". *Nat. Rev. Neurol.* 6, 131-144 (2010); Lewis, J. *et al.* "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein", *Nat. Genet.* 25, 402-405; Weiner, M.W. *et al.* (2013) "The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A Review Of Papers Published Since Its Inception", *Alzheimers. Dement.* 9: e111-e194), lo que sugiere que un mayor desarrollo en este campo está justificado (véase, Congdon, E.E. (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau  
 35 Pathology", *J. Alzheimers. Dis.* 40:S113-S121). Sin embargo, los niveles de Tau en el LCR en otras tauopatías por lo general no están alterados en comparación con los controles (Theunis, C. *et al.* "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy", *PLoS. One.* 8, e72301 (2013); Hales, C.M. *et al.* (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar  
 40 Degeneration Biomarkers", *Int. Rev. Psychiatry* 25:210-220), y los colorantes de formación de imágenes pueden no detectar Tau patológica en todas las tauopatías (Fodero-Tavoletti, M. T. *et al.* (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies", *Alzheimers. Res. Ther.* 6:11). Es más probable que la formación de imágenes de estas lesiones de Tau junto con amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) conduzca a un diagnóstico preciso, ya que el patrón regional de los agregados de Tau difiere entre las diferentes tauopatías. Además,  
 45 todos ellos, excepto la enfermedad de Alzheimer, se definen en parte por la falta de depósito de  $A\beta$ . La formación de imágenes *in vivo* de placas de  $A\beta$  usando compuestos que se unen bien a las láminas  $\beta$  ya se encuentra en uso clínico (Mason, N.S. *et al.* (2013) "Positron Emission Tomography Radioligands For In Vivo Imaging Of  $A\beta$  Plaques", *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 56:89-95). Varios de estos ligandos de unión a Tau a base de colorantes se han identificado recientemente en estudios preclínicos y algunos de ellos se están evaluando (Fodero-Tavoletti, M. T. *et al.*  
 50 (2014) "Assessing THK523 Selectivity For Tau Deposits In Alzheimer's Disease And Non-Alzheimer's Disease Tauopathies", *Alzheimers. Res. Ther.* 6:11; Fodero-Tavoletti, M. T. *et al.* (2011) "18F-THK523: A Novel In Vivo Tau Imaging Ligand For Alzheimer's Disease", *Brain* 134:1089-1100; Zhang, W. *et al.* (2012) "A Highly Selective And Specific PET Tracer For Imaging Of Tau Pathologies", *J. Alzheimers. Dis.* 31:601-612; Chien, D.T. *et al.* (2013) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F-18]-T807", *J. Alzheimers. Dis.* 34:457-468;  
 55 Maruyama, M.H. *et al.* (2013) "Imaging Of Tau Pathology In A Tauopathy Mouse Model And In Alzheimer Patients Compared To Normal Controls", *Neuron* 79:1094-1108; Okamura, N. *et al.* (2005) "Quinoline And Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes For In Vivo Imaging Of Tau Pathology In Alzheimer's Disease" *J. Neurosci.* 25:10857-10862; Harada, R., *et al.* (2013) "Comparison Of The Binding Characteristics Of [18F]THK-523 And Other Amyloid Imaging Tracers To Alzheimer's Disease Pathology", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40:125-132; Ono, M. *et al.* (2011)  
 60 "Rhodanine And Thiohydantoin Derivatives For Detecting Tau Pathology In Alzheimer's Brains", *ACS Chem. Neurosci.* 2:269-275; Xia, C.F. *et al.* (2013) "[18F]T807, A Novel Tau Positron Emission Tomography Imaging Agent For Alzheimer's Disease", *Alzheimers. Dement.* 9:666-676; Chien, D.T. (2014) "Early Clinical PET Imaging Results With The Novel PHF-Tau Radioligand [F18]-T808", *J. Alzheimers. Dis.* 38:171-184; Villemagne, V.L. *et al.* (2014) "In Vivo Evaluation Of A Novel Tau Imaging Tracer For Alzheimer's Disease", *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 41:816-826;  
 65 Okamura, N. *et al.* (2014) "Non-Invasive Assessment Of Alzheimer's Disease Neurofibrillary Pathology Using 18F-THK5105 PET", *Brain* 137:1762-1771). La esperanza y la promesa de los ligandos a base de Tau es que serán mejores

que los ligandos de A $\beta$  para controlar el estado y la progresión de la neurodegeneración. Es probable que las sondas a base de anticuerpos proporcionen una mayor especificidad para detectar lesiones de Tau. En particular, los fragmentos de anticuerpos más pequeños que se unen a Tau son atractivos como ligandos para la formación de imágenes *in vivo* para detectar lesiones de Tau en pacientes con enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

Dentro del campo del cáncer, los anticuerpos terapéuticos se han desarrollado conjuntamente de forma rutinaria como agentes de formación de imágenes y varios de estos anticuerpos y moléculas de Fab están aprobados por la FDA para la formación de imágenes de tumores (Kaur, S. *et al.* "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging", *Cancer Lett.* 315, 97-111 (2012)).

Los presentes inventores han descubierto ligandos de formación de imágenes derivados de anticuerpos que proporcionan una excelente especificidad para detectar lesiones de Tau y, en particular, fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios más pequeños (moléculas de scFv) que son atractivos para la formación de imágenes *in vivo* de agregados de Tau. Se prevé que estos ligandos de formación de imágenes derivados de anticuerpos puedan ser útiles para controlar la progresión de la enfermedad de la patología Tau, la eficacia de las terapias dirigidas a Tau y para identificar tauopatías negativas para A $\beta$ .

Gu *et al.* ((2013) *J. Biol. Chem.* 288(46):33081-33095) se refiere a dos anticuerpos contra tau dirigidos a la región 396/404 de Tau.

El documento US 2010/316564 se refiere a métodos y composiciones para tratar, prevenir y diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en un sujeto mediante la administración de un péptido tau inmunogénico o un anticuerpo que reconoce el epítipo de tau inmunogénico en condiciones eficaces para tratar, prevenir o diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.

Lemoine *et al.* ((2014) *Alzheimer's & Dementia* 10(4):P155) se refiere a la caracterización de la unión de THK5117 en el tejido cerebral con EA.

Krishnaswamy *et al.* ((2014) *Alzheimer's & Dementia* 10(4):P252) se refiere a derivados de anticuerpos contra Tau como agentes de formación de imágenes de diagnóstico para tauopatías.

Otvos *et al.* ((1994) *J. Neurosci. Res.* 39:669-673) se refiere al anticuerpo monoclonal PHF-1 que reconoce la proteína Tau fosforilada en los restos serina 396 y 404.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende: (A) un fragmento de anticuerpo variable monocatenario (scFv), en donde dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y (B) un portador no tóxico farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o estabilizante. La presente invención también se refiere a métodos, medicamentos para su uso y kits de los mismos como se define en las reivindicaciones. En la medida en que se mencionen otras composiciones farmacéuticas en el presente documento, estas se incluyen únicamente con fines de referencia. La presente invención se refiere a sondas de fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se define en las reivindicaciones que son capaces de unirse inmuno-específica y selectivamente a un epítipo que contiene fosfo-serina del péptido Tau-fosfo-serina 396/404 de Tau. Dichos ligandos de formación de imágenes son útiles para detectar el conformero patológico de la proteína Tau si está presente en una muestra biológica, especialmente junto con el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía, y proporcionar de este modo un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y otras patologías de Tau. Las moléculas de scFv de la presente invención tienen utilidad como marcadores de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas y como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dichas afecciones.

En detalle, la invención se refiere a un fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en las reivindicaciones, que es capaz de unirse inmuno-específicamente a un péptido Tau fosforilado que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos del péptido Tau 396/404 (SEQ ID NO: 7): TDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL, en donde los restos serina en las posiciones 11 y 19 del mismo (mostrados subrayados) están fosforilados, en donde la molécula de unión es adicionalmente capaz de unirse inmuno-específicamente a Tau fosforilada con mayor selectividad que a Tau no fosforilada.

La invención se refiere particularmente a un fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en las reivindicaciones en donde tras una inyección periférica en un receptor, la molécula de unión se colocaliza sustancialmente con un agregado de Tau.

El fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en las reivindicaciones comprende las seis de:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;
- (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; y/o
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

El fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en las reivindicaciones es scFv235 (**SEQ ID NO: 18**)

La invención también se refiere a fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se define en las reivindicaciones que están marcados de forma detectable y, especialmente, en donde el marcador detectable es un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador radioisotópico o un marcador enzimático. En una realización de la presente invención, el fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en las reivindicaciones está marcado de forma detectable.

La invención también se refiere al uso de cualquiera de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se define en las reivindicaciones en un método *ex vivo* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto en donde dicho método comprende:

- (A) proporcionar una muestra de biopsia del sujeto;
- (B) poner en contacto la muestra con el fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en el presente documento; y
- (C) detectar la presencia, en su caso, de Tau fosforilada en la muestra de dicho sujeto, usando dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario. En una realización, la muestra de biopsia es del cerebro o de un líquido biológico (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero, plasma, etc.) de un sujeto receptor. La invención se refiere particularmente a un uso de este tipo, el uso en donde la detección comprende la formación de imágenes *ex vivo* de la molécula de unión unida a la proteína Tau fosforilada y, más particularmente, en donde la detección es para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía de un sujeto. La presente invención proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto, en una muestra de biopsia del sujeto, como se define en las reivindicaciones.

La invención también se refiere a un medicamento *in vivo* para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía de un sujeto, en donde el medicamento comprende una composición farmacéutica que comprende fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se define en las reivindicaciones en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía, y uno o más portadores, diluyentes y/o estabilizantes.

La invención se refiere particularmente a los usos citados anteriormente, en donde el sujeto es un ser humano.

La presente invención proporciona un kit para detectar o medir la presencia o cantidad de proteína Tau fosforilada en el cerebro de un sujeto, o para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto, en donde dicho kit comprende la composición farmacéutica de la invención como se define en las reivindicaciones.

La invención se refiere además a cualquiera de los métodos *ex vivo* citados anteriormente, o a cualquiera de los medicamentos citados anteriormente, o a cualquiera de los kits citados anteriormente, en donde la tauopatía se selecciona del grupo que comprende demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia con granos argirófilos, complejo demencia-parkinsonismo de esclerosis lateral amiotrófica, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Strausler-Scheinker, enfermedad de Hallerworden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, panencefalitis esclerosante subaguda, distrofia miotónica, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, parkinsonismo postencefalítico, traumatismo craneoencefálico agudo y encefalopatía traumática crónica.

#### Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A-1B** muestran la unión de clones de scFv seleccionados aleatoriamente generados a partir del anticuerpo 6B2G12 (**Figuras 1A y 1B**) al epítipo no fosforilado de la **SEQ ID NO: 27** o el epítipo de Tau fosforilado de la **SEQ ID NO: 28**. Los clones de la **Figura 1A** se seleccionaron contra el epítipo fosforilado (**SEQ ID NO: 28**). Los clones de la **Figura 1B** se seleccionaron contra el epítipo no fosforilado (**SEQ ID NO: 27**).

**Figuras 2A-2E:** scFv235 se une selectivamente al epítipo de fosfo-Tau y a la proteína Tau en el homogeneizado de cerebro con enfermedad de Alzheimer.

La **Figura 2A** muestra que scFv235 se une selectivamente al epítipo de fosfo-Tau-serina 396/404 (P-Ser396/404) en ELISA en comparación con su epítipo equivalente no fosforilado (Ser396/404).

La **Figura 2B** muestra que scFv235 se une específicamente a Tau del homogeneizado de cerebro con enfermedad de Alzheimer. La incubación de un homogeneizado de cerebro de un individuo con enfermedad de Alzheimer con scFv235 da como resultado la inmunoprecipitación de bandas de Tau en el intervalo de 50-70 kDa. Las transferencias Western con CP27 (Tau humana) y anticuerpo contra Tau total policlonal (Dako) mostraron resultados similares sin

que se detectasen otras bandas. A modo de comparación, se muestra un sobrenadante de baja velocidad (LSS, por sus siglas en inglés) del homogeneizado de cerebro en una calle adyacente de la misma transferencia con varias bandas Tau positivas adicionales.

- 5 **Figura 2C:** La incubación de un homogeneizado de cerebro de un individuo con enfermedad de Alzheimer con 6B2G12 da como resultado la inmunoprecipitación de bandas de Tau en el intervalo de 50-70 kDa, así como fragmentos de degradación en el intervalo de 20-30 kDa. Las transferencias Western con CP27 (Tau humana) y anticuerpo contra Tau total policlonal (Dako) mostraron una mayor detección de Tau intacta con CP27 y fragmentos de Tau más pequeños con Tau Dako. A modo de comparación, se muestra un sobrenadante de baja velocidad (LSS, por sus siglas en inglés) del homogeneizado de cerebro en una calle adyacente de la misma transferencia con varias bandas Tau positivas adicionales.

- 15 **Figura 2D:** Muestra los resultados de la tinción diferencial para cuatro secciones de cerebro humano. **Fila 1:** sección de cerebro de un individuo con enfermedad de Alzheimer EA-1; **Fila 2:** sección de cerebro de un individuo con enfermedad de Alzheimer EA-2; **Fila 3:** sección de cerebro de un individuo con enfermedad de Pick; **Fila 4:** sección de cerebro de un individuo de control sano. **Columna A:** sección teñida con Hoechst para mostrar núcleos; **Columna B:** sección teñida con scFv235; **Columna C:** sección teñida con PHF1; **Columna D:** secciones fusionadas para mostrar la localización (véanse las flechas). La tinción de secciones de cerebro humano con scFv235 reveló una tinción neuronal extensa que mostró una localización parcial con la tinción PHF1. Se observó una tinción muy limitada en el tejido humano de control. Barra de escala = 20 µm.

**Figura 2E:** Muestra que scFv 235 se une a la proteína Tau patológica en secciones de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer, pero presenta una unión limitada a secciones de cerebro humano de control.

- 25 **Figuras 3A-3D:** Formación de imágenes *in vivo* de inclusiones de Tau en ratones P301L, htau/PSI, htau, Tg-SwDI y de tipo silvestre después de la inyección intracarotídea o intravenosa de scFv235 o 6B2G12 marcados con fluorescencia. En diferentes paneles se muestran imágenes representativas de diversos grupos.

- 30 **Figura 3A:** Formación de imágenes intracarotídeas. Imágenes grabadas antes de la inyección (**Columna A**) y a intervalos especificados (**Columna B**, **Columna C** y **Columna D**) post-inyección. **Fila 1:** imágenes de ratón transgénico P301L (12 meses de edad), inyectado con scFv235 marcado con un colorante de infrarrojo cercano (680 nm) y del que se obtuvieron imágenes antes de la inyección (**Columna A**) y 38 minutos (**Columna B**), 82 minutos (**Columna C**) y 220 minutos (**Columna D**) post-inyección. La señal se detecta en todo el cuerpo, con mayor intensidad en el cerebro, y disminuye lentamente con el tiempo. La señal cerebral alcanzó su punto máximo a 35-38 min (1714 % por encima de la señal basal pre-inyección) y se mantuvo fuerte 82 y 330 minutos post-inyección (1675 % y 1468 %, respectivamente). **Fila 2:** imágenes de un ratón transgénico htau/PSI (22 meses) inyectado con scFv235, registradas antes de la inyección y 37 minutos (**Columna B**), 65 minutos (**Columna C**) y 176 minutos (**Columna D**) post-inyección. De nuevo, la señal más intensa se detectó en el cerebro y disminuyó gradualmente con el tiempo. La señal cerebral alcanzó su punto máximo a los 37 minutos (1443 % por encima de la señal basal pre-inyección) y se mantuvo fuerte 65 y 176 minutos post-inyección (1144 % y 1093 %, respectivamente). **Fila 3:** imágenes de ratón wt (de tipo silvestre, por sus siglas en inglés) (9 meses) inyectado con scFv235, antes de la inyección y 37 minutos (**Columna B**), 75 minutos (**Columna C**) y 265 minutos (**Columna D**) post-inyección. Se detectó una señal cerebral muy limitada post-inyección y ninguna señal en la periferia. **Fila 4:** imágenes de ratón transgénico P301L (10 meses) inyectado con 6B2G12, registradas antes de la inyección y 37 minutos (**Columna B**), 170 minutos (**Columna C**) y 291 minutos (**Columna D**) post-inyección. La señal es más fuerte en el cerebro y disminuye gradualmente con el tiempo, con una señal similar obtenida 20-95 minutos post-inyección (600-632 % por encima del valor basal), con una reducción modesta en los 170 y 291 minutos representados (497 % y 431 %, respectivamente). **Fila 5:** imágenes de un ratón wt (8 meses) inyectado con 6B2G12, registradas antes de la inyección y 37 minutos (**Columna B**), 90 minutos (**Columna C**) y 225 minutos (**Columna D**) post-inyección. Prácticamente no se detecta ninguna señal. La barra de escala muestra la intensidad de píxeles máxima, mientras que la región de interés (ROI, por sus siglas en inglés) es la eficiencia radiante total (TRE, por sus siglas en inglés) de la intensidad de píxeles sumada.

- 50 **Figura 3B:** Análisis cuantitativo de señal cerebral de IVIS (Sistema de formación de imágenes *in vivo*) a lo largo del tiempo después de la inyección intracarotídea: La señal más alta se detectó en ratones P301L inyectados con scFv235. Los ratones mayores (11 y 12 meses) tuvieron un pico de eficiencia radiante total (TRE) a  $2,23E+11$  y  $2,64E+11$ , respectivamente, mientras que los ratones más jóvenes (3 y 8 meses) tuvieron señales máximas inferiores ( $1,88E+11$  y  $1,86E+11$ , respectivamente). El mismo modelo de P301L (7-10 meses) tuvo una señal cerebral fuerte, pero menor después de la inyección de 6B2G12, que variaba de  $2,20E+11$  a  $1,16E+11$ . Se observó una intensidad de señal similar en un ratón htau/PSI viejo inyectado con scFv235 (22 meses; pico a  $1,40E+11$ ) pero limitada en un ratón htau/PSI de 7 meses de edad, que se confirmó que carecía de patología Tau. Los ratones Wt (12-13 meses) y un ratón htau (13 meses) tuvieron una señal baja en todos los puntos temporales y no tenían patología Tau. La inyección del marcador fluorescente solo en un ratón htau/PSI viejo (23 meses) y un ratón P301L (7 meses) proporcionó una señal cerebral superior que en ratones wt, inyectados con scFv235 o anticuerpo, pero fue sustancialmente menor que en cualquiera de los ratones con tauopatía inyectados con scFv235 o 6B2G12. Se confirmó que estos dos ratones inyectados con colorante tenían una patología Tau extensa (véase la **Figura 4B**).

**Figura 3C:** Formación de imágenes intravenosas. Imágenes grabadas antes de la inyección (**Columna A**) y a intervalos especificados (**Columna B**, **Columna C** y **Columna D**) post-inyección. **Fila 1:** imágenes de ratón transgénico P301L (13 meses de edad), inyectado con scFv235 marcado con un colorante de infrarrojo cercano (680 nm) y del que se obtuvieron imágenes antes de la inyección (**Columna A**) y 18 minutos (**Columna B**), 210 minutos (**Columna C**) y 11520 minutos (día 8) (**Columna D**) post-inyección. La señal cerebral máxima se detectó 18 min (1754 % por encima del valor basal pre-inyección), con señal menor a los 210 min (reducción del 18 % con respecto a la señal máxima), que había disminuido sustancialmente a los 8 días (reducción del 43 %). **Fila 2:** imágenes de un ratón con placa de A $\beta$  Tg-SwDI (12 meses) registradas antes de la inyección y 25 minutos (**Columna B**), 60 minutos (**Columna C**) y 11520 minutos (día 8) (**Columna D**) post-inyección. Se detectó una señal cerebral muy limitada post-inyección y ninguna señal en la periferia. **Fila 3:** imágenes de ratón transgénico P301L (7 meses) inyectado con 6B2G12, antes de la inyección y 25 minutos (**Columna B**), 120 minutos (**Columna C**) y 11520 minutos (día 8) (**Columna D**) post-inyección. La señal cerebral era fuerte a los 25 minutos (1211 % por encima del valor basal pre-inyección), alcanzó su punto máximo a los 35 minutos (1445 %), con menor señal a los 120 minutos (reducción del 11 % desde la señal máxima) y fue mucho más débil a los 8 y 12 días (reducción del 67 % y 70 %, respectivamente). **Fila 4:** imágenes de ratón Tg-SwDI inyectado con 6B2G12 (12 meses), registradas antes de la inyección y 25 minutos (**Columna B**), 180 minutos (**Columna C**) y 11520 minutos (día 8) (**Columna D**) post-inyección. Se detectó una señal cerebral muy limitada post-inyección y ninguna señal en la periferia.

**Figura 3D:** Análisis cuantitativo de la señal cerebral de IVIS a lo largo del tiempo después de la inyección intravenosa: se inyectaron scFv235 y 6B2G12 en ratones P301L. Se pudieron obtener imágenes de estos ratones en puntos temporales más tempranos post-inyección que los ratones inyectados por vía intracarotídea, ya que esta última vía requiere cuidados postoperatorios más prolongados para prevenir la hemorragia. La señal máxima se obtuvo generalmente dentro de la primera hora post-inyección, dependiendo del animal, a intervalos similares para todas las sondas. La señal global fue sustancialmente superior para scFv235 y 6B2G12 en comparación con la IgG de control, aunque los ratones inyectados con IgG tenían la patología Tau más robusta (véase la **Tabla 6**). Un ratón inyectado con 6B2G12 (BI5) tenía una señal de IVIS comparable a la de los ratones inyectados con IgG, pero una patología Tau más modesta. La señal disminuyó gradualmente a lo largo de 14 días a velocidades diferentes para cada ratón P301L. Se detectó una señal muy limitada en todos los puntos temporales en los ratones Tg-SwDI o wt inyectados con cualquiera de las sondas.

**Figuras 4A-4D:** Colocalización de scFv235 y 6B2G12 inyectados con proteína Tau intraneuronal, marcadores de endosomas-autofagosomas-lisosomas y microglia. Los cerebros se extrajeron 3-4 horas después de la inyección intracarotídea y la formación de imágenes de IVIS, se fijaron, se seccionaron coronalmente y se tiñeron para: (1) Tau con Tau5 (Tau total), MCI (conformacional), PHF1 (fosfo-Tau) y (2) endosomas tempranos (EEA1); (3) endosomas tardíos/lisosomas (Rab 7); y (4) autofagosomas (LC3, P62). Las secciones también se tiñeron con microglía (Iba-1).

**Figura 4A:** Se obtuvieron imágenes de ratones P301L inyectados con scFv235 (**Filas 1-2, 4 y 7:** ratón "A12"; **Fila 3:** ratón "BB8"; **Filas 5-6:** ratón "A13") para identificar núcleos (**Columna A**), se obtuvieron imágenes con scFv235 (**Columna B**), se obtuvieron imágenes para mostrar PHF1 (**Columna C**) y se creó una imagen fusionada (**Columna D**). Las imágenes mostraron una colocalización parcial con MCI, Tau5 y PHF1, y una colocalización completa con Rab7, EEA1, LC3 y P62.

**Figura 4B:** Se obtuvieron imágenes de ratones htau/PSI inyectados con scFv235 (**Filas 1, 5, 7-8:** ratón "A47"; **Filas 2-4 y 6:** ratón "B32") para identificar núcleos (**Columna A**), se obtuvieron imágenes con scFv235 (**Columna B**), se obtuvieron imágenes para mostrar PHF1 (**Columna C**) y se creó una imagen fusionada (**Columna D**). Las imágenes mostraron una colocalización parcial del inyectado con scFv235 con MCI, Tau5 e Iba-1 (no se muestra) y una colocalización completa con anticuerpos contra PHF1, Rab7, EEA1, LC3 y P62.

**Figura 4C:** Se obtuvieron imágenes de ratones P301L inyectados con 6B2G12 (**Filas 1 y 7:** ratón "A52"; **Filas 2-6:** ratón "A50") para identificar núcleos (**Columna A**), se obtuvieron imágenes con scFv235 (**Columna B**), se obtuvieron imágenes para mostrar PHF1 (**Columna C**) y se creó una imagen fusionada (**Columna D**). Las imágenes mostraron una colocalización parcial con MCI, Tau5, PHF1, Rab7, EEA1, LC3 y P62.

**Figura 4D:** Se obtuvieron imágenes de ratones wt inyectados con scFv235 (**Filas 1-3**) o 6B2G12 (**Filas 4-6**) para identificar núcleos (**Columna A**), se obtuvieron imágenes con scFv235 (**Columna B**), se obtuvieron imágenes para mostrar PHF1 (**Columna C**) y se creó una imagen fusionada (**Columna D**). Las imágenes mostraron una señal limitada del fragmento de anticuerpo y una tinción limitada con los marcadores de anticuerpo, excepto por la Tau normal detectada con Tau5. Los núcleos se tiñen de azul con tinción nuclear de Hoechst. Barra de escala = 10  $\mu$ m. Las flechas apuntan a algunas de las neuronas con colocalización parcial. No se usaron flechas cuando hubo colocalización completa.

La **Figura 5** muestra que scFv235 se colocalizó con Tau patológica dentro de las neuronas cerebrales después de una inyección intracarotídea en ratones con ovillos P301L (F6) y htau/PSI (A47), pero no tuvo una captación detectable en ratones de control de tipo silvestre (RI).

Las **Figuras 6A-6F** muestran la excelente correlación que se observó de la señal de IVIS con (**Figuras 6A-6B**) señal

de sonda de tejido cerebral (scFv235:  $r = 0,98$ , 6B2G12:  $r = 0,87$ ) y con (**Figuras 6C-6D**) patología Tau (scFv235:  $r = 0,94$ , 6B2G12:  $r = 0,75$ ). La señal de la sonda de tejido cerebral también se correlacionó muy bien con (**Figuras 6E-6F**) patología Tau cerebral (scFv235:  $r = 0,99$ , 6B2G12:  $r = 0,97$ ).

## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende: (A) un fragmento de anticuerpo variable monocatenario, en donde dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y (B) un portador no tóxico farmacéuticamente aceptable, diluyente y/o estabilizante. La presente invención también se refiere a métodos, usos, medicamentos para su uso y kits de los mismos como se define en las reivindicaciones. En la medida en que se mencionen otras composiciones farmacéuticas en el presente documento, estas se incluyen únicamente con fines de referencia. La presente invención se refiere a sondas de fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios que son capaces de unirse inmunoespecífica y selectivamente a un epítipo que contiene fosfoserina del péptido Tau-fosfo-serina 396/404 de Tau. Dichos ligandos de formación de imágenes son útiles para detectar el conformero patológico de la proteína Tau si está presente en una muestra biológica, especialmente junto con el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía, y proporcionar de este modo un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y otras patologías de Tau. Las moléculas de scFv de la presente invención tienen utilidad como marcadores de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas, y como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dichas afecciones.

Las sondas de fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención proporcionan una mayor especificidad que los colorantes de lámina  $\beta$  para detectar lesiones de Tau en pacientes con EA u otras tauopatías. En particular, los fragmentos de anticuerpos más pequeños que se unen a Tau son atractivos como ligandos para la formación de imágenes *in vivo*. Su tamaño más pequeño en comparación con los anticuerpos conduce a un mejor acceso a los agregados de Tau. Otra ventaja es su eliminación relativamente rápida de la circulación en comparación con los anticuerpos no modificados que tienen semividas más prolongadas. Dentro del campo del cáncer, se han desarrollado conjuntamente de forma rutinaria anticuerpos terapéuticos como agentes de formación de imágenes y varios de estos anticuerpos y Fab o diacuerpos más pequeños y moléculas de scFv con mejores propiedades farmacocinéticas se han aprobado o propuesto como agentes de formación de imágenes de tumores (véase, Kaur, S. *et al.* (2012) "Recent Trends In Antibody-Based Oncologic Imaging", *Cancer Lett.* 315:97-111; Olafsen, T. *et al.* (2010) "Antibody Vectors For Imaging", *Semin. Nucl. Med.* 40:167-181).

### I. Tau y los péptidos tau inmunogénicos preferidos de la presente invención

Como se usa en el presente documento, el término "Tau" es sinónimo de la proteína Tau y se refiere a cualquiera de las isoformas de la proteína Tau (identificadas por ejemplo en UniProt como P10636, 1-9). La numeración de aminoácidos de Tau se proporciona con respecto a la SEQ ID NO: 1 como se muestra a continuación, siendo Met el aminoácido 1. "P-Tau" se refiere a una proteína Tau que se ha fosforilado en uno o más restos serina o treonina. Por ejemplo, P-Ser 396/404 se refiere a un polipéptido de Tau que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en donde los restos serina 396 y 404 están fosforilados:

#### SEQ ID NO: 1:

```
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIIEG
TTAAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTTPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP
GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV
QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L
```

Tau es una proteína soluble asociada a microtúbulos que es fosforilada y desfosforilada dinámicamente por una serie de enzimas cinasas durante el ciclo celular. La capacidad de Tau para estabilizar los microtúbulos depende del grado de fosforilación. En su forma desfosforilada, la proteína es capaz de interactuar con la tubulina para estabilizar los microtúbulos y promover el ensamblaje de la tubulina en microtúbulos (que forman el citoesqueleto de la célula y son los componentes principales de los husos mitóticos que separan los cromosomas eucariotas en la mitosis). En su forma fosforilada, Tau es capaz de disociarse de los microtúbulos, permitiendo de este modo que se produzca la mitosis. La fosforilación de Tau actúa como un interruptor directo de asociación-disociación de microtúbulos dentro de la neurona (Pedersen, J.T. *et al.* (2015) "Tau Immunotherapy For Alzheimer's Disease", *Trends Mol. Med.* 3 de abril de 2015. pii: S1471-4914(15)00058-1; páginas 1-9).

La hiperfosforilación de Tau puede dar como resultado la formación de "ovillos" autoensamblantes insolubles, denominados en el presente documento "agregados de Tau", de filamentos helicoidales emparejados y filamentos lineales. Dichos agregados de Tau pueden ser intracelulares (por ejemplo, intraneuronales), pero también puede formarse fuera de las células. La presencia de agregados de Tau afecta a la capacidad de Tau para estabilizar los microtúbulos y, por lo tanto, conduce al desensamblaje de los microtúbulos, al colapso de la columna dendrítica y a la degeneración de los axones. La proteína Tau normal contiene, en promedio, dos sitios fosforilados; los filamentos Tau hiperfosforilados tienen en promedio entre siete y ocho sitios fosforilados. La Tau hiperfosforilada es el componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares que son el sello distintivo principal de la enfermedad de Alzheimer.

## II. Los anticuerpos preferidos y fragmentos de unión a epítomos de la presente invención

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta así como a una molécula que tiene un fragmento de unión a epítipo de la misma. Los anticuerpos de origen natural normalmente comprenden un tetrámero que por lo general está formado por al menos dos cadenas pesadas (H) y al menos dos cadenas ligeras (L). Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada, que por lo general comprende tres dominios (CH1, CH2 y CH3). Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgG (subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Las cadenas ligeras incluyen cadenas kappa y cadenas lambda. La región variable de cadena pesada y ligera normalmente es responsable del reconocimiento de antígenos, mientras que la región constante de cadena pesada y ligera puede participar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad", que se intercalan con regiones de secuencia más conservada, denominadas "regiones marco conservadas" (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL comprende tres dominios CDR y cuatro dominios FR dispuestos del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. De particular relevancia son los anticuerpos y sus fragmentos de unión al epítipo que se han "aislado" para que existan en un medio físico distinto de aquel en el que pueden aparecer en la naturaleza o que se han modificado para diferir de un anticuerpo de origen natural en la secuencia de aminoácidos.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos (incluyendo los fragmentos Fab y (Fab)<sub>2</sub>) que presentan la capacidad de unión a epítomos, por ejemplo, mediante escisión por proteasas de anticuerpos intactos, y dichos fragmentos pueden ser fragmentos de anticuerpos de dominio único, moléculas de scFv y dominios de unión a epítomos de anticuerpos, etc., que se forman usando técnicas recombinantes. Por ejemplo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, dichas secuencias génicas o su ADNc codificante pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador flexible (normalmente de aproximadamente 10, 12, 15 o más restos de aminoácidos) lo que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se asocian para formar moléculas de unión a epítipo monovalentes (conocidas como moléculas de Fv monocatenarias (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 85:5879-5883). Como alternativa, mediante el empleo de un enlazador flexible que es demasiado corto (por ejemplo, de menos de aproximadamente 9 restos) para permitir que las regiones VL y VH de una única cadena polipeptídica se asocien entre sí, se puede formar un anticuerpo biespecífico, diacuerpo o molécula similar (en la que dos cadenas polipeptídicas de este tipo se asocian para formar una molécula de unión a epítipo bivalente) (véase, por ejemplo, *PNAS USA* 90(14), 6444-8 (1993) para consultar una descripción de diacuerpos). Los fragmentos de anticuerpos de dominio único poseen solo un dominio variable (por ejemplo, VL o VH). Los ejemplos de fragmentos de unión a epítipo incluyen (i) fragmentos Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VN, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento W02007059782; (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) fragmentos Fv que consisten esencialmente en un dominio VL y VH, (v) fragmentos dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consisten esencialmente en un dominio VH y también llamados anticuerpos de dominio (Holt *et al.*; *Trends Biotechnol.* Noviembre de 2003; 21(11):484-90); (vi) camélido o nanocuerpos (Revets *et al.*; *Expert Opin Biol Ther.* Enero de 2005; 5\_(1): 1 11-24) y (vii) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aisladas. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se asocian para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o Fv monocatenario (scFv), véase, por ejemplo, Bird *et al.*, *Science* 242, 423-426 (1988) y Huston *et al.*, *PNAS USA* 85, 5879-5883 (1988)). Estos y otros fragmentos de anticuerpos se analizan adicionalmente en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique otra cosa, también incluye polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis peptídica y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado de este modo puede poseer cualquier isotipo. Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o



IgM) que está codificada por genes de la región constante de cadena pesada. La elección del isotipo normalmente estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como inducción de ADCC. Son isotipos de ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humanas, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo anti-Tau puede cambiarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo que originariamente era IgM, puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG. Además, pueden usarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Por lo tanto, la función efectora de los anticuerpos puede cambiarse mediante el cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.

Dichos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Pueden obtenerse fragmentos Fab tratando un anticuerpo IgG con papaína; pueden obtenerse fragmentos Fab' con digestión con pepsina del anticuerpo IgG. Un fragmento F(ab') también puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub>. Un fragmento Fab' puede obtenerse tratando un fragmento F(ab')<sub>2</sub> con un agente reductor, tal como ditiotretol. También puede generarse un fragmento de anticuerpo mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de traducción para producir una molécula de fragmento de anticuerpo truncado de este tipo. Los fragmentos adecuados capaces de unirse a un epítipo deseado pueden cribarse fácilmente para determinar su utilidad de la misma manera que un anticuerpo intacto.

Un ejemplo de un anticuerpo monovalente es como se describe en la publicación PCT WO 2007/059782 que tiene una supresión de la región bisagra. Un anticuerpo de este tipo puede construirse mediante un método que comprende: i) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo anti-alfa-sinucleína específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica la región CL constante de una Ig, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VL de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CL de una Ig están unidas operativamente entre sí, en donde, en caso de un subtipo IgG1, la secuencia de nucleótidos que codifica la región CL se ha modificado de manera que la región CL no contenga ningún aminoácido capaz de formar enlaces disulfuro o enlaces covalentes con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la región CL en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o a un ser humano; ii) proporcionar una construcción de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo monovalente, comprendiendo dicha construcción una secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y una secuencia de nucleótidos que codifica una región CH constante de una Ig humana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la región CH se ha modificado de manera que la región correspondiente a la región bisagra y, según lo requiera el subtipo de Ig, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprenden ningún resto de aminoácido que participe en la formación de enlaces disulfuro o enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con otros péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica de la región CH de la Ig humana en presencia de IgG humana policlonal o cuando se administra a un animal o a un ser humano, en donde dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región VH de un anticuerpo específico de antígeno seleccionado y dicha secuencia de nucleótidos que codifica la región CH de una Ig están unidas operativamente entre sí; iii) proporcionar un sistema de expresión celular para producir dicho anticuerpo monovalente; iv) producir dicho anticuerpo monovalente coexpresando las construcciones de ácido nucleico de (i) y (ii) en células del sistema de expresión celular de (iii).

De manera similar, un anticuerpo monovalente puede comprender:

- (i) una región variable de un anticuerpo como se describe en el presente documento o una parte de unión a antígeno de dicha región, y
- (ii) una región CH de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende las regiones CH2 y CH3, en donde la región CH o fragmento de la misma se ha modificado de manera que la región correspondiente a la región bisagra y, si la inmunoglobulina no es un subtipo IgG4, otras regiones de la región CH, tales como la región CH3, no comprenden restos de aminoácidos, que son capaces de formar enlaces disulfuro con una región CH idéntica u otros enlaces covalentes o no covalentes estables entre cadenas pesadas con una región CH idéntica en presencia de IgG humana policlonal.

En otro ejemplo, la cadena pesada del anticuerpo monovalente se ha modificado de manera que se ha suprimido toda la bisagra.

En otro ejemplo, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado de manera que no comprende ningún sitio aceptor para la glicosilación ligada a N.

Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo del mismo se une "inmunoespecíficamente" a una región de otra molécula (es decir, un epítipo) si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad o avidez con ese epítipo con respecto a epítopos alternativos. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a epítipo del mismo que se une específicamente a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana.

Como se usa en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo o fragmento de unión del mismo a un antígeno predeterminado, normalmente se refiere a la unión con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos cuando se determina mediante, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) en un instrumento biacore 3000 (preferentemente usando el anticuerpo como ligando y el antígeno como analito), y que se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  que es al menos diez veces inferior, tal como al menos 100 veces inferior, por ejemplo, al menos 1.000 veces inferior, tal como al menos 10.000 veces inferior, por ejemplo, al menos 100.000 veces inferior que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es inferior depende de la  $K_D$  del anticuerpo, de manera que cuando la  $K_D$  del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es inferior que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. El término " $k_d$ " ( $s^{-1}$  o  $1/s$ ), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se conoce como valor  $k_{off}$ . El término " $k_a$ " ( $M^{-1} \times s^{-1}$  o  $1/M$ ), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular. El término " $K_d$ " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término " $K_A$ " ( $M^{-1}$  o  $1/M$ ), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo particular y se obtiene dividiendo la  $k_a$  por la  $k_d$ .

Como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo o un fragmento de unión a epítipo del mismo se une "selectivamente" a un epítipo peptídico fosforilado si se une inmunoespecíficamente a dicho epítipo con mayor afinidad que con la que se une (si es que se une) a un epítipo peptídico no fosforilado que tiene la misma secuencia de aminoácidos. Dicha afinidad superior será al menos 10 veces superior, al menos 30 veces superior, al menos 100 veces superior, al menos 300 veces superior, al menos 1.000 veces superior, al menos 3.000 veces superior o al menos 10.000 veces superior. scFv235 se une "selectivamente" al péptido P-Ser396/404 fosforilado con respecto al péptido no fosforilado (presentando una "selectividad" de aproximadamente 4.000 veces). El grado de "selectividad" de un anticuerpo, o de un fragmento de unión a epítipo del mismo, para Tau fosforilada se determina comparando, a través de ELISA o Biacore, la afinidad con la que un scFv de dicho anticuerpo se une inmunoespecíficamente a un péptido Tau diana no fosforilado y a una variante fosforilada del mismo.

El término "epítipo" significa un determinante antigénico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos por lo general consisten en agrupaciones de moléculas de superficie tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen por que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también denominados componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que son bloqueados eficazmente por el péptido de unión a antígeno específicamente (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente).

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo" significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse inmunoespecíficamente a un epítipo. Un fragmento de unión a epítipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 dominios CDR de dicho anticuerpo y, aunque es capaz de unirse inmunoespecíficamente a dicho epítipo, puede presentar una inmunoespecificidad, afinidad o selectividad hacia dicho epítipo que difiere de la de dicho anticuerpo. Sin embargo, el fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en las reivindicaciones contiene los 6 dominios CDR.

Los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención, y sus fragmentos de unión a epítipo de Tau serán preferentemente "humanizados", en particular si se emplean con fines terapéuticos. El término "humanizado" se refiere a una molécula química, preparada generalmente usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables de anticuerpos no humanos completos fusionados con dominios constantes humanos, o sólo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dichos dominios variables injertadas en regiones marco conservadas humanas apropiadas de dominios variables humanos. Los restos marco de dichas moléculas humanizadas pueden ser de tipo silvestre (por ejemplo, totalmente humanos) o pueden modificarse para que contengan una o más sustituciones de aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo humano cuya secuencia ha servido como base para la humanización. La humanización reduce o elimina la probabilidad de que una

región constante de la molécula actúe como inmunógeno en individuos humanos, pero sigue existiendo la posibilidad de una respuesta inmunitaria a la región variable extraña (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) "*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE. UU.) 86:4220-4224). Otro enfoque se centra no solamente en proporcionar regiones constantes derivadas de regiones humanas, sino en la modificación de las regiones variables, así como en una remodelación tan estrecha como sea posible de las mismas a la forma humana. Se sabe que las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco conservadas (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que supuestamente proporcionan un armazón para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, las regiones variables se pueden "reconformar" o "humanizar" injertando CDR derivadas de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se ha de modificarse. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos se ha publicado por Sato, K. *et al.* (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies for Therapy*", *Nature* 332:323-327; Verhoeven, M. *et al.* (1988) "*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity*", *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) "*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation*". *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) "*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV- Neutralizing Activity*", *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) "*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE. UU.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) "*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*", *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) "*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE. UU.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) "*Humanization Of An Anti-pl85her2 Antibody For Human Cancer Therapy*", *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE. UU.) 89:4285-4289; y Co, M.S. *et al.* (1992) "*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen*", *J. Immunol.* 148:1149-1154. Algunos anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). Otros anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original. La capacidad de humanizar un anticuerpo es bien conocida (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE. UU. N.º 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.859.205; 6.407.213; 6.881.557).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo variable monocatenario humano. Pueden generarse anticuerpos humanos adecuados usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y en conjunto en el presente documento se denominan "ratones transgénicos".

El ratón HuMAb contiene un minilocus del gen de la inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de las regiones variable y constante de cadena pesada humana ( $\mu$  e Y) y las regiones variable y constante de cadena ligera (K) humana no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que activan los locus de la cadena  $\mu$  y K endógena (Lonberg, N. *et al.*, *Nature* 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, dichos ratones presentan expresión reducida de IgM o IgK de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos, experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgG, k humana de alta afinidad; anticuerpos monoclonales (Lonberg, N. *et al.* (1994), citado anteriormente; revisado en Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N., *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor, L. *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20, 6287- 6295 (1992), Chen, J. *et al.*, *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuaillon *et al.*, *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. *et al.*, *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Véanse también los documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7 tienen una alteración de JKD en sus genes de cadena ligera (kappa) endógenos (como se describe en Chen *et al.*, *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una alteración de CMD en sus genes de cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)) y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429).

Los ratones HCo12 tienen una alteración de JKD en sus genes de cadena ligera (kappa) endógenos (como se describe en Chen *et al.*, *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), una alteración de CMD en sus genes de cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), y un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424).

En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de cadena ligera kappa de ratón se había alterado homocigóticamente como se describe en Chen *et al.*, *EMBO J.* 12, 811-820 (1993) y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha alterado

homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF del cromosoma 14 (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478.

Los esplenocitos de estos ratones transgénicos pueden usarse para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. Los anticuerpos monoclonales o policlonales humanos o los anticuerpos que se originan a partir de otras especies también pueden generarse transgénicamente a través de la generación de otro mamífero o planta no humano que sea transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable del mismo. En relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos y recuperarse de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

En algunos anticuerpos, sólo parte de una CDR, en concreto, el subconjunto de restos de CDR necesarios para la unión, denominados las SDR, son necesarios para conservar la unión en un anticuerpo humanizado. Los restos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en las SDR pueden identificarse basándose en estudios previos (por ejemplo, los restos H60-H65 en CDR H2 con frecuencia no son necesarios), de regiones de CDR de Kabat que se encuentran fuera de los bucles hipervariables de Chothia (véase, Kabat *et al.* (1992) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Publicación de los Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU. N.º 91-3242; Chothia, C. *et al.* (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins", *J. Mol. Biol.* 196:901-917), mediante modelado molecular y/o empíricamente, o como se describe en Gonzales, N.R. *et al.* (2004) "SDR Grafting Of A Murine Antibody Using Multiple Human Germline Templates To Minimize Its Immunogenicity", *Mol. Immunol.* 41:863-872. En dichos anticuerpos humanizados en posiciones en las que uno o más restos de CDR de donante están ausentes o en las que se omite una CDR de donante completa, el aminoácido que ocupa la posición puede ser un aminoácido que ocupa la posición correspondiente (por numeración de Kabat) en la secuencia del anticuerpo aceptor. El número de dichas sustituciones de aminoácidos aceptores por donantes en las CDR que se han de incluir refleja un equilibrio de consideraciones por competencia. Dichas sustituciones son potencialmente ventajosas para disminuir el número de aminoácidos de ratón en un anticuerpo humanizado y, en consecuencia, disminuyen la posible inmunogenicidad. Sin embargo, las sustituciones también pueden provocar cambios de afinidad, y preferentemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de las CDR y los aminoácidos que se han de sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

El hecho de que una alteración de un único aminoácido de un resto de CDR puede dar como resultado la pérdida de la unión funcional (Rudikoff, S. *et al.* (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 79 (6):1979-1983) proporciona un medio para identificar sistemáticamente secuencias de CDR funcionales alternativas. En un método para obtener dichas CDR variantes, se somete a mutagénesis un polinucleótido que codifica la CDR (por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o mediante un método dirigido al sitio (por ejemplo, amplificación mediada por la cadena de polimerasa con cebadores que codifican el locus mutado)) para producir una CDR que tiene un resto de aminoácido sustituido. Comparando la identidad del resto relevante en la secuencia de CDR original (funcional) con la identidad de la secuencia de CDR variante sustituida (no funcional), se puede identificar la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj para esa sustitución. El sistema BLOSUM proporciona una matriz de sustituciones de aminoácidos creada mediante el análisis de una base de datos de secuencias para alineaciones fiables (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?", *Nature Biotech.* 22(8): 1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 89:10915-10919; Karlin, S. *et al.* (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective", *J. Mol. Biol.* 219, 555-565). En la actualidad, la base de datos BLOSUM más avanzada es la base de datos BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). La **Tabla 1** presenta las puntuaciones de sustitución BLOSUM62.ijj (cuanto más alta es la puntuación, más conservadora es la sustitución y, por lo tanto, es más probable que la sustitución no afecte a la función). Si un fragmento de unión a antígeno que comprende la CDR resultante no se une a R0R1, por ejemplo, entonces la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj se considera insuficientemente conservadora, y se selecciona una nueva sustitución candidata y se produce teniendo una puntuación de sustitución más alta. Por lo tanto, por ejemplo, si el resto original era glutamato (E) y el resto sustituto no funcional era histidina (H), entonces la puntuación de sustitución BLOSUM62.ijj será 0 y se prefieren cambios más conservadores (tales como a aspartato, asparagina, glutamina o lisina).

Tabla 1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3

(continuación)

Tabla 1																				
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Las sustituciones conservadoras pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas:

5

#### Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservadoras:

Tabla 2	
Restos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Restos básicos	Lys (K), Arg (R) e His (H)
Restos hidrófilos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Restos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

#### Clases alternativas de sustitución conservadora de restos de aminoácidos:

10

Tabla 3			
1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

#### Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de los restos de aminoácidos:

Tabla 4	
Restos que contienen grupo alcohol	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y

(continuación)

Tabla 4	
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos con carga negativa	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos cargados positivamente	H, K y R
Restos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Restos muy pequeños	A, G y S
Restos implicados en la formación de giros	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

Los grupos de sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

5 También pueden formularse grupos adicionales de aminoácidos usando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2.<sup>a</sup> Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

10 Como alternativa puede usarse la tecnología de presentación en fagos para aumentar (o disminuir) la afinidad de las CDR. Esta tecnología, conocida como maduración por afinidad, emplea mutagénesis o "avance de CDR" y la reelección usa el antígeno diana o un fragmento antigénico del mismo para identificar anticuerpos que tienen CDR que se unen con mayor (o menor) afinidad al antígeno en comparación con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (1992) *J. Immunology* 149:3903). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos simples da como resultado un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Es posible  
15 construir bibliotecas que consisten en una combinación de clones variantes, cada uno de los cuales difiere en modificaciones de un aminoácido único en una CDR única y que contienen variantes que representan cada posible sustitución de aminoácidos para cada resto de CDR. Los mutantes con afinidad de unión aumentada (o disminuida) por el antígeno pueden cribarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con afinidad por el  
20 antígeno aumentada o disminuida (por ejemplo, ELISA) (véase Wu *et al.* 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 95:6037; Yelton *et al.*, 1995, *J. Immunology* 155:1994). Posiblemente puede usarse avance de CDR, que aleatoriza la cadena ligera, (véase, Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Bio.* 263:551).

25 Se describen métodos para lograr dicha maduración por afinidad, por ejemplo, en: Krause, J.C. *et al.* (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody", *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. *et al.* (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas", *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. *et al.* (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes", *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. *et al.* (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal  
30 Antibody Against HIV-1 gp41", *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. *et al.* (2009) "ffinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth", *Virology* 393(1): 112-119; Finlay, W.J. *et al.* (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational  
35 Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions", *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. *et al.* (2009) *Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development Methods* *Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. *et al.* (2008) *Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification*, *Mol. Immunol.* 46(1): 135-144; y Barderas, R. *et al.* (2008) "Affinity Maturation Of Antibodies Assisted By In Silico Modeling", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 105(26):9029-9034.

40 La expresión "animal transgénico no humano" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas humanos de cadena pesada y/o ligera (ya sea integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos totalmente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o  
45 un transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpo anti-Tau humano cuando se inmuniza con antígeno Tau y/o células que expresan Tau. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tales como los ratones HC07 o HCo12 o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de ratones KM transcromosómicos como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones  
50 transgénicos y transcromosómicos (denominados colectivamente en el presente documento "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno determinado (tal como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) experimentando recombinación de V-D-J y cambio de isotipo.

El uso de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones como sondas de formación de imágenes de Tau tiene un gran potencial debido a su especificidad. Debido a la impermeabilidad general de la barrera hematoencefálica, se ha descubierto que se prefieren fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios más pequeños (moléculas de scFv) como ligandos de formación de imágenes *in vivo* para detectar lesiones de Tau. Las moléculas de scFv se forman como una proteína de fusión de las regiones variables de los dominios de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de un anticuerpo, conectados entre sí a través de un péptido enlazador corto de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 restos de aminoácidos. El enlazador por lo general es rico en glicina para mayor flexibilidad (por ejemplo, GGGGSGGGGSGGGGS (**SEQ ID NO: 2**) (Fisher, A. *et al.* (2009) "Efficient Isolation Of Soluble Intracellular Single-Chain Antibodies Using The Twin-Arginine Translocation Machinery", *J. Mol. Biol.* 385(1):299-311; Bird, R.E. *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", *Science* 242:423-426; Huston, J.S. *et al.* (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In *Escherichia coli*" *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 85:5879-5883), así como serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo N del dominio variable de cadena pesada con el extremo C del dominio VL variable de cadena ligera o viceversa (Huang, L. *et al.* (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases", *Int. J. Mol. Sci.* 14(9): 19109-19127; Ahmad, Z.A. *et al.* (2012) "scFv Antibody: Principles And Clinical Application", *Clin. Dev. Immunol.* 2012:980250; Huhlov, A. *et al.* (2004) "Engineered Single Chain Antibody Fragments For Radioimmunotherapy", *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 48(4):279-288). Un ejemplo de un enlazador de este tipo es GSTSGSGKPGSGEGSTKG (**SEQ ID NO:3**) (Whitlow, M. *et al.* (1993) "An Improved Linker For Single-Chain Fv With Reduced Aggregation And Enhanced Proteolytic Stability", *Protein Eng.* 6:989-995). El enlazador de la SEQ ID NO: 18 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 4**): SSGGGGSGGGGGSSRSS.

Con el fin de facilitar la purificación y/o recuperación, el scFv puede incluir una polihistidina ("**Marcador de His**") (por ejemplo, (**SEQ ID NO: 5**)<sup>HHHHHH</sup>). Las cadenas laterales de imidazol de los restos de histidina del marcador de His pueden participar en enlaces de coordinación reversibles con determinados iones de metales de transición, tales como Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y especialmente Ni<sup>2+</sup>. Por lo tanto, cuando se aplican moléculas de scFv marcadas con His a una matriz que contiene dichos iones metálicos, se unen específicamente a la matriz, mientras que la mayoría de las proteínas sin marcar no lo hacen. El scFv puede incluir adicionalmente o como alternativa un "**Marcador de HA**" tal como (**SEQ ID NO: 6**) GAYPYDVPDYAS. La hemaglutinina (HA) de la gripe humana es una glicoproteína de superficie necesaria para la infectividad del virus humano. El marcador de HA deriva de la glicoproteína de superficie hemaglutinina (HA) de la gripe humana y permite la detección del scFv usando un anticuerpo anti-marcador de HA (Millipore).

Las moléculas de scFv pueden expresarse directamente o como una proteína de fusión que está unida a un péptido líder N-terminal que se escinde para producir el scFv (véase, por ejemplo, Huston, J.S. *et al.* (1988) "Protein Engineering Of Antibody Binding Sites: Recovery Of Specific Activity In An Anti-Digoxin Single-Chain Fv Analogue Produced In *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 85:5879-5883). Por ejemplo, el scFv puede fusionarse con el péptido líder trp LE modificado (MLE)) y escindirse mediante la escisión ácida del enlace peptídico Asp-Pro (Piszkiwicz, D. *et al.* (1970) "Anomalous Cleavage Of Aspartyl-Proline Peptide Bonds During Amino Acid Sequence Determinations", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40(5): 1173-1178; Fraser, K.J. *et al.* (1972) "Specific Cleavage Between Variable And Constant Domains Of Rabbit Antibody Light Chains By Dilute Acid Hydrolysis", *Biochemistry* 11(26):4974-4977; Poulsen, K. *et al.* (1972) "An Active Derivative Of Rabbit Antibody Light Chain Composed Of The Constant And The Variable Domains Held Together Only By A Native Disulfide Bond." *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 69(9):2495-2499).

En una realización adicional, un scFv puede unirse a otro scFv (que puede ser igual o diferente) para formar una molécula bivalente. Esto puede hacerse produciendo una única cadena peptídica con dos regiones VH y dos VL, produciendo moléculas de scFv en tándem (Xiong, C.-Y. *et al.* (2006) "Development Of Tumor Targeting Anti-MUC-1 Multimer: Effects Of di-scFv Unpaired Cysteine Location On PEGylation And Tumor Binding", *Protein Engineering Design and Selection* 19(8):359-367; Kufer, P. *et al.* (2004) "A Revival Of Bispecific Antibodies", *Trends in Biotechnology* 22(5):238-24). Como alternativa, mediante un scFv en formación cuyo Dominio variable de cadena pesada está separado de su Dominio variable de cadena ligera por un enlazador que es demasiado corto para permitir que dichos dominios formen complejos entre sí y formen un sitio de unión a epítipo, se puede forzar a dos moléculas de scFv a dimerizarse en forma de un diacuerpo (Hollinger, P. *et al.* (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 90(14):6444-6448). Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación hasta 40 veces inferiores a las de las moléculas de scFv correspondientes, lo que significa que tienen una afinidad mucho mayor por su diana. Por consiguiente, los fármacos de diacuerpos podrían administrarse a dosis mucho más bajas que otros anticuerpos terapéuticos y son capaces de dirigirse a tumores de forma muy específica *in vivo* (Adams, G.P. *et al.* (1998) "Prolonged *in vivo* Tumour Retention Of A Human Diabody Targeting The Extracellular Domain Of Human HER2 neu", *Brit. J. Cancer* 77(9): 1405-1412). Los enlazadores aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros, los llamados triacuerpos o tricuerpos. También se han producido tetracuerpos. Presentan una afinidad incluso mayor por sus dianas que los diacuerpos (Le Gall, F. *et al.* (1999) "Di-, Tri- And Tetrameric Single Chain Fv Antibody Fragments Against Human CD19: Effect Of Valency On Cell Binding". *FEBS Letters* 453(1): 164-168). Todos estos formatos pueden estar compuestos por moléculas de scFv variables para formar dímeros, trímeros, etc. que tienen especificidad para dos o más epítopos

diferentes (es decir, diauerpos biespecíficos, etc.) (Dincq, S. *et al.* (2001) "Expression And Purification Of Monospecific And Bispecific Recombinant Antibody Fragments Derived From Antibodies That Block The CD80/CD86-CD28 Costimulatory Pathway", *Protein Express. Purificat.* 22(1): 11-24).

- 5 Como se analiza a continuación, se aislaron moléculas de scFv adecuadas de bibliotecas de moléculas de scFv que se habían generado a partir de hibridomas de anticuerpos contra Tau usando una tecnología de presentación en fagos combinatoria (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE. UU. N.º 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; y Winter, G. *et al.* (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology", *Annu. Rev. Immunol.* 12,433-455). Se identificaron numerosas moléculas de scFv selectivas de fosfo-Tau y se confirmó su reactividad hacia Tau mediante
- 10 inmunoprecipitación, tinción de tejido de tauopatía humano y de ratón, así como ensayos de afinidad. La inyección periférica de estas moléculas de scFv dio como resultado una fuerte señal cerebral *in vivo* en ratones transgénicos con tauopatía, pero no en ratones de tipo silvestre o con placa amiloide  $\beta$ . Se demostró que la señal de formación de imágenes se correlacionaba muy bien con la colocación de la sonda con agregados de Tau intraneuronales. Ambos se asociaron a marcadores de endosomas, autofagosomas y lisosomas, sugiriendo su interacción en estas vías de
- 15 degradación. Estas sondas de formación de imágenes derivadas de anticuerpos específicos tienen un gran potencial como marcadores diagnósticos para la EA y tauopatías relacionadas.

- Estos esfuerzos condujeron al aislamiento del anticuerpo anti-fosfo-Tau 396,404 preferido, 6B2G12, que se provocó contra un péptido que tenía la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 7**): TDHGAEIVYKSPVSGDTSPRHL, que corresponde a los restos de aminoácidos 386-408 de la proteína Tau (**SEQ ID NO: 1**). Los restos serina subrayados en las posiciones 11 y 19 de la **SEQ ID NO: 7** (correspondientes a las posiciones 396 y 404 de Tau (**SEQ ID NO: 1**)) están fosforilados. El inmunógeno empleado contenía este péptido, modificado para contener un resto
- 20 cisteína N-terminal que se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés).

- 25 El Dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 6B2G12 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 8**) (las CDR están subrayadas):

ELDVQMTQTP LTLSTVIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPQGS  
PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GYYCVQGTH  
SPLTFGAGTK LELK

- 30 El Dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 6B2G12 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 9**) (las CDR están subrayadas):

LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ SHGKSLEWIG  
SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE DSAVYYCAMG  
DSAWFAYWGQ GTLTVTS

- 35 Este anticuerpo se usó para formar la molécula de scFv: scFv235.

El Dominio variable de cadena ligera de scFv235 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 10**) (las CDR están subrayadas y la diferencia con el anticuerpo parental se muestra en cursiva):

- 40 ELDVVMTQTP LTLSTVIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPQGS  
PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GYYCVQGTH  
SPLTFGAGTK LELK

El Dominio variable de cadena pesada de scFv235 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 11**) (las CDR están subrayadas):

- 45 LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ SHGKSLEWIG  
SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE DSAVYYCAMG  
DSAWFAYWGQ GTLTVTS

Por lo tanto, la CDR1 de Dominio variable de cadena ligera de scFv235 y el anticuerpo 6B2G12 tienen ambos la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 12**): KSSQSLLYSNGKTYLN.

- 50 La CDR2 de Dominio variable de cadena ligera de scFv235 y el anticuerpo 6B2G12 tienen ambos la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 13**): LVSKLDS.



La CDR3 de Dominio variable de cadena ligera de scFv235 y el anticuerpo 6B2G12 tienen ambos la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 14**): VQGTHTSPLT.

La CDR1 de Dominio variable de cadena pesada de scFv235 y el anticuerpo 6B2G12 tienen ambos la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 15**): EYTFTEYTKH.

La CDR2 de Dominio variable de cadena pesada de scFv235 y el anticuerpo 6B2G12 tienen ambos la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 16**): SINPNNGDTYYNQKFTD.

La CDR3 de Dominio variable de cadena pesada de scFv235 y el anticuerpo 6B2G12 tienen ambos la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 17**): GDSAWFAY.

La secuencia completa de scFv235 es (**SEQ ID NO: 18**):

ELDVMTQTP LTLSVTIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPQGS  
PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GYYCYVQGT  
SPLTFGAGTK LELKSSGGGG SGGGGGGSSR SSLEVQLQQS GPVLKPGAS  
VKISCKTSEY TFTEYTKHWV KQSHGKSLEW IGSINPNNGD TYYNQKFTDK  
ATLTVDKSST TASMELRSLT FEDSAVYYCA MGDSAWFAYW GQGTLVTVSA

en donde los restos de aminoácidos 1-114 son los restos de aminoácidos del Dominio variable de cadena ligera descFv235 (**SEQ ID NO: 10**), los restos de aminoácidos 115-132 son los restos de aminoácidos del enlazador (**SEQ ID NO: 4**), los restos de aminoácidos 133-249 son los restos de aminoácidos del Dominio variable de cadena pesada de scFv235 (**SEQ ID NO: 11**).

En una realización preferida, se prepara scFv235 como una proteína de fusión que incluye una porción de péptido líder N-terminal que tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 19**): IQEEFKMKKTAIAIAVALAGFATVAQAA, y/o una porción de péptido de secuencia C-terminal. La porción de péptido de secuencia C-terminal puede incluir: un dominio constante de anticuerpo, tal como (**SEQ ID NO: 20**): AKTTPPSVTSGQAGQ (Hussein, A.H. et al. (2007) "Construction and Characterization of Single-Chain Variable Fragment Antibodies Directed against the Bordetella pertussis Surface Adhesins Filamentous Hemagglutinin and Pertactin", *Infect. Immun.* 75(11):5476-5482), un marcador de His, tal como (**SEQ ID NO: 5**): HHHHHH) y/o un marcador de HA tal como (**SEQ ID NO: 6**): GAYPYDVPDYAS, o cualquier combinación o subcombinación de los mismos, y en cualquier orden. Una porción de péptido C-terminal preferida tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 21**): AKTTPPSVTSGQAGQHSHHHHHGAYPYDVPDYAS, y por lo tanto incluye (en la dirección N-terminal a C-Terminal) **SEQ ID NO: 20**, **SEQ ID NO: 5**, y **SEQ ID NO: 6**.

Por lo tanto, en una realización preferida, la proteína de fusión scFv235 comprenderá la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 22-26 (en las que las porciones de péptido N-terminal y/o C-terminal de la fusión ScFv están subrayadas):

**SEQ ID NO: 22** (una fusión de las **SEQ ID NO: 19 y 18**)

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEL DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS  
ISCKSSQSLL YSNGKTYLNW LLQRPQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS  
GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCVQGTHTSP LTFGAGTKLE LKSSGGGGSG  
GGGGGSSRSS LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ  
SHGKSLEWIG SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE  
DSAVYYCAMG DSAWFAYWQG GTLVTVSA

**SEQ ID NO: 23** (una fusión de las **SEQ ID NO: 18 y 20**):

ELDVMTQTP LTLSVTIGQP ASISCKSSQS LLYSNGKTYL NWLLQRPQGS  
PKRLIYLVSK LDSGVPDRFT GSGSGTDFTL KISRVEAEDL GYYCYVQGT  
SPLTFGAGTK LELKSSGGGG SGGGGGGSSR SSLEVQLQQS GPVLKPGAS  
VKISCKTSEY TFTEYTKHWV KQSHGKSLEW IGSINPNNGD TYYNQKFTDK  
ATLTVDKSST TASMELRSLT FEDSAVYYCA MGDSAWFAYW GQGTLVTVSA  
AKTTPPSVTS GQAGQ

SEQ ID NO: 25 (una fusión de las SEQ ID NO: 19, 18 y 20)

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEL DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS  
 ISCKSSQSL L YSNGKTYLNW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLKI SRVEAEDLG V YYCVQGTHSP LTFGAGTKLE LKSSGGGGSG  
 GGGGGSSRSS LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ  
 SHGKSLEWIG SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE  
 DSAVYYCAMG DSAWFAYWGQ GTLTVSAAK TTPPSVTSGQ AGQ

5

SEQ ID NO: 26 (una fusión de las SEQ ID NO: 19, 18 y 21)

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAAEL DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS  
 ISCKSSQSL L YSNGKTYLNW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLKI SRVEAEDLG V YYCVQGTHSP LTFGAGTKLE LKSSGGGGSG  
 GGGGGSSRSS LEVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSEYTF TEYTKHWVKQ  
 SHGKSLEWIG SINPNNGDTY YNQKFTDKAT LTVDKSSTTA SMELRSLTFE  
 DSAVYYCAMG DSAWFAYWGQ GTLTVSAAK TTPPSVTSGQ AGQHHHHHG  
AYPYDVPDYA S

10 Aunque los scFv son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, pueden usarse diversos enfoques auxiliares para promover adicionalmente dicho tránsito (Huang, L. *et al.* (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases" *Int. J. Mol. Sci.* 14(9): 19109-19127).

15 Un conjunto limitado de proteínas y péptidos se transportan a través de la barrera hematoencefálica a través de transcitosis mediada por receptores (Hervé, E. *et al.* (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis", *AAPS J.* 10(3):455-472), siendo los tres ligandos mejor estudiados la insulina, hierro-transferrina y LDL-colesterol (Bickel, U. *et al.* (2001) "Delivery Of Peptides And Proteins Through The Blood Brain Barrier", *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46:247-279; Tuma, P.L. *et al.* (2003) "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers", *Physiol. Rev.* 83:871-932. Por lo tanto, el transporte de un scFv a través de la barrera hematoencefálica puede promoverse fusionando el scFv con un anticuerpo o un fragmento de unión a epítipo del mismo, que sea inmunoespecífico para un receptor de dichos ligandos (por ejemplo, el receptor de insulina humana (HIR), el receptor de transferrina (TfR), proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP1) y 2 (LRP2), receptor de toxina diftérica no tóxica/factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, etc.). La proteína de fusión resultante puede transportarse a través de la barrera hematoencefálica a través de su unión al receptor (Boado, R. J. *et al.* (2010) "IgG-Single-Chain Fv Fusion Protein Therapeutic For Alzheimer's Disease: Expression In CHO cells And Pharmacokinetics And Brain Delivery In The Rhesus Monkey" *Biotechnol. Bioeng.* 105:627-635; Jones, A.R. *et al.* (2007) "Blood-Brain Barrier Transport Of Therapeutics Via Receptor-Mediation" *Pharm. Res.* 24(9): 1759-1771; Wang, Y.Y. *et al.* (2009) "Receptor-Mediated Therapeutic Transport Across The Blood-Brain Barrier" *Immunotherapy* 1(6):983-993; Lajoie, J.M. *et al.* (2015) "Targeting Receptor-Mediated Transport For Delivery Of Biologics Across The Blood-Brain Barrier", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55:613-631; Pardridge, W.M. (2102) "Drug Transport Across The Blood-Brain Barrier", *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32(11): 1959-1972; Bhaskar, S. *et al.* (2010) "Multifunctional Nanocarriers For Diagnostics, Drug Delivery And Targeted Treatment Across Blood-Brain Barrier: Perspectives On Tracking And Neuroimaging", *Part. Fibre. Toxicol.* 7:3 págs. 1-25).

35 El scFv puede aumentarse para que contenga un péptido policationico que facilite la transcitosis mediada por adsorción. Los péptidos policationicos adecuados incluyen hexametilendiamina, putrescina, espermidina y espermina (Hervé, F. *et al.* (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis", *AAPS J.* 10(3):455-472; Kandimalla, K.K. *et al.* (2006) "Physiological And Biophysical Factors That Influence Alzheimer's Disease Amyloid Plaque Targeting Of Native And Putrescine Modified Human Amyloid Beta40", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:17-25). El scFv puede aumentarse para que comprenda grupos policationicos mediante un tratamiento que amida algunos o todos sus grupos carboxílicos (es decir, el grupo carboxilo terminal o las cadenas laterales carboxílicas de restos de glutamato o aspartato del scFv).

45 Como alternativa, el scFv puede aumentarse para que contenga un péptido de penetración celular ("CPP", por sus siglas en inglés) (Rao, K.S. *et al.* (2009) "Targeting Anti-HIV Drugs To The CNS", *Expert Opin. Drug Deliv.* 6(8):771-784; Mathupala, S.P. *et al.* (2009) "Delivery Of Small-Interfering RNA (siRNA) To The Brain", *Expert Opin. Ther. Pat.* 19(2): 137-140; Herve, F. *et al.* (2008) "CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis", *AAPS J.* 10(3):455-472). Dichos péptidos incluyen el péptido activador transcripcional (TAT) transactivante del VIH-1, el péptido del factor de transcripción del virus del herpes simple de tipo 1 (HSV VP-22), antenapedia y penetratina (Wadia, J.S. *et al.* (2004) "Transducible TAT-HA Fusogenic Peptide Enhances Escape Of TAT-Fusion Proteins After Lipid Raft Macropinocytosis", *Nat. Med.* 10:310-315; Richard, J.P. *et al.* (2003) "Cell-Penetrating Peptides. A Reevaluation Of

50

*The Mechanism Of Cellular Uptake", J. Biol. Chem. 278:585-590; Temsamani, J. et al. (2004) "The Use Of Cell-Penetrating Peptides For Drug Delivery", Drug Discov. Today 9:1012-1019).*

### III. Usos de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención

La presente invención se refiere al uso de fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de unión selectiva de fosfo-Tau e inmunoespecíficos de Tau, como se definen en las reivindicaciones, para diagnosticar y/o tratar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un paciente objeto. Con respecto a dicha utilidad diagnóstica, dichos usos pueden implicar la detección de la presencia de un conformero de Tau patológico usando los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones derivados del anticuerpo 6B2G12 de la presente divulgación que preferentemente se ha marcado de manera detectable (denominándose dichas moléculas colectivamente en la divulgación moléculas de diagnóstico). Estos usos implican detectar la presencia de un conformero de Tau patológico *ex vivo* (por ejemplo, en una muestra de biopsia o autopsia) usando las moléculas de diagnóstico de la presente invención. La presente invención proporciona un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto, en una biopsia del sujeto, como se define en las reivindicaciones.

En una realización, dichos fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios selectivos de fosfo-Tau e inmunoespecíficos de Tau pueden ser anticuerpos humanizados.

Con respecto a la utilidad terapéutica de la presente invención, dichos usos pueden implicar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones derivados del anticuerpo 6B2G12 a un paciente que tiene uno o más síntomas de la enfermedad de Alzheimer o dicha tauopatía y, por lo tanto, necesita dicha terapia, o puede implicar la administración de cantidades profilácticamente eficaces de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones derivados del anticuerpo 6B2G12 a un paciente que no presenta dichos síntomas, o que presenta síntomas de demencia leve o pretauopatía que son indicativos de enfermedad de Alzheimer o tauopatía incipiente, denominándose dichos fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios colectivamente en la divulgación moléculas terapéuticas. La presente invención proporciona un medicamento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía de un sujeto, en donde dicho medicamento comprende la composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía.

Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo de scFv (scFv235) tiene especificidad para P-Ser 396/404, sin embargo, junto con scFv235 pueden usarse moléculas de scFv que tengan especificidad para otro u otros péptidos Tau, por ejemplo, las descritas en el documento US 2008/0050383.

El término "tauopatía", como se usa en el presente documento, abarca cualquier enfermedad neurodegenerativa que implique la agregación patológica de microtúbulos de la proteína Tau dentro del cerebro. En consecuencia, además de la enfermedad de Alzheimer familiar y esporádica, las tauopatías de la presente invención incluyen, sin limitación, demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia con granos argirófilos, complejo demencia-parkinsonismo de esclerosis lateral amiotrófica, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Hallerworden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, panencefalitis esclerosante subaguda, distrofia miotónica, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, parkinsonismo postencefalítico, traumatismo craneoencefálico agudo y encefalopatía traumática crónica.

### IV. Producción de las moléculas de unión a Tau de la presente invención

Las moléculas de unión a Tau se producen preferentemente a través de la expresión recombinante de una molécula de ácido nucleico que codifica su cadena o cadenas polipeptídicas constituyentes. Por lo tanto, la presente invención se refiere también en consecuencia a un vector de expresión que codifica uno o más de dichos fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones.

Un vector de expresión puede ser cualquier vector de ADN o ARN adecuado, incluyendo vectores cromosómicos, no cromosómicos y de ácidos nucleicos sintéticos (una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico vírico (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-Tau está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe en, por ejemplo, Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 12, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como se describe en, por ejemplo, Schakowski *et al.*, *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), o como una

construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada de CaP04 (como se describe en, por ejemplo, el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler *et al.*, *Cell* 14, 725 (1978) y Coraro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión de un fragmento de anticuerpo variable monocatenario de unión a Tau, como se define en las reivindicaciones, en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison, WI) y similares).

Un vector de expresión también puede ser, o como alternativa, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel *et al.*, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987) y Grant *et al.*, *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

En un vector de expresión, una molécula de ácido nucleico que codifica un fragmento de anticuerpo variable monocatenario anti-Tau puede comprender o estar asociada a cualquier promotor, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión adecuados. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de IE de CMV humano, así como RSV, SV40, SL3-3, MMTV y promotores LTR de VIH), secuencias de terminación poli (A) eficaces, un origen de replicación para producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la materia reconocerá que dichos términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica en determinadas condiciones).

Incluso en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un fragmento de anticuerpo variable monocatenario de la invención o una molécula biespecífica de la divulgación como se define en el presente documento. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen levaduras, bacterias y células de mamíferos, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un fragmento de anticuerpo variable monocatenario que se une a Tau como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un fragmento de anticuerpo variable monocatenario anti-Tau como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un fragmento de anticuerpo variable monocatenario anti-Tau como se define en las reivindicaciones, comprendiendo dicho método las etapas de a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en el presente documento y b) purificar el fragmento de anticuerpo variable monocatenario del medio de cultivo.

En general, los fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios anti-Tau producidos pueden modificarse mediante asociaciones a dichos sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto está determinada generalmente por la capacidad de conservar al menos sustancialmente la selectividad anti-Tau y/o la especificidad anti-Tau asociada al fragmento de anticuerpo variable monocatenario anti-Tau parental no derivatizado. La inclusión de uno o más aminoácidos modificados puede aumentar la semivida sérica del polipéptido, reducir la antigenicidad del polipéptido o aumentar la estabilidad en el almacenamiento del polipéptido. El aminoácido o los aminoácidos se modifican, por ejemplo, cotraduccional o postraduccionalmente durante la producción recombinante (por ejemplo, glicosilación ligada a N en motivos N-X-S/T durante la expresión en células de mamífero) o se modifican por medios sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido modificado incluyen un aminoácido glicosilado, un aminoácido sulfatado, un aminoácido prenilado (por ejemplo, farnesilado, geranilgeranilado), un aminoácido acetilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido carboxilado, un aminoácido fosforilado y similares. Las referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos son abundantes a lo largo de la bibliografía. Se encuentran protocolos de ejemplo en Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. El aminoácido modificado puede seleccionarse, por ejemplo, de un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico o un aminoácido conjugado con un agente derivatizador orgánico.

Como se ha indicado anteriormente, cuando se desea aumentar la semivida de una molécula terapéutica administrada, dichas moléculas pueden formarse para comprender restos de hidratos de carbono, tales como polioles polioxiethylados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000, por ejemplo, aproximadamente 3.000-12.000 g/mol) (Moosmann, A. *et al.* (2014) "Purification Of PEGylated Proteins, With The

Example Of PEGylated Lysozyme and PEGylated scFv", *Methods Mol. Biol.* 1129:527-538; Jevsevar, S. *et al.* (2010) "PEGylation Of Therapeutic Proteins", *Biotechnol. J.* 5:113-228) o a través de glicosilación o añadiendo o asociando proteínas tales como la albúmina sérica humana (Müller, M.R. *et al.* (2012) "Improving The Pharmacokinetic Properties Of Biologics By Fusion To An Anti-HSA Shark VNAR Domain", *MAbs.* 4(6):673-685; Stork, R. *et al.* (2008) "N-Glycosylation As Novel Strategy To Improve Pharmacokinetic Properties Of Bispecific Single-Chain Diabodies", *J. Biol. Chem.* 283:7804-7812; Alt, M. *et al.* (1999) "Novel Tetravalent And Bispecific IgG-like Antibody Molecules Combining Single-Chain Diabodies With The Immunoglobulin Gamma1 Fc or CH3 Region", *FEBS Lett.* 454:90-94; Peters T. *et al.* (1985) "Serum Albumin", *Adv. Protein Chem.* 37:161-245). Se conocen polímeros y métodos de ejemplo para unirlos a péptidos, (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE. UU. N.º 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285 y 4.609.546).

## V. Composiciones farmacéuticas de la presente invención

Los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones con frecuencia se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios y una diversidad de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (21.<sup>a</sup> Edición) (2005) (Troy, D.B. *et al.* (Ed.) Lippincott Williams & Wilkins (Publ.), Baltimore MD). La forma preferida depende del modo previsto de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones también pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, portadores, excipientes, diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tales como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica, y que son vehículos habitualmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de dichos diluyentes agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros portadores, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o diversos tampones. Otros portadores son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Las composiciones también pueden incluir macromoléculas grandes de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (por ejemplo, sefarsa funcionalizada con látex, agarosa, celulosa y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (tales como gotículas de aceite o liposomas). La idoneidad de los portadores y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina basándose en la ausencia de una repercusión negativa significativa sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o la composición farmacéutica de la presente invención (por ejemplo, menos de una repercusión sustancial (por ejemplo, un 10 % o menos de inhibición relativa, un 5 % o menos de inhibición relativa, etc.)) sobre la unión al antígeno.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, sorbitol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden potenciar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención pueden prepararse con portadores que protegerán los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos portadores pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos,

ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Generalmente, los expertos en la materia conocen métodos para la preparación de dichas formulaciones. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

5 En una realización, los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención pueden formularse para garantizar una distribución *in vivo* adecuada. Los portadores farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Además, en las composiciones pueden incorporarse compuestos activos complementarios.

15 Normalmente, las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente acuoso o no acuoso o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes, por ejemplo, enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios, por ejemplo, de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la criodesecación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo anteriormente esterilizada por filtración.

35 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la criodesecación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo anteriormente esterilizada por filtración.

45 Para la administración parenteral, los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención normalmente se formulan como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceite, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, en las composiciones puede haber presentes sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético. El aceite de cacahuete, el aceite de soja y el aceite mineral son todos ejemplos de materiales útiles. En general, los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son transportadores líquidos preferidos, en particular para soluciones inyectables. Los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de manera que permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición de ejemplo comprende scFv235 a aproximadamente 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

60 Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas; pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas, tales como polilactida, poliglicólido o copolímero, para un efecto adyuvante potenciado (Langer, *et al.*, *Science* 249:1527 (1990); Hanes, *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97-119 (1997)). Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

## 65 VI. Administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención

Los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención pueden administrarse por medios parenterales, tópicos, orales o intranasales para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La inyección intramuscular (por ejemplo, en los músculos del brazo o de la pierna) y la infusión intravenosa son métodos preferidos de administración de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención. En algunas realizaciones, dichos fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios como se definen en las reivindicaciones se administran en forma de una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™ (Elan Pharm. Technologies, Dublín, Irlanda). En algunas realizaciones, los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado/a por vía parenteral", como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, por lo general mediante inyección, e incluyen la inyección epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intracraneal, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácico, epidural e intraesternal, subcutánea e infusión. En una realización, esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos, se administran a un paciente susceptible de padecer, o de otro modo, en riesgo de padecer, la enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retardar la aparición de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad.

En aplicaciones terapéuticas (es decir, en aplicaciones que implican a un paciente al que se le ha diagnosticado la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía), los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención se administran a dicho paciente en una cantidad suficiente para curar, tratar o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad (según lo aducido por evaluación bioquímica, histológica y/o conductual), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunas realizaciones, la administración de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención reducen o eliminan el deterioro cognitivo leve en pacientes que aún no han desarrollado la patología característica del Alzheimer.

Las dosis eficaces de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente pueden variar dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosis de tratamiento normalmente se ajustan para optimizar su seguridad y eficacia. Cualquier día dado que se administra una dosis, la dosis puede variar de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg y, más por lo general, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, las dosis de ejemplo incluyen: de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, por ejemplo, aproximadamente 0,15 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 0,2 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 0,5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1,5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 2 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal.

Un médico o veterinario que tenga experiencia habitual en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar con dosis del fragmento de anticuerpo variable monocatenario anti-Tau empleado en la composición farmacéutica de la invención a niveles inferiores a los necesarios con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz de este tipo dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, administrada próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. Aunque es posible que un compuesto se administre solo, es preferible administrar el compuesto en forma de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

Una pauta de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunas realizaciones, se administrarán uno, dos o más anticuerpos (o fragmentos de unión a

epítipo de los mismos) junto con la administración de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención, en cuyo caso, la dosis de cada molécula administrada se encuentra en los intervalos indicados.

La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

- 5 En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones es necesaria una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine y preferentemente hasta que el paciente muestre un alivio parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, al paciente se le puede administrar
- 10 dicha molécula terapéutica usando una posología profiláctica.

- Con fines terapéuticos, los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención se administran por lo general en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas (por ejemplo, un bolo o una infusión) pueden ser semanalmente, mensualmente o anualmente. En algunas realizaciones, la dosis se ajusta para
- 15 conseguir una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunas realizaciones de 25-300 µg/ml. Como alternativa, el fragmento de anticuerpo variable monocatenario de la presente invención puede administrarse en forma de una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se necesita una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la mayor semivida, seguidos
- 20 de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. Las moléculas de scFv, según se reivindica, generalmente tienen semividas séricas cortas.

- Otro aspecto de la presente invención es una terapia de combinación en donde un anticuerpo adicional, o un fragmento de unión a epítipo del mismo, que reconoce la proteína Tau, o un epítipo inmunogénico de la misma, se administra
- 25 en combinación con fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención. En el caso de enfermedades amiloidogénicas, tales como, la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, la modulación inmunitaria para eliminar los depósitos de beta-amiloide (Aβ) es una terapia emergente. Las inmunoterapias dirigidas a Aβ han dado como resultado uniformemente mejoras cognitivas. Es probable que las patologías de Tau y Aβ sean sinérgicas. Por lo tanto, una terapia de combinación dirigida a la eliminación de ambas enfermedades al mismo tiempo puede ser más eficaz dirigirse a cada una de ellas individualmente. En el caso de la enfermedad de Parkinson y enfermedades neurodegenerativas relacionadas, la modulación inmunitaria para eliminar las formas agregadas de la proteína α-sinucleína también es una terapia emergente. Una terapia de combinación dirigida a la eliminación de las proteínas Tau y α-sinucleína simultáneamente puede ser más eficaz que dirigirse a cada una de ellas individualmente.

## 35 VII. Utilidad de las moléculas de unión a Tau A. Utilidad diagnóstica

- La detección de la presencia de un confórmero de Tau patológico en un sujeto usando un fragmento de anticuerpo variable monocatenario de diagnóstico de la presente invención puede conseguirse obteniendo una muestra biológica del sujeto (por ejemplo, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo), poniendo en contacto la muestra biológica con dicho
- 40 fragmento de anticuerpo variable monocatenario de diagnóstico y detectando la unión de la molécula de diagnóstico a un confórmero de la proteína Tau patológico en la muestra del sujeto. Los ensayos para realizar la detección de una proteína Tau patológica en una muestra biológica que pueden adaptarse fácilmente a la detección de las moléculas de diagnóstico de la presente invención son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, ELISA, inmunohistoquímica, transferencia Western.

- Normalmente, el fragmento de anticuerpo variable monocatenario de diagnóstico de la presente invención está marcado, aunque en algunos métodos *ex vivo*, la molécula puede no estar marcada y se usa un agente marcador secundario para unirse a dicha molécula (acoplada o conjugada ya sea directamente a la molécula o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la materia. La elección del marcador depende del medio de detección. Por ejemplo, un marcador fluorescente (tal como un quelato de tierras raras (por ejemplo, un quelato de europio)), un marcador de tipo fluoresceína (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, diclorotriazinilamina fluoresceína), un marcador de tipo rodamina (por ejemplo, ALEXA FLUOR® 568 (Invitrogen), TAMRA® o cloruro de dansilo), VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer), ficoeritrina; umbeliferona, lisamina; una cianina; una
- 55 ficoeritrina, Rojo Texas, BODIPY FL-SE® (Invitrogen) o un análogo de los mismos, es adecuado para la detección óptica. Pueden emplearse marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, luminol, luciferasa, luciferina y aecuatorina). Dicho diagnóstico y detección también pueden lograrse acoplando la molécula de diagnóstico de la presente invención a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, o a complejos de grupos prostéticos tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina. También pueden emplearse marcadores paramagnéticos y marcadores radioisotópicos, y se detectan preferentemente usando tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). Los radiomarcadores incluyen, pero sin limitación, bismuto (<sup>213</sup>Bi), carbono (<sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C), cromo (<sup>51</sup>Cr), cobalto (<sup>57</sup>Co, <sup>60</sup>Co), cobre (<sup>64</sup>Cu), disprosio (<sup>165</sup>Dy), erbio (<sup>169</sup>Er), flúor (<sup>18</sup>F), gadolinio (<sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), germanio (<sup>68</sup>Ge), oro (<sup>198</sup>Au), holmio (<sup>166</sup>Ho), hidrógeno (<sup>3</sup>H), indio (<sup>111</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>115</sup>In), yodo (<sup>121</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), iridio (<sup>192</sup>Ir), hierro (<sup>59</sup>Fe), criptón (<sup>81m</sup>Kr), lantano (<sup>140</sup>La), lutelio (<sup>177</sup>Lu), manganeso (<sup>54</sup>Mn), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), nitrógeno (<sup>13</sup>N, <sup>15</sup>N), oxígeno (<sup>15</sup>O), paladio



- (<sup>103</sup>Pd), fósforo (<sup>32</sup>P), potasio (<sup>42</sup>K), praseodimio (<sup>142</sup>Pr), prometio (<sup>149</sup>Pm), renio (<sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re), rodio (<sup>105</sup>Rh), rubidio (<sup>81</sup>Rb, <sup>82</sup>Rb), rutenio (<sup>82</sup>Ru, <sup>97</sup>Ru), samario (<sup>153</sup>Sm), escandio (<sup>47</sup>Sc), selenio (<sup>75</sup>Se), sodio (<sup>24</sup>Na), estroncio (<sup>85</sup>Sr, <sup>89</sup>Sr, <sup>92</sup>Sr), azufre (<sup>35</sup>S), tecnecio (<sup>99</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Tl), estaño (<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn), xenón (<sup>133</sup>Xe), iterbio (<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb, <sup>177</sup>Yb), itrio (<sup>90</sup>Y) y cinc (<sup>65</sup>Zn); metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos (tales como iones paramagnéticos de aluminio (Al), bario (Ba), calcio (Ca), cerio (Ce), disprosio (Dy), erbio (Er), europio (Eu), gandominio (Gd), holmio (Ho), iridio (Ir), litio (Li), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), neodimio (Nd), osmio (Os), oxígeno (O), paladio (Pd), platino (Pt), rodio (Rh), rutenio (Ru), samario (Sm), sodio (Na), estroncio (Sr), terbio (Tb), tulio (Tm), estaño (Sn), titanio (Ti), wolframio (W) y circonio (Zr)), y en particular, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ti<sup>3+</sup>, V<sup>3+</sup> y V<sup>4+</sup>). Se conocen en la técnica métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados (véase, por ejemplo, Junghans *et al.*, en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2.<sup>a</sup> edición, Chafner y Longo, ed., Lippincott Raven (1996)) y las patentes de los EE. UU. N.º 4.681.581; 4.735.210; 5.101.827; 5.102.990; los documentos RE 35.500; 5.648.471 y 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina-T (Lindegren, S. *et al.* (1998) "Chloramine-T In High-Specific-Activity Radioiodination Of Antibodies Using N-Succinimidyl-3-(Trimethylstannyl)Benzoate As An Intermediate", *Nucl. Med. Biol.* 25(7):659-665; Kurth, M. *et al.* (1993) "Site-Specific Conjugation Of A Radioiodinated Phenethylamine Derivative To A Monoclonal Antibody Results In Increased Radioactivity Localization In Tumor", *J. Med. Chem.* 36(9): 1255-1261; Rea, D.W. *et al.* (1990) "Site-specifically radioiodinated antibody for targeting tumors", *Cancer Res.* 50(3 Supl):857s-861s).
- El diagnóstico se realiza comparando el número, el tamaño y/o la intensidad de los confórmers de Tau patológicos marcados, agregados de Tau y/u ovillos neurofibrilares en una muestra del sujeto, con los valores basales correspondientes. Los valores basales pueden representar los niveles medios en una población de individuos no enfermos. Los valores basales también pueden representar niveles previos determinados en el mismo sujeto.
- Los métodos de diagnóstico descritos anteriormente también pueden usarse para controlar la respuesta de un sujeto a la terapia. En esta realización, la detección de la presencia de Tau patológica en una muestra de un sujeto se determina antes del comienzo del tratamiento. El nivel de Tau patológica en la muestra del sujeto en este punto temporal se usa como valor basal. En diversos momentos durante el curso del tratamiento, la detección de confórmers de proteína Tau patológicos, agregados de Tau y/u ovillos neurofibrilares se repite y los valores medidos posteriormente se comparan con los valores basales. Una disminución en los valores con respecto a las señales basales indica una respuesta positiva al tratamiento. Los valores también pueden aumentar temporalmente en los líquidos biológicos a medida que la Tau patológica se elimina del cerebro.
- La presente invención se refiere además a un kit, como se define en las reivindicaciones, para realizar los métodos de diagnóstico y control descritos anteriormente. Normalmente, dichos kits contienen el fragmento de anticuerpo variable monocatenario de diagnóstico de la presente invención. El kit también puede incluir un marcador detectable. El propio fragmento de anticuerpo variable monocatenario de diagnóstico puede contener el marcador detectable (por ejemplo, molécula fluorescente, biotina, etc.) que es directamente detectable o detectable a través de una reacción secundaria (por ejemplo, reacción con estreptavidina). Como alternativa, puede usarse un segundo reactivo que contenga el marcador detectable, donde el segundo reactivo tiene especificidad de unión para el fragmento de anticuerpo variable monocatenario primario. En un kit de diagnóstico adecuado para medir la proteína Tau patológica en una muestra biológica, los anticuerpos del kit pueden suministrarse pre-unidos a una fase sólida, tal como los pocillos de una placa de microtitulación. La presente invención proporciona un kit para detectar o medir la presencia o cantidad de proteína Tau fosforilada en el cerebro de un sujeto, o para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto, en donde dicho kit comprende la composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones.

## B. Utilidad terapéutica

- Los fragmentos de anticuerpos variables de unión a Tau pueden marcarse con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección usando un sistema de formación de imágenes particular conocido por los expertos en la materia. Los niveles de fondo pueden determinarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo la comparación de la cantidad de molécula marcada detectada con un valor patrón determinado anteriormente para un sistema de formación de imágenes particular.
- El término "tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, significa mejorar, ralentizar o revertir el progreso o la gravedad de una enfermedad o trastorno, o mejorar, ralentizar o revertir uno o más síntomas o efectos secundarios de dicha enfermedad o trastorno. A efectos de la presente invención, "tratamiento" o "tratar" significa además un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados, donde los "resultados clínicos beneficiosos o deseados" incluyen, sin limitación, el alivio de un síntoma, la disminución de la extensión de un trastorno o enfermedad, estado estabilizado de la patología o trastorno (es decir, que no empeora), retardo o ralentización de la progresión de un estado de enfermedad o trastorno, mejora o paliación de un estado de enfermedad o trastorno, y remisión de una enfermedad o trastorno, ya sea parcial o total, detectable o indetectable.
- Una "cantidad eficaz", cuando se aplica a un fragmento de anticuerpo variable monocatenario de la invención, se refiere a una cantidad suficiente, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir un efecto biológico previsto o un resultado terapéutico deseado que incluye, sin limitación, resultados clínicos. La expresión

"cantidad terapéuticamente eficaz", cuando se aplica a un fragmento de anticuerpo variable monocatenario de la invención, tiene por objeto indicar una cantidad del fragmento de anticuerpo variable monocatenario que es suficiente para mejorar, paliar, estabilizar, revertir, ralentizar o retardar la progresión de un trastorno o estado de enfermedad, o de un síntoma del trastorno o enfermedad. En una realización, la presente invención proporciona un medicamento o un fragmento de anticuerpo variable monocatenario de la presente invención para la administración en combinación con otros compuestos. En dichos casos, la "cantidad eficaz" es la cantidad de la combinación suficiente para provocar el efecto biológico previsto.

Como se ha indicado anteriormente, un aspecto se refiere a un medicamento o fragmento de anticuerpo variable monocatenario de la presente invención para su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto a través de la administración de una cantidad eficaz del fragmento de anticuerpo variable monocatenario definido en las reivindicaciones para prevenir o tratar dicha enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía. Dicha administración puede proporcionarse para promover la eliminación de agregados de Tau del cerebro de un sujeto o puede proporcionarse con el fin de ralentizar un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto. Adicionalmente, dicha administración puede proporcionarse profilácticamente con el fin de retardar, impedir, atenuar o prevenir la aparición de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía asociada a los ovillos neurofibrilares. Una cantidad adecuada para lograr el tratamiento terapéutico o profiláctico se define, respectivamente, como una dosis terapéuticamente eficaz o una dosis profilácticamente eficaz. En pautas tanto profilácticas como terapéuticas, los agentes por lo general se administran en varias dosis hasta que se haya conseguido una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, la respuesta inmunitaria se controla y se administran dosis repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a disminuir. Una dosis terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz de dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la molécula para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios se ve compensado por el efecto terapéuticamente beneficioso.

Los pacientes aptos para el tratamiento incluyen individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer o dicha otra tauopatía que muestran síntomas clínicamente reconocidos o indicaciones de dichas afecciones, así como pacientes que actualmente no muestran síntomas de dichas afecciones. Aunque la enfermedad de Alzheimer se diagnostica definitivamente sólo mediante biopsia *post-mortem*, las personas que padecen enfermedad de Alzheimer son diagnosticadas clínicamente usando los criterios de la "Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados" ("ADRDA", por sus siglas en inglés) (Carrillo, M.C. *et al.* (2013) "Revisiting The Framework Of The National Institute On Aging-Alzheimer's Association Diagnostic Criteria", *Alzheimers Dement.* 9(5):594-601; Budson, A.E. *et al.* (2012) "New Criteria For Alzheimer Disease And Mild Cognitive Impairment: Implications For The Practicing Clinician", *Neurologist* 18(6):356-363; Sarazin, M. *et al.* (2012) "Clinical And Research Diagnostic Criteria For Alzheimer's Disease", *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 22(1):23-32; Husain, M.M. (2005) "Clinical Diagnosis And Management Of Alzheimer's Disease" *Neuroimaging Clin. N. Amer.* 15(4):767-777; Small, G.W. *et al.* (1997) "Diagnosis And Treatment Of Alzheimer Disease And Related Disorders. Consensus Statement Of The American Association For Geriatric Psychiatry, The Alzheimer's Association, And The American Geriatrics Society", *JAMA* 278(16): 1363-1371). Dichos individuos pueden distinguirse como alternativa de aquellos que tienen enfermedades o afecciones que no están relacionadas con la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía por la presencia de factores de riesgo correlacionados (es decir, uno o más factores que se ha encontrado que tienen una coincidencia superior al 50 % con la enfermedad de Alzheimer o dicha otra tauopatía). Dichos factores de riesgo correlacionados incluyen el hallazgo de que un paciente haya tenido familiares que hayan experimentado la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía similar, o presente antecedentes familiares de hipercolesterolemia o aterosclerosis. Dichos factores de riesgo correlacionados incluyen particularmente el hallazgo de que un paciente posee uno o más marcadores genéticos o bioquímicos que se han correlacionado con (es decir, se ha encontrado que tienen una coincidencia superior al 50 %) con la aparición de dicha enfermedad real. Los ejemplos de dichos marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones correlacionadas en el gen de APP, por ejemplo, mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 del gen de APP (denominadas mutaciones Hardy y Swedish, respectivamente). Otros marcadores adecuados de riesgo genético conocido incluyen mutaciones correlacionadas en los genes de presenilina (PS1 y PS2) y en el gen de ApoE4 (Bekris, L.M. *et al.* (2010) "Genetics of Alzheimer Disease " *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23(4):213-227).

Dichas mutaciones de PS1 incluyen las sustituciones: R35Q; A79V; V82L; L85P; V89L; V94M; V96F; V97L; F105I; F105L; F105V; L113P; L113Q; Y115C; Y115D; Y115H; T116I; T116N; P117A; P117L; P117R; P117S; E120D; E120D; E120G; E120K; E123K; N135D; N135S; A136G; M139I; M139I; M139K; M139T; M139V; I143F; I143M; I143N; I143T; I143V; M146I; M146I; M146I; M146L; M146L; M146V; T147I; L153V; Y154C; Y154N; H163R; H163Y; W165C; W165G; L166H; L166P; L166R; S169L; S169P; S170F; L171P; L173F; L173W; L174M; L174R; F175S; F177L; F177S; S178P; G183V; E184D; V191A; G206A; G206D; G206S; G206V; G209E; G209R; G209V; S212Y; I213F; I213L; I213T; H214D; H214Y; G217D; G217R; L219F; L219P; Q222H; Q222R; Q223R; L226F; L226R; I229F; A231T; A231V; M233I; M233L; M233L; M233T; M233V; L235P; L235V; F237I; F237L; K239N; T245P; A246E; L248R; L250S; L250V; Y256S; A260V; V261F; V261L; L262F; C263F; C263R; P264L; G266S; P267L; P267S; R269G; R269H; L271V; V272A; E273A; T274R; R278I; R278K; R278S; R278T; E280A; E280G; L282F; L282R; L282V; P284L; P284S; A285V; L286P; L286V; T291P; E318G; R358Q; S365A; R377M; G378E; G378V; L381V; G384A; F386S; S390I; V391F; L392P; L392V; G394V; N405S; A409T; C410Y; V412I; L418F; L420R; L424F; L424H; L424R; L424V; A426P; A431E; A431V; A434C; L435F;

P436Q; P436S; e I439S.

Dichas mutaciones de PS2 incluyen las sustituciones: R29H; G34S; R62C; R62H; R71W; A85V; T122P; T122R; S130L; V139M; N141I; L143H; V148I; R163H; M174V; S175C; Y231C; Q228L; M239V; M230I; A252T; P334R; T430M; e D439A.

Dichos alelos de ApoE4 incluyen el alelo  $\epsilon 4$ , el alelo  $\epsilon 3$  y el alelo  $\epsilon 2$  (Verghese, P.B. *et al.* (2011) "Apolipoprotein E In Alzheimer's Disease And Other Neurological Disorders." *Lancet Neurol.* 10(3):241-252).

Además, hay disponible una serie de ensayos de diagnóstico para identificar individuos que tienen la enfermedad de Alzheimer. Estos incluyen la medición de los niveles en LCR de Tau y A $\beta$ 42. Los niveles elevados de Tau y disminuidos de A $\beta$ 42 significan la presencia de la enfermedad de Alzheimer.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona está en riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, los medicamentos o fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención pueden administrarse profilácticamente a la población general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Los medicamentos o fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios de la presente invención son especialmente útiles para el tratamiento profiláctico de individuos que tienen un riesgo genético conocido de padecer la enfermedad de Alzheimer. En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Por lo general, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente cumpla 40, 50, 60, 70, 80 o 90 años. El tratamiento suele conllevar la administración de múltiples dosis durante un período de tiempo. El tratamiento controlarse sometiendo a ensayo fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios o respuestas de linfocitos T o linfocitos B activados a los fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios a lo largo del tiempo. Si la respuesta fracasa, se indica una dosis de refuerzo. En el caso de pacientes potenciales con síndrome de Down, el tratamiento puede comenzar prenatalmente administrando el agente terapéutico a la madre durante el embarazo o poco después del nacimiento del paciente.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran diversos métodos para composiciones en los métodos de diagnóstico o tratamiento de la invención. Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar, pero de ninguna manera limitar, el alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### Aislamiento de scFv235

Se generaron moléculas de scFv a partir del clon de hibridoma 6B2G12 (generado contra P-Ser396/404 de la proteína Tau) (Congdon, E.E.) *et al.* (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fc $\gamma$  Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance", *J. Biol. Chem.* 288:35452-35465; Gu, J. *et al.* (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology", *J. Biol. Chem.* 288(46):33081-33095). Brevemente, la estirpe celular de hibridoma 6B2G12 se cultivó a 37 °C con un CO<sub>2</sub> al 5 % en medio RPMI con estreptomicina (50  $\mu$ g/ml) y penicilina G (50 U/ml), y su ARNm se aisló y purificó según el protocolo de un kit de aislamiento de ARN (Promega), y posteriormente se almacenó a -80 °C. La primera cadena de ADNc se construyó según el protocolo de un kit de síntesis de primera cadena de ADNc (kit Takara (TAK6115A)).

Los clones se cribaron para determinar su capacidad de expresar moléculas de scFv inmuno-específicas para el epítipo de Tau P-Ser396, 404 usando péptidos (Fundación Keck, Universidad de Yale) que tienen las secuencias de Tau-serina 396/404 (**SEQ ID NO: 27**):

RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL

y Tau-fosfo-serina 396/404 (**SEQ ID NO: 28**):

RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL

en donde los restos serina subrayados en las posiciones 18 y 26 de la **SEQ ID NO: 28** (correspondientes a las posiciones 396 y 404 de Tau (**SEQ ID NO: 1**)) están fosforilados. Estos péptidos también pueden usarse para selección, para ELISA y en Biacore para estudios de unión. Se generaron miles de clones, de los cuales se representa la unión de 90 clones seleccionados aleatoriamente **Figuras 1A-1B**. Entre dichas moléculas de scFv seleccionadas estaba scFv235 (véase la **Figura 1A**).

#### Producción de anticuerpos solubles

Se produjeron scFv como se describe en Barbas, C. F., III *et al.* (2001) "Phage Display: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Cold spring Harbor, Nueva York. Brevemente, se produjo scFv235 en células de *E. coli* no

supresoras competentes (células Top 10, Invitrogen) en medio de súper caldo (SB) (10 g de MOPS, 30 g de triptona, 20 g de extracto de levadura por litro) con 50 µg/ml de carbenicilina y 20 ml de MgC12 1M por litro. El cultivo se indujo añadiendo IPTG 1 mM (isopropil-β-D-tiogalactósido) y se aisló scFv235 del sedimento como se describe en Barbas, C. F., III *et al.* (2001).

5

## Ejemplo 2

### Caracterización de scFv235

- 10 Una única construcción de aquellos scFv235 mostró una especificidad de fosfoepítipo superior tanto cuando el péptido se aplica como recubrimiento en placas de ELISA (**Figura 2A**) así como en Biacore cuando la molécula estaba inmovilizada y los péptidos de unión estaban en solución. Además, scFv235 o su anticuerpo parental, 6B2G12, inmunoprecipitaron la proteína Tau en homogeneizados de cerebro de individuos con enfermedad de Alzheimer
- 15 (**Figuras 2B-2C**) y muestran tinción de colocalización parcial con Tau patológica en tejido cerebral fijado con enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Pick (**Figura 2D-2E**). De manera significativa, scFv235 detectó solo bandas de proteína Tau de longitud completa, mientras que 6B2G12 se unió tanto a fragmentos de Tau de longitud completa como a fragmentos degradados.

- 20 El scFv235 marcado con His se purificó usando resina de agarosa Ni-NTA cargada en una columna de gravedad, siguiendo el protocolo del kit Qiagen. Después, el fragmento de anticuerpo se dializó en PBS y se usó para una caracterización adicional. La fosfoselectividad del scFv purificado se confirmó por primera vez en un ensayo ELISA como lo describió Asuni, A.A. *et al.* (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements", *J. Neurosci.* 27:9115-9129, en el que los péptidos Tau-fosfo-serina 396/404 y Tau-serina 396/404 se aplicaron como recubrimiento sobre la placa durante la
- 25 noche a 4 °C y, después del bloqueo, se incubaron con 2,5 µg de scFv235 durante 2 h. Se usó el anticuerpo secundario anti-HA conjugado con HRP para detectar scFv235 unido a 450 nm.

### Análisis por resonancia de plasmón superficial (SPR)

- 30 Las cinéticas de unión de scFv235 y su anticuerpo parental, 6B2G12, a sus moléculas diana se midieron mediante SPR en un Biacore 2000 (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se describió anteriormente (Krishnaswamy, S. *et al.* (2009) "Cloning Antifungal Single Chain Fragment Variable Antibodies By Phage Display And Competitive Panning Elution", *Anal. Biochem.* 395:16-24; Krishnaswamy, S. *et al.* (2011) "Isolation And Characterization Of Recombinant Single Chain Fragment Variable Anti-Idiotypic Antibody Specific To *Aspergillus fumigatus* Membrane Protein", *J. Immunol. Methods* 366:60-68). Brevemente, se diluyó scFv235/anticuerpo (10 µg/ml) en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, y se inmovilizó en un chip sensor CM5 separado con un kit de acoplamiento de amina (tiempo de contacto de 7 min a un caudal de 5 µl/min). El material unido a la superficie sin reaccionar se bloqueó con etanolamina. Se usó un canal de cada chip sensor, preparado de la misma manera sin scFv235 ni anticuerpo,
- 40 para controlar la unión no específica del péptido. Todas las mediciones se realizaron con tampón HBS-EP (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM y tensoactivo P20 al 0,005 %) a un caudal de 5 µl/min a 25 °C. Después de cada medición, la superficie del chip se regeneró con 10 µl de un tampón que contenía NaCl 500 mM y HCl de glicina 0,1 M, pH 8,0. Se determinó la unión de los péptidos Tau-fosfo-serina 396/404 y Tau-serina 396/404 a diversas concentraciones y se calculó la constante de disociación en equilibrio (Kd) usando el software BIAevaluation con  $K_d = K_{off}/K_{on}$ . La **Tabla 5** y la **Tabla 6** resumen la cinética y la especificidad de la unión del anticuerpo 6B2G12 y scFv235.

45

Tabla 5		
Péptidos analitos	Afinidad por K <sub>D</sub> (M)	
	6B2G12	scFv235
Fosfo-Tau-serina 396/404	$3,95 \times 10^{-10}$	$1,04 \times 10^{-6}$
Tau-serina 396/404	$2,51 \times 10^{-9}$	$4,06 \times 10^{-3}$

La selectividad de scFv235 para el péptido fosforilado (**SEQ ID NO: 28**) con respecto al péptido no fosforilado (**SEQ ID NO: 27**) ( $1 / [1,04 \times 10^{-6} / 4,06 \times 10^{-3}]$ ) es de  $3,9 \times 10^3$ .

Tabla 6						
Péptidos analitos	Asociación (1/Ms)		Disociación (1/S)		K <sub>D</sub> (M)	
	6B2G12	scFv235	6B2G12	scFv235	6B2G12	scFv235
Fosfo-Tau-serina 396/404	$3,69 \times 10^6$	$3,93 \times 10^3$	$1,46 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$	$3,95 \times 10^{-10}$	$9,94 \times 10^{-7}$
Tau-serina 396/404	$1,16 \times 10^6$	9,74	$2,92 \times 10^{-3}$	$3,96 \times 10^{-2}$	$2,51 \times 10^{-9}$	$4,06 \times 10^{-3}$

50

Por lo tanto, scFv235 tiene una afinidad aproximadamente 2.508 veces inferior por el péptido fosforilado P-Ser396/404

que el anticuerpo 6B2G12 (es decir, para fosfo-Tau-serina 396/404, la relación de [Asociación de 6B2G12 / Disociación de 6B2G12] con respecto a [Asociación de scFv235 / Disociación de scFv235] = 2.508), y una afinidad 1,62 millones de veces inferior por el péptido P-Ser396/404 no fosforilado que el anticuerpo 6B2G12 (es decir, para Tau 396/404 no fosforilada, la relación de [Asociación de 6B2G12 / Disociación de 6B2G12] con respecto a [Asociación de scFv235 / Disociación de scFv235] = 1,62 millones).

Por lo tanto, el anticuerpo 6B2G12 tiene una  $K_a$  para el péptido no fosforilado que es aproximadamente 3 veces inferior que su  $K_a$  para el péptido fosforilado, y una  $K_d$  para el péptido no fosforilado que es aproximadamente el doble de su  $K_d$  para el péptido fosforilado. Por el contrario, y de manera inesperada, scFv235, que deriva de este anticuerpo, presenta una  $K_a$  para el péptido no fosforilado que es aproximadamente 400 veces inferior que su  $K_a$  para el péptido fosforilado, y una  $K_d$  para el péptido no fosforilado que es aproximadamente diez veces inferior que su  $K_d$  para el péptido fosforilado.

### Inmunoprecipitación

Se usaron los kits Dynabeads His-Tag Isolation y Dynabeads Protein G (Invitrogen) para la inmunoprecipitación de Tau en homogeneizado de cerebro con EA (250 µg) con scFv235 o anticuerpo (10 µg), con el protocolo según las instrucciones del kit. Las proteínas arrastradas se separaron en geles de acrilamida al 10 %, seguido de transferencia Western. Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después, la transferencia se incubó con una dilución 1:1000 de CP27 (anticuerpo Tau específico humano) o anticuerpo Tau total (Dako), durante la noche a 4 °C. A esto le siguió una incubación de 2 h con anticuerpo secundario conjugado con HRP (1:1000) en PBS que contenía leche desnatada al 5 %. Después del lavado, las proteínas en la membrana se detectaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL; Pierce). Se obtuvieron imágenes de bandas inmunorreactivas usando el sistema de formación de imágenes Fuji LAS-4000.

Las moléculas de scFv arrastraron específicamente bandas de Tau en el intervalo de 50-70 kDa, unidas a Tau patológica en secciones de cerebro con enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Pick, y tenían afinidad en Biacore hacia el fosfoepítipo ( $1,04 \times 10^{-6}$  -  $6,05 \times 10^{-8}$  M) y el epítipo no fosforilado ( $4,06 \times 10^{-3}$  -  $1,86 \times 10^{-8}$  M).

### Tinción de tejido cerebral humano

El scFv235 purificado con marcador de His se marcó usando el kit de marcaje de proteínas ALEXA® FLUOR 568 (Molecular Probes, Invitrogen) según las instrucciones del kit. Se tiñeron varios cerebros con EA, enfermedad de Pick y de control emparejados por edad (National Disease Research Interchange) con el scFv235 marcado con 568 usando procedimientos convencionales. Brevemente, las secciones de cerebro montadas en portaobjetos e incluidas en parafina se desparafinaron en xileno y se aclararon a través de un gradiente de etanol, se lavaron en PBS, seguido de desenmascaramiento de epítipo en ácido fórmico al 0,3 % y, después de lavados con PBS, se incubaron con una mezcla de 10 µg/ml de scFv235 y dilución 1:1000 de sobrenadante de cultivo de anticuerpo Tau PHF1 durante la noche a 4 °C. El PHF1 unido se detectó con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Alexa Fluor 488, dilución 1:500, Life Technologies). Los núcleos se detectaron con DAPI y los portaobjetos se cubrieron con medio de montaje de reactivo antidecoloración ProLong Gold (Life Technologies). Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal de barrido láser Fluoview 1000 (Olympus) usando una longitud de onda y filtros de acuerdo a las características de los fluoróforos.

### Ejemplo 3

#### Animales, inyecciones de anticuerpos marcados y formación de imágenes de IVIS

En vista de sus características superiores, se eligió scFv235 para la formación de imágenes *in vivo* en ratones. Los ratones se alojaron en instalaciones aprobadas por AAALAC y recibieron alimento y agua a demanda. Los experimentos se realizaron con un protocolo aprobado por IACUC. Se usaron tres modelos diferentes de ovillos transgénicos: htau (Andorfer, C. *et al.* (2003) "Hyperphosphorylation And Aggregation Of Tau In Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms", *J. Neurochem.* 86:582-590); htau/PSI (Boutajangout, A. *et al.* (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model", *J. Neurosci.* 30:16559-16566) y JNPL3 (Lewis, J. *et al.* (2000) "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein", *Nat. Genet.* 25:402-405). Los controles fueron ratones de tipo silvestre y ratones de placa de Aβ transgénicos (Tg-SwDI (Davis, J. *et al.* (2004) "Early-Onset And Robust Cerebral Microvascular Accumulation Of Amyloid Beta-Protein In Transgenic Mice Expressing Low Levels Of A Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form Of Amyloid Beta-Protein Precursor", *J. Biol. Chem.* 279:20296, 20306).

Se realizaron inyecciones intracarotídeas según lo descrito por Asuni, A.A. *et al.* (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements", *J. Neurosci.* 27, 9115-9129. Brevemente, los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2 % y se mantuvieron con isoflurano al 1,5 % en O2 al 30 %. Después de exponer la vaina carotídea, se expusieron la arteria carótida común izquierda (CCA, por sus siglas en inglés), la arteria carótida externa (ECA, por sus siglas en inglés) y

la arteria carótida interna (ICA, por sus siglas en inglés) a través de una incisión en la línea media. Se ató una sutura de seda al extremo distal de la ECA y se ataron temporalmente la CCA izquierda, la ICA y la arteria pterigopalatina. Una aguja de calibre 30 conectada a un tubo PE-10 (Becton Dickinson, San Diego, CA) se conectó a una jeringa de 1 ml y después se administraron 250 µg de scFv235 marcado en 400-500 µl de PBS en la arteria carótida común durante un período de 10-15 min. Se aplicó pegamento KRAZY® en el sitio de la inyección para prevenir la hemorragia posoperatoria. Como alternativa, a los ratones se les inyectó en la vena femoral la misma dosis. Se afeitó la cara medial del muslo derecho y se limpió con solución de Betadine y etanol al 70 %. Se realizó una pequeña incisión (0,5 cm) paralela a la vena en la piel de la cara interna del muslo. Cuando se abre el ojal de la piel, es visible la vena femoral. Se fijó una aguja de calibre 30 conectada a un tubo PE-10 a una jeringa de 1 ml, y se administró a través de una aguja perforada hacia arriba en la vena femoral durante un período de 3-5 min de forma manual. Una vez retirada la aguja, se comprimió el sitio de la punción con un aplicador con punta de algodón, con el fin de evitar la hemorragia. Tan pronto como cesó el flujo de sangre, la piel se suturó con hilo de seda trenzado 4/0 usando suturas simples interrumpidas. Para la formación de imágenes de IVIS, se conjugó scFv235 o 6B2G12 con VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™ (Perkin Elmer). A los ratones se les afeitó la cabeza y el cuerpo para evitar la difracción de la luz provocada por el pelaje. Después de la inyección, los ratones se sometieron a formación de imágenes, a diversos intervalos como se detalla en las **Figuras 3A-3D**, en IVIS Lumina XR (Perkin Elmer) usando un filtro de excitación de 675 nm y un filtro de emisión Cy5.5.

La inyección intracarotídea con scFv235 marcado con un fluoróforo condujo a una colocación parcial (Tau-5) a completa (PHF-1) con agregados intraneuronales de Tau teñidos dentro del cerebro en ratones transgénicos con tauopatía (n = 6), pero no en ratones wt (n = 4). Además, el scFv se colocó con marcadores de endosomas-autofagosomas-lisosomas, que se sabe que contienen agregados de Tau, lo que sugiere que esta interacción tiene lugar en estas vías de degradación. Los resultados preliminares de la formación de imágenes de IVIS en ratones vivos muestran una señal sustancialmente más fuerte del hemisferio derecho en los ratones transgénicos en comparación con los de tipo silvestre cuando se toman imágenes aproximadamente 30 min después de la inyección intracarotídea derecha. Esta señal disminuye gradualmente y se propaga desde el cerebro a la periferia a lo largo de varias horas.

#### Análisis de imágenes de IVIS

Las imágenes se analizaron usando el software Living Imaging de Perkin Elmer según el protocolo en línea. Se calculó la eficiencia radiante total (intensidad de señal sumada) en la región de interés delineada (cerebro). La eficiencia radiante total se calculó como:

$$\text{Eficiencia radiante total} = \frac{p / s / \text{cm}^2 / \text{sr}}{\mu\text{W}/\text{cm}^2}$$

#### Inmunohistoquímica de secciones de cerebro de ratón

Después de la obtención de imágenes, el tejido se procesó según lo descrito por Asuni, A. A. *et al.* (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements", *J. Neurosci.* 27, 9115-9129. Brevemente, a los ratones se les perfundió PBS por vía transaórtica, los cerebros se extirparon y se fijaron en PLP al 2 % durante la noche, se colocaron en DMSO al 2 % en tampón de fosfato de glicerol al 20 % durante la noche, después se seccionaron para detectar la señal de 680XL-scFv235 y determinar la ubicación subcelular de scFv mediante cotinción con el marcador de la proteína Tau y el sistema endosómico/autofagosómico/lisosómico. Se prepararon secciones coronales en serie de 40 µm del cerebro y se realizó una tinción de inmunofluorescencia según el protocolo convencional en secciones flotantes libres. Brevemente, después de lavados con PBS, la permeabilización con Triton-X-100 al 0,3 % y el bloqueo en BSA al 5 %, el tejido se incubó con anticuerpos (1:500-1:1000) durante la noche a 4 °C [Tau (Tau5, MCI, PHF1), microglía (Iba1), endosomas tempranos (EEA1), endosomas tardíos (rab7), endosomas tardíos/lisosomas (lamp2, P62) y autofagosomas (LC3 y P62). Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón/conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) y los núcleos con DAPI. Después de cubrir con cubreobjetos con ProLong Gold, el tejido se analizó con un microscopio láser de barrido confocal Zeiss LSM 700. La extensión de la tinción con cada marcador y su colocación se calificó usando una escala semicuantitativa de 0-4 4, donde 1-4 indica un grado creciente de estos parámetros (1: mínima; 2: modesta; 3: moderada; 4: extensa). Dicho análisis se realizó para: 1) señal residual del scFv/anticuerpo marcado con fluorescencia inyectado; 2) grado de patología Tau cerebral; 3-4) extensión de la colocación de la señal de scFv/anticuerpo inyectado con 3) tinción de anticuerpo contra Tau o 4) tinción de anticuerpo contra endosoma/lisosoma/autofagosoma.

#### Estadística

El análisis de correlación entre los diferentes parámetros descritos en las **Figuras 6A-6F** se analizó mediante correlación de rangos de Spearman. Cuando la señal de tejido cerebral de scFv235 o anticuerpo era un parámetro, sólo se incluyeron cerebros de ratones extirpados pocas horas después de la inyección, ya que la señal de tejido cerebral se debilita con el tiempo. Para las correlaciones entre la señal de IVIS y la patología Tau, se incluyeron todos los ratones inyectados.

## Análisis de formación de imágenes

Los estudios de formación de imágenes usando el Sistema de formación de imágenes *in vivo* ("IVIS") reveló señales cerebrales fuertes de ratones transgénicos ("tg") con tauopatía cuando se inyectó scFv235 marcado con colorante de infrarrojo cercano en la arteria carótida derecha (250 µg/450-500 µl). La señal se mantuvo alta y relativamente estable durante al menos 250-300 min (**Figuras 3A-3D**). Los ratones JNPL3 (Lewis, J. *et al.* (2000) "*Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein*", *Nat. Genet.* 25:402-405), con la mutación de Tau P301L, mostraron una señal más fuerte que los ratones htau/PSI (Boutajangout, A. *et al.* (2010) "*Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model*", *J. Neurosci.* 30:16559-16566), que tienen una patología Tau global más leve. La señal cerebral de los ratones P301L inyectados con scFv235 alcanzó su punto máximo a los 35-38 minutos (1714 % por encima de la señal basal pre-inyección) y se mantuvo fuerte 82 y 330 minutos post-inyección (1675 % y 1468 %, respectivamente). En los ratones htau/PSI, la señal cerebral de scFv235 alcanzó su punto máximo a los 37 minutos (1443 % por encima de la señal basal pre-inyección) y se mantuvo fuerte 65 y 176 minutos post-inyección (1144 % y 1093 %, respectivamente). El modelo htau/PSI tuvo menos señal que los ratones P301L, tanto en el cerebro como en la periferia. Los ratones más viejos dentro de cada genotipo tenían una señal más fuerte que los ratones más jóvenes, lo que se esperaba puesto que aquellos deberían tener una patología Tau más avanzada. Se observó una señal mínima en ratones de tipo silvestre (wt) inyectados con la misma sonda o en ratones con ovidos que recibieron solamente el colorante fluorescente solo sin el scFv. El anticuerpo del que derivó scFv, 6B2G12, proporcionó resultados similares cuando se inyectó a la misma dosis y por la misma vía, aunque su intensidad de señal era sustancialmente menor. La formación de imágenes 20-95 minutos post-inyección mostró una señal del 600-632 % por encima del valor basal, con una reducción modesta a los 170 y 291 minutos representados (497 % y 431 %, respectivamente). Los ratones P301L mayores (11-12 meses) inyectados con scFv235 tuvieron una señal cerebral máxima [eficiencia radiante total (TRE)] de  $2,23 \times 10^{11}$  y  $2,64 \times 10^{11}$ , respectivamente, mientras que los ratones más jóvenes (3 y 8 meses) tuvieron señales máximas inferiores de  $1,88 \times 10^{11}$  y  $1,86 \times 10^{11}$ , respectivamente. El mismo modelo de P301L (7-10 meses) tuvo una señal cerebral fuerte, pero menor después de la inyección de 6B2G12, variando de  $2,20 \times 10^{11}$  a  $1,16 \times 10^{11}$ . Se observó una intensidad de señal similar en un ratón htau/PSI viejo inyectado con scFv235 (22 meses; pico a  $1,40 \times 10^{11}$ ) pero limitada en un ratón htau/PSI de 7 meses, que se confirmó que carecía de patología Tau. Los ratones Wt (12-13 meses) y un ratón htau (13 meses) tuvieron una señal baja en todos los puntos temporales y no tenían patología Tau. La inyección del marcador fluorescente solo en un ratón htau/PSI viejo (23 meses) y un ratón P301L (7 meses) proporcionó una señal cerebral superior que en ratones wt, inyectados con scFv235 o 6B2G12, pero fue sustancialmente menor que en cualquiera de los ratones con tauopatía inyectados con el scFv o anticuerpo. Se confirmó que estos dos ratones inyectados con colorante tenían una patología Tau extensa.

Posteriormente se extirparon los cerebros para realizar análisis adicionales para verificar la presencia y la ubicación subcelular del scFv o anticuerpo en el cerebro (**Figuras 4A-4D**). Ambos se detectaron principalmente en neuronas, parcialmente colocalizados con proteínas Tau patológicas y exclusivamente en el sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma. Se detectó una porción más pequeña en la microglía. Los ratones transgénicos con patología Tau limitada, por su corta edad, diferencias de modelo o variabilidad intramodelo, tuvieron una señal cerebral de IVIS débil después de la inyección del ligando de diagnóstico.

Los inventores también evaluaron la viabilidad de usar la vía intravenosa (i.v.), que sería más útil para inyecciones múltiples y para su uso clínico. De manera destacada, también se observaron fuertes señales cerebrales para ambos ligandos cuando se usó esta vía de administración, a la misma dosis, lo que indica, que incluso con el aclaramiento hepático de primer paso, en el cerebro entró una cantidad suficiente del ligando para permitir detectar claramente las lesiones de Tau. Se realizaron sesiones de formación de imágenes más largas en los ratones inyectados i.v., mostrando una eliminación gradual de la señal durante 8-14 días (**Figura 3C-3D**). En cuanto a la inyección intracutánea (i.c.), los ratones inyectados con el scFv mostraron una señal generalmente más fuerte que los ratones inyectados con el anticuerpo contra Tau. En ratones P301L inyectados i.v., la señal cerebral de scFv235 máxima se detectó a los 18 minutos (1754 % por encima del valor basal pre-inyección), con señal menor a los 210 min (reducción del 18 % con respecto a la señal máxima), que había disminuido sustancialmente a los 8 días (reducción del 43 %). En ratones inyectados con el anticuerpo 6B2G12, la señal cerebral era fuerte a los 25 minutos (1211 % por encima del valor basal pre-inyección), alcanzó su punto máximo a los 35 minutos (1445 %), con menor señal a los 120 minutos (reducción del 11 % desde la señal máxima) y fue mucho más débil a los 8 y 12 días (reducción del 67 % y 70 %, respectivamente). Los ratones P301L inyectados con IgG agrupada de control tuvieron una señal de IVIS modesta a pesar de tener una patología Tau muy extensa, y la señal cerebral no se colocó con los marcadores de Tau. Esto es coherente con los hallazgos previos de los inventores en tejidos de ratones P301L después de una inyección intracarotídea de IgG de control (Asuni, A.A. *et al.* (2007) "*Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements*", *J. Neurosci.* 27:9115-9129). Los ratones de tipo silvestre (Wt) o con placas de A $\beta$  (Tg-SwDI, (Davis, J. *et al.* (2004) "*Early-Onset And Robust Cerebral Microvascular Accumulation Of Amyloid Beta-Protein In Transgenic Mice Expressing Low Levels Of A Vasculotropic Dutch/Iowa Mutant Form Of Amyloid Beta-Protein Precursor*", *J. Biol. Chem.* 279:20296-20306) tuvieron una señal cerebral mínima en todos los puntos temporales, destacando la especificidad de las sondas para la patología Tau. Al igual que con la inyección i.c., el scFv o anticuerpo contra Tau se colocó con Tau patológica y las sondas se detectaron en el sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma dentro de las neuronas (**Figuras 3A-3D, Figuras 4A-4D**), y en cierta medida en la microglía.

Se descubrió que scFv235 se colocaliza con Tau patológica dentro de las neuronas cerebrales después de la inyección intracarotídea en ratones con ovillos P301L (F6) y htau/PS1 (A47). (**Figura 5**). Los cerebros se extirparon después de la última sesión de formación de imágenes. Se detectaron agregados de Tau con los anticuerpos PHF-1 y Tau-5, y mostraron una colocalización parcial con scFv235. Se usó una tinción nuclear específica para identificar los núcleos celulares. La **Figura 5** también muestra que los ratones de control de tipo silvestre (RI) no tuvieron una captación cerebral detectable de scFv235 después de la inyección intracarotídea. Tau-5 tiñó principalmente la proteína Tau axonal normal y no se observó tinción patológica de PHF1.

En resumen, una comparación del grado de la señal de IVIS, la señal de scFv o de anticuerpo residual de cerebros seccionados y la extensión de la patología de Tau, después de ambas vías de administración, reveló una excelente correlación entre estos parámetros (**Figuras 4A-4D, Tabla 7, Tabla 8 (Partes A-C), Figura 5 y Figuras 6A-6F**), scFv: señal de IVIS frente a señal de scFv de tejido cerebral,  $r = 0,93$ ,  $p < 0,0006$ ; señal de IVIS frente a patología Tau cerebral,  $r = 0,86$ ,  $p < 0,0002$ ; señal de scFv de tejido cerebral frente a patología Tau cerebral,  $r = 0,87$ ,  $p < 0,01$ ; 6B2G12: señal de IVIS frente a señal de 6B2G12 de tejido cerebral,  $r = 0,87$ ,  $p = 0,1$ ; señal de IVIS frente a patología Tau cerebral,  $r = 0,9$ ,  $p < 0,0004$ ; señal de 6B2G12 de tejido cerebral frente a patología Tau cerebral,  $r = 0,8$ ,  $p = 0,05$ . Estos hallazgos indican que este scFv particular, el anticuerpo parental y el enfoque global funcionaron muy bien para detectar y evaluar el grado de patología Tau en animales vivos.

Tabla 7			
Descripción general de los estudios de formación de imágenes de IVIS de ratones que recibieron una inyección intracarotídea o intravenosa con sondas de diagnóstico scFv235 o anticuerpo 6B2G12			
Vía de inyección y sonda	Ratones	Resultados	
<b>Objetivo:</b>		<b>Captación de scFv235 en el cerebro y unión a la proteína Tau patológica en neuronas</b>	
<b>Colorante conjugado:</b>		<b>Alexa Fluor 568</b>	
Intracarotídea - scFv235	3 htau/ PS1	Buena señal de scFv que se colocaliza bien con Tau5 y el anticuerpo MCI.	
Intracarotídea - scFv235	2 WT	Señal de scFv limitada	
<b>Objetivo:</b>		<b>Formación de imágenes de IVIS en vivo para scFv235/6B2G12</b>	
<b>Colorante conjugado:</b>		<b>VIVOTAG 680 XL FLUOROCHROME™</b>	
Intracarotídea - scFv235	3 htau/ PS1	Señales de IVIS	Señal de tinción
		No se realizó la formación de imágenes para el ratón B32	Señal de scFv fuerte que se colocaliza bien con agregados de Tau y marcadores de endosoma/autofagosoma/lisosoma (e/a/l) para el ratón B32
		Señal débil para el ratón BB5	Señal de scFv débil y sin patología Tau para el ratón BB5
		Señal fuerte en el hemisferio derecho que disminuye lentamente hasta 4 h para el ratón A47	Señal de scFv fuerte que se colocaliza bien con agregados de Tau y marcadores de e/a/l para el ratón A47
Intracarotídea - scFv235	4 P301L	Señal de scFv fuerte que se mantiene incluso después de 5 h	Señal de scFv fuerte que se colocaliza bien con agregados de Tau y marcadores de e/a/l
Intracarotídea - scFv235	2 WT y 1 htau	Señal débil	Señal de scFv débil. Patología Tau limitada (htau) o nula (wt)
Intracarotídea - Colorante libre	2 P301L	Señal modesta	Señal débil que no se colocaliza con los agregados de Tau
Intracarotídea - 6B2G12	3 P301L	Señal fuerte que disminuye lentamente las siguientes 3-5 h	Señal de 6B2G12 fuerte que se colocaliza bien con agregados de Tau y marcadores de e/a/l
Intracarotídea - 6B2G12	3 WT	Señal débil	Señal de 6B2G12 débil; Sin patología Tau



(continuación)

<b>Tabla 7</b> <b>Descripción general de los estudios de formación de imágenes de IVIS de ratones que recibieron una inyección intracarotídea o intravenosa con sondas de diagnóstico scFv235 o anticuerpo 6B2G12</b>			
Intravenosa - scFv235	3 P301L	Señal fuerte hasta 1 h que disminuye lentamente las siguientes 3 h	Señal scFv débil después de 7-31 días que se colocaliza bien con agregados de Tau y marcadores e/a/l
Intravenosa - scFv235	1 TgSwDI, 1 WT	Señal débil	Señales de scFv y anticuerpo contra Tau débiles
Intravenosa - 6B2G12	3 P301L	Señal fuerte hasta 1 h que disminuye lentamente las siguientes 3 h	Señal débil después de 7-31 días que se colocaliza bien con agregados de Tau y marcadores e/a/l
Intravenosa - 6B2G12	1 Tg-SwDI, 1 WT	Señal débil	Señal de 6B2G12 débil. Sin patología Tau
Intravenosa - IgG de control	2 P301L	Señal modesta	Señal de IgG de control débil. Patología Tau extensa, pero la IgG de control no se colocaliza con agregados de Tau

<b>Tabla 8 (Parte A)</b> <b>Señal de IVIS (Eficiencia radiante total máxima) y evaluación semicuantitativa de la señal de sonda de las secciones de cerebro, patología Tau y colocalización de la sonda inyectada con diversos marcadores de la proteína Tau y del sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma</b>					
ID de ratones	Cepa	Edad (Meses)	Material inyectado/Vía Intracarotídea (IC) Intravenosa (IV)	IVIS-Eficiencia radiante total máxima	Extirpación del cerebro después de la inyección
BB8	P301L	8	IC- scFv235	1,86E+11	180 minutos
A12	P301L	12	IC- scFv235	2,64E+11	330 minutos
A13	P301L	11	IC- scFv235	2,23E+11	252 minutos
F6	P301L	3	IC- scFv235	1,88E+11	280 minutos
A50	P301L	9	IC - 6B2G12	1,16E+11	291 minutos
A52	P301L	9	IC - 6B2G12	1,23E+11	235 minutos
C1	P301L	7	IC - 6B2G12	2,20E+11	Día 7
B32	htau/PS1	23	IC - scFv235	-	120 minutos
A47	htau/PS1	22	IC- scFv235	1,40E+11	200 minutos
BB5	htau/PS1	7	IC- scFv235	2,56E+10	200 minutos
R1	WT	11	IC- scFv235	4,36E+10	125 minutos
4	WT	8	IC- scFv235	1,34E+10	265 minutos
N32	htau	11	IC- scFv235	3,87E+10	Día 7
A56	htau/PS1	23	IC - Colorante 680	7,45E+10	122 minutos
D24	P301L	7	IC - Colorante 680	6,56E+10	165 minutos
1	WT	8	IC - 6B2G12	1,22E+10	290 minutos
2	WT	8	IC - 6B2G12	1,48E+10	225 minutos
3	WT	8	IC - 6B2G12	1,21E+10	180 minutos
A55	P301L	9	IV- scFv235	2,07E+11	Día 7
B11	P301L	13	IV- scFv235	2,28E+11	Día 31
E19	P301L	8	IV- scFv235	1,13E+11	Día 7
A49	P301L	11	IV - 6B2G12	1,48E+11	Día 12
C2	P301L	7	IV - 6B2G12	1,85E+11	Día 12
B15	P301L	13	IV - 6B2G12	7,62E+10	Día 31
VN139	Tg-SwDI	12	IV- scFv235	1,58E+10	Día 31
6	WT	8	IV- scFv235	1,11E+10	Día 7
VN142A	Tg-SwDI	12	IV - 6B2G12	1,49E+10	Día 31
7	WT	8	IV - 6B2G12	8,95E+09	Día 7

(continuación)

Tabla 8 (Parte A)					
Señal de IVIS (Eficiencia radiante total máxima) y evaluación semicuantitativa de la señal de sonda de las secciones de cerebro, patología Tau y colocación de la sonda inyectada con diversos marcadores de la proteína Tau y del sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma					
ID de ratones	Cepa	Edad (Meses)	Material inyectado/Vía Intracarotídea (IC) Intravenosa (IV)	IVIS-Eficiencia radiante total máxima	Extirpación del cerebro después de la inyección
D13	P301L	13	IV- IgG de control	8,94E+10	Día 16
D15	P301L	13	IV- IgG de control	9,03E+10	Día 16

Tabla 8 (Parte B)					
Señal de IVIS (Eficiencia radiante total máxima) y evaluación semicuantitativa de la señal de sonda de las secciones de cerebro, patología Tau y colocación de la sonda inyectada con diversos marcadores de la proteína Tau y del sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma					
ID de ratones	Señal cerebral en secciones	Patología Tau cerebral	Colocalización con marcadores de Tau		
			Tau5	MCI	PHF1
BB8	+++	+++	+++	+++	+++
A12	++++	++++	+++	+++	+++
A13	++++	+++	+++	+++	+++
F6	+++	++	+++	+++	+++
A50	+++	+++	+++	+++	++
A52	+++	+++	+++	+++	+++
C1	++	++++	+++	+++	+++
B32	+++	+++	+++	+++	+++
A47	+++	+++	+++	+++	+++
BB5	+	0	0	0	0
R1	+	0	0	0	0
4	+	0	0	0	0
N32	+	0	+	0	+
A56	+	++	0	0	0
D24	++	+++	0	0	0
1	+	0	0	0	0
2	+	0	0	0	0
3	+	0	0	0	0
A55	++	+++	++++	++++	+++
B11	+	+++	++++	++++	+++
E19	+	+++	++++	++++	+++
A49	++	+++	++++	++++	++
C2	++	+++	++++	++++	++
B15	+	+++	++++	++++	++
VN139	0	0	0	0	0
6	+	0	0	0	0
VN142A	0	0	0	0	0
7	+	0	0	0	0
D13	+	++++	0	0	0
D15	+	++++	0	0	0

Tabla 8 (Parte C)				
Señal de IVIS (Eficiencia radiante total máxima) y evaluación semicuantitativa de la señal de sonda de las secciones de cerebro, patología Tau y colocalización de la sonda inyectada con diversos marcadores de la proteína Tau y del sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma				
ID de ratones	Colocalización con marcadores de endosoma/lisozima/autofagia			
	EEA1	Rab7	LC3	P62
BB8	+++	+++	+++	+++
A12	+++	+++	+++	+++
A13	+++	+++	++++	+++
F6	+++	+++	++++	+++
A50	+++	+++	+++	+++
A52	+++	+++	+++	+++
C1	+++	+++	+++	+++
B32	+++	+++	++++	+++
A47	+++	+++	++++	+++
BB5	0	0	0	0
R1	0	0	0	0
4	0	0	0	0
N32	+	0	0	0
A56	0	0	0	0
D24	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
A55	+++	+++	+++	+++
B11	+++	+++	+++	+++
E19	+++	+++	+++	+++
A49	+++	+++	+++	+++
C2	+++	+++	+++	+++
B15	+++	+++	+++	+++
VN13 9	0	0	0	0
6	0	0	0	0
VN14 2A	0	0	0	0
7	0	0	0	0
D13	-	-	-	-
D15	-	-	-	-

Por lo tanto, en resumen, se generaron moléculas de scFv de un anticuerpo contra Tau monoclonal usando tecnología de presentación en fagos. Después de una caracterización exhaustiva, se evaluó scFv235 como una sonda de formación de imágenes en ratones vivos con tauopatía. El scFv235 mostró consistentemente una fuerte señal cerebral después de la inyección periférica en dos modelos de ratón con ovillos de tauopatía, pero no en ratones de tipo silvestre o con placa de A $\beta$ . La administración del anticuerpo original produjo resultados similares, pero con una intensidad de señal menor. Ambas sondas se colocalizan con agregados de Tau intraneuronales y marcadores de las vías endosoma/autofagosoma/lisosoma.

Los datos muestran que los anticuerpos contra Tau y sus derivados administrados periféricamente pueden usarse para obtener imágenes de lesiones cerebrales de Tau en animales vivos. De manera destacada, la intensidad de la señal cerebral se correlacionó muy bien con la extensión de la patología Tau, con importantes implicaciones para el uso experimental y clínico de este enfoque. Puede usarse en esta forma para el control no invasivo de la patología Tau y la eficacia del tratamiento en modelos animales de tauopatía, y dichos ligandos tienen un gran potencial como ligandos de PET clínicos para el mismo fin.

La excelente correlación entre la señal de IVIS, la señal de sonda residual en el tejido cerebral y la patología Tau confirman que este enfoque es útil para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías en seres

humanos y modelos animales relacionados y que proporciona un medio para controlar la eficacia del tratamiento en dichos pacientes y modelos animales relacionados.

La molécula de scFv o su anticuerpo parental se detectaron principalmente en neuronas, colocalizados con proteínas Tau patológicas en el sistema endosoma-autofagosoma-lisosoma. Esto es coherente con la distribución similar de anticuerpos contra Tau marcados y sus fragmentos Fab que se observa después de la inyección intracarotídea o la administración de dichas moléculas a cultivos de cortes de cerebro derivados de ratones con tauopatía (Gu, J. *et al.* (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology", *J. Biol Chem.* 288:33081-33095; Congdon, E. E. *et al.* (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance", *J. Biol Chem.* 288:35452- 35465; Asuni, A. A. *et al.* (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements", *J. Neurosci.* 27: 9115-9129; Krishnamurthy, P.K. *et al.* (2011) "Mechanistic Studies Of Antibody-Mediated Clearance Of Tau Aggregates Using An Ex Vivo Brain Slice Model", *Front. Psychiatry* 2:59). Sin embargo, este es el primer informe que detecta dichos agregados *in vivo* usando anticuerpos o sus fragmentos como agentes de formación de imágenes. Estudios preclínicos y clínicos previos dirigidos a Aβ, α-sinucleína o la proteína Tau demuestran que los anticuerpos tienen un acceso sustancial a los cerebros con agregados de estos péptidos/proteínas, presumiblemente debido a la inflamación asociada que conduce a la apertura de la barrera hematoencefálica (Congdon, E.E. *et al.* (2014) "Harnessing The Immune System For Treatment And Detection Of Tau Pathology", *J. Alzheimers. Dis.* 40:S113-S121; Lemere, C.A. *et al.* (2010) "Can Alzheimer Disease Be Prevented By Amyloid-Beta Immunotherapy?", *Nat. Rev. Neurol.* 6:108-119).

Existen varias explicaciones posibles para la señal inferior del anticuerpo en comparación con el scFv. El anticuerpo tiene aproximadamente 6 veces el tamaño del scFv (150 kDa frente a 25 kDa), lo que puede provocar una menor captación cerebral y neuronal. Las inyecciones tienen el mismo peso (250 µg) y, por lo tanto, contienen 6 veces menos moléculas del anticuerpo en comparación con el fragmento. Esta dosis inicial se eligió basándose en un estudio previo de captación cerebral de IgG policlonal marcada anti-Tau de ratón (Asuni, AA *et al.* (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements", *J. Neurosci.* 27:9115-9129). La mayor afinidad del anticuerpo por Tau, en comparación con el scFv puede contrarrestar estos problemas.

La señal cerebral de IVIS débil en ratones Tg con patología Tau limitada, respalda adicionalmente la conclusión de que la señal potenciada en los ratones Tg no es un mero reflejo de la sobreexpresión de Tau, sino que indica más bien la presencia de patología Tau. Los ratones JNPL3 (P301L) presentan una señal cerebral y periférica más fuerte que los ratones htau/PSI. Dentro del cerebro, esto encaja con una patología Tau más grave. La señal periférica mayor observada en ratones P301L parece derivar en parte de la médula espinal, que se sabe que tiene lesiones de Tau extensas en este modelo (Lewis, J. *et al.* "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein", *Nat. Genet.* 25, 402-405). Asimismo, el promotor priónico de su transgén de Tau mutado da como resultado una expresión de Tau más global que en el modelo de htau/PSI. Esto puede conducir a la agregación de Tau en diversos órganos.

Para estudios en animales, la formación de imágenes de IVIS es más rentable que los estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) e implica una preparación de la sonda mucho más sencilla; su marcaje se realiza con un colorante de infrarrojo cercano en lugar de un procedimiento de radiomarcado más complicado, lo que puede requerir un ciclotrón en el sitio. Por lo tanto, la formación de imágenes de IVIS es ideal para el desarrollo de sondas para seleccionar ligandos para estudios PET posteriores. Estos estudios indican además que es una forma eficiente de controlar el desarrollo de la patología Tau y de cribar la eliminación de agregados de Tau mediada por la terapia de Tau, sirviendo cada animal como su propio control durante los estudios longitudinales.

Los hallazgos respaldan firmemente la capacidad y el uso de anticuerpos contra Tau y/o sus moléculas de scFv para detectar lesiones de Tau *in vivo*. A diferencia de los colorantes que se unen a las láminas β, se cree que las sondas derivadas de anticuerpos contra Tau (por ejemplo, scFv235) dirigidas a diferentes epítomos proporcionan una imagen más detallada del perfil patológico de las proteínas Tau en cada individuo. Se prevé que esta información es capaz de guiar la pauta de tratamiento, que puede incluir inmunoterapia de Tau activa o pasiva dirigida a los mismos epítomos de Tau que se detectaron con la formación de imágenes. Es probable que un enfoque tan personalizado sea más eficaz para ralentizar la progresión de la tauopatía diana (véase, por ejemplo, Gu, J. *et al.* (2013) "Two Novel Tau Antibodies Targeting The 396/404 Region Are Primarily Taken Up By Neurons And Reduce Tau Protein Pathology", *J. Biol Chem.* 288:33081-33095; Congdon, E. E. *et al.* (2013) "Antibody Uptake into Neurons Occurs Primarily via Clathrin-dependent Fcγ Receptor Endocytosis and Is a Prerequisite for Acute Tau Protein Clearance", *J. Biol Chem.* 288:35452-35465; Boutajangout, A. *et al.* (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model", *J. Neurosci.* 30:16559-16566; Asuni, A.A. *et al.* (2007) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers In A Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology With Associated Functional Improvements", *J. Neurosci.* 27:9115-9129; Boutajangout, A. *et al.* (2011) "Passive Immunization Targeting Pathological Phospho-Tau Protein In A Mouse Model Reduces Functional Decline And Clears Tau Aggregates From The Brain" *J. Neurochem.* 118:658-667; Boimel, M. *et al.* (2010) "Efficacy And Safety Of Immunization With Phosphorylated Tau Against Neurofibrillary Tangles In Mice", *Exp. Neurol.* 224, 472-485 (2010);

Chai, X. *et al.* (2011) "Passive Immunization With Anti-Tau Antibodies In Two Transgenic Models: Reduction Of Tau Pathology And Delay Of Disease Progression", *J. Biol. Chem.* 286:34457-34467 (2011); Bi, A. *et al.* (2011) "Tau-Targeted Immunization Impedes Progression of Neurofibrillary Histopathology in Aged P301L Tau Transgenic Mice", *PLoS. One.* 6:e26860; d'Abramo, C. *et al.* (2013) "Tau Passive Immunotherapy in Mutant P301L Mice: Antibody Affinity versus Specificity", *PLoS ONE* 8:e62402; Troquier, L. *et al.* (2012) "Targeting Phospho-Ser422 By Active Tau Immunotherapy In The THY-Tau22 Mouse Model: A Suitable Therapeutic Approach", *Curr. Alzheimers Res.* 9, 397-405; Kfoury, N. *et al.* (2012) "Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species", *J. Biol. Chem.* 287:19440-19451; Theunis, C. *et al.* (2013) "Efficacy And Safety Of A Liposome-Based Vaccine Against Protein Tau, Assessed In Tau.P301L Mice That Model Tauopathy", *PLoS. One.* 8:e72301; Yanamandra, K. *et al.* (2013) "Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology And Improve Cognition in vivo", *Neuron* 80:402-414; Castillo-Carranza, D.L. *et al.* (2014) "Specific Targeting Of Tau Oligomers In Htau Mice Prevents Cognitive Impairment And Tau Toxicity Following Injection With Brain-Derived Tau Oligomeric Seeds", *J. Alzheimers. Dis.* 40:S97-S111; Castillo-Carranza, D.L. *et al.* (2014) "Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles", *J. Neurosci.* 34:4260-4272). La disponibilidad de biomarcadores selectivos para determinar el acoplamiento de la diana, la eliminación y la progresión de la enfermedad será esencial para evitar los estudios prolongados, caros y no concluyentes en ensayos de inmunoterapia clínicos de la enfermedad de Alzheimer previos. La formación de imágenes de estas lesiones de Tau será muy útil para evaluar la eficacia de futuros ensayos, así como para diagnosticar tauopatías negativas para A $\beta$ .

#### Ejemplo 4

##### Detección específica y dependiente de epítipo de agregados de Tau en ratones con tauopatía transgénica *in vivo*

Como se ha indicado anteriormente, la inyección periférica de un fragmento de anticuerpo variable monocatenario (scFv) generado a partir del anticuerpo 6B2G12 dio como resultado una señal cerebral *in vivo* fuerte en ratones transgénicos con tauopatía usando un Sistema de formación de imágenes *in vivo* (IVIS), pero no en ratones de tipo silvestre o con placa amiloide  $\beta$  (Krishnaswamy S. *et al.* (2014) "Antibody-Derived *in vivo* Imaging of Tau Pathology" *J. Neurosci.* 34:16835-16850). Se observó una especificidad similar, pero una señal más débil, con el anticuerpo 6B2G12 parental. De manera destacada, la intensidad de la señal de formación de imágenes se correlacionó bien con el grado de patología tau y la colocalización de la sonda con agregados de tau intraneuronales. Ambos atributos se asociaron a marcadores de endosomas, autofagosomas y lisosomas, lo que indica su interacción en estas vías de degradación.

Se realizó una comparación de la intensidad de señal de diversos anticuerpos contra tau contra diferentes epítopos de tau en los mismos ratones transgénicos con tauopatía (P301L, htau) administrando inyecciones intravenosas únicas de diferentes anticuerpos contra tau. Se compararon dos dosis diferentes (50  $\mu$ g frente a 250  $\mu$ g) en ocasiones en los mismos animales. Las inyecciones se separaron con un intervalo de al menos una semana con el fin de permitir que la señal cerebral disminuyese a los valores de fondo basales. Como era de esperar, la dosis mayor produjo una señal cerebral varias veces superior para todos los anticuerpos, lo que sugiere que su captación cerebral no está saturada con la dosis inferior. Generalmente, la administración del anticuerpo 6B2G12 (afinidad de nM a pM) condujo a una señal aproximadamente 2-3 veces más fuerte que: (1) la señal proporcionada por un anticuerpo de afinidad inferior (de nM a  $\mu$ M), pero más fosfoselectivo, que se une inmunoespecíficamente al mismo epítipo p396,404; (2) la señal proporcionada por un anticuerpo de afinidad superior (nM) que se une inmunoespecíficamente a un epítipo que es distinto del epítipo p396,404; o (3) la señal proporcionada por un anticuerpo de baja afinidad que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de tau conformacional. Estas diferencias probablemente reflejan tanto la prominencia relativa de estos epítopos de anticuerpos contra tau en estos animales como las afinidades de los anticuerpos. Todos los anticuerpos evaluados mostraron especificidad para la patología tau, dando como resultado una señal cerebral mucho más fuerte en ratones con tauopatía en comparación con una señal cerebral muy débil en ratones con placa de A $\beta$  (Tg-SwDI) o de tipo silvestre. También se detectó una señal limitada con el anticuerpo IgG de control. De manera destacada, la señal observada se correlacionó bien con el grado de patología tau y los anticuerpos inyectados por vía intravenosa se colocalizaron parcialmente con agregados de tau neuronales teñidos (PHF1, MCI y tau-5) y marcadores de endosomas, autofagosomas y lisosomas (EEA1, LC3, P62 y Rab7) como se ha observado con el anticuerpo 6B2G12.

En general, estos hallazgos indican que pueden usarse anticuerpos contra tau contra diferentes epítopos para evaluar la prominencia de epítopos *in vivo* en modelos en ratón. Los fragmentos de anticuerpos más pequeños de dichas sondas de formación de imágenes con una penetración cerebral incluso mejor que dan como resultado una señal cerebral más fuerte (tal como scFv235) tienen un gran potencial como ligandos de formación de imágenes clínicos.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

- 5 (A) un fragmento de anticuerpo variable monocatenario, en donde dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y  
(B) un portador, diluyente y/o estabilizante no tóxico farmacéuticamente aceptable.

10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario es una parte de una proteína de fusión cuya secuencia de aminoácidos consiste, en la dirección N-terminal a C-terminal, en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (1) el fragmento de anticuerpo variable monocatenario y una porción de péptido de secuencia C-terminal SEQ ID NO: 20; y  
15 (2) el fragmento de anticuerpo variable monocatenario y una porción de péptido de secuencia C-terminal SEQ ID NO: 21.

20 3. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario está marcado de forma detectable.

4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en donde dicho marcador detectable es un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador radioisotópico o un marcador enzimático.

25 5. Un método *ex vivo* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto, en donde dicho método comprende:

- (A) proporcionar una muestra de biopsia que se haya obtenido del sujeto;  
30 (B) poner en contacto la muestra con el fragmento de anticuerpo variable monocatenario como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y  
(C) detectar la presencia, en su caso, de Tau fosforilada en la muestra de dicho sujeto, usando dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario.

35 6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha detección comprende la formación de imágenes *ex vivo* de dicho fragmento de anticuerpo variable monocatenario unido a dicha proteína Tau fosforilada.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde dicha detección es para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer de dicho sujeto.

40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde dicha detección es para diagnosticar una tauopatía distinta de la enfermedad de Alzheimer de dicho sujeto.

45 9. El fragmento de anticuerpo variable monocatenario, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o dicha otra tauopatía.

50 10. Un medicamento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía de un sujeto, en donde dicho medicamento comprende la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en una cantidad eficaz para tratar dicha enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía.

11. Un kit para detectar o medir la presencia o cantidad de proteína Tau fosforilada en el cerebro de un sujeto, o para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía en un sujeto, en donde dicho kit comprende la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5, 6 u 8, en donde dicha detección es para diagnosticar una tauopatía en dicho sujeto; en donde dicha tauopatía se selecciona del grupo que comprende demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia con granos argirófilos, complejo demencia-parkinsonismo de esclerosis lateral amiotrófica,  
60 demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Hallerworden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, panencefalitis esclerosante subaguda, distrofia miotónica, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, parkinsonismo postencefálico, traumatismo craneoencefálico agudo y encefalopatía traumática crónica.

65 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8 o 12, o el medicamento de la reivindicación 10, en donde dicho

sujeto es un ser humano.

14. El kit de la reivindicación 11, en donde dicho kit es para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

- 5 15. El kit de la reivindicación 11, en donde dicho kit es para diagnosticar una tauopatía seleccionada del grupo que comprende demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia con granos argirófilos, complejo demencia-parkinsonismo de esclerosis lateral amiotrófica, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Hallerworden-Spatz, miositis por cuerpos de inclusión, enfermedad de
- 10 Creutzfeld-Jakob, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, panencefalitis esclerosante subaguda, distrofia miotónica, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, parkinsonismo postencefálico, traumatismo craneoencefálico agudo y encefalopatía traumática crónica.

Unión por ELISA de clones de svFv de 6BG12 seleccionado contra el epítipo S396,404 fosforilado

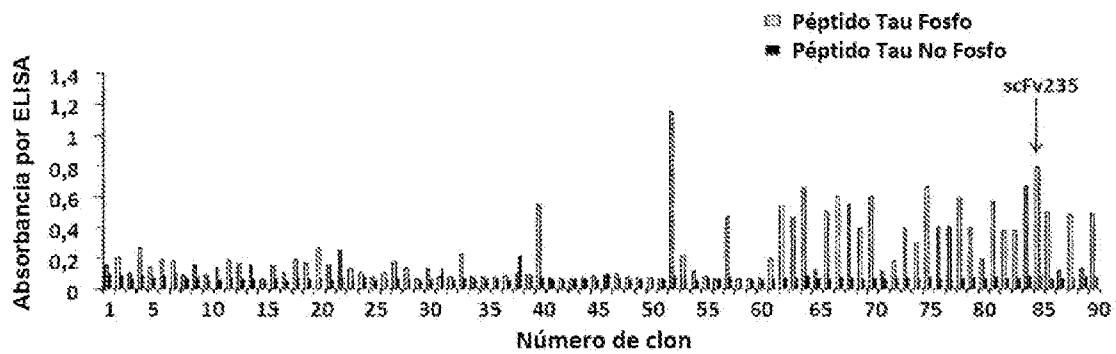


Figura 1A

Unión por ELISA de clones de svFv de 6BG12 seleccionado contra el epítipo S396,404 no fosforilado

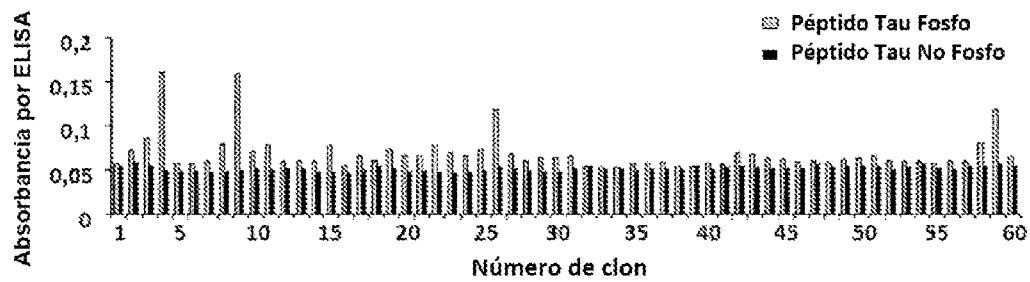
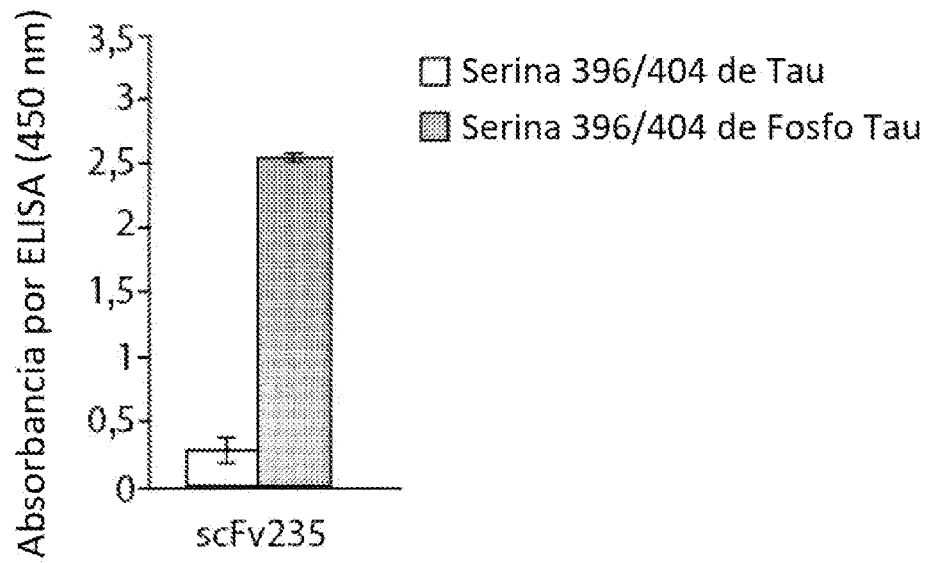
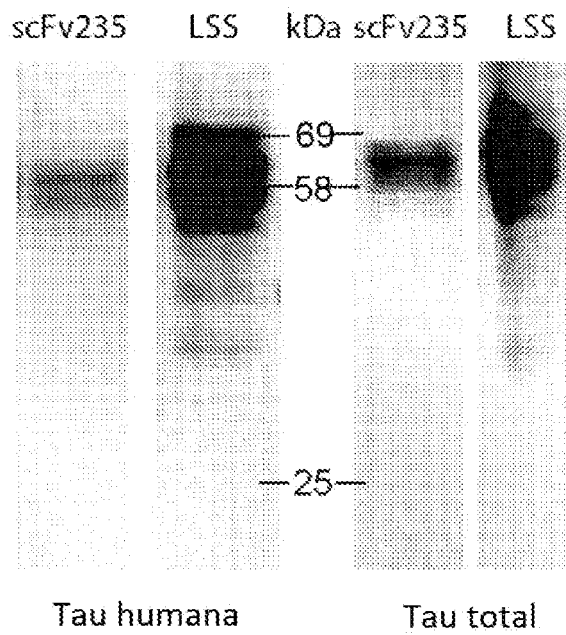


Figura 1B

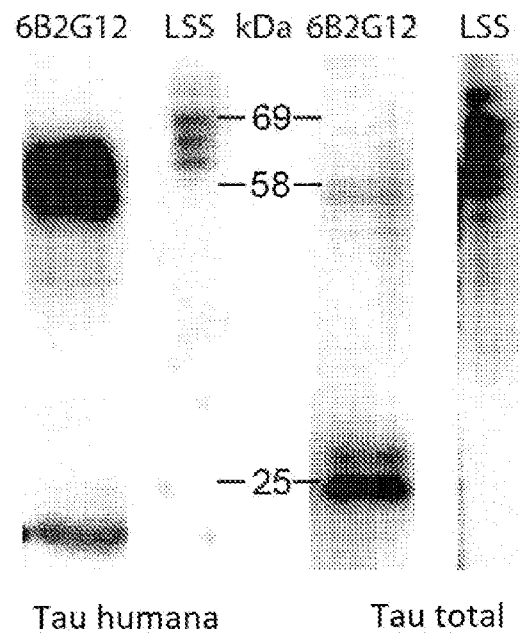




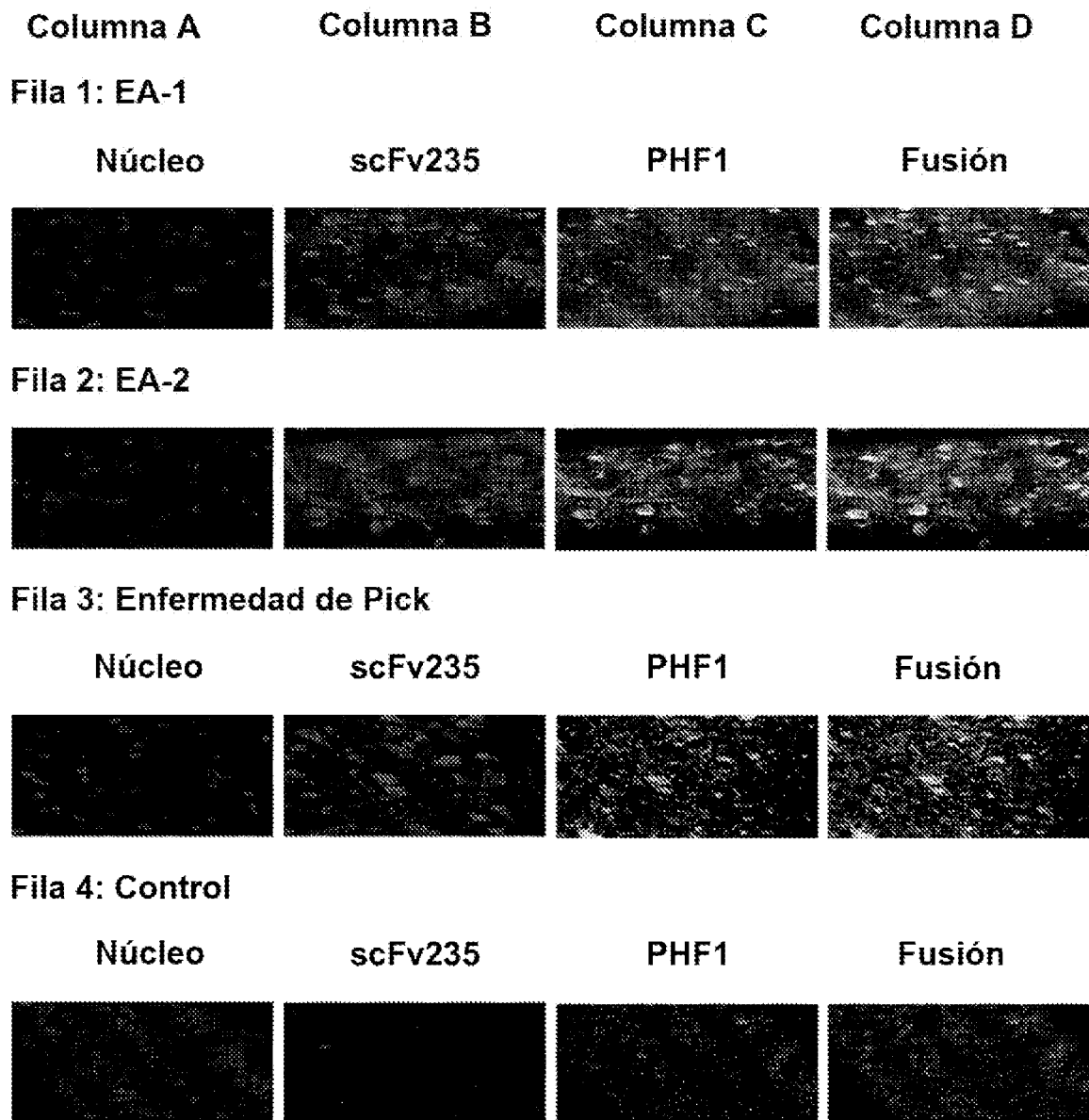
**Figura 2A**



**Figura 2B**

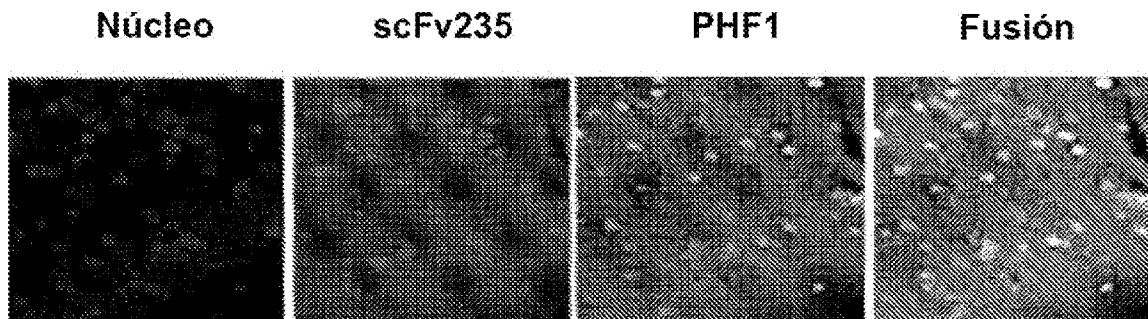


**Figura 2C**

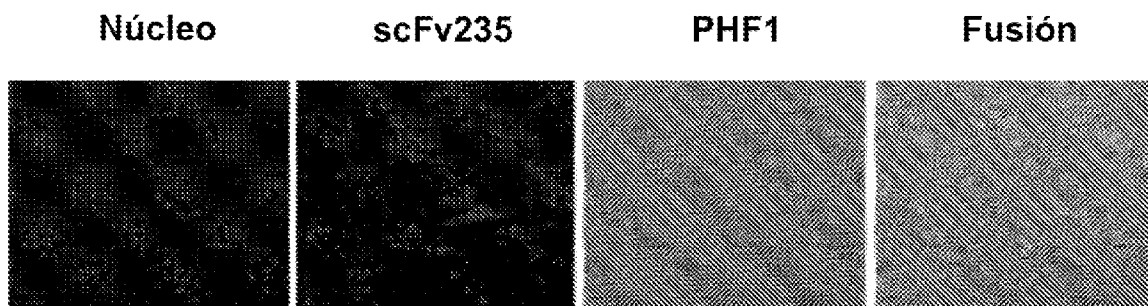


**Figura 2D**

**Fila 1: ScFv235 se une a tau patológica en secciones de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer**



**Fila 2: ScFv235 tiene unión limitada a secciones de cerebro humano de control**



**Figura 2E**

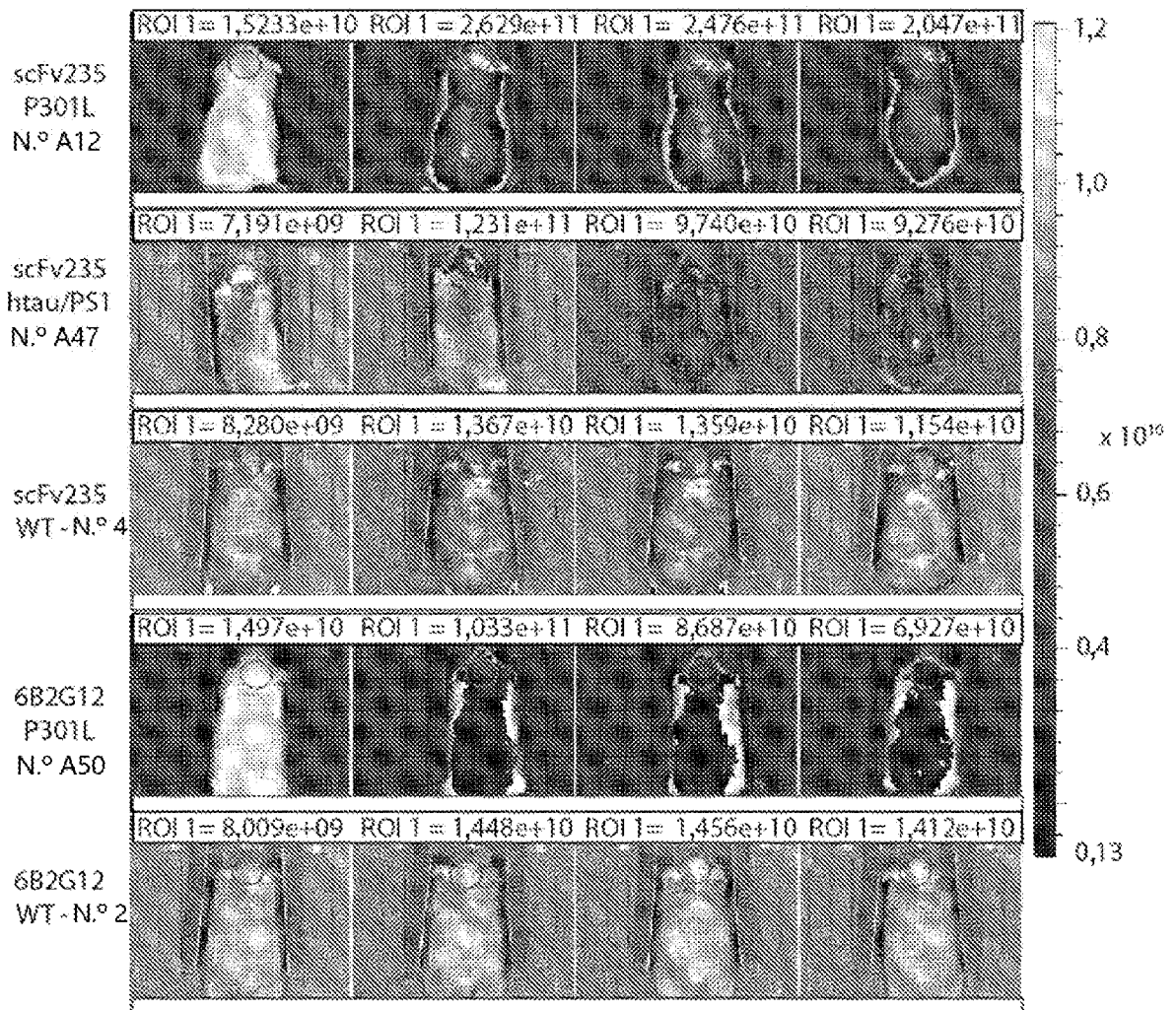


Figura 3A

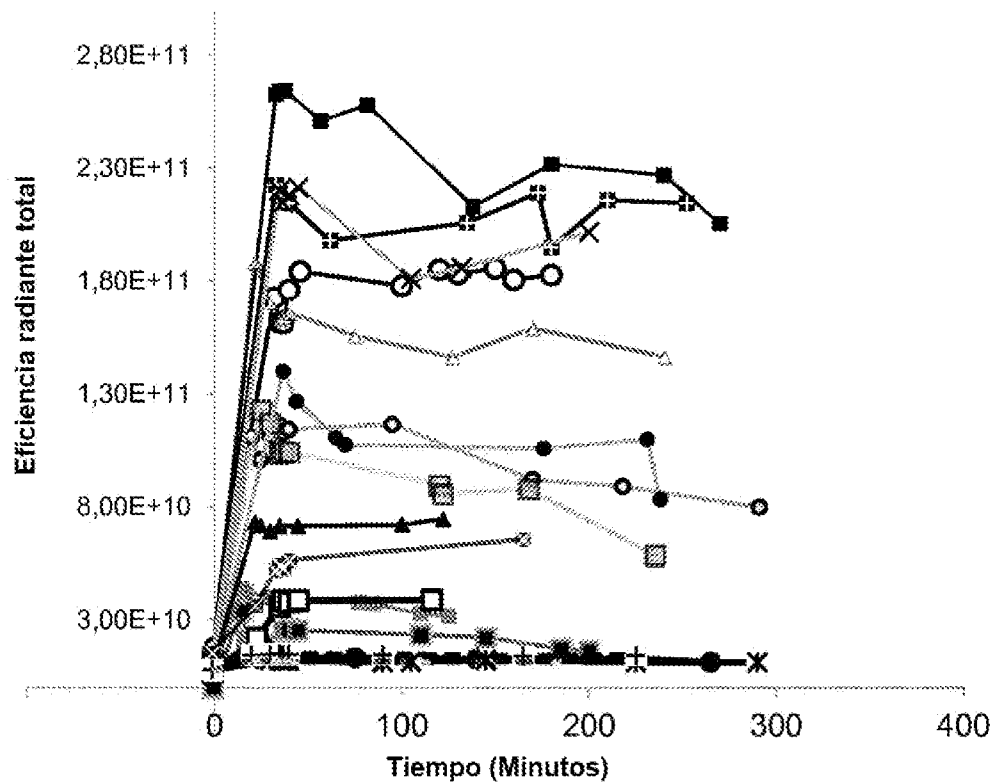


Figura 3B

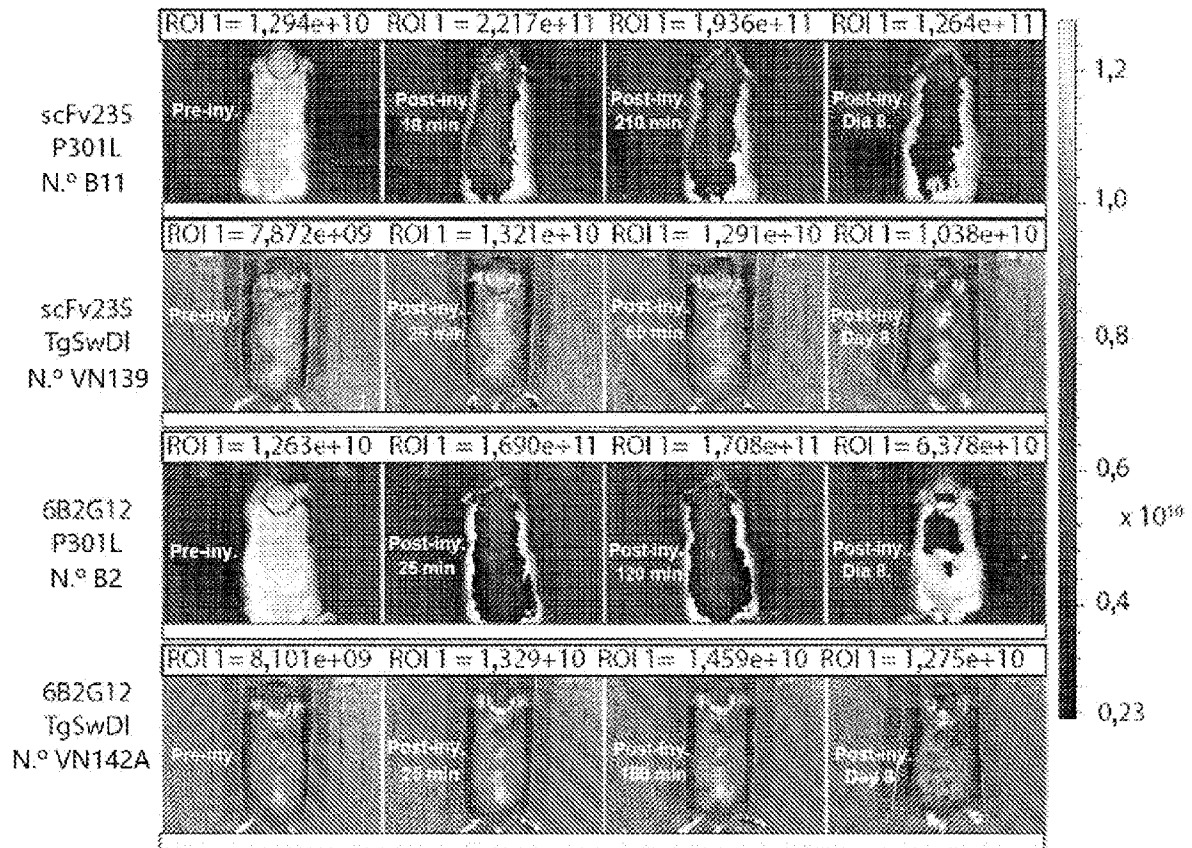


Figura 3C

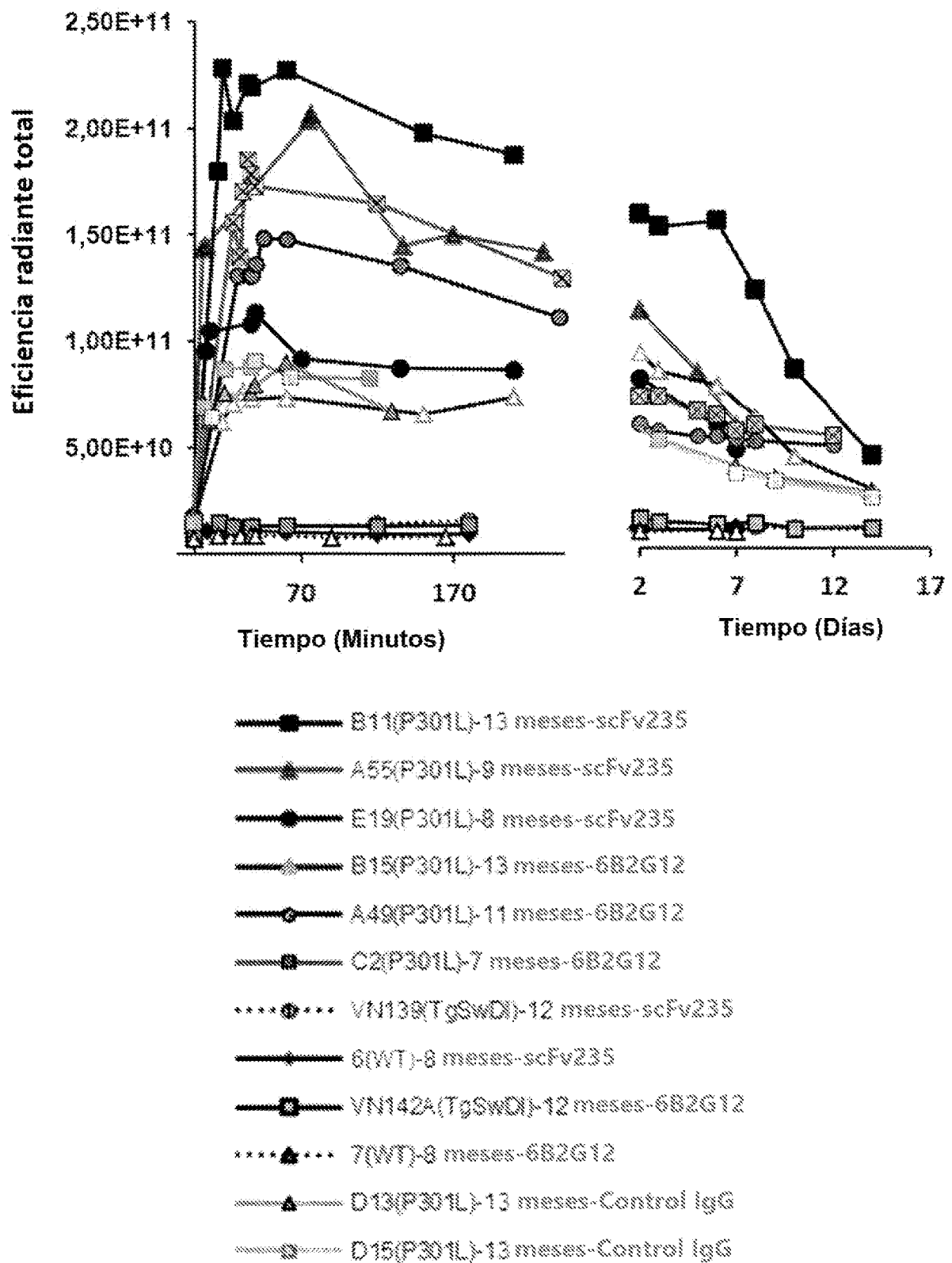


Figura 3D

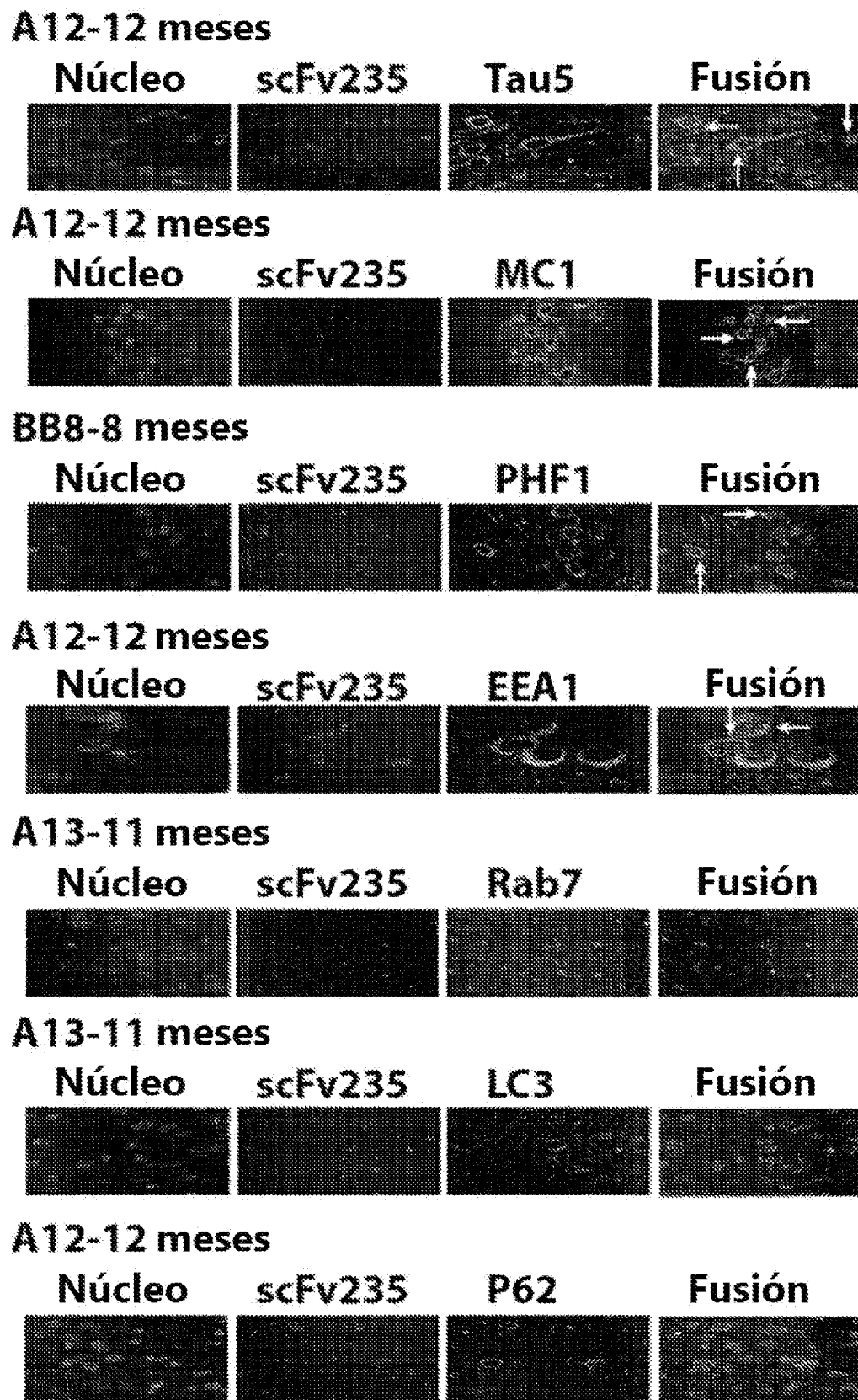
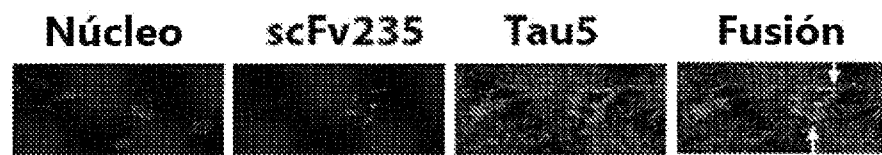


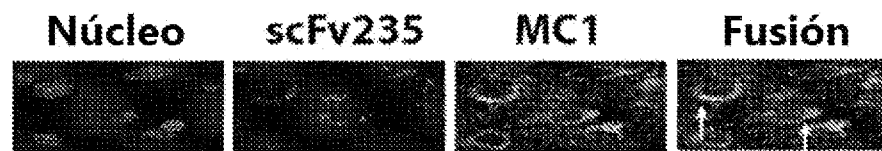
Figura 4A



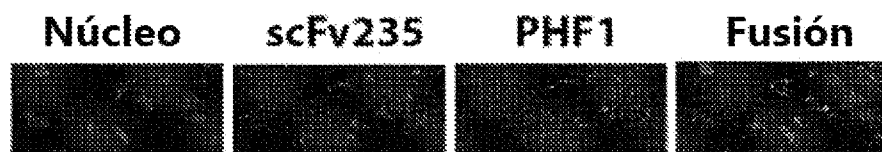
**A47-22 meses**



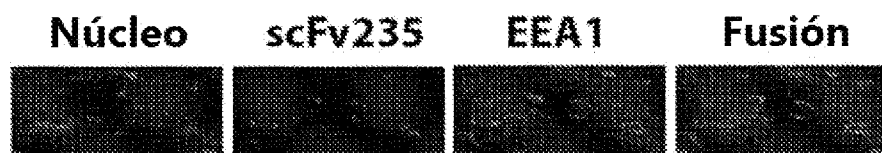
**B32-23 meses**



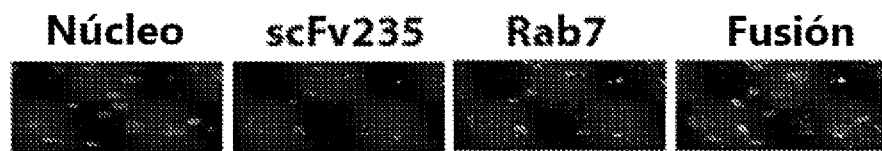
**B32-23 meses**



**B32-23 meses**



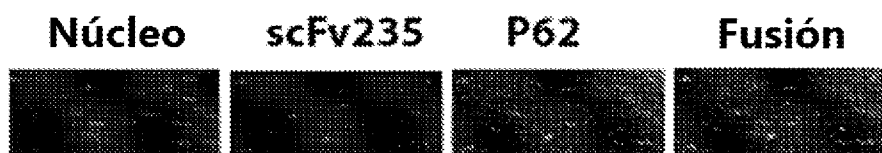
**A47-22 meses**



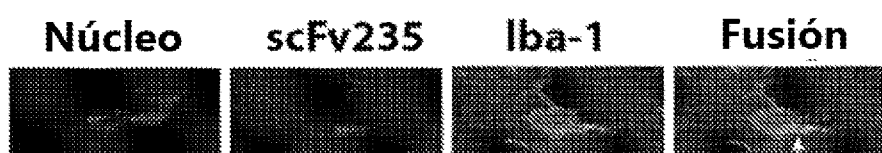
**B32-23 meses**



**A47-22 meses**



**A47-22 meses**



**Figura 4B**

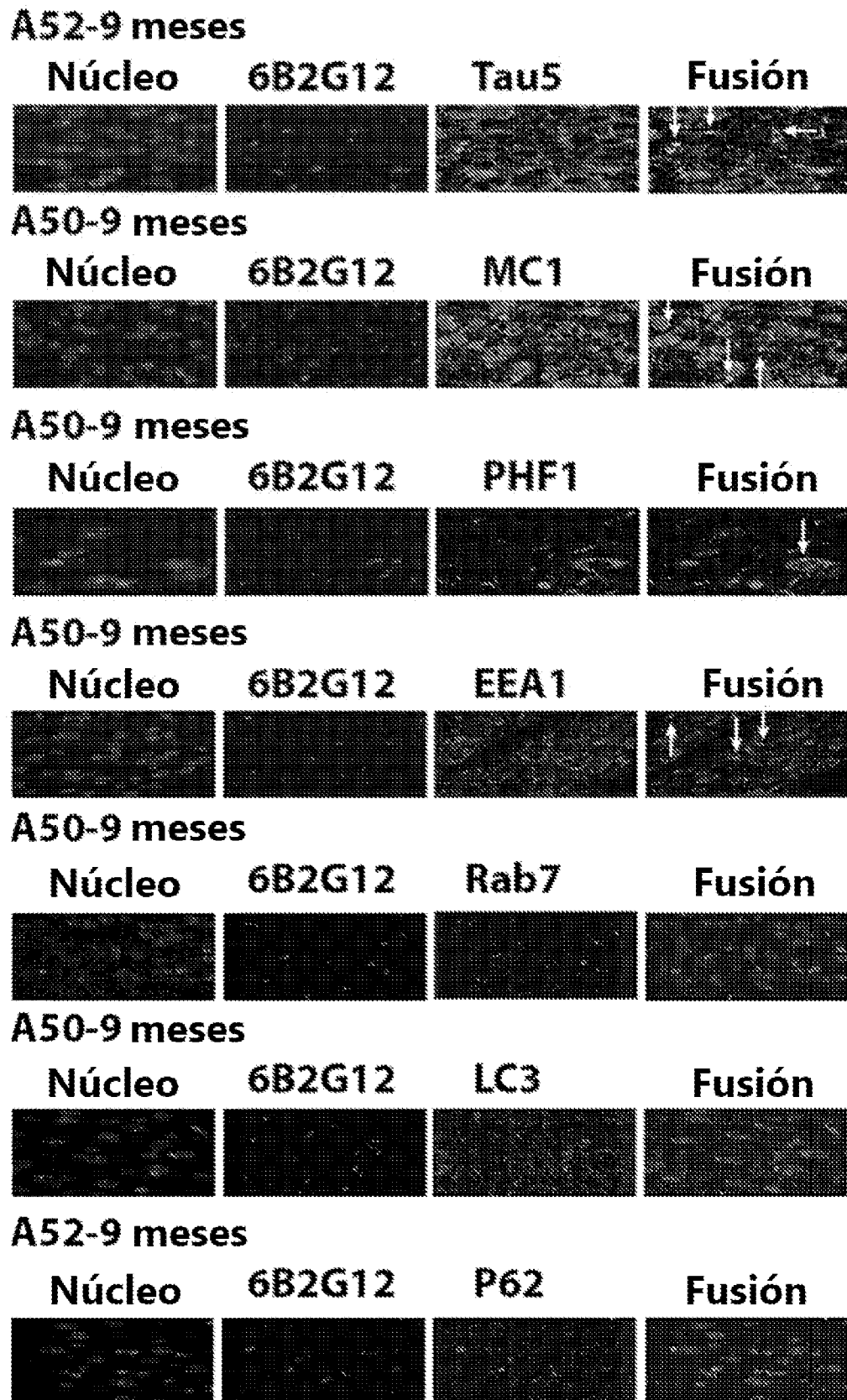
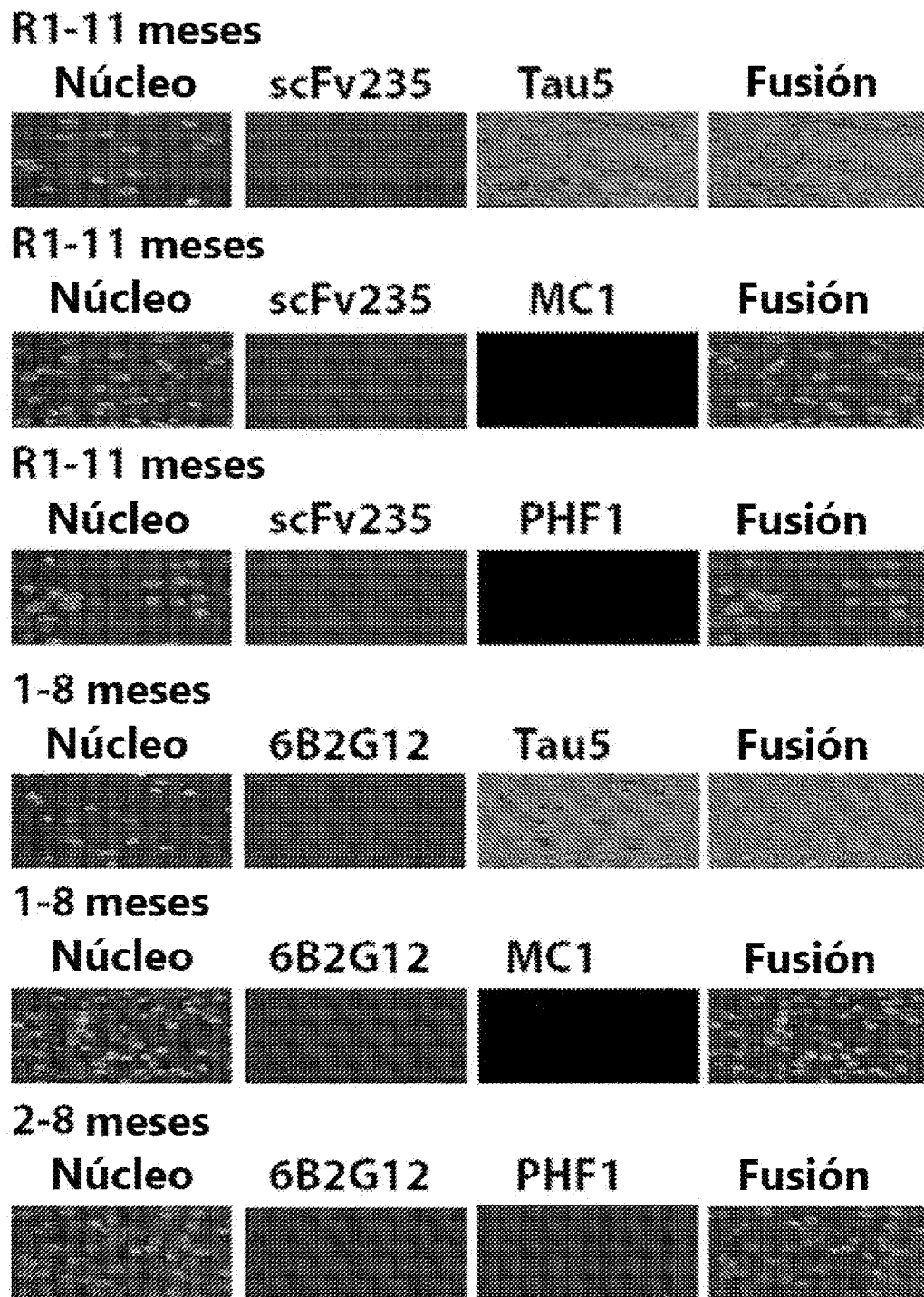
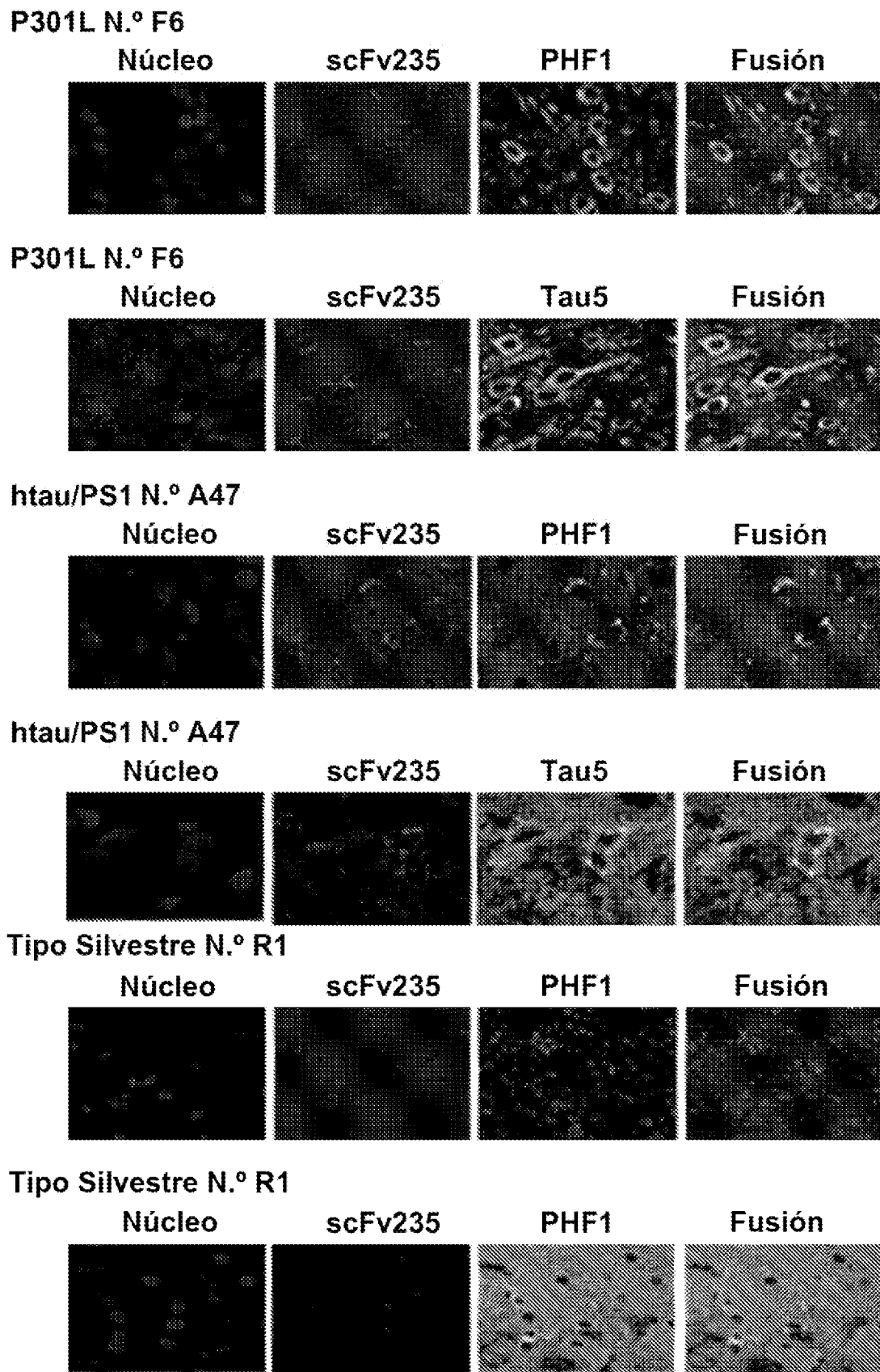


Figura 4C

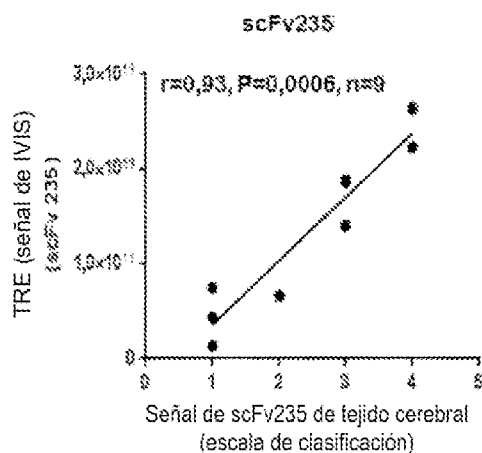


**Figura 4D**

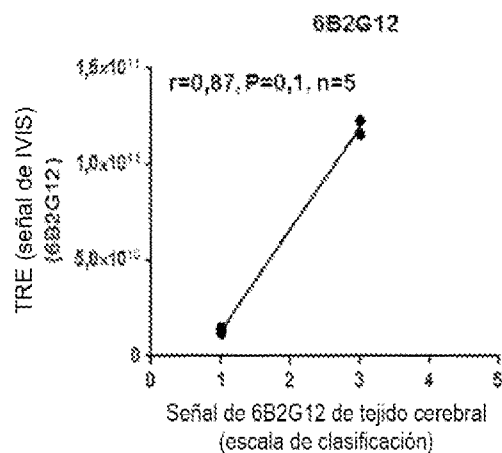


**Figura 5**

### IVIS frente a señal de tejido cerebral

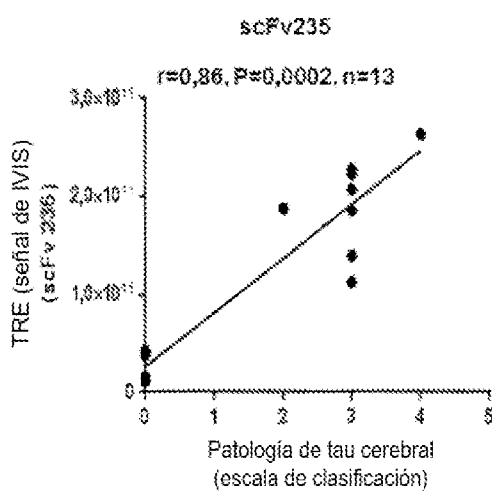


**Figura 6A**

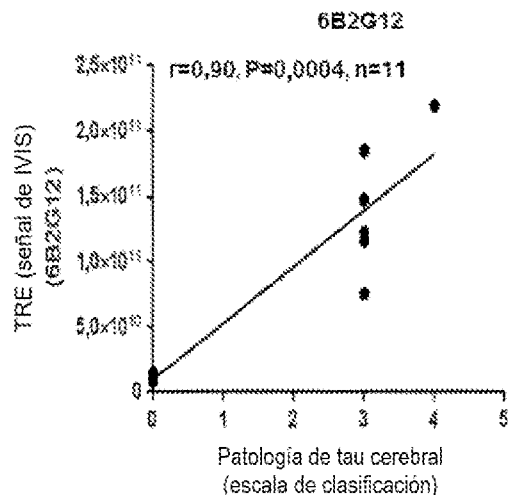


**Figura 6B**

### IVIS frente a patología de tau cerebral

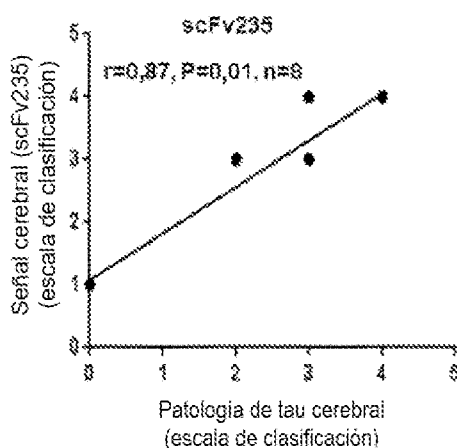


**Figura 6C**

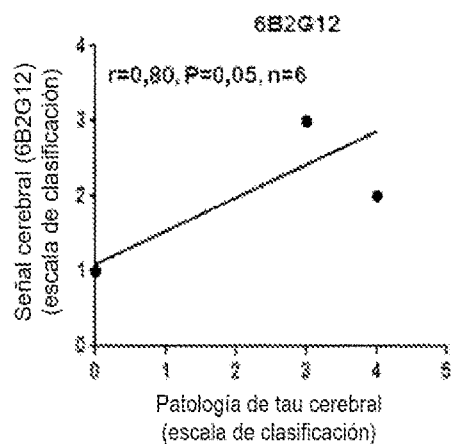


**Figura 6D**

### Señal de tejido cerebral frente a patología de tau cerebral



**Figura 6E**



**Figura 6F**