

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 969**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/US2016/046520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17027691**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16835899 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023 EP 3334761**

54 Título: **Moléculas basadas en anticuerpos selectivas para el epítipo ^(p)Ser404 de Tau y sus usos en el diagnóstico y tratamiento de la tauopatía**

30 Prioridad:

13.08.2015 US 201562204711 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SIGURDSSON, EINAR

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 954 969 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

Moléculas basadas en anticuerpos selectivas para el epítipo ^(p)Ser404 de Tau y sus usos en el diagnóstico y tratamiento de la tauopatía

La divulgación técnica que se expone más adelante puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Los elementos de la divulgación que no entran en el ámbito de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo, a saber, para situar la invención real reivindicada en un contexto técnico más amplio. Por otro lado, cuando la invención se refiera al tratamiento, debe entenderse que la protección conferida no cubre el método de tratamiento realizado directamente en el cuerpo, sino un producto de finalidad limitada, es decir, un producto para su uso en el método terapéutico indicado.

Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente de EE. UU. número de serie 62/204.711 (presentada el 13 de agosto de 2015; pendiente).

Declaración con respecto a la investigación o desarrollo con fondos federales

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de las subvenciones número NS077239, AG032611 y AG020197, otorgada por los National Institutes of Health (NIH). El gobierno posee determinados derechos sobre la invención.

Referencia al listado de secuencias

La presente solicitud incluye uno o más listados de secuencias de conformidad con 37 C.F.R. 1.821 et seq., que se divulgan en medios legibles por ordenador (nombre del archivo: 1400-0009PCT_ST25.txt, creado el 6 de agosto de 2016 con un tamaño de 38.518 bytes).

Campo de la invención

La divulgación general del presente documento se refiere a moléculas basadas en anticuerpos (incluidas moléculas scFv, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, diacuerpos, y los dominios de unión al epítipo de los mismos) que son capaces de unirse inmuno-específica y selectivamente al epítipo ^(p)Ser404 de Tau. Las moléculas basadas en anticuerpos de la invención son como se definen en las reivindicaciones adjuntas, como se analiza a continuación. Tales moléculas basadas en anticuerpos son útiles para detectar el conformero patológico de la proteína Tau si está presente en una muestra biológica, especialmente junto con el diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía, y así proporcionar un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y otras patologías de Tau. Las moléculas basadas en anticuerpos (y en particular, las moléculas scFv) de la presente invención tienen una utilidad particular como marcadores de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas, y como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dichas afecciones.

Antecedentes de la invención

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 de anticuerpos de Tau anormal en el líquido cefalorraquídeo se ha mostrado prometedora (Blennow, K. *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 de anticuerpos de la proteína fosfo-Tau en el líquido cefalorraquídeo ha mostrado cierta utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (Blennow, K. *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 Pathology," J. Alzheimers Dis. 40: S 113-S121). Sin embargo, los niveles de Tau en el LCR en otras tauopatías no suelen estar 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. Onc. 8, e72301 (2013); Hales, C.M. *et al.* (2013) "From Frontotemporal Lobar Degeneration Pathology To Frontotemporal Lobar Degeneration Biomarkers," Int. Rev. Psychiatry 25:210-220), y las pruebas de imagen pueden no detectar Tau patológica en todas la 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 obtención

de imágenes de estas lesiones de Tau junto con amiloide- β ($A\beta$) conduzca a un diagnóstico preciso, ya que el patrón regional de los agregados de Tau difiere entre las diferentes tauopatías. Por otra parte, todos ellos, excepto la enfermedad de Alzheimer, se definen en parte por la falta de depósito de $A\beta$. La obtención de imágenes *in vivo* de placas $A\beta$ utilizando compuestos que se unen bien a las láminas β ya se encuentra en uso clínico (Mason, N.S. *et al.* (2013) "Positron Emission Tomography Radioligands For *In Vivo* Imaging Of ABeta Plaques," J. Labelled Comp. Radiopharm. 56:89-95). Varios de estos ligandos de unión a Tau basados en colorantes se han identificado recientemente en estudios preclínicos y algunos de ellos están siendo evaluados (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; 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; 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) "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; 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 basados en Tau es que serán mejores que los ligandos $A\beta$ para monitorizar el estado y la progresión de la neurodegeneración. Es probable que las sondas basadas en anticuerpos proporcionen una mayor especificidad para detectar lesiones Tau. En particular, fragmentos de anticuerpos más pequeños que se unen a Tau son atractivos como ligandos para pruebas de imágenes *in vivo* para detectar lesiones Tau en pacientes con enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías. La publicación PCT WO 2012/045882 se refiere a tratamientos terapéuticos y diagnósticos para enfermedades y trastornos causados por o asociados con ovillos neurofibrilares.

Dentro del campo del cáncer, los anticuerpos terapéuticos se han desarrollado conjuntamente de forma rutinaria como agentes de diagnóstico por imágenes y varios de estos anticuerpos y moléculas Fab están aprobados por la FDA para diagnóstico por 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 moléculas derivadas de anticuerpos que proporcionan una excelente especificidad para detectar lesiones de Tau y, en particular, fragmentos de anticuerpos variables monocatenarios más pequeños (moléculas scFv) que son atractivos para la obtención de imágenes *in vivo* de agregados 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 $A\beta$. Además, tales moléculas derivadas de anticuerpos tienen utilidad como agentes terapéuticos en la prevención, tratamiento y manejo de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a una molécula basada en un anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo ^(P)Ser404 de Tau, en donde dicha molécula comprende una cadena polipeptídica variable ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:9** y una cadena polipeptídica variable pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:13**, y en donde dicho epítipo está dentro de la secuencia:

TDHGAEIVYK^(P)SPWSGDT^(P)SPRHL (**SEQ ID NO: 8**)

que consiste en los aminoácidos 386-408 de Tau, en donde los restos en la posición 11 y 19 de la **SEC ID NO:8**, que corresponden a las posiciones 396 y 404 de Tau son fosfoserinas.

La invención se refiere particularmente a la realización de la molécula basada en anticuerpo descrita anteriormente, en donde la molécula es un anticuerpo o comprende un fragmento de un anticuerpo de unión al epítipo.

La invención se refiere particularmente a la realización de la molécula basada en anticuerpo descrita anteriormente, en donde la molécula es un anticuerpo humanizado o comprende un fragmento de un anticuerpo humanizado de unión al epítipo.

La invención se refiere particularmente a la realización de la molécula basada en anticuerpos descrita anteriormente, en donde la molécula comprende un fragmento de unión al epítipo ^(P)Ser404 de un anticuerpo y es un scFv o un diacuerpo.

La invención se refiere particularmente a la realización de la molécula basada en anticuerpo descrita anteriormente, en donde la molécula es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo de unión al epítipo del mismo que, tras la inyección periférica en un receptor, co-localiza sustancialmente con un agregado de Tau.

5 El fragmento de unión al epítipo de la molécula basada en anticuerpos descrita anteriormente comprende los seis de:

- (a) una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:10**;
- (b) una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:11**;
- (c) una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:12**;
- 10 (d) una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:14**;
- (e) una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:15**; y
- (f) una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:16**.

15 El fragmento de unión al epítipo de la molécula basada en anticuerpos descrita anteriormente comprende el dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEC ID NO:9** y el dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEC ID NO:13**.

La invención se refiere particularmente a la realización de la molécula basada en anticuerpos descrita anteriormente, en la que la molécula es un scFv que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEC ID NO:17**.

20 La invención se refiere particularmente a la realización de la molécula basada en anticuerpo descrita anteriormente, en la que la molécula es el anticuerpo 4E6G7.

25 La invención se refiere particularmente a la realización de cualquiera de las moléculas basadas en anticuerpos descritas anteriormente, en la que la molécula está marcada de forma detectable y, en particular, en la que el marcador detectable es un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador radioisotópico o un marcador enzimático.

30 La invención se refiere particularmente al uso *ex vivo* o *in vitro* de cualquiera de las moléculas basadas en anticuerpos marcadas descritas anteriormente para detectar o medir la presencia o la cantidad de la proteína Tau fosforilada en una muestra biológica de un sujeto humano, en el que dicha detección o medición comprende la obtención de imágenes *ex-vivo*.

35 La invención se refiere particularmente a tal uso de cualquiera de las moléculas basadas en anticuerpos marcadas descritas anteriormente, en el que la detección o medición comprende la obtención de imágenes *ex vivo* de la molécula basada en anticuerpos unida a la proteína Tau fosforilada.

40 La invención se refiere particularmente a las moléculas basadas en anticuerpos marcadas descritas anteriormente para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada del grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, y en el que el sujeto es un ser humano.

45 La invención también proporciona un medicamento que comprende cualquiera de las moléculas basadas en anticuerpos descritas anteriormente en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo de parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica y en el que el sujeto es un ser humano, y en el que el medicamento comprende además uno o más vehículos, diluyentes y/o estabilizantes.

50 La invención también proporciona dicho medicamento para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, y en el que el sujeto es un ser humano.

La invención también proporciona un kit para detectar o medir la presencia o la cantidad de la proteína Tau fosforilada en el cerebro de un sujeto humano o para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo de parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica y en el que el sujeto es humano y en el que el kit comprende cualquiera de las moléculas basadas en anticuerpos marcadas descritas anteriormente.

La invención se refiere particularmente a cualquiera de los usos descritos anteriormente, medicamentos o kits, en donde la tauopatía es en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el 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 Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda y encefalopatía traumática crónica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1, los **Paneles AB** muestran el efecto del anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**; *p = 0,05) e IgG control (**Panel B**) sobre la toxicidad celular mediada por 10 µg/ml de PHF determinado por la liberación de LDH.

La Figura 2, los **Paneles AB** muestran el efecto del anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**; *p = 0,05) e IgG control (**Panel B**) sobre la toxicidad celular mediada por 1 µg/ml de PHF determinado por la liberación de LDH.

La Figura 3, los **Paneles A-C** muestran inmunotransferencias que muestran la capacidad del anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**; 10 µg/ml) para evitar la pérdida de la señal de NeuN en relación con las células tratadas con 10 µg/ml de PHF y 1 µg/ml de IgG de ratón no específica (**Panel B**). El **Panel C** muestra la cuantificación de la señal en muestras tratadas con PHF solo o una combinación de PHF y el anticuerpo 4E6G7.

La Figura 4, los **Paneles A-C** muestran que PHF induce una pérdida de NeuN a 1 µg/ml y que este efecto se puede prevenir con el anticuerpo 4E6G7. Se muestran inmunotransferencias para muestras tratadas con 1 µg/ml de PHF solo o 1 µg/ml de PHF y 1 µg/ml de anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) o 1 µg/ml de IgG control (**Panel B**). El **Panel C** muestra la cuantificación de la señal en muestras tratadas con PHF solo o una combinación de PHF y el anticuerpo 4E6G7.

La Figura 5, Los **Paneles A-D** muestran que el anticuerpo 4E6G7 puede prevenir los aumentos de Tau intracelular provocados por la exposición a 10 µg/ml de material PHF. El **Panel A** muestra inmunotransferencias de muestras incubadas con PHF o PHF en combinación con el anticuerpo 4E6G7, probado con un anticuerpo pan-Tau. El **Panel B** muestra inmunotransferencias de muestras de células incubadas con IgG de ratón de control y PHF. El **Panel C** muestra la cuantificación de los niveles totales de Tau en muestras incubadas con PHF y anticuerpo 4E6G7. El **Panel D** muestra los resultados normalizados para los niveles de NeuN.

La Figura 6, Los **Paneles A-D** muestran que PHF a 1 mg/ml puede promover aumentos en Tau intracelular y que el anticuerpo 4E6G7 puede prevenir estos efectos. **Panel A** y **Panel B**: Inmunotransferencias para muestras expuestas a PHF, PHF + Anticuerpo o PHF + IgG control, sondado con un anticuerpo policlonal pan-Tau. **Panel C**: Cuantificación de los niveles totales de Tau. **Panel D**: Producción intracelular de Tau normalizada a NeuN.

La Figura 7, Los **Paneles A-D** muestran la capacidad del anticuerpo 4E6G7 para prevenir el aumento de Tau fosforilada provocado por la exposición a PHF a 10 µg/ml. Los **Paneles A-B** muestran inmunotransferencias de células expuestas a PHF solo o a PHF en combinación con el anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) o IgG control (**Panel B**), probado con un anticuerpo policlonal que reconoce ^(P)Ser199 fosfo-Tau. El **Panel C** cuantifica los niveles de ^(P)Ser199 fosfo-tau en relación con las células no tratadas. El **Panel D** normaliza los resultados a los niveles de NeuN.

Figura 8 (Paneles A-D) muestran que niveles más bajos de PHF (1 µg/ml) también pueden inducir un aumento en los niveles de Tau fosforilada y que dichos aumentos pueden prevenirse mediante el anticuerpo 4E6G7. Los **Paneles A-B** muestran inmunotransferencias de células expuestas a PHF solo o a PHF en combinación con el anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) o IgG control (**Panel B**), probado con un anticuerpo policlonal que reconoce ^(P)Ser199 fosfo-Tau. El **Panel C** cuantifica los niveles de ^(P)Ser199 fosfo-tau en relación con las células no tratadas. El **Panel D** normaliza los resultados a los niveles de NeuN.

La Figura 9, Los Paneles A-G muestran que el anticuerpo 4E6G7 puede reducir la propagación de Tau patológica entre poblaciones celulares. **La Figura 9, El Panel A** muestra un esquema de las cámaras microfluídicas, mostrando los depósitos que reciben las células muestreadas. **La Figura 9, El Panel B** es un esquema ampliado de la caja central en el **Panel A**, que muestra los microsurcos que conectan los dos depósitos. **Figura 9, El Panel C** es una imagen confocal que muestra los axones (marcados con flechas) que crecen a través de los microsurcos. La célula se tiñe con un anticuerpo pan-Tau. **La Figura 9, Los Paneles D-F** muestran material PHF marcado con fluorescencia (1 µg/ml) que se añadió a una cámara del dispositivo de microfluidos que contiene células JNPL3. **La Figura 9, El Panel D** muestra la ubicación de la proteína Tau. **La Figura 9, El Panel E** muestra la ubicación de PHF. **La Figura 9, El Panel F** es una imagen fusionada que muestra tanto la ubicación de la proteína Tau como la ubicación de PHF.

La Figura 10, Los Paneles A-L muestran el efecto del régimen de dosificación sobre la unión de anticuerpos y PHF. Los **Paneles A-D** muestran que las neuronas absorben fácilmente la PHF-Tau de los medios y se pueden ver puntas positivas para PHF en cuerpos celulares y procesos neuronales. Los **Paneles E-H** muestran el efecto del régimen de dosificación de PHF → Anticuerpo sobre la unión de PHF y el anticuerpo. Los **Paneles I-L** muestran el efecto del régimen de dosificación de PHF + anticuerpo sobre la unión de anticuerpos y PHF. Cuando se suman, el anticuerpo 4E6G7 y el material de PHF formaron grandes agregados extracelulares.

La Figura 11, Los Paneles A-B muestran que el mecanismo de acción del anticuerpo 4E6G7 está influenciado por el régimen de dosificación. Se añadieron 10 µg/ml de PHF a las neuronas JNPL3, con el anticuerpo 4E6G7 añadido al mismo tiempo o 24 horas más tarde. El **Panel A** muestra la proporción de Tau/NeuN en función del día de recolección para las células tratadas con el régimen de dosificación PHF + Anticuerpo. El **Panel A** muestra la proporción de Tau/NeuN en función del día de recolección para las células tratadas con el régimen de dosificación de PHF → Anticuerpo.

La Figura 12, Los Paneles AB muestran que los ratones hTau que habían sido inmunizados con el anticuerpo 4E6G7 exhibieron mejoras significativas en la prueba de laberinto simétrico de campo cerrado (CFSM) ($p < 0.01$) (**Figura 12, Panel A**), mientras que los ratones de control no (**Figura 12, Panel B**).

La Figura 13, Los Paneles A-E muestran que los ratones hTau/PS1 inmunizados con el anticuerpo 4E6G7 funcionaron sustancialmente mejor que los ratones de control en el laberinto de brazos radiales (**Panel A**), en el laberinto simétrico de campo cerrado (**Panel B** (Día 1), el **Panel C** (Día 2) y el **Panel D** (Día 3) y en la Prueba de Reconocimiento de Objetos (**Panel E**).

La Figura 14, Los Paneles A-C muestran secciones de cerebro teñidas con PHF-1 para ratones de control (**Figura 14, Panel A**) y ratones hTau/PS1 inmunizados con el anticuerpo 4E6G7 (**Figura 14, Panel B**). **La Figura 14, El Panel C** muestra un análisis cuantitativo de la tinción con PHF-1 de células cerebrales de ratones control e inmunizados.

La Figura 15, Los Paneles A-B muestran que los ratones inmunizados con el anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) exhibieron mejoras significativas en el laberinto simétrico de campo cerrado (CFS) (48 % menos de errores, $p < 0,01$), en comparación con su rendimiento previo a la inmunización, mientras que los ratones tratados con IgG control no mejoraron. Cuando se divide por sexo, tanto los machos como las hembras tratados con el anticuerpo 4E6G7 mostraron una mejora significativa con respecto a su rendimiento previo al tratamiento (52 % y 44 % menos errores, $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente, véase el texto para consultar el promedio y el SEM). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló un efecto significativo del tratamiento ($p = 0,0018$) pero no del sexo ($p = 0,5145$), lo que indica que los resultados observados no son atribuibles a las diferencias de sexo. Por el contrario, los animales tratados con IgG no mostraron mejoría cuando todos los animales se consideraron juntos o cuando se dividieron por sexo. El **Panel B** muestra que los ratones inmunizados con el anticuerpo 6B2G12 no mejoraron en la misma prueba. **: $p < 0,01$.

La Figura 16, Los Paneles A-F muestran que el anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 difieren en su unión al material PHF de origen humano. **Panel A:** Se colocaron diferentes especies de tau en nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo 4E6G7 o el anticuerpo 6B2G12 como anticuerpo primario. El anticuerpo 4E6G7 se unió mejor a PHF solubilizado pero el anticuerpo 6B2G12 reaccionó más fuertemente con la fracción de tau insoluble en sarcosilo. Ambos anticuerpos tenían una reactividad limitada con la proteína tau soluble de sarcosilo. **Panel B:** Las mismas tres fracciones de tau se prepararon a partir de cerebro de control y se colocaron sobre nitrocelulosa. Ninguno de los anticuerpos mostró unión a la fracción soluble en sarcosilo y solo una unión limitada a PHF solubilizado y tau insoluble en sarcosilo. (Las imágenes de las tres muestras de los cerebros de control tratados con el anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 se tomaron de la misma tira, el orden se ha modificado para mayor claridad.) **Panel C:** Las placas se recubrieron con PHF solubilizado de cerebros con EA y de control. El anticuerpo 6B2G12 mostró una unión significativamente mayor a los cerebros con EA que a los controles y que el anticuerpo 4E6G7 a EA o control en diluciones, 1/200-1/125 ($p < 0,0001-0,05$). El anticuerpo 4E6G7 no mostró una unión a EA significativamente mayor que al control. **Panel D:** La placa de ensayo se recubrió con tau soluble en sarcosilo de cerebros con EA y cerebros de control, y se añadieron diluciones en serie del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12. A la dilución 1/200, el anticuerpo 6B2G12 mostró una unión significativamente mayor a los

cerebros con EA que a los de control, y una unión mayor que el anticuerpo 4E6G7 a cualquiera de las fracciones ($p < 0,01$, $0,05$ y $0,05$ respectivamente). **Panel E:** Las placas de ensayo se recubrieron con tau insoluble en sarcosilo. El anticuerpo 6B2G12 mostró una unión significativamente mayor a los cerebros con EA en relación con los de control, y que el anticuerpo 4E6G7 a EA o control, de las diluciones 1/200-1/125 mil ($p < 0,0001$ - $0,05$). Como anteriormente, no se observaron diferencias significativas entre las muestras de EA y de control con el anticuerpo 4E6G7. **Panel F:** Se realizaron ensayos ELISA competitivos preincubando los anticuerpos con concentraciones crecientes de material de PHF solubilizado ($0,01$ - $1 \mu\text{g/ml}$). La unión del anticuerpo 6B2G12 no se inhibió a ninguna concentración de PHF. Sin embargo, la unión del anticuerpo 4E6G7 se inhibió de forma dependiente de la dosis con una CI_{50} de 71 nM . Todos los resultados muestran que el anticuerpo 4E6G7 se une preferentemente a especies de tau solubilizadas, mientras que el anticuerpo 6B2G12 se une principalmente a tau altamente agregada insoluble. Todas las columnas o puntos de cada gráfico tienen barras de error SEM, sin embargo, algunas de ellas son demasiado pequeñas para ser visibles.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a moléculas basadas en anticuerpos (incluyendo moléculas scFv, anticuerpos, diacuerpos y los dominios de unión al epítipo de los mismos) que son capaces de unirse al epítipo ^(p)Ser404 de Tau, en las que dicha molécula comprende una cadena polipeptídica variable ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:9** y una cadena polipeptídica variable pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:13**; y en la que dicho epítipo está dentro de la secuencia:

TDHGAEIVYK^(P)SPWSGDT^(P)SPRHL (**SEQ ID NO:8**)

que consiste en los aminoácidos 386-408 de Tau, en donde los restos en la posición 11 y 19 de la **SEC ID NO:8**, que corresponden a las posiciones 396 y 404 de Tau son fosfoserinas. Tales moléculas basadas en anticuerpos son útiles para detectar el conformero patológico de la proteína Tau si está presente en una muestra biológica, especialmente junto con el diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto descrito en el presente documento y así proporcionar un diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer y dichas patologías de Tau. Las moléculas basadas en anticuerpos marcadas (y en particular, las moléculas scFv) de la presente invención tienen una utilidad particular como marcadores de diagnóstico para la tauopatía (y en particular para la enfermedad de Alzheimer y las tauopatías en sujetos con afecciones definidas en el presente documento) y las moléculas basadas en anticuerpos (y en particular, las moléculas scFv) de la presente invención tienen una utilidad particular como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tales afecciones.

El término "**tauopatía**", tal 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 están en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre: 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 Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda y encefalopatía traumática crónica.

Las moléculas basadas en anticuerpos de la presente invención proporcionan una mayor especificidad que los colorantes de lámina β para detectar lesiones de Tau en pacientes con EA o tauopatías en un sujeto descrito en el presente documento. En particular, fragmentos de anticuerpos más pequeños que se unen a Tau son atractivos como ligandos para la obtención 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, los anticuerpos terapéuticos se han desarrollado conjuntamente de forma rutinaria como agentes de obtención de imágenes y varios de estos anticuerpos y Fab o diacuerpos más pequeños y moléculas 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

Tal 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 en, por ejemplo, UniProt como P10636, 1-9). Tau es una proteína soluble asociada a microtúbulos que es fosforilada y desfosforilada dinámicamente por una serie de enzimas quinasas durante el ciclo celular. La capacidad de Tau para estabilizar los microtúbulos depende del grado de fosforilación. En su forma desfosforilada, la proteína puede 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 así 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.* 2015 Apr 3. pii: S1471-4914(15)00058-1;

páginas 1-9).

La numeración de aminoácidos de los restos de Tau proporcionados en el presente documento se proporciona con respecto a la **SEC ID NO:1**, como se muestra a continuación, siendo la metionina el primer resto de aminoácido de la misma.

SEQ ID NO:1:

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG
TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK
IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTTPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP
GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM
PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDLFKDRV
QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS
GDTSPRHLN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

El término "**Fosfo-Tau**" o "**P-Tau**" se refiere a una proteína o péptido Tau que ha sido fosforilado en uno o más restos de serina o treonina. Tal como se usa en el presente documento, la notación "^(P)Ser" o "^(P)S" denota el resto de aminoácido fosfoserina. Por ejemplo, la notación "^(P)Ser396/^(P)Ser404" se refiere a una parte polipeptídica de **SEC ID NO:1** en la que los restos que corresponden a los restos 396 y 404 de la **SEC ID NO:1** (mostrada subrayada anteriormente) son restos de fosfoserina. Por el contrario, la notación "Ser396/Ser404" se refiere a una parte polipeptídica de **SEC ID NO:1** en la que los restos que corresponden a los restos 396 y 404 de la **SEC ID NO:1** son ambos restos de serina. Así pues, por ejemplo, la notación "^(P)Ser396/Ser404" se refiere a una parte polipeptídica de **SEQ ID NO:1** en la que el resto que corresponde al resto 396 de **SEC ID NO:1** es un resto de fosfoserina y el resto que corresponde al resto 404 de la **SEC ID NO:1** es serina.

La hiperfosforilación de Tau puede dar como resultado en la formación de "ovillos" autoensamblantes insolubles, denominados en el presente documento "**agregados de Tau**", de filamentos helicoidales apareados 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, el colapso de la columna dendrítica y la degeneración de los axones. La proteína Tau normal contiene, de media, dos sitios fosforilados; los filamentos Tau hiperfosforilados promedian entre siete y ocho sitios fosforilados. La proteína tau hiperfosforilada es el componente principal de los ovillos neurofibrilares intracelulares que son el principal sello distintivo de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías. Tal como se usa en el presente documento, el término "**Tau patológica**" se refiere a la Tau hiperfosforilada que es característica de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

II. Las moléculas basadas en anticuerpos preferidas de la presente invención

Las "**moléculas basadas en anticuerpos**" de la presente invención, como se ha descrito anteriormente, son anticuerpos que son capaces de unirse inmunoespecífica y selectivamente al epítipo ^(P)Ser404 de Tau, así como fragmentos y derivados de los mismos que presentan dicha inmunoespecificidad de unión y de forma selectiva. Tal como se usa en el presente documento, se dice que una molécula es un "**fragmento**" de otra molécula si se obtiene mediante la fragmentación real de dicha molécula original (por ejemplo, un fragmento Fab o (Fab)₂) o si comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una parte de la secuencia de aminoácidos de tal molécula original. Tal como se usa en el presente documento, se dice que una molécula es un "**derivado**" de otra molécula (o parte relevante de la misma) si se obtiene a través de la modificación química real de dicha molécula original o parte de la misma o si comprende una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de dicha molécula original o parte relevante de la misma (por ejemplo, que difieran en menos del 30 %, menos del 20 %, menos del 10 % o menos del 5 % de dicha molécula original o de dicha parte relevante de la misma, o en 10 restos de aminoácidos, o menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 restos de aminoácidos de dicha molécula original o parte relevante de la misma).

Tal 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 la misma que se une al epítipo. Tal como se usa en el presente documento, los términos "fragmento", "región" y "dominio" generalmente pretenden ser sinónimos, a menos que el contexto de su uso indique lo contrario. Los anticuerpos de origen natural normalmente comprenden un tetrámero que normalmente está formado por al menos dos cadenas pesadas (H) y al menos dos cadenas ligeras (L). Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada, normalmente formada por tres dominios (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 está formada por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como "región 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 la cadena pesada y ligera puede participar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, 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", o "CDR", que se intercalan con regiones de secuencia más conservada, denominadas "regiones marco" (FR, del inglés *Framework Regions*). Cada región VH y VL está formada por tres dominios CDR y cuatro dominios FR dispuestos desde el 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 interacciona con un antígeno. De particular relevancia son los anticuerpos y sus fragmentos de unión al epítipo que han sido "aislados" para existir en un medio físico distinto de aquel en el que puede ocurrir en la naturaleza o que han sido modificados para diferir de un anticuerpo natural. en la secuencia de aminoácidos.

Los fragmentos de anticuerpos (incluidos fragmentos Fab y (Fab)₂) que exhiben la capacidad de unión a epítopos se pueden obtener, por ejemplo, mediante escisión por proteasa de anticuerpos intactos. Más preferentemente, dichos fragmentos serán moléculas scFv y los dominios de unión al epítipo de anticuerpos como se ha descrito anteriormente, que se forman usando técnicas recombinantes. Por ejemplo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, la región VL y la región VH, están codificados por genes separados, dichas secuencias génicas o su ADNc codificante pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador flexible (típicamente de alrededor de 10, 12, 15 o más restos de aminoácidos) que les permite formar una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se asocian para formar moléculas monovalentes de unión al epítipo (conocidas como moléculas monocatenarias Fv (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426; y Huston *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). De manera 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 sola 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, en Holliger, P. *et al.* (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90(14), 6444-8 (1993) una descripción de diacuerpos). Como se describe en el presente documento, pero no se reivindica, los fragmentos de anticuerpos de un solo dominio poseen solo un dominio variable (por ejemplo, VL o VH). Los ejemplos de fragmentos de unión a epítipo incluidos en la presente invención incluyen (i) fragmentos Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; y (iii) fragmentos Fv que consisten esencialmente en un dominio VL y VH. Por otra parte, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes independientes, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena única Fv de cadena única (scFv), véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426 y Huston *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). Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención se analizan adicionalmente en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, 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 por cualquier técnica conocida, tales como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo. Tal 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 los genes de la región constante de la cadena pesada. La elección del isotipo normalmente estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de CCDA. Los ejemplos de isotipos son IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo anti-Tau de la presente invención puede cambiarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que originalmente era IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Adicionalmente, pueden usarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Así pues, puede cambiarse la función efectora de los anticuerpos de la invención mediante cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo una IgG1, κ.

Dichos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab se pueden obtener tratando un anticuerpo IgG con papaína; Los fragmentos Fab' se pueden obtener con digestión con

pepsina del anticuerpo IgG. Un fragmento F(ab') también puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación mediante 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')₂. Se puede obtener un fragmento Fab' tratando un fragmento F(ab')₂ con un agente reductor, tal como ditiotreitól. El fragmento de anticuerpo también puede generarse mediante la expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos en células recombinantes (véase, por ejemplo, Evans, M.J. *et al.* (1995) "Rapid Expression Of An Anti-Human C5 Chimeric Fab Utilizing A Vector That Replicates In COS And 293 Cells," J. Immunol. Meth. 184:123-38). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte de un fragmento F(ab')₂ 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 tal molécula de fragmento de anticuerpo truncado. Los fragmentos adecuados capaces de unirse a un epítipo deseado pueden seleccionarse fácilmente para determinar su utilidad de la misma manera que un anticuerpo intacto.

En una realización, tales fragmentos de anticuerpos son un anticuerpo monovalente, preferentemente un anticuerpo monovalente como se describe en la publicación PCT WO 2007/059782 que tiene una delección de la región bisagra. Dicho anticuerpo 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 la que 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 la que, 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 la que 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, tal 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 policlonal humana o cuando se administra a un ser humano animal, 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 forma similar, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monovalente, que comprende:

- (i) una región variable de un anticuerpo de la invención 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 el que 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, tal 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 una realización adicional, la cadena pesada del anticuerpo monovalente se ha modificado de forma que se ha suprimido toda la bisagra.

En otra realización adicional, la secuencia de dicho anticuerpo monovalente se ha modificado para que no comprenda ningún sitio aceptor para la glicosilación ligada a N.

Tal 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 aidez con ese epítipo en relación con epítipos alternativos. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a epítipo del mismo que se une inmunoespecíficamente a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana.

Tal como se usa en el presente documento, el término **"que se une"** 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) en un instrumento biacore 3000 (preferentemente utilizando 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 menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo, al menos 100.000 veces menor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, caseína, etc.) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, para 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 menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces. El término " k_d " (s^{-1} o $1/s$), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Dicho valor también se conoce como valor k_{off} . El término " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$ o $1/M$), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante asociación de una interacción particular antígeno-anticuerpo. El término " K_D " (M), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular y se obtiene dividiendo la k_d por la k_a . El término " K_A " (M^{-1} o $1/M$), tal como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación en el equilibrio de una interacción antígeno-anticuerpo particular y se obtiene dividiendo la k_a por la k_d .

Tal 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 inmuno-específicamente a dicho epítipo con mayor afinidad que la que se une (si es que se une) a un epítipo peptídico no fosforilado que tiene la misma secuencia de aminoácidos. Lo más preferentemente, tal mayor afinidad será al menos 10 veces mayor, al menos 30 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 300 veces mayor, al menos 1.000 veces mayor, al menos 3.000 veces mayor o al menos 10.000 veces mayor. 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 anticuerpo o un fragmento de unión al epítipo del mismo se une inmuno-específicamente a un péptido Tau diana no fosforilado y a una variante fosforilada del mismo.

El término "**epítipo**" se refiere a un determinante antigénico capaz de unirse inmuno-específicamente a un anticuerpo. Los epítopos comprenden habitualmente agrupaciones de moléculas de superficie tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero, pero no al segundo, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Un epítipo puede comprender restos de aminoácidos directamente implicados en la unión (también llamado componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que se bloquean eficazmente mediante la unión del péptido de unión a antígeno específico (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específico).

Tal como se usa en el presente documento, el término "**fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo**" significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse inmuno-específicamente a un epítipo. El fragmento de unión a epítipo contiene los 6 dominios CDR en VL y VH del anticuerpo descrito anteriormente y, aunque es capaz de unirse inmuno-específicamente a dicho epítipo, puede exhibir una inmuno-especificidad, afinidad o selectividad hacia dicho epítipo que difiere de la de dicho anticuerpo. Un fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo puede ser una sola cadena polipeptídica (por ejemplo, un scFv) o puede comprender dos o más cadenas polipeptídicas, cada una con un extremo amino y un extremo carboxilo (por ejemplo, un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento (Fab')₂, etc.).

Las moléculas basadas en anticuerpos de la presente invención y sus fragmentos de unión al epítipo de Tau serán, preferentemente, "humanizadas", particularmente si se van a emplear con fines terapéuticos. El término "humanizado" se refiere a una molécula quimérica, preparada de forma general usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina procedente de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante basada en la estructura y/o en la 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 como se describe en el presente documento, pero no se reivindica, solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dichos dominios variables injertadas en regiones marco humanas apropiadas de dominios variables humanos. Los restos marco de tales moléculas humanizadas pueden ser de tipo salvaje (por ejemplo, completamente 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 pesada y ligera contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que supuestamente proporcionan un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, las regiones variables se pueden "remodelar" o "humanizar" injertando CDR derivadas de anticuerpos no

humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos se ha notificado 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-p185her2 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. La capacidad de humanizar un antígeno es bien conocida (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5,530,101; 5,585,089; 5,859,205; 6,407,213; 6881557).

En una realización, una molécula basada en un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos adecuados pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y en conjunto, en el presente documento reciben el nombre de "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 la cadena pesada humana (μ e Y) y las regiones variable y constante de la cadena ligera (K) humana no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y K (Lonberg, N. *et al.* (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," *Nature* 368:856-859). 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 humana de alta afinidad, anticuerpos monoclonales κ (Lonberg, N. *et al.* (1994) "Antigen-Specific Human Antibodies From Mice Comprising Four Distinct Genetic Modifications," *Nature* 368:856-859; Lonberg, N. (1994) "Human Monoclonal Antibodies from Transgenic Mice," En: HANDBOOK EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY, Volumen 181 (Starke, K. *et al.*, Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg; Lonberg, N. *et al.* (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", *Intern. Rev. Immunol.* 13(1):65-93; Harding, F. *et al.* (1995) "Class Switching In Human Immunoglobulin Transgenic Mice," *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe con detalle en Taylor, L. *et al.* (1992) "A Transgenic Mouse That Expresses A Diversity Of Human Sequence Heavy And Light Chain Immunoglobulins," *Nucl. Acids Res.* 20(23):6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) "Immunoglobulin Gene Rearrangement In B Cell Deficient Mice Generated By Targeted Deletion Of The JH Locus," *Int'l. Immunol.* 5:647-656; Tuailon, N. *et al.* (1994) "Biased Utilization Of DHQ52 And JH4 Gene Segments In A Human Ig Transgenic Minilocus Is Independent Of Antigenic Selection," *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) "Human Immunoglobulin Transgenes Undergo Rearrangement, Somatic Mutation And Class Switching In Mice That Lack Endogenous IgM," *Int'l. Immunol.* 6:579-591; Fishwild, D. *et al.* (1996) "High Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," *Nature Biotechnol.* 14:845-851; véanse también las patentes de EE. UU. N.º 5.545.806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,770,429; 5,545,807; las publicaciones de PCT WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187).

Los ratones HCo7 tienen una interrupción de JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (como se describe en Chen *et al.* (1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," *EMBO J.* 12:821-830), una interrupción de CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describe en el ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild, D. *et al.* (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," *Nature Biotechnol.* 14:845-851) y un transgén de cadena pesada humana de HCo7 (tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.770.429).

Los ratones HCo2 tienen una interrupción de JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (como se describe en Chen *et al.* (1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," *EMBO J.* 12:821-830), una interrupción de CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (como se describe en el ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild, D. *et al.* (1996) "High-Avidity Human IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," *Nature Biotechnol.* 14:845-851) y un transgén de cadena pesada humana HCo2 (como se describe en el ejemplo 2 de la publicación PCT WO 01/14424).

En la cepa de ratón KM, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha interrumpido homocigotamente como se describe en Chen *et al.* (1993) "B Cell Development In Mice That Lack One Or Both Immunoglobulin Kappa Light Chain Genes," *EMBO J.* 12:821-830) y el gen endógeno de cadena pesada de ratón se ha interrumpido homocigotamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild, D. *et al.* (1996) "High Avidity Human

IgG Kappa Monoclonal Antibodies From A Novel Strain Of Minilocus Transgenic Mice," Nature Biotechnol. 14:845-851). 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 la publicación PCT WO 02/43478.

- 5 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 de la presente invención o los anticuerpos de la presente invención que se originan 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 producción del anticuerpo
- 10 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, las patentes de EE.UU. n.º 5.827.690; 5.756.687; 5.750.172 y 5.741.957.

- 15 Como se divulga en el presente documento, pero no se reivindica, en algunos anticuerpos solo parte de una CDR, a saber, el subconjunto de restos de CDR necesarios para la unión, denominados "**SDR**", son necesarios para retener la unión en un anticuerpo humanizado. Los restos de CDR que no entran en contacto con el antígeno y que no están en los SDR se pueden identificar basándose en estudios previos (por ejemplo, los restos H60-H65 en CDR H2 a menudo 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, National
- 20 Institutes of Health Publication No. 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
- 25 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 a 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
- 30 pueden provocar cambios de afinidad, y preferentemente se evitan reducciones significativas en la afinidad. Las posiciones para la sustitución dentro de CDR y los aminoácidos a sustituir también pueden seleccionarse empíricamente.

- El hecho de que una alteración de un solo 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. (USA) 79 (6):1979-1983) proporciona un medio para identificar sistemáticamente secuencias de CDR
- 35 funcionales alternativas. En el presente documento se divulga, pero no se reivindica, un método para obtener tales variantes de CDR, 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
- 40 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.iiij 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 confiables (Eddy, S.R. (2004)
- 45 "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. (USA) 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. (USA) 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
- 50 más avanzada es la base de datos BLOSUM62 (BLOSUM62.iiij). La **tabla 1** presenta las puntuaciones de sustitución BLOSUM62.iiij (cuanto más alta es la puntuación, más conservadora es la sustitución y, por 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 ROR1, por ejemplo, entonces la puntuación de sustitución BLOSUM62.iiij se considera insuficientemente conservativa, y se selecciona una nueva sustitución candidata y se produce teniendo una puntuación de sustitución
- 55 más alta. Así pues, por ejemplo, si el resto original era glutamato (E) y el resto sustituto no funcional era histidina (H), entonces la puntuación de sustitución de BLOSUM62.iiij será 0 y se prefieren cambios más conservadores (tales como 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	¥	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
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3

(continuación)

Tabla 1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	w	¥	V
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
O	-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
¥	-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

En el presente documento se divulga, pero no se reivindica, el uso de mutagénesis guiada o aleatoria para identificar CDR mejoradas.

5

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

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 no cargados	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos alifáticos no cargados	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Restos no polares no cargados	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

10

Clases alternativas de sustitución de restos de aminoácidos conservadores:

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:

15

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
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos cargados negativamente	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos cargados positivamente	H, K y R

(continuación)

Tabla 4	
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 se pueden formular grupos adicionales de aminoácidos utilizando los principios descritos en, por ejemplo, Creighton (1984) *PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

- 10 La tecnología de presentación en fagos se puede utilizar alternativamente 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 precursor (véase, por ejemplo, Glaser *et al.* (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System," *J. Immunology* 149:3903-3913). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos simples da como resultado un repertorio semialeatorizado de mutaciones de aminoácidos. Es posible construir bibliotecas que consisten en una combinación de clones variantes, cada uno de los cuales difiere en modificaciones de un solo aminoácido en una sola CDR 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 explorarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Se puede usar cualquier método de rastreo conocido en la técnica para identificar anticuerpos mutantes con mayor o menor afinidad por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (véase Wu, H. *et al.* (1998) "Stepwise *In Vitro* Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized mAb," *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)* 95:6037-6042; Yelton *et al.* (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," *J. Immunology* 155:1994). Se puede usar paseo sobre CDR, que aleatoriza la cadena ligera, (véase, Schier, R. *et al.* (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity Anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," *J. Mol. Biol.* 263:551-567).

- Métodos para lograr dicha maduración por afinidad se describen, 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 Antibody Against HIV-1 gp41," *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. *et al.* (2009) "Affinity 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 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) "*In 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. (USA)* 105(26):9029-9034.

45

- 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 completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o 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 la 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 HCo7 o HCo12 o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de los ratones KM transcromosómicos como se describe en la publicación PCT WO 02/43478. Tales ratones 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) sometidos a recombinación de V-D-J y a conmutación del isotipo.

55

El uso de moléculas basadas en anticuerpos marcadas de la presente invención 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 scFv) como ligandos de imagen *in vivo* para detectar lesiones Tau. Las moléculas scFv se forman como una proteína de fusión de las regiones variables de los dominios de las cadenas pesada (H) y ligera (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 suele ser rico en glicina para mayor flexibilidad (por ejemplo, GGGGGGGGSGGGGS (**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 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 dicho enlazador 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). Un enlazador particularmente preferido para la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 4**): SSGGGGSGGGGGGSSRSS.

Para facilitar la purificación y/o recuperación, el scFv puede incluir una polihistidina ("**Marcador His**") (por ejemplo, (**SEQ ID NO:5**) HHHHHH). Las cadenas laterales de imidazol de los restos de histidina del marcador His pueden participar en enlaces de coordinación reversibles con ciertos iones de metales de transición, tales como Co²⁺, Zn²⁺ y especialmente Ni²⁺. Así pues, 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 adicional o alternativamente un "**Marcador de HA**" tal como (**SEQ ID NO: 6**) GAYPYDVPDYAS. La hemaglutinina (HA) de influenza humana es una glicoproteína de superficie requerida para la infectividad del virus humano. El marcador de HA deriva de la glicoproteína de superficie hemaglutinina (HA) de influenza humana y permite la detección del scFv usando un anticuerpo anti-marcador de HA (Millipore).

Las moléculas de scFv se pueden expresar 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 se puede hacer produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos VL, produciendo moléculas 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). De manera alternativa, por 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 al epítipo, se puede forzar a dos moléculas de scFv a dimerizarse como 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 más bajas que las moléculas scFv correspondientes, lo que significa que tienen una afinidad mucho mayor por su objetivo. Por consiguiente, los fármacos de diacuerpos podrían administrarse a dosis mucho más bajas que otros anticuerpos terapéuticos y son capaces de atacar 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. Exhiben una afinidad aún mayor por sus objetivos 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, diacuerpos 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).

R. El "Epítipo ^(P)Ser404"

- 5 Las moléculas basadas en anticuerpos descritas anteriormente de la presente invención exhiben inmunoespecificidad al resto de fosfoserina ^(P)Ser404 de Tau (**SEQ ID NO:1**) y sus isoformas relacionadas, y, por lo tanto, se hace referencia en el presente documento como inmunoespecificidad para el "Epítipo ^(P)Ser404". Tal como se usa en el presente documento, se dice que un anticuerpo exhibe inmunoespecificidad para el epítipo ^(P)Ser404 si exhibe unión mejorada al resto de fosfoserina ^(P)Ser404 relativo a ^(P)Ser396 o a cualquier otro resto de aminoácido del inmunógeno, tal que la
- 10 sustitución de ^(P)Ser404 con Ser404 disminuye la unión por tal anticuerpo específico de epítipo ^(P)Ser404 para dicha variante de inmunógeno en mayor medida que el reemplazo de cualquier otro resto de dicho inmunógeno. Aunque cualquier inmunógeno que contenga el epítipo ^(P)Ser404 se puede emplear para aislar y caracterizar tales anticuerpos, se prefiere emplear un péptido que tenga la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NÚM:7**): TDHGAEIVYK^(P)SPWSGDT^(P)SPRHL (que corresponde a los restos de aminoácidos 386-408 de la proteína Tau (**SEQ ID**
- 15 **NO:1**)) que se ha fosforilado en las posiciones 396 y 404, tal que la secuencia de aminoácidos del inmunógeno preferido tenga la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:8**: TDHGAEIVYK^(P)SPWSGDT^(P)SPRHL. Los restos de serina subrayados en las posiciones 11 y 19 de **SEC ID NO:7**, y los restos de fosfoserina subrayados en las posiciones 11 y 19 de **SEC ID NO:8** corresponden a las posiciones 396 y 404 de Tau (**SEC ID NO:1**). El inmunógeno empleado contenía este péptido y, preferentemente, se modifica para que contenga un resto de cisteína N-terminal que se
- 20 conjuga con hemocianina de lapa californiana (KLH). Tales esfuerzos condujeron al aislamiento del anticuerpo **4E6G7** (también conocido como Anticuerpo 4E6), que se une inmunoespecíficamente al Epítipo ^(P)Ser404 (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; 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).
- 25

Como se analiza posteriormente, el anticuerpo 4E6G7 exhibe un espectro deseable de funcionalidades, incluyendo, en particular, la mejora aguda mediada por anticuerpos en la cognición se relaciona con la eliminación de fosfo-tau soluble y una unión de alta afinidad a PHF solubilizado. Un aspecto de la presente invención se refiere al

30 reconocimiento de que la eficacia terapéutica en el tratamiento de la tauopatía se correlaciona positivamente con la afinidad de un anticuerpo por el PHF solubilizado. Así pues, además de proporcionar el anticuerpo 4E6G7, en el presente documento se divulga, pero no se reivindica, es un método para aislar especies de anticuerpos terapéuticamente eficaces adicionales, en el que dichos anticuerpos se obtienen seleccionando anticuerpos anti-Tau para aquellos que muestran una alta afinidad por el PHF solubilizado.

35

B. Anticuerpo 4E6G7

El dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:9**; Las CDR están subrayadas):

40

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
 ASTLYTGVPS RFGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPTWTFG
 GTKLEIKR

El dominio variable de cadena ligera CDR1 del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:10**): HASQNINVWLS

45

El dominio variable de cadena ligera CDR2 del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:11**): EASTLYT

El dominio variable de cadena ligera CDR3 del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:12**): QQGQSYPTW

50

El dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:13**; Las CDR están subrayadas):

VQLQQSGAEL VQPGASVKLS CTASGFNIKD TSMHWVRQRP EQGLEWIGRI
 APANGNTKYD PKFQGGKATIT TDTSSNTAYL QLSSLTSEDV AVYYCSGSGN
 YDWGQGTTLT VS

55

Así pues, el dominio variable de cadena pesada CDR1 del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:14**): GFNIKDTSMH

Así pues, el dominio variable de cadena pesada CDR2 del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:15**): RIAPANGNTKYDPKFQG

60

Así pues, el dominio variable de cadena pesada CDR3 del anticuerpo 4E6G7 tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:16**): SGNYYD

5 C. Moléculas scFv

Las moléculas scFv se pueden generar a partir del anticuerpo 4E6G7 y, por lo tanto, poseen los mismos Dominios Variables de Cadena Ligera y Pesada que el anticuerpo 4E6G7.

- 10 La secuencia completa de un scFv de ejemplo es (**SEQ ID NO: 17**) (los restos de CDR están subrayados):

```
DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPWTFGG
GTKLEIKRss ggggsggggg gssrssVQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSEDTAVYY CSGSGNYDWG QGTTLTVS
```

- 15 en la que los restos de aminoácidos 1-108 son los restos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo 4E6G7 (**SEQ ID NO:9**), los restos de aminoácidos 109-126 son los restos de aminoácidos del enlazador (**SEC ID NO:4**) (mostrado en minúsculas y cursivas), y los restos de aminoácidos 127-238 son los restos de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada del anticuerpo 4E6G7 (**SEC ID NO:13**)

- 20 En una realización preferente, se prepara un scFv de ejemplo como una proteína de fusión que incluye una parte de péptido líder N-terminal que tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:18**): IQEEFKMKKTAIAIAVALAGFATVAQAA y/o una parte de péptido C-terminal. La parte de péptido C-terminal puede incluir: un dominio constante de anticuerpo, tal como (**SEC ID NO:19**): 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),
- 25 un marcador de His, tal como (**SEC ID NO:5**): HHHHHH) y/o un marcador de HA tal como (**SEC ID NO:6**): GAYPYDVPDYAS o cualquier combinación o subcombinación de los mismos, y en cualquier orden. Una parte de péptido C-terminal preferida tiene la secuencia de aminoácidos (**SEC ID NO:20**): AKTTPPSVTSGQAGQH~~HHHHH~~GAYPYDVPDYAS, y por lo tanto incluye (en la dirección N-terminal a C-Terminal) **SEC ID NO:19**, **SEQ ID NO:5** y **SEQ ID NO:6**.

- 30 Así pues, en realizaciones preferidas, las proteínas de fusión scFv de ejemplo comprenderán la secuencia de aminoácidos de cualquiera de **SEQ ID NO: 21-29** (donde las partes peptídicas N-terminal y/o C-terminal de la fusión ScFv están subrayadas):

- 35 **SEC ID NO:21** una fusión de las **SEQ ID NO: 18 y 17**):

```
IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDTITIS
CHASQNINVW LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPSRF SGSGSGTGFT
LTISLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGGS
SRSSVQLQGS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHWV RQRPEQGLEW
IGRIAPANGN TKYDPKFQ GKATITTDTSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
GSGNYDWGG TLTVS
```

- 40 **SEC ID NO:22** una fusión de las **SEQ ID NO: 17 y 19**):

```
DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPWTFGG
GTKLEIKRss gggsggggg gssrssVQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSEDTAVYY CSGSGNYDWG QGTTLTVSAK TTPPSVTSGQ
AGQ
```

- SEC ID NO:23** una fusión de las **SEQ ID NO: 17 y 5**):

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPs RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPTWTFGG
GTKLEIKRss ggggsggggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSED TAVYY CSGSGNYDWG QGTTTLTVSHH HHHH

SEC ID NO:24 una fusión de las **SEQ ID NO: 17 y 6):**

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPs RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPTWTFGG
GTKLEIKRss ggggsggggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSED TAVYY CSGSGNYDWG QGTTTLTVSGA YPYDVPDYAS

SEC ID NO:25 (una fusión de las **SEQ ID NO: 17 y 20):**

DIQMNQSPSS LSASLGDTIT ISCHASQNIN VWLSWYQQKP GNIPKLLIFE
ASTLYTGVPs RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQSYPTWTFGG
GTKLEIKRss ggggsggggg gssrsvQLQ QSGAELVQPG ASVKLSCTAS
GFNIKDTSMH WVRQRPEQGL EWIGRIAPAN GNTKYDPKFQ GKATITTDTS
SNTAYLQLSS LTSED TAVYY CSGSGNYDWG QGTTTLTVSAK TTPSVTSGQ
AGQHHHHHHG AYPYDVPDYA S

SEC ID NO:26 (una fusión de las **SEQ ID NO: 18, 17 y 19):**

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDTITIS
CHASQNINWV LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPsRF SGSGSGTGFT
LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGGS
SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHWV RQRPEQGLEW
IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTDTSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
GSGNYDWGQG TLT TVSAKTT PPSVTSGQAG Q

SEC ID NO:27 una fusión de las **SEQ ID NO: 18, 17 y 5):**

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDTITIS
CHASQNINWV LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPsRF SGSGSGTGFT
LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGGS
SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHWV RQRPEQGLEW
IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTDTSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
GSGNYDWGQG TLT TVSHHHH HH

SEC ID NO:28 (una fusión de las **SEQ ID NO: 18, 17 y 6):**

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDTITIS
CHASQNINWV LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPsRF SGSGSGTGFT
LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGGS
SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHWV RQRPEQGLEW
IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTDTSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
GSGNYDWGQG TLT TVSGAYP YDVPDYAS

SEC ID NO:29 (una fusión de las **SEQ ID NO: 18, 17 y 20):**

IQEEFKMKKT AIAIAVALAG FATVAQAADI QMNQSPSSLS ASLGDTITIS
CHASQNINWV LSWYQQKPGN IPKLLIFEAS TLYTGVPsRF SGSGSGTGFT
LTISSLQPED IATYYCQQGQ SYPWTFGGGT KLEIKRSSGG GSGGGGGGGS
SRSSVQLQQS GAELVQPGAS VKLSCTASGF NIKDTSMHWV RQRPEQGLEW
IGRIAPANGN TKYDPKFQ GK ATITTDTSN TAYLQLSSLT SEDTAVYYCS
GSGNYDWGQG TLT TVSAKTT PPSVTSGQAG QHHHHHHGAY PYDVPDYAS

Aunque los scFv pueden atravesar la barrera hematoencefálica, se pueden utilizar varios enfoques auxiliares para promover aún más dicho tránsito (Huang, L. *et al.* (2013) "Single-Chain Fragment Variable Passive Immunotherapies For Neurodegenerative Diseases," *Int. J. Mol. Sci.* 14(9): 19109-19127). Un conjunto limitado de proteínas y péptidos se transportan a través de la barrera hematoencefálica mediante transcitosis mediada por receptores (Hervé, F. *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). Así pues, el transporte de un scFv a través de la barrera hematoencefálica se puede promover fusionando el scFv con un anticuerpo o un fragmento de unión a epítipo del mismo, que es inmuno-específico para un receptor de tales 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 tóxico/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. (2012) "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 pp. 1-25).

El scFv se puede aumentar para que contenga un péptido policatiónico que facilite la transcitosis mediada por adsorción. Los péptidos policatiónicos 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 policatiónicos 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).

De manera alternativa, el scFv se puede aumentar para que contenga un péptido de penetración celular ("CPP") (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 InterferingRNA (siRNA) To The Brain," *Expert Opin. Ther. Pat.* 19(2):137-140; Hervé, 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 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 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 a las moléculas basadas en anticuerpos que son inmuno-específicas para el ^(P)epítipo {P}Ser404 para su uso en el diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una condición seleccionada del grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, en donde el sujeto es un ser humano. Con respecto a tal utilidad diagnóstica, tales usos pueden implicar la detección, en el sujeto (es decir, *in vivo*), la presencia de un conformero de Tau patológico usando, por ejemplo, el anticuerpo 4E6G7 o un fragmento de unión al epítipo ^(P)Ser404 del mismo (especialmente un fragmento scFv del mismo), que se ha marcado de forma detectable (tales moléculas se denominan colectivamente en el presente documento moléculas de diagnóstico de la presente invención). De manera alternativa, dichos usos pueden implicar la detección de la presencia de un conformero Tau patológico *ex vivo* (por ejemplo, en una muestra de biopsia o posmortem) usando las moléculas de diagnóstico de la presente invención.

En una realización, las moléculas basadas en anticuerpos específicos del epítipo el epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención pueden ser anticuerpos humanizados.

Con respecto a la utilidad terapéutica de las moléculas basadas en anticuerpos específicos del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención, dicha utilidad puede implicar la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha molécula basada en anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo 4E6G7 y, más particularmente, un fragmento scFv del

mismo) 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 una cantidad profilácticamente efectiva de tales moléculas basadas en anticuerpos a un paciente que no presenta tales síntomas, o que presenta síntomas de demencia leve o pre-tauopatía que son indicativos de enfermedad de Alzheimer incipiente o tauopatía, denominándose dichas moléculas colectivamente en el presente documento moléculas terapéuticas de la presente invención.

Las moléculas basadas en anticuerpos específicas del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención se pueden usar en conjunto con fines diagnósticos y/o terapéuticos con anticuerpos y moléculas basadas en anticuerpos que tienen inmunoespecificidad para epítipos distintos del epítipo ^(P)Ser404.

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

Las moléculas de unión a tau de la presente invención se producen preferentemente mediante la expresión recombinante de una molécula de ácido nucleico que codifica su(s) cadena(s) polipeptídica(s) constituyente(s). Por tanto, la invención también se refiere a un vector de expresión que codifica una o más cadenas polipeptídicas de un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector de ADN o ARN adecuado, incluidos los 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, incluidos, 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 and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 2, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos son bien conocidos 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 una molécula basada en anticuerpo específica de epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención 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 alternativamente, un vector adecuado para la expresión de tales moléculas basadas en anticuerpos 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 de la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica una molécula basada en el anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención puede comprender o asociarse con cualquier promotor adecuado, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión. 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) efectivas, un origen de replicación para el producto del plásmido 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 tales términos son en realidad descriptores de un grado de expresión génica bajo ciertas condiciones).

Aún en un aspecto adicional más, la invención se refiere a una célula huésped eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce una molécula basada en anticuerpo específica de epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención. Los ejemplos de células huésped incluyen levaduras, bacterias y células de mamíferos, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, 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 una molécula basada en anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención. En otra realización, 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 una molécula basada en anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir una molécula basada en anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención, comprendiendo dicho método las etapas de a) cultivar un hibridoma o una célula huésped de la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y b)

purificar el anticuerpo de la invención a partir del medio de cultivo.

En general, una la molécula basada en el anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención puede modificarse mediante la inclusión de cualquier número adecuado de aminoácidos modificados y/o asociaciones con tales sustituyentes conjugados. La idoneidad en este contexto generalmente está determinada por la capacidad de retener al menos sustancialmente la inmunoespecificidad para el epítipo ^(P)Ser404 asociado con el anticuerpo anti-Tau original no derivatizado. La presencia de uno o más aminoácidos modificados puede ser ventajosa en, por ejemplo, el aumento de la semivida sérica del polipéptido, la reducción de la antigenicidad del polipéptido o el aumento de la estabilidad de almacenamiento del polipéptido. El (los) aminoácidos se modifica(n), 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 modificada 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 fosforilado y similares. Las referencias adecuadas para guiar a un experto en la modificación de aminoácidos son abundantes a lo largo de la literatura. Los protocolos de ejemplo se encuentran en Walker (1998) *Protein Protocols On CD-Rom*, Humana Press, Totowa, NJ. El aminoácido modificado puede, por ejemplo, seleccionarse entre 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 derivador orgánico.

Como se ha indicado anteriormente, cuando se desea aumentar la semivida de una molécula terapéutica administrada de la presente invención, tales moléculas pueden formarse para comprender restos de carbohidratos, tal como polioles polioxietilados 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, de 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 mediante glicosilación o añadiendo o asociando proteínas 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 Gammal Fc or CH3 Region," *FEBS Lett.* 454:90-94; Peters T. *et al.* (1985) "Serum Albumin," *Adv. Protein Chem.* 37:161-245). Los polímeros y métodos de ejemplo para unirlos a péptidos, son conocidos, (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.766.106; 4,179,337; 4.495.285 y 4.609.546).

V. Composiciones farmacéuticas de la presente invención

Las moléculas basadas en anticuerpos específicos del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención se administran ventajosamente como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo y uno o más de otros diversos componentes farmacéuticamente aceptables. Véase REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (21ª Edición) (2005) (Troy, D.B. *et al.* (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins (Publs.), 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, farmacéuticamente aceptable, vehículos no tóxicos, excipientes, diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, aminoácidos libres de proteínas o azúcares), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica y que son vehículos de uso habitual para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona de tal forma que no afecte a la actividad biológica de la combinación. Son ejemplos de tales 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 vehículos, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la 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 vehículos son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas o dispersiones 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 metabolismo lento, 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 vehículos y otros componentes de las composiciones farmacéuticas se determina en función de la ausencia de un impacto negativo significativo sobre las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o la composición farmacéutica de la presente invención (por ejemplo, menos de un impacto sustancial (por ejemplo, 10 % o menos de inhibición relativa, 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 mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables, biocompatibles tales como copolímero de etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solo o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los expertos en la materia conocen generalmente métodos para la preparación de tales formulaciones. Véase, por ejemplo, SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En una realización, los compuestos de la presente invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o dispersiones 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. Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Normalmente, las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El vehículo 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 se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, se preferirá 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 retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, 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 previamente esterilizada por filtración.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos 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 previamente esterilizada por filtración.

Para la administración parenteral, los agentes 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 vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceite, solución salina, glicerol o etanol. Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, las sustancias reguladoras del pH y similares pueden estar presentes en las composiciones. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético. El aceite de cacahuete, el aceite de soja y el aceite mineral son todos ejemplos de materiales útiles. En general, glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son transportadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los agentes de la presente invención se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que se puede formular de tal forma que permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición de ejemplo comprende un scFv a aproximadamente 5 mg/ml, formulada en tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas, tales como polilactida, poliglicólido o copolímero, para un efecto adyuvante mejorado (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.

VI. Administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención

Las moléculas basadas en anticuerpos descritas anteriormente de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral, tópica, oral o intranasal para 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 las moléculas de la presente invención. En algunos usos, tales moléculas se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™ (Elan Pharm. Technologies, Dublín, Irlanda). En algunos usos, las moléculas 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", tal como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen inyección epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intracraneal, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, 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, enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad o retardar la aparición de la enfermedad, incluidos los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento 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 afectan a un paciente al que se le ha diagnosticado la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto descrito en el presente documento) las moléculas terapéuticas 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 las moléculas terapéuticas de la presente invención reduce o elimina el deterioro cognitivo leve en pacientes que aún no han desarrollado la patología característica de Alzheimer.

Las dosis efectivas de las moléculas terapéuticas proporcionadas de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente pueden variar dependiendo de muchos factores diferentes, entre los que se incluyen 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 generalmente se ajustan para optimizar su seguridad y eficacia. Cualquier día dado que se administra una dosis, la dosificación puede oscilar de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg y, más habitualmente, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. 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 dosificaciones ejemplares 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 de

aproximadamente 0,15 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 0,2 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal

5 Un médico o veterinario que tenga experiencia en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o el veterinario podría empezar con dosis del anticuerpo anti-tau o fragmento usado en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En
10 general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y, por ejemplo, administrada próxima al sitio del objetivo. 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
15 por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. Si bien es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

20 Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos usos, se administrarán uno, dos o más anticuerpos (o fragmentos de unión a epítipo de los mismos) junto con la administración de las moléculas terapéuticas de la presente invención, en cuyo caso, la dosificación de cada molécula administrada se encuentra en los intervalos indicados.

25 La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo 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. A continuación, la patente puede
30 administrar dicha molécula terapéutica utilizando un régimen de dosificación profiláctico.

Con fines terapéuticos, las moléculas de la presente invención normalmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas (por ejemplo, un bolo o una infusión) pueden ser semanales, mensualmente o
35 anualmente. En algunos usos, la dosis se ajusta para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml y en algunos usos de 25-300 µg/ml. De manera alternativa, las moléculas terapéuticas de la presente invención se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la mayor semivida, seguidos de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. Las moléculas scFv generalmente
40 tienen semividas en suero cortas.

Otro aspecto de la presente invención es una terapia de combinación en la que 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 en combinación con una molécula terapéutica de la presente invención. En el caso de enfermedades amiloidogénicas,
45 tales como, enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down, la modulación inmunitaria para eliminar los depósitos de beta-amiloide (Aβ) es una terapia emergente. Las inmunoterapias dirigidas a Aβ han resultado consistentemente en mejoras cognitivas. Es probable que las enfermedades de Tau y Aβ sean sinérgicas. Por tanto, una terapia combinada dirigida a la eliminación de ambas enfermedades al mismo tiempo puede ser más efectiva que dirigida a cada una de ellas individualmente. En el caso de la enfermedad de Parkinson y enfermedades neurodegenerativas relacionadas,
50 la modulación inmunitaria para eliminar las formas agregadas de la proteína α-sinucleína también es una terapia emergente. Una terapia de combinación que apunte a la eliminación de las proteínas Tau y α-sinucleína simultáneamente puede ser más eficaz que dirigirse a cada una de ellas individualmente.

55 VII. Utilidad de las moléculas de unión a Tau de la presente invención

D. Utilidad de diagnóstico

Detectar la presencia de un confórmero de Tau patológico en un sujeto utilizando una molécula diagnóstica basada en anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 marcada mencionada anteriormente de la presente invención se puede
60 lograr obteniendo una muestra biológica del sujeto (por ejemplo, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, poniendo en contacto la muestra biológica con dicho anticuerpo de diagnóstico y detectando la unión de la molécula de diagnóstico a un confórmero patológico de la proteína Tau en la muestra del sujeto. Los ensayos para llevar a cabo 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,
65 inmunohistoquímica, transferencia Western, etc.

De manera alternativa, detectar la presencia de un confórmero de proteína tau patológica en un sujeto usando molécula diagnóstica basada en anticuerpo específico del epítipo ^(P)Ser404 marcado de la presente invención se puede lograr usando técnicas de formación de imagen *in vivo*. La formación de imágenes *in vivo* implica administrar al sujeto el anticuerpo de diagnóstico que tiene especificidad antigénica para un péptido Tau patológico y detectar la unión del reactivo de anticuerpo de diagnóstico al confórmero de proteína Tau patológica *in vivo*.

Las moléculas de diagnóstico basadas en anticuerpos específicos del epítipo ^(P)Ser404 marcadas de la presente invención se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intracarotídea, etc.) en el cuerpo del paciente o directamente en el cerebro por inyección intracraneal. La dosificación de tal molécula debe ser de aproximadamente 0,0001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg y más normalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de aproximadamente 1-10 mg/kg.

Normalmente, una molécula de diagnóstico basada en anticuerpos específicos del epítipo ^(P)Ser404 marcada de la presente invención está marcada, aunque en algunos métodos *ex vivo* o *in vitro*, 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 producto 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 ficoeritrina, Rojo Texas, BODIPY FL-SE[®] (Invitrogen) o un análogo de los mismos, es adecuado para la detección óptica. Se pueden emplear marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, luminol, luciferasa, luciferina y aecutorina). Dicho diagnóstico y detección también se pueden lograr acoplando la molécula de diagnóstico de la presente invención a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitaciones, diversas enzimas, enzimas que incluyen, pero sin limitaciones, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa, o a complejos de grupos protésicos tales como, pero sin limitaciones, estreptavidina/biotina y avidina/biotina. También se pueden emplear 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 limitaciones, bismuto (²¹³Bi), carbono (¹¹C, ¹³C, ¹⁴C), cromo (⁵¹Cr), cobalto (⁵⁷Co, ⁶⁰Co), cobre (⁶⁴Cu), disprosio (¹⁶⁵Dy), erbio (¹⁶⁹Er), flúor (¹⁸F), gadolinio (¹⁵³Gd, ¹⁵⁹Gd), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), germanio (⁶⁸Ge), oro (¹⁹⁸Au), holmio (¹⁶⁶Ho), hidrógeno (³H), indio (¹¹¹In, ¹¹²In, ¹¹³In, ¹¹⁵In), yodo (¹²¹I, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I), iridio (¹⁹²Ir), hierro (⁵⁹Fe), criptón (^{81m}Kr), lantano (¹⁴⁰La), lutelio (¹⁷⁷Lu), manganeso (⁵⁴Mn), molibdeno (⁹⁹Mo), nitrógeno (¹³N, ¹⁵N), oxígeno (¹⁵O), paladio (¹⁰³Pd), fósforo (³²P), potasio (⁴²K), praseodimio (¹⁴²Pr), prometio (¹⁴⁹Pm), renio (¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re), rodio (¹⁰⁵Rh), rubidio (⁸¹Rb, ⁸²Rb), rutenio (⁸²Ru, ⁹⁷Ru), samario (¹⁵³Sm), escandio (⁴⁷Sc), selenio (⁷⁵Se), sodio (²⁴Na), estroncio (⁸⁵Sr, ⁸⁹Sr, ⁹²Sr), azufre (³⁵S), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), estaño (¹¹³Sn, ¹¹⁷Sn), xenón (¹³³Xe), iterbio (¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Yb), itrio (⁹⁰Y) y cinc (⁶⁵Zn); metales emisores de positrones utilizando varias tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos (tales como iones paramagnéticos de aluminio (Al), bario (Ba), calcio (Ca), cerio (Ce), disprosio (Dy), erbio (Er), europio (Eu), gadolinio (Gd), holmio (Ho), iridio (Ir), litio (Li), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (M), 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), tungsteno (W) y circonio (Zr)), y en particular, Co⁺², CR⁺², Cr⁺³, Cu⁺², Fe⁺², Fe⁺³, Ga⁺³, Mn⁺³, Ni⁺², Ti⁺³, V⁺³ y V⁺⁴). 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 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y las patentes de EE.UU. n.º 4.681.581; 4.735.210; 5.101.827; 5.102.990; RE 35.500; 5.648.471 y 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse mediante un método de cloramina-T (Lindgren, 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 Suppl):857s-861s).

El diagnóstico se realiza comparando el número, el tamaño y/o la intensidad de los confórmeros de Tau patológicos marcados, agregados de tau y/o ovillos neurofibrilares en una muestra del sujeto, o en el sujeto, a 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 usos diagnósticos y los métodos *ex vivo/in vitro* descritos anteriormente también se pueden usar para controlar la respuesta de un sujeto a la terapia. En la presente realización, la detección de la presencia de Tau patológica en un sujeto se determina antes del comienzo del tratamiento. El nivel de Tau patológica en el sujeto en este momento se usa como valor basal. En varios momentos durante el curso del tratamiento, la detección de confórmeros patológicos de la proteína Tau, agregados de tau y/o ovillos neurofibrilares se repite y los valores medidos posteriormente se comparan con los valores basales. Una disminución en los valores en relación con las señales basales indica una

respuesta positiva al tratamiento. Los valores también pueden aumentar temporalmente en los fluidos biológicos a medida que la Tau patológica se elimina del cerebro.

La presente invención se refiere además a un kit para realizar los métodos de diagnóstico y seguimiento descritos anteriormente. Normalmente, dichos kits contienen el anticuerpo de diagnóstico marcado de la presente invención. El propio anticuerpo 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). De manera alternativa, se puede utilizar un segundo reactivo que contiene el marcador detectable, donde el segundo reactivo tiene especificidad de unión por el anticuerpo primario. En un kit de diagnóstico adecuado para medir la proteína Tau patológica en una muestra biológica, los anticuerpos del kit pueden suministrarse preligados a una fase sólida, tal como a los pocillos de una placa de microtitulación.

Se puede detectar *in vivo* la presencia de anticuerpos anti-Tau marcados o sus fragmentos de unión a Tau con fines diagnósticos. En una realización, dicho diagnóstico comprende: a) administrar a un sujeto una cantidad eficaz de dicha molécula marcada; b) esperar un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que la molécula marcada se concentre en los sitios (si los hay) de Tau agregada y para permitir que la molécula marcada no unida se elimine a un nivel de fondo; c) determinar un nivel de fondo; y d) detectar dicha molécula marcada en el sujeto, de manera que la detección de la molécula marcada por encima del nivel de fondo es indicativa de que el sujeto tiene una tauopatía, o es indicativa de la gravedad de tal tauopatía. De acuerdo con tal realización, el anticuerpo se marca con un resto de formación de imágenes adecuado para la detección utilizando un sistema de formación de imágenes particular conocido por los expertos en la técnica. Los niveles de fondo se pueden determinar mediante diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo la comparación de la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar determinado previamente para un sistema de formación de imágenes particular. Los métodos y sistemas que pueden utilizarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, pero sin limitaciones, tomografía computerizada (TAC), exploración de cuerpo entero como tomografía por emisión de positrones (PET; del inglés, Positron Emission Tomography), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM; en inglés, MRI) y ecografía.

E. Utilidad terapéutica

Como se ha indicado anteriormente, un aspecto de la presente invención se refiere a una molécula basada en anticuerpos específicos del epítipo ^(P)Ser404 mencionada anteriormente de la presente invención (especialmente el anticuerpo 4E6G7 o un fragmento scFv del mismo) para su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, en donde el sujeto es un ser humano; mediante la administración de la molécula basada en anticuerpos específicos del epítipo ^(P)Ser404 de la presente invención (especialmente el anticuerpo 4E6G7 o un fragmento scFv del mismo) en una cantidad eficaz para prevenir o tratar tal enfermedad de Alzheimer o tauopatía. Dicha administración puede proporcionarse para promover la eliminación de agregados de Tau del cerebro de un sujeto o puede proporcionarse para ralentizar un fenotipo conductual relacionado con enredos en un sujeto. Además, dicha administración puede proporcionarse profilácticamente para retrasar, impedir, atenuar o prevenir la aparición de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía asociada con los ovillos neurofibrilares.

El término "**tratamiento**" o "**que trata**" como se usa en el presente documento significa mejorar, retrasar 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. Para los fines de la presente invención, "tratamiento" o "que trata" es una estrategia para obtener beneficio o resultados clínicos 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 de enfermedad o trastorno estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de una enfermedad o estado de trastorno, mejora o paliación de un estado de enfermedad o trastorno, y remisión de una enfermedad o trastorno, tanto parcial como total, detectable o indetectable.

Una "**cantidad eficaz**", cuando se aplica a un anticuerpo de la invención, se refiere a una cantidad suficiente, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr 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 anticuerpo de la invención, pretende indicar una cantidad del anticuerpo que es suficiente para mejorar, paliar, estabilizar, revertir, retardar o retrasar la progresión de un trastorno o estado de enfermedad, o de un síntoma del trastorno o enfermedad. En una realización, los usos de la presente invención prevén la administración del anticuerpo en combinación con otros compuestos. En dichos ejemplos, la "cantidad eficaz" es la cantidad de la combinación suficiente para provocar el efecto biológico pretendido.

Se define una cantidad adecuada para realizar el tratamiento terapéutico o profiláctico, respectivamente, como una dosis terapéuticamente efectiva o una dosis profilácticamente efectiva. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, los agentes se administran habitualmente en varias dosis hasta que se ha logrado una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, la respuesta inmunitaria se monitoriza y se administran dosis repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a disminuir. Una dosis terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva de tal anticuerpo o fragmento de unión a epítipo del mismo puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, 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 del anticuerpo o parte del anticuerpo se ve compensado por el efecto terapéuticamente beneficioso.

Los pacientes aptos para el tratamiento incluyen personas que padecen la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía de este tipo que muestran síntomas clínicamente reconocidos o indicaciones de tales afecciones, así como pacientes que actualmente no muestran síntomas de tales condiciones. Aunque la enfermedad de Alzheimer se diagnostica definitivamente sólo mediante biopsia *posmortem*, las personas que padecen enfermedad de Alzheimer se diagnostican clínicamente utilizando los criterios de la "Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados" (ADRD) (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). Tales individuos pueden distinguirse alternativamente de aquellos que tienen enfermedades o afecciones que no están relacionadas con la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía por la presencia de factores de riesgo correlacionados (es decir, uno o más factores que se ha encontrado que tienen más del 50 % de coincidencia con la enfermedad de Alzheimer). enfermedad u 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 tales marcadores genéticos de riesgo hacia la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones correlacionadas en el gen APP, por ejemplo, mutaciones en la posición 717 y las posiciones 670 y 671 del gen 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 ApoE4 (Bekris, L.M. *et al.* (2010) "Genetics of Alzheimer Disease," *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23(4):213-227).

Tales 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; E120G; E120K; E123K; N135D; N135S; A136G; M139I; M139L; M139K; M139T; M139V; I143F; I143M; I143N; I143T; I143V; M146I; M146L; M146L; 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; y I439S.

Tales 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; y D439A.

Dichos alelos ApoE4 incluyen el alelo $\epsilon 4$, alelo $\epsilon 3$ y 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, una serie de pruebas de diagnóstico están disponibles para identificar a las personas que tienen la enfermedad de Alzheimer. Estos incluyen la medición de los niveles en LCR de Tau y A β 42. Los niveles elevados de Tau y disminuidos de A β 42 significan la presencia de la enfermedad de Alzheimer.

En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquier persona está en riesgo de sufrir enfermedad de Alzheimer. Por tanto, las moléculas terapéuticas de la presente invención pueden administrarse profilácticamente a la población general sin necesidad de ninguna evaluación del riesgo del sujeto paciente. Los presentes usos son especialmente útiles para el tratamiento profiláctico de individuos que tienen un riesgo genético conocido de

enfermedad de Alzheimer. En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Habitualmente, 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 periodo de tiempo. El tratamiento puede controlarse analizando las respuestas de anticuerpos o linfocitos T o linfocitos B activados al agente terapéutico a lo largo del tiempo. Si la respuesta falla, está indicada 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 de la paciente.

La presente invención refleja el hallazgo de que dos anticuerpos, el anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12, producidos contra la misma región del epítipo de Tau tenían efectos muy diferentes sobre la cognición en un modelo de ratón de tauopatía en etapa temprana. Ambos anticuerpos tienen fosfoselectividad para el inmunógeno pero difieren en muchos aspectos. El anticuerpo 4E6G7 de menor afinidad es eficaz para mejorar de forma aguda el aprendizaje espacial y la memoria y reducir la fosfo-tau soluble, mientras que el anticuerpo 6B2G12 de mayor afinidad es ineficaz. Notablemente, los datos muestran además diferencias de eficacia idénticas en un modelo de cultivo de tauopatía neuronal primaria tratado con filamentos helicoidales emparejados (PHF) aislados de un cerebro con Alzheimer. Esto indica que el modelo de cultivo *ex vivo* tiene una validez predictiva similar a la del modelo de ratón a pesar de las diferencias en los parámetros medidos. Tanto la toxicidad como la siembra de tau fueron prevenidas por el anticuerpo 4E6G7 pero no por el anticuerpo 6B2G12. Por otra parte, el anticuerpo 4E6G7 redujo la propagación de PHF entre las neuronas. Así pues, la eficacia del anticuerpo 4E6G7 se relaciona con su unión de alta afinidad al PHF solubilizado, mientras que se encontró que el anticuerpo 6B2G12 ineficaz se unía principalmente a PHF agregado. El bloqueo de la absorción del anticuerpo 4E6G7 en las neuronas impidió sus efectos protectores si el anticuerpo se administraba después de que se hubiera internalizado el PHF. Por tanto, en estas condiciones, el anticuerpo está trabajando intracelularmente. Cuando el anticuerpo 4E6G7 y PHF se administraron al mismo tiempo, el anticuerpo era extracelularmente protector. Dado que tal escenario imita la fisiología que se observa en la tauopatía, los datos indican que la administración extracelular del anticuerpo 4E6G7 será terapéuticamente eficaz.

Como se analiza posteriormente, se detectó una modesta patología de tau mediante inmunohistoquímica en cerebros de ratones hTau y los grupos de tratamiento y control no parecieron diferir. En tales condiciones de patología tau en etapa temprana, es más fácil cuantificar la patología temprana de tau en transferencias Western que mediante inmunohistoquímica, y en dichas transferencias la proteína tau insoluble estaba claramente presente en los ratones hTau de 12-13 meses de edad. Ninguno de los anticuerpos tau indujo cambios en los niveles de tau insoluble medidos por el anticuerpo tau específico humano (CP27), aunque el anticuerpo 4E6G7 mejoró notablemente el aprendizaje espacial y la memoria. Los análisis de la fracción de tau soluble revelaron que estos beneficios cognitivos estaban asociados con niveles reducidos de proteína fosfo-tau (reactiva a PHF-1). Es probable que en tales condiciones de tratamiento agudo, los cambios globales en los niveles de tau insoluble pueden no ser fácilmente alcanzables, mientras que la proteína tau patológica soluble debería ser más susceptible de eliminación. De hecho, el anticuerpo PHF-1 reconoce un epítipo fosfo-tau dentro de la misma región que el anticuerpo 4E6G7, lo que puede explicar por qué esta fracción tau se elimina preferentemente. Sin embargo, no parece ser un aclaramiento específico del oligómero, ya que no se observaron diferencias en las inmunotransferencias T22 entre los ratones tratados con el anticuerpo 4E6G7 y los tratados con IgG.

No se observó un rescate funcional de la memoria asociativa del miedo después del tratamiento agudo con el anticuerpo 4E6G7 o el anticuerpo 6B2G12. Hay muchas explicaciones posibles para esto. En primer lugar, el protocolo de entrenamiento utilizado puede haber sido demasiado "fuerte" para detectar un déficit de memoria sutil. Esto puede ser particularmente importante porque la patología general de tau que se observó, aunque presente, era leve. En estudios previos, los déficits de memoria asociativa se observaron solo en ratones de edad avanzada con mayores niveles de patología tau (Levenga, J., *et al.* (2013) "Tau Pathology Induces Loss Of Gabaergic Interneurons Leading To Altered Synaptic Plasticity And Behavioral Impairments," *Acta Neuropathol. Commun.* 1:34).

A pesar de los diferentes sistemas modelo utilizados, los hallazgos obtenidos de los experimentos *ex vivo* e *in vivo* son consistentes y no dependen del modelo, que sustenta su validez. En ambos casos, el anticuerpo 4E6G7 muestra eficacia en la prevención de la patología tau y la toxicidad/deterioro cognitivo asociados, mientras que el anticuerpo 6B2G12 no lo hace.

Se obtuvo una idea de las especies de tau relevantes a partir de estudios ELISA y de transferencia por puntos de la unión de anticuerpos a solubles, especie tau humana solubilizada o agregada. El anticuerpo 4E6G7 reconoce principalmente PHF solubilizado, en un ELISA y ensayo de transferencia por puntos, lo que puede explicar la falta de cambios de tau más globales en los animales en condiciones tan agudas. Los ratones de esta edad con una patología tau modesta pueden ser ideales para evaluar los efectos agudos de las terapias, particularmente bajo la comparación cognitiva por pares como se usa en el presente documento, lo que mejora la sensibilidad para detectar efectos beneficiosos. Tales beneficios de aprendizaje y memoria *in vivo* del anticuerpo 4E6G7 y la falta de los mismos para el anticuerpo 6B2G12 en los ratones htau están de acuerdo con los resultados de eficacia *in vivo* y en el modelo de cultivo de la tauopatía. Curiosamente, las especies tau solubles se han relacionado recientemente con la LTP y la memoria en ratones htau (Fa, M. *et al.* (2016) "Extracellular tau oligomers produce an immediate impairment of LTP and memory," *Sci. Rep.* 6:19393).

Aunque los ensayos ELISA y de transferencia por puntos proporcionaron información útil sobre las propiedades de unión a tau del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12, se consideró que los datos obtenidos de las imágenes confocales eran de mayor valor para determinar el mecanismo y la posible explicación de las diferencias en la eficacia. Con coincubación en el ensayo de cultivo, los complejos extracelulares de PHF exógeno y el anticuerpo 4E6G7 se forman cuando el anticuerpo 4E6G7 se une al PHF soluble. Esta formación de complejo neutralizó el PHF e impidió su absorción. Sin embargo, con el anticuerpo 6B2G12, tales complejos no se formaron, ya que el anticuerpo 6B2G12 no se une bien al PHF solubilizado y el PHF se detectó intraneuronalmente. Esto indica que el anticuerpo 6B2G12 no pudo prevenir la absorción y toxicidad de PHF. Estos resultados respaldan la conclusión de que los anticuerpos pueden ser beneficiosos mientras trabajan en el espacio intersticial entre las células. En el cerebro vivo, estos complejos tau-anticuerpo podrían luego ser captados y eliminados por la microglía (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; Funk, K.E., *et al.* (2015) "Distinct Therapeutic Mechanisms of Tau Antibodies: Promoting Microglial Clearance Versus Blocking Neuronal Uptake," J. Biol. Chem. 290(35):21652-21662; Luo, W., *et al.* (2015) "Microglial Internalization And Degradation Of Pathological Tau Is Enhanced By An Anti-Tau Monoclonal Antibody," Sci. Rep. 5:11161).

Como se analiza posteriormente, la adición de 10 o 1 µg/ml de pérdida celular inducida por dosis de PHF, medido usando los niveles de LDH y NeuN, así como aumento de tau total y fosforilada en el resto de las neuronas. Se propaga entre poblaciones celulares, a través de la liberación y posterior absorción por otras neuronas. Para probar la eficacia de las moléculas de la presente invención, se utilizaron tres métodos de dosificación diferentes (que diferían en el momento de la administración de tau y de anticuerpos). Para uno de los anticuerpos, El anticuerpo 4E6G7, dos de estos métodos, adición del PHF y el anticuerpo juntos, y adición del anticuerpo 4E6G7 24 horas después del PHF, evitó la toxicidad, siembra y propagación de PHF. Curiosamente, aunque igualmente eficaz, el mecanismo a través del cual ocurre la protección difería entre los paradigmas de dosificación.

Cuando se añadieron el anticuerpo 4E6G7 o el anticuerpo 6B2G12 24 horas después de PHF, estos se co-localizaron intracelularmente con PHF, pero sólo el anticuerpo 4E6G7 evitó la toxicidad por PHF. Según los datos confocales de los experimentos de coincubación, así como datos de los ensayos de transferencia por puntos y ELISA, Se descubrió que el anticuerpo 4E6G7 se unía mejor al PHF solubilizado que el anticuerpo 6B2G12 (que reacciona mejor con el PHF agregado y la tau insoluble). Se considera que esta característica explica la eficacia intracelular del anticuerpo 4E6G7, es decir, que al unirse a PHF solubilizado, el anticuerpo 4E6G7 actúa para prevenir la polimerización de PHF, facilitando así el acceso de las enzimas lisosomales para eliminar el PHF y/o neutralizar directamente el PHF soluble y prevenir la toxicidad. Sin embargo, la unión del anticuerpo 6B2G12-PHF puede ser inerte sin promover el desensamblaje. Por otra parte, debido a la mala unión, puede ser incapaz de prevenir la formación de fibrillas de PHF y/o la toxicidad del PHF soluble.

Los hallazgos que se presentan a continuación explican así la eficacia terapéutica del anticuerpo 4E6G7. Es capaz tanto del bloqueo extracelular como de la eliminación intracelular de PHF. Los datos anteriores indican que el anticuerpo 4E6G7 entra en el sistema endosomal/lisosomal dentro de las neuronas de tauopatía y promueve la eliminación de tau nativa, posiblemente evitando la agregación (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; 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; 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). Otros grupos han observado la internalización de anticuerpos de tau (Collin, L., *et al.* (2014) "Neuronal Uptake Of TauIPs422 Antibody And Reduced Progression Of Tau Pathology In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease," Brain 137(Pt 10):2834-2846; Kondo, A. *et al.* (2015) "Antibody Against Early Driver Of Neurodegeneration Cis P-Tau Blocks Brain Injury And Tauopathy," Nature 523(7561):431-436) y colocalización lisosomal (Collin, L., *et al.* (2014) "Neuronal Uptake Of TauIPs422 Antibody And Reduced Progression Of Tau Pathology In A Mouse Model Of Alzheimer's Disease," Brain 137(Pt 10):2834-2846). Adicionalmente, se ha observado la colocalización neuronal entre anticuerpos, la diana y los marcadores endosómicos/lisosomales para anticuerpos α-sinucleína en un modelo de EP de ratón (Masliah, E., *et al.* (2011) "Passive Immunization Reduces Behavioral And Neuropathological Deficits In An Alpha-Synuclein Transgenic Model Of Lewy Body Disease," PLoS One 6(4):e19338). En otros experimentos, los anticuerpos tau pueden bloquear la absorción de tau patológica o mejorar los resultados experimentales aparentemente sin entrar en las neuronas (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(12):4260-4272; d'Abramo, C. *et al.* (2013) "Tau Passive Immunotherapy In Mutant P301L Mice: Antibody Affinity Versus Specificity," PLoS One 8(4):e62402; 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(2):402-414). El hecho de que los anticuerpos entren en las neuronas probablemente esté influenciado por varios factores, incluidos, la carga, la afinidad del objetivo y del receptor Fc, y como sugieren los datos presentados en el presente documento, la ubicación de la diana y el momento de la adición de anticuerpos.

Por el contrario, la incubación previa con el anticuerpo 4E6G7 (es decir, en ausencia de PHF) no fue eficaz para reducir la toxicidad o la siembra de la patología tau que se produce una vez que se añade PHF. Una razón probable es la falta

relativa del epítipo objetivo en estas condiciones. Anteriormente, se ha demostrado que la absorción del anticuerpo neuronal 4E6G7 se correlaciona en gran medida con los niveles patológicos de tau intracelular (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). Cuando se añade primero el anticuerpo, la eficacia requiere retención en las neuronas hasta la adición de PHF 24 horas más tarde. Sin embargo, una escasez del objetivo significa que el anticuerpo permanecerá sin unir y será más propenso a la degradación o al reciclaje fuera de la célula, como se ve a través de imágenes confocales. Aunque el anticuerpo 4E6G7 fue ineficaz en estas condiciones, no descarta la administración profiláctica de anticuerpos tau, ya que los anticuerpos circulantes podrían prevenir el inicio de la enfermedad al eliminar los agregados de tau en etapa temprana. De hecho, los hallazgos de la presente invención respaldan la conclusión de que dicha administración profiláctica de anticuerpos tau terapéuticamente efectivos (por ejemplo, el anticuerpo 4E6G7 o fragmentos del mismo que se unen al epítipo) a sujetos con riesgo de tauopatía, pero que no tienen tauopatía real, no está asociada con efectos adversos y que dicha administración se vuelve efectiva al establecerse una tauopatía real. Los anticuerpos exógenos tienen una semivida de una a tres semanas y se podrían usar dosis más bajas en individuos presintomáticos en riesgo.

Perceptiblemente, las diferentes eficacias entre los métodos de dosificación también se observaron en el ensayo de dispersión usando las cámaras microfluídicas. En ambos sistemas modelo, solo la dosificación de coincubación o PHF → Ac fue efectiva, mientras que Ac → PHF no lo era.

En hallazgos publicados previamente (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), tanto el anticuerpo 4E6G7 como el anticuerpo 6B2G12 mostraron eficacia en la prevención del aumento de los niveles de fosfo-tau en un modelo de corte de cerebro, en contraste con la ineficacia del anticuerpo 6B2G12 en las neuronas primarias en el estudio actual. Es probable que haya múltiples factores que contribuyan a estas diferencias. En el sistema de cultivo de cortes, el tratamiento con anticuerpos duró hasta seis semanas y no se introdujo tau exógena en ese sistema. En los resultados que se presentan a continuación, se usa una escala de tiempo mucho más corta (siete días en lugar de seis semanas) y la tau de PHF que se utiliza se aisló de un cerebro humano con EA. La tau que se encuentra en la fracción PHF también representa una etapa diferente de formación de ovillos. Por otra parte, el PHF aislado del cerebro con EA puede tener modificaciones postraduccionales adicionales que no están presentes en la tau endógena de los cortes. Es probable que las diferencias en la salud celular en el transcurso de los experimentos también estén influenciadas por el modelo de cultivo. En los cultivos primarios, las neuronas carecen del apoyo trófico proporcionado por las células gliales, que están presentes en los cortes de cerebro.

La absorción de anticuerpos en las neuronas se puede bloquear con un anticuerpo contra los receptores FcII/III o con dansil cadaverina, que bloquea la endocitosis mediada por receptores (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). En condiciones de coincubación, el bloqueo de la absorción de anticuerpos no tuvo ningún efecto sobre el resultado. Sin embargo, cuando se añadió el anticuerpo 4E6G7 24 horas después de la adición de PHF, el bloqueo de su absorción impidió sus efectos beneficiosos. Estos hallazgos confirman que en condiciones de coincubación, el anticuerpo está trabajando extracelularmente, pero cuando se añade 24 horas después de PHF, sus efectos son intracelulares.

Tanto el anticuerpo 4E6G7 como el anticuerpo 6B2G12 se incorporan a las neuronas de tauopatía en cultivos primarios y de cortes de cerebro, en los que colocalizan con agregados de tau en el sistema endosomal-lisosomal (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; 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). Por otra parte, el anticuerpo 6B2G12 y su derivado de fragmento variable de cadena única se pueden usar para obtener imágenes de lesiones tau *in vivo* y terminan en los mismos compartimentos neuronales después de la inyección periférica (Krishnaswamy, S. *et al.* (2014) "Antibody-Derived *in vivo* Imaging of Tau Pathology," *J. Neurosci.* 34(50): 16835-16850). Dicha absorción y colocalización no es en sí misma una indicación de eficacia, pero se ha demostrado que la prevención de la absorción neuronal del anticuerpo 4E6G7 bloquea la eliminación aguda de tau mediada por anticuerpos (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). Los datos del cultivo confirman dicha eliminación intracelular y, además, muestran la prevención de la neurotoxicidad por el anticuerpo 4E6G7 en un modelo de cultivo diferente, que es más relevante para la enfermedad humana ya que se utiliza material PHF derivado de EA. Por otra parte, en cultivos primarios tratados con PHF, el anticuerpo 6B2G12 fue ineficaz en varias condiciones experimentales utilizando múltiples medidas de resultado. En conjunto, por lo tanto, se encuentra que el anticuerpo 4E6G7 es más adecuado como un anticuerpo terapéutico dirigido a especies tau solubles y el anticuerpo 6B2G12, o idealmente sus derivados más pequeños con mejor acceso al objetivo, más útil como sonda de imagen para lesiones de tau insoluble.

Específicamente, el modelo de cultivo *ex-vivo* muestra que el anticuerpo 4E6G7, un anticuerpo monoclonal tau dirigido a la región de la fosfoserina 396/404 evitó la toxicidad y redujo los niveles de tau inducidos por la adición de material PHF derivado del cerebro de la enfermedad de Alzheimer. Notablemente, otro anticuerpo tau monoclonal, el anticuerpo 6B2G12, que tiene una afinidad sustancialmente mayor por el inmunógeno del péptido tau y la tau de PHF agregada

que el anticuerpo 4E6G7, fue ineficaz en estas condiciones experimentales. Análisis posteriores revelaron que el anticuerpo 4E6G7 tenía mayor afinidad que el anticuerpo 6B2G12 por el PHF solubilizado que se usó para promover la toxicidad en neuronas cultivadas. Esto probablemente explica la eficacia del primer anticuerpo y la falta del mismo para el segundo. Estos hallazgos tienen implicaciones importantes para el desarrollo de inmunoterapias pasivas de tau. La eficacia no se puede predecir por la afinidad al inmunógeno solo o a la tau agregada, pero tiene que determinarse en modelos biológicos de patología tau. Combinado con datos de imágenes, estos resultados proporcionan información sobre cómo se relacionan la afinidad y la eficacia.

Otros estudios de inmunoterapia tau informaron diferencias de eficacia entre anticuerpos que reconocen epítomos de diferentes secuencias de tau y un estudio entre diferentes isotipos de dos anticuerpos de afinidad similar contra el mismo epítopo (para una revisión, véase Pedersen, J.T. *et al.* (2015) "Tau Immunotherapy for Alzheimer's Disease," Trends Mol. Med. 21(6):394-402). El anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 son del mismo isotipo, IgG1, y los hallazgos presentados en el presente documento muestran por primera vez que una diferencia sutil en el reconocimiento de epítomos puede afectar profundamente a la eficacia. Notablemente, tales hallazgos confirman y proporcionan una visión mecánica de estas diferencias in vivo en un modelo de cultivo neuronal *ex vivo* relevante de la enfermedad, en el que la patología tau se promueve con PHF derivado del cerebro de Alzheimer en neuronas primarias que expresan la mutación tau familiar. Por tanto, las eficacias contrastantes se observan consistentemente en diferentes modelos con o sin mutación tau y pueden tener importantes implicaciones terapéuticas para las tauopatías tanto familiares como esporádicas. Los modelos empleados tienen una sólida validez de construcción y apariencia, ya que se basan en una racionalidad teórica sólida, ya que la tau humana normal o familiar (mutada) se expresa, y tienen las características clave asociadas con las tauopatías, a saber, agregación de tau, toxicidad y alteraciones cognitivas asociadas en los animales. El modelo de cultivo de PHF humano tiene una fuerte validez predictiva para el resultado en el modelo animal.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Materiales - El anticuerpo policlonal de conejo Pan-Tau correspondiente a los restos 243-441 se adquirió en Dako (Carpinteria, CA). El anticuerpo policlonal de conejo específico para ³²P-Ser199 Tau se adquirió en Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX).

Ratones - Se recolectaron crías de ratón de la línea de ratones JNPL3 el día cero posnatal para cultivos primarios. Estos animales expresan la isoforma Tau humana 0N4R que contiene la mutación P301L de origen natural, además de la Tau de ratón nativa (Lewis, J., *et al.* (2000) "Neurofibrillary Tangles, Amyotrophy And Progressive Motor Disturbance In Mice Expressing Mutant (P301L) Tau Protein," Nature Genetics 25(4):402-405). Para experimentos que examinan la propagación de Tau entre poblaciones celulares, también se usaron cachorros de tipo salvaje ("**SV**") de la misma cepa que los animales transgénicos.

Aislamiento de material de filamento helicoidal apareado (PHF) - PHF-Tau se extrajo del cerebro de un paciente humano con EA. El tejido se homogeneizó en tampón (1 ml/g de tejido) que contenía NaCl 0,75 M, EGTA 1 mM, MgSO₄ 0,5 mM, ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico 100 mM y cóctel de inhibidores de proteasa de Roche. A continuación, las muestras se centrifugaron a 11.000 g durante 20 minutos a 4 °C y se descartó el sedimento. El sobrenadante restante se volvió a centrifugar a 100.000 g durante 60 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió en tampón de extracción PHF (Tris 10 mM, sacarosa al 10 %, NaCl 0,85 M y EGTA 1 mM, pH 7,4) y se centrifugó a 15.000 g durante 20 minutos a 4 °C. Se repitió esta misma resuspensión y centrifugación, y el sedimento final se disolvió en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) y se dializó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 6 horas.

Marcado fluorescente - El anticuerpo 4E6G7 y el material PHF de origen humano se marcaron con los kits de marcaje Alexa Fluor 488 y 647, respectivamente. El anticuerpo o PHF se incubó con colorante reactivo con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Según las instrucciones, se preparó la columna de elución y se añadió la mezcla colorante/sustrato. Se recogió el material y se verificó el marcaje.

Cultivos neuronales primarios - Los cultivos neuronales primarios se prepararon como se describe en 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(49):35452-35465. Brevemente, las placas se recubrieron con poli-L-lisina durante 3 horas antes de la adición de las células. Se recogieron cerebros de crías de ratón el día cero posnatal y se descartó el tronco encefálico. Se extrajeron las meninges de la corteza y el hipocampo. El tejido se cortó en trozos grandes y se lavó cinco veces en HBSS+++ (solución salina equilibrada de Hank, 10 ml de HEPES 1 M, 5 ml de penicilina/estreptomicina, 10 ml de piruvato de sodio 100 mM). Después del lavado, el tejido se incubó durante 20 minutos con 200 µl de tripsina al 0,5 %. La tripsina se neutralizó con 5 ml de medio de siembra en placas (medio de Eagle mínimo, 15 ml de glutaMAX, 50 ml de SFB, 4 ml de suplemento B27, 2,5 ml de penicilina/estreptomicina), y se lavó tres veces más en HBSS+++ . Después de esto, las células se disociaron manualmente y se centrifugaron durante 1 minuto a 0,5 x g. A continuación, las células

se resuspendieron en medios de placas y se distribuyeron uniformemente entre los pocillos. Después de 24 horas de cultivo, se eliminó el medio de siembra en placas y se añadió medio Neuronal (Neurobasal A, 1 ml de B27, 17 µl de medio basal Eagle). Se utilizó el mismo procedimiento para cultivos desarrollados en cámaras microfluídicas. Las células de los ratones JNPL3 se colocaron en placas en un lado del dispositivo de aislamiento de axones. Las células se dejaron incubar durante 72 horas. Después de este período, se recogieron los cerebros de los animales SV y las células se sembraron en placas en el lado opuesto.

Ensayos de LDH - Se recogieron medios de todos los grupos de tratamiento después de siete días de cultivo. Se determinaron los niveles de LDH (lactato deshidrogenasa) en los medios utilizando un kit de detección de citotoxicidad de Roche. Los valores obtenidos de las muestras tratadas se compararon con los valores obtenidos de los medios recogidos el día cero para determinar el alcance de la toxicidad. También se recogieron medios de un conjunto de células no tratadas para examinar los cambios normales en la salud celular durante el período de cultivo. Las muestras tratadas, los controles y los blancos se añadieron a una placa de 96 pocillos y los reactivos de detección se añadieron según las instrucciones. Las placas se incubaron durante 20 minutos a 37 °C y se leyeron con un lector de placas BioTek Synergy 2.

Cámaras microfluídicas y difusión de tau - Las células se recogieron y se sembraron en placas como se ha descrito anteriormente. Después de la adición de las células SV, se les dio a los cultivos una semana en cultivo para estabilizarlos. Se utilizaron los mismos tres métodos de tratamiento. Se añadieron PHF y anticuerpo 4E6G7 (1 µg/ml cada uno) a la cámara que contenía células JNPL3, mientras que la cámara opuesta que contenía células SV no se trató. Como control negativo, un grupo de células se incubó con 1 µg/ml del material PHF y 50 nM de toxina botulínica. La toxina se eligió debido a su capacidad para evitar la fusión de la membrana y la liberación de vesículas unidas a la membrana y, por lo tanto, evitar la liberación de PHF-Tau en la cámara opuesta. En cultivos neuronales, también se ha demostrado que la toxina botulínica previene la propagación de la huntingtina mutante al bloquear la liberación de vesículas sinápticas (Pecho-Vrieseling, E., *et al.* (2014) "Transneuronal Propagation Of Mutant Huntingtin Contributes To Non-Cell Autonomous Pathology In Neurons," *Nat. Neurosci.* 17(8): 1064-1072). En todos los grupos, después del tratamiento final, las células se mantuvieron en cultivo durante 72 horas más. A continuación, se fijaron los cubreobjetos y las muestras se tiñeron para detectar anticuerpos que reconocieran Tau total. Se determinó el porcentaje de células en la cámara contralateral que contenían material PHF marcado para cada grupo de tratamiento.

Inmunohistoquímica - Se eliminó el medio y las células se lavaron tres veces en PBS. Los cubreobjetos se fijaron en formaldehído al 4 % que contenía sacarosa al 0,5 % durante 20 minutos a 37 °C. Las células se permeabilizaron y bloquearon usando PBS que contenía 3 % Pecho-Vrieseling, E., *et al.*, Transneuronal propagation of mutant huntingtin contributes to non-cell autonomous pathology in neurons. *Nat Neurosci.* 2014. 17(8): pag. 1064-72. BSA y saponina al 0,1 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución de 1:200 durante 1 hora, después de lo cual las células se lavaron tres veces con PBS durante cinco minutos por lavado. El anticuerpo secundario se aplicó a una dilución de 1:400 durante 30 minutos y las células se lavaron tres veces más antes de montar los cubreobjetos utilizando medio de montaje Dako Fluorescent. Las imágenes se recopilaron con un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti y se procesaron con Image J.

Inmunotransferencia - Las células se lavaron tres veces en PBS y luego se lisaron en tampón RIPA modificado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 µg/ml de mezcla completa de inhibidores de proteasa (Roche Applied Science)). Las muestras se sometieron a ultrasonidos brevemente y el volumen se ajustó para la concentración de proteína total. Se añadió tampón de carga (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 5 % de glicerol, 2-mercaptoetanol, SDS al 2,3 %, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 µg/ml de inhibidor de proteasa completo de Roche Applied Science) y las muestras se hirvieron durante 5 minutos. Todas las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 %, luego se transfirieron a 100 V durante 1 hora. Las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TBST) que contenía un 5 % de leche desgrasada durante 30 minutos, después de lo cual se incubaron en anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Las transferencias se lavaron y se incubaron con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 1 hora. Las bandas se visualizaron usando un Fuji LAS-4000 y la señal quimioluminiscente se cuantificó usando Multigauge.

Ejemplo 2

Aislamiento de fragmentos de scFv del anticuerpo 4E6G7

Las moléculas scFv pueden generarse a partir del anticuerpo 4E6G7 del clon del hibridoma (generado contra el inmunógeno preferido que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:8**: TDHGAEIVYK^(p)SPVVS^(p)SGDT^(p)SPRHL) (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; 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, el anticuerpo 4E6G7 de la línea celular de hibridoma se puede cultivar a 37 °C con 5 % de CO₂ en medio RPMI que contenía estreptomycin (50 µg/ml) y Penicilina G (50 U/ml), y su ARNm aislado y purificado según el protocolo de un kit de aislamiento de ARN (Promega), y posteriormente almacenado a -80 °C. La primera cadena de ADNc puede construirse según el protocolo de un kit de síntesis de primera cadena de ADNc (kit Takara (TAK6115A)).

Luego, los clones pueden examinarse por su capacidad para expresar moléculas de scFv que son inmuno-específicas para el epítipo ^(P)Ser404 usando péptidos (Keck Foundation, Yale University) que tienen las secuencias de Tau 379-408 (^(P)Ser396/^(P)Ser404) (**SEQ ID NO: 30**):

5 RENAKAKTDH GAEIVYK^(P)SPV VSGDT^(P)SPRHL
y Tau 379-408 (Ser396/Ser404) (**SEQ ID NO:31**):

RENAKAKTDH GAEIVYK^(P)SPV VSGDTSPRHL

Estos péptidos también se pueden usar para *panning*, ELISA y en Biacore para estudios de unión.

10 Ejemplo 3

Anticuerpo 4E6G7:

Prevención mediada por anticuerpos tau de siembra de patología tau y toxicidad asociada

15 La patología tau se propaga entre las neuronas en cultivo *in vivo* y puede ser el objetivo de anticuerpos tanto intracelular como extracelularmente. La capacidad del anticuerpo 4E6G7, que se une inmuno-específicamente al epítipo ^(P)Ser404, para prevenir la toxicidad y la propagación de la patología Tau mediada por la preparación de filamentos helicoidales apareados (PHF) de un sujeto con Alzheimer. Con este fin, los cultivos neuronales primarios de JNPL3 (P301L) se prepararon como se describe y se dejaron recuperar en el cultivo durante una semana antes del tratamiento. Las células se incubaron con 1 o 10 µg/ml del material de PHF de origen humano, con células y medios de cultivo recogidos a los 1, 2, 3, 5 y 7 días. Los cultivos de control se trataron durante siete días con PHF solo (1 o 10 µg/ml) (células tratadas con "PHF solo"). Para cultivos tratados con una combinación de PHF (1 o 10 µg/ml) y anticuerpo 4E6G7 (10 µg/ml), se utilizaron tres estrategias de tratamiento diferentes. En la primera, se añadió material de PHF y se dejó incubarlo con los cultivos durante 24 horas. Después de este período, las células se lavaron con medio Neuronal y se añadió medio fresco que contenía 1 µg/ml de anticuerpo 4E6G7 (células tratadas con "anticuerpo PHF --?"). En la segunda, el material PHF y el anticuerpo 4E6G7 se añadieron al medio de cultivo simultáneamente (células tratadas con "Anticuerpo + PHF"). La tercera estrategia de dosificación es la inversa de la primera, se añadió anticuerpo 4E6G7 24 horas antes de PHF (células tratadas con "anticuerpo → PHF"). Como control, se usó IgG de ratón no específica en lugar del anticuerpo Tau. En experimentos con dansilcadaverina (DC), se emplearon los mismos métodos con 1 µg/ml de DC añadida junto con el anticuerpo.

La Figura 1, Los Paneles AB muestran el efecto del anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) e IgG1 control (**Panel B**) sobre la toxicidad celular mediada por 10 µg/ml de PHF determinada por la liberación de LDH. Como se muestra en la Figura 1, **Panel A**, en las células tratadas con 10 µg/ml de PHF, La señal de LDH promedió un 67 % por encima de la de los controles no tratados ($p = 0,001$). El anticuerpo 4E6G7 (1 µg/ml) en los paradigmas PHF + Anticuerpo y PHF → Anticuerpo redujo significativamente la LDH en comparación con PHF solo (11 % por encima del control $p = 0,02$ y 15 % por encima del control $p = 0,03$) y fue comparable a las muestras no tratadas, indicando que el anticuerpo puede prevenir la toxicidad. Sin embargo, el Anticuerpo → PHF no fue eficaz para reducir la señal de LDH (53 % por encima del control, $p = 0,009$) y no mostró una mejora significativa con respecto a las muestras de PHF solo a la concentración de 1 µg/ml analizada. Como se muestra en la Figura 1, **Panel B**, la IgG1 tampoco fue eficaz para prevenir el aumento de los niveles de LDH provocado por la adición de PHF. La LDH en los grupos de PHF + anticuerpo, PHF → Anticuerpo y Anticuerpo → PHF aumentó hasta un 80, 43 y 61 % por encima de los valores de control ($p = 0,004$, 0,03 y 0,01, respectivamente). Ninguno de los grupos fue significativamente diferente de PHF solo. (* $p = 0,05$).

La Figura 2, Los Paneles AB muestran el efecto del anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) e IgG1 control (**Panel B**) sobre la toxicidad celular mediada por 1 µg/ml de PHF determinada por la liberación de LDH. Como se muestra en la Figura 2, **Panel A**, la incubación con 1 µg/ml de PHF aumentó la señal de LDH en un 35 % en relación con las células de control no tratadas ($p = 0,04$). El anticuerpo monoclonal tau 4E6G7 en las condiciones de PHF + anticuerpo o PHF → anticuerpo redujo significativamente la LDH en comparación con las muestras de PHF solo ($p = 0,04$ y 0,03, respectivamente) y no difirió significativamente de las células no tratadas. El grupo Anticuerpo → PHF no mostró LDH reducida en comparación con las neuronas que recibieron solo PHF (11 % por encima del control). Como se muestra en la Figura 2, **Panel B**, a la dosis de 1 µg/ml de PHF, las muestras tratadas con IgG1 no mostraron niveles de LDH significativamente más altos que las células de control, indicando que puede ofrecer alguna protección no específica (PHF + Anticuerpo, PHF-), los grupos de anticuerpo y anticuerpo → PHF estaban un 6 % por encima del control, igual al control y 67 % por encima del control, respectivamente). Sin embargo, las muestras de IgG1 tampoco fueron significativamente diferentes de las muestras de PHF solo. (* $p = 0,05$) confirmando de nuevo la especificidad del efecto del anticuerpo 4E6G7 para prevenir la toxicidad por PHF.

La toxicidad se examinó además mediante inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce el marcador neuronal NeuN. NeuN es una proteína nuclear específica de neuronas observada en la mayoría de los tipos de células neuronales en todo el sistema nervioso de ratones adultos (Mullen, R.J. *et al.* (1992) "NeuN, A Neuronal Specific Nuclear Protein In Vertebrates," Development 116(1):201-211). La proteína sirve como marcador neuronal en el diagnóstico diferencial de las neoplasias de células claras del sistema nervioso central (Soylemezoglu, F. *et al.* (2003) "Neuronal Nuclear Antigen (NeuN): A New Tool In The Diagnosis Of Central Neurocytoma," Pathol. Res. Pract. 199(7):463-468).

Quando se incubaba en presencia de 10 µg/ml de PHF, la señal de NeuN disminuyó constantemente y se redujo un 94 % en relación con las muestras de control no tratadas el día 7 (**Figura 3, Paneles AB**). Como fue el caso con las muestras de LDH, los paradigmas PHF + Anticuerpo y PHF → Anticuerpo dieron como resultado niveles de NeuN significativamente más altos que los de las muestras incubadas con PHF solo (las muestras estaban un 16 % y un 24 % por encima del control no tratado el día 7, $p = 0,000003$ y $0,00002$). También como anteriormente, el método de dosificación de Anticuerpo → PHF no fue eficaz para prevenir la pérdida de NeuN durante el período de tratamiento (93 % de pérdida, $p = 0,0008$ en relación con el control) y no mostró ninguna mejora con respecto a las muestras de PHF solo (**Figura 3, Panel C**). Al igual que en el ensayo de LDH, la IgG1 no tuvo efecto sobre la toxicidad inducida por PHF.

Se incubaron grupos adicionales de neuronas con 1 µg/ml de PHF y 1 µg/ml de anticuerpo 4E6G7 o IgG de control. (**Figura 4, Paneles A-B**). Se observó una pérdida del 30 % de la señal de NeuN en relación con las células de control no tratadas en el grupo de PHF solo ($p = 0,03$) después de siete días de cultivo. (**Panel C**). Como en los experimentos de 10 µg/ml, los grupos de PHF + Anticuerpo y PHF → Anticuerpo mostraron eficacia en la prevención de la pérdida de NeuN y el día 7 fueron comparables a los controles no tratados y significativamente más altos que las muestras de PHF solo ($p = 0,03$). El grupo Anticuerpo → PHF también mostró una disminución en los niveles de NeuN (disminución del 36 % en relación con el control no tratado) comparable a la de las neuronas incubadas con muestras de PHF solo, lo que confirma la ineficacia de este enfoque a la dosis empleada. Como en las muestras de dosis más altas de PHF, la IgG1 de ratón de control fue ineficaz para prevenir la toxicidad en cualquiera de las condiciones de dosificación y no difirió significativamente de los resultados observados con PHF solo.

Estos datos muestran que los anticuerpos Tau pueden ser eficaces para mediar en la toxicidad provocada por la exposición a agregados de Tau mal plegados. El anticuerpo 4E6G7 evitó la toxicidad y solo en ciertas condiciones. Cuando se agrega el anticuerpo 4E6G7 antes de PHF, es posible que el nivel relativamente bajo de Tau nativo de las neuronas no proporcione objetivos suficientes para promover la retención del anticuerpo necesario para proteger completamente las células.

Ejemplo 4

Anticuerpo 4E6G7:

Prevención de cambios en los niveles de Tau mediada por anticuerpos Tau

Además de las medidas de toxicidad, también se investigó el efecto de los tratamientos con PHF y anticuerpos sobre los niveles de Tau. A la concentración de 10 µg/ml, los niveles totales de Tau en el grupo de PHF solo mostraron una disminución inicial seguida de una recuperación (**Figura 5, Paneles A-D**). Sin embargo, el día 7, los niveles totales de Tau se redujeron significativamente en relación con las células de control (una disminución del 29 %, $p = 0,002$) (**Panel C**). Sin embargo, los grupos de anticuerpo 4E6G7 PHF + Anticuerpo y PHF → anticuerpo tienen niveles de Tau significativamente más altos (48 % y 51 % por encima del control) que las células incubadas con PHF solo (**Panel C**). Nuevamente, el grupo de Anticuerpo → PHF y los grupos de IgG1 fueron ineficaces en la prevención de cambios en los niveles de Tau en comparación con las células de PHF solo.

Quando estos resultados se normalizan para los niveles de NeuN, se observa que las células restantes en el grupo PHF tienen significativamente más Tau que las células de control (aumento de 5,6 veces, $p = 0,0005$ y $0,04$) (**Figura 5, Panel D**). En los grupos de PHF + Anticuerpo y PHF → Anticuerpo, los niveles ajustados de Tau son comparables al control y significativamente más bajos que para las células que habían recibido PHF solo ($p = 0,01$ y $0,001$ respectivamente). Los resultados de las células tratadas con IgG1 de control no diferían significativamente de los de las células que habían recibido PHF solo. El control de NeuN no alteró el patrón de resultados para dichas células de control.

A la dosis de 1 µg/ml, los niveles aumentados de Tau eran evidentes incluso antes de la normalización con los niveles de NeuN (**Figura 6, Paneles A-D**). La **Figura 6**, Los **Paneles A-D** muestran que PHF a 1 mg/ml puede promover aumentos en Tau intracelular y el anticuerpo 4E6G7 puede prevenir estos efectos. Los **Paneles A-B** muestran inmunotransferencias para muestras expuestas a PHF solo, PHF + anticuerpo, PHF → Anticuerpo y Anticuerpo → PHF para el anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) o IgG de control (**Panel B**), sondado con un anticuerpo policlonal pan-Tau. El **Panel C** muestra una cuantificación de los niveles totales de Tau. A 1 µg/ml, el PHF promueve aumentos significativos en Tau intracelular (95 % por encima del control, $p = 0,001$). Para el anticuerpo 4E6G7, el PHF + Anticuerpo y PHF → el anticuerpo fueron significativamente más bajos que las muestras de PHF solo ($p = 0,001$ para ambas). Las células tratadas con Anticuerpo → PHF no se redujeron en relación con las células que habían sido tratadas con PHF solo. El ajuste para los niveles de NeuN, de nuevo, el tratamiento con PHF solo aumentó significativamente la Tau intracelular en relación con las células de control (aumento de 1,6 veces, $p = 0,02$). Para el anticuerpo 4E6G7, las células tratadas con PHF + Anticuerpo y PHF → Anticuerpo, pero no las células tratadas con Anticuerpo → PHF, exhibieron niveles de Tau corregidos significativamente más bajos en comparación con los grupos de PHF solos ($p = 0,03$ para ambos) y no difirieron de los controles no tratados (**Panel D**). La IgG1 no evita aumentos significativos en Tau total después de la exposición a PHF con o sin control de los niveles de NeuN.

Además de los niveles totales de Tau, se investigaron los niveles de Tau fosforilados en ^(P)Ser199. La fosforilación de Tau en la serina 199 (^(P)Ser199) parece estar implicada en la enfermedad de Alzheimer y otras afecciones neurológicas (Biernat, J. *et al.* (1992) "The Switch Of Tau Protein To An Alzheimer-Like State Includes The Phosphorylation Of Two Serine-Proline Motifs Upstream Of The Microtubule Binding Region," *EMBO J.* 11(4):1593-1597; Takamatsu, J. (1998) "Selective Expression Of Ser 199/202 Phosphorylated Tau In A Case Of Frontotemporal Dementia," *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9(2):82-89; Itoh, N. *et al.* (2001) "Large-Scale, Multicenter Study Of Cerebrospinal Fluid Tau Protein Phosphorylated At Serine 199 For The Antemortem Diagnosis Of Alzheimer's Disease," *Ann. Neurol.* 50(2):150-156; Maurage, C.A. *et al.* (2003) "Phosphorylated Serine 199 Of Microtubule-Associated Protein Tau Is A Neuronal Epitope Abundantly Expressed In Youth And An Early Marker Of Tau Pathology," *Acta Neuropathol.* 105(2):89-97; Hampel, H. *et al.* (2004) "Measurement Of Phosphorylated Tau Epitopes In The Differential Diagnosis Of Alzheimer Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study," *Arch. Gen. Psychiatry* 61(1):95-102; Morioka, M. *et al.* (2006) "Hyperphosphorylation At Serine 199/202 Of Tau Factor In The Gerbil Hippocampus After Transient Forebrain Ischemia," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347(1):273-278; Loeffler, D.A. *et al.* (2015) "Effects Of Antibodies To Phosphorylated And Non-Phosphorylated Tau On *In Vitro* Tau Phosphorylation At Serine-199: Preliminary Report," *Exp. Gerontol.* 67:15-18). Así pues, los anticuerpos (tales como el anticuerpo AT8) que se unen a ^(P)Ser199 se pueden utilizar para evaluar la presencia de la enfermedad de Alzheimer.

En las condiciones de 10 µg/ml de PHF, las muestras tratadas con PHF solo y las muestras tratadas con anticuerpo → PHF habían reducido significativamente los niveles de fosfo-Tau en relación con las células no tratadas (reducción del 34 %, 7 % y 54 %, $p = 0,00004$, 0,01 y 0,01, **Figura 7**). Sin embargo, tanto el grupo de tratamiento con PHF + Anticuerpo como PHF → Anticuerpo tenían niveles de fosfo-Tau significativamente más altos que el grupo de PHF solo ($p = 0,00001$ y 0,00007). Ninguno de los grupos de dosificación de IgG1 difirió significativamente del PHF solo.

Corrigiendo por los niveles de NeuN, las muestras de PHF solo mostraron niveles más altos de ^(P)Ser199 Tau (un aumento por 4,1 veces, $p = 0,00004$). Los niveles de fosfo-tau en las células tratadas con PHF + anticuerpo y PHF → ? anticuerpo fueron significativamente más bajas que los de las células que habían sido tratadas con PHF solo ($p = 0,000001$ y 0,000007), y comparables a los controles no tratados. Al igual que con los valores no corregidos, los resultados de las células que se trataron adicionalmente con IgG1 de control no difirieron de los de las células que recibieron PHF solo, tampoco lo hizo el grupo tratado con Anticuerpo → PHF.

Las células que se habían incubado solo con PHF en las condiciones de dosificación de 1 µg/ml tenían niveles de fosfo-Tau significativamente más altos que las células de control no tratadas (65 % por encima del control, $p = 0,001$, **La Figura 8, Paneles A-D**). La **Figura 8, Paneles A-D**, muestran que niveles más bajos de PHF (1 µg/ml) también pueden inducir un aumento en los niveles de Tau fosforilada y que dichos aumentos pueden prevenirse mediante el anticuerpo 4E6G7. Los **Paneles AB** muestran inmunotransferencias de células expuestas a PHF solo o a PHF en combinación con el anticuerpo 4E6G7 (**Panel A**) o IgG1 de control (**Panel B**), probado con un anticuerpo policlonal que reconoce ^(P)Ser199 fosfo-Tau. El **Panel C** cuantifica los niveles de ^(P)Ser199 fosfo-Tau en relación con las células no tratadas. El **Panel D** normaliza los resultados a los niveles de NeuN.

En células tratadas con 1 µg/ml de PHF y anticuerpo 4E6G7, el anticuerpo fue efectivo en la prevención de cambios patológicos inducidos por PHF en condiciones de dosificación de PHF + Anticuerpo y PHF → ? anticuerpo. Ambos grupos tenían niveles de fosfo-Tau significativamente más bajos que PHF solo ($p = 0,01$ y 0,006) a niveles comparables a los controles no tratados. Sin embargo, en las condiciones de dosificación Anticuerpo → PHF, el anticuerpo 4E6G7 fue ineficaz para reducir los niveles de fosfo-tau. Ninguno de los grupos de IgG difirió en comparación con las muestras de PHF solo. Controlando con los niveles de NeuN, estas diferencias permanecieron. Los niveles de fosfo-Tau en las muestras de PHF solo fueron 1,5 veces más altos que los de las células de control no tratadas ($p = 0,01$). De los paradigmas de dosificación de 4E6G7, los grupos de PHF + Ac y PHF → Ac tenían niveles de tau comparables a los de los controles no tratados y significativamente más bajos que los observados en las muestras de PHF solo ($p = 0,03$ para ambos). Como anteriormente, ninguno de los grupos de IgG1 difería de las muestras de PHF solo.

Ejemplo 5

El anticuerpo 4E6G7 puede reducir la propagación de tau patológica entre poblaciones celulares

Con el fin de evaluar si el tratamiento con el anticuerpo 4E6G7 podría retardar la propagación de Tau patológica entre las células, se sembraron en placas neuronas JNPL3 y SV en placas en lados opuestos de cámaras de aislamiento de axones microfluídicos. **La Figura 9, El Panel A** muestra un esquema de las cámaras microfluídicas, mostrando los depósitos que reciben las células muestreadas. **La Figura 9, Panel B** es un esquema ampliado del recuadro central en el **Panel A**, que muestra los microsurcos que conectan los dos depósitos. Para asegurar que los axones de las células JNPL3, pero no los de las células SV, atravesaban los microsurcos, las neuronas de ratones JNPL3 se sembraron en placas 72 horas antes que las neuronas SV. Una vez estabilizados los cultivos celulares, se añadió 1 µg/ml de material PHF marcado con fluorescencia a la cámara que contenía las neuronas JNPL3. Se prepararon cultivos adicionales de la misma manera y se trataron con una combinación de PHF y el anticuerpo 4E6G7 utilizando las estrategias de dosificación de PHF + anticuerpo, PHF → Anticuerpo y Anticuerpo → PHF descritas anteriormente. Como control negativo, se incubó un conjunto adicional de células con PHF y toxina botulínica A 50 nM. Esta toxina descompone SNAP-25/23, un componente de la transmisión sináptica y la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB)

con la membrana plasmática. Setenta y dos horas después, los cubreobjetos se fijaron y tiñeron como se ha descrito anteriormente con un anticuerpo que reconoce Tau total y se determinó el número de células SV que contenían material PHF marcado ($n = 969$ células contadas). **La Figura 9, El Panel C** es una imagen confocal que muestra los axones (marcados con flechas) que crecen a través de los microsuros. La célula se tiñe con un anticuerpo pan-Tau.

La Figura 9, Los Paneles D-F muestran material PHF marcado con fluorescencia ($1 \mu\text{g/ml}$) que se añadió a una cámara del dispositivo de microfluidos que contiene células JNPL3. **La Figura 9, El Panel D** muestra la ubicación de la proteína Tau. **La Figura 9, El Panel E** muestra la ubicación de PHF. **La Figura 9, Panel F** es una imagen fusionada que muestra tanto la ubicación de la proteína Tau como la ubicación de PHF.

En los cultivos tratados con PHF solo, el $24 \pm 3 \%$ de las células contenía material de PHF marcado con fluorescencia. Cuando se añadió 50 nM de toxina botulínica a cultivos tratados con PHF, esto se redujo a $4 \pm 0,2 \%$ ($p = 0,0004$), lo que indica que el PHF en las células SV llega allí a través de la liberación sináptica. Los grupos de tratamiento con PHF + anticuerpo y PHF \rightarrow anticuerpo también exhibieron números reducidos de células positivas para PHF ($15 \pm 2 \%$ ($p = 0,01$) y $18 \pm 4 \%$ ($p = 0,05$), respectivamente). Sin embargo, como se esperaba conforme a otros resultados, no hubo cambios significativos en el porcentaje de células positivas para PHF en condiciones de Anticuerpo \rightarrow PHF (**Figura 9, Panel G**).

Ejemplo 6

Influencia del método de dosificación en el patrón de PHF y unión de anticuerpos

Se utilizó material de PHF marcado con fluorescencia y el anticuerpo 4E6G7 para examinar si el método de tratamiento utilizado afectaba el patrón de unión de PHF y anticuerpo. Las neuronas primarias se incubaron con $10 \mu\text{g/ml}$ de PHF o $1 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 4E6G7 de la siguiente manera: El PHF solo, PHF + anticuerpo, PHF \rightarrow Anticuerpo o Anticuerpo \rightarrow PHF, como se ha descrito anteriormente. Las imágenes confocales se recogieron 24 horas después de haber aplicado el último tratamiento. Todos los cubreobjetos se tiñeron con anticuerpo policlonal pan-Tau de Dako. Se descubrió que PHF se absorbía fácilmente en las neuronas y se podía ver en todas las células después de 24 horas en cultivo. (**Figura 10, Paneles AD**). En células del régimen de tratamiento PHF \rightarrow Anticuerpo, se pudo observar la absorción y amplia distribución intracelular del material de PHF. En este régimen de dosificación, el anticuerpo 4E6G7 también se internalizó y co-localizó con el PHF añadido previamente (**Figura 10, Paneles E-H**). Sin embargo, se observó un patrón diferente en el grupo de PHF + Ac. En estas condiciones, el PHF y el anticuerpo 4E6G7 también se observaron colocalizados, pero los complejos PHF-anticuerpo eran extracelulares (**Figura 10, Paneles I-L**). Estos resultados indican que, aunque estos dos métodos de dosificación son efectivos para reducir los cambios patológicos asociados con la adición de PHF, el mecanismo de acción difiere.

Para investigar más a fondo si el momento y el orden relativo de la administración de anticuerpos y PHF afectan al mecanismo de acción, se sembró en placas un grupo adicional de células y se dosificó como se ha descrito anteriormente. Se añadieron $10 \mu\text{g/ml}$ de PHF a las neuronas JNPL3, con 4E6G7 añadido al mismo tiempo o 24 horas después. En cultivos adicionales también se añadió $1 \mu\text{g/ml}$ de dansilcadaverina (DC), un inhibidor de la endocitosis mediada por clatrina (Congdon, E.E. *et al.* (2013) "Antibody Uptake Into Neurons Occurs Primarily Via Clathrin-Dependent Fcgamma Receptor Endocytosis And Is A Prerequisite For Acute Tau Protein Clearance," J. Biol. Chem. 288(49):35452-35465) junto con 4E6G7 para determinar si la internalización del anticuerpo es necesaria para que 4E6G7 ejerza sus efectos. Así pues, estos experimentos permiten confirmar si se requiere internalización para prevenir la patología inducida por PHF.

Cuando los niveles totales de Tau se examinaron mediante inmunotransferencia, no se observaron diferencias significativas entre las muestras incubadas con o sin DC en ninguna de las dos condiciones de dosificación. En las células que habían sido tratadas con el régimen de PHF + anticuerpo, la adición de DC no cambió los niveles de NeuN en relación con la proporción Tau/NeuN (**Figura 11, Panel A**) o el control. Sin embargo, cuando las células que habían sido tratadas con el régimen PHF \rightarrow Anticuerpo se incubaron con $1 \mu\text{g/ml}$ de DC, se observó una disminución significativa de NeuN (reducida al 32% del control en comparación con las células sin DC, $p = 0,00005$). Adicionalmente, la proporción de Tau/NeuN cambió significativamente en las células que habían sido tratadas con el régimen PHF \rightarrow Anticuerpo donde se había agregado DC ($1,18$ para células sin DC y $2,95$ para células tratadas con DC, $p = 0,008$; **La Figura 11, Panel B**). Estos resultados indican que, en condiciones en las que se añaden el anticuerpo 4E6G7 y el PHF, la internalización a través de los receptores Fc es innecesaria para que el anticuerpo evite los cambios patológicos inducidos por PHF. Por el contrario, una vez que el material PHF ha sido absorbido por las neuronas, la prevención de la internalización de anticuerpos bloqueó su eficacia en la prevención de la toxicidad por PHF.

Ejemplo 7

Prevención de la toxicidad y reducción de los niveles de tau por el anticuerpo 4E6G7 y sus fragmentos de unión a tau

Los datos muestran que el anticuerpo 4E6G7, un anticuerpo monoclonal de tau dirigido a la región ^(P)Ser396 y ^(P)Ser404 de la proteína Tau evitó la toxicidad y redujo los niveles de Tau inducidos por la adición de material PHF derivado del

paciente. Estos hallazgos respaldan el uso del anticuerpo 4E6G7 y sus fragmentos de unión a Tau, tal como un fragmento scFv del mismo, en inmunoterapias pasivas con Tau.

En solitario, la adición de 10 o 1 µg/ml de PHF indujo pérdida de células, medida usando ensayos de inmunotransferencia con LDH y NeuN, así como un aumento de Tau total y fosforilada en el resto de las neuronas. Se propaga entre poblaciones celulares, a través de la liberación y posterior absorción por otras neuronas. Para probar la eficacia del anticuerpo 4E6G7 se utilizaron tres métodos de dosificación diferentes, que diferían en el momento de la administración de Tau y de anticuerpo. Dos de estos métodos, la adición del PHF y el anticuerpo juntos, y la adición del anticuerpo 24 horas después del PHF evitó la toxicidad del PHF y la propagación de la siembra de Tau. Curiosamente, aunque igualmente eficaz, el mecanismo a través del cual se produce la protección fue diferente. Con coinubación, se formaron complejos extracelulares de PHF exógeno y anticuerpo 4E6G7 que neutralizaron el PHF e impidieron su absorción. Estos resultados respaldan la conclusión de que los anticuerpos pueden ser beneficiosos mientras trabajan en el espacio intersticial entre las células. En el cerebro vivo, estos complejos Tau-anticuerpo podrían a continuación ser absorbidos y eliminados por las células gliales. Cuando se añadió el anticuerpo 4E6G7 24 horas después de PHF, las dos moléculas se colocalizan intracelularmente. El anticuerpo 4E6G7 entra en el sistema endosomal/lisosomal y promueve la eliminación de Tau nativa, posiblemente promoviendo el desensamblaje de agregados (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(49):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; Krishnamurthy, P.K. *et al.* (2011) "Mechanistic Studies of Antibody-Mediated Clearance of Tau Aggregates Using an ex vivo Brain Slice Model," *Frontiers in Psychiatry*/Frontiers Research Foundation 2:59, páginas 1-6). Esta colocalización neuronal entre el anticuerpo, la diana y los marcadores endosómicos/lisosomales también se puede observar en estudios que usan inmunoterapia pasiva en modelos animales de la enfermedad de Parkinson. En conjunto, estos hallazgos explican la eficacia terapéutica del anticuerpo 4E6G7; es capaz tanto del bloqueo extracelular de la absorción de PHF como de su eliminación intracelular.

Por el contrario, la preincubación con el anticuerpo 4E6G7 fue significativamente menos efectiva tanto para reducir la toxicidad como para la siembra de la patología Tau en los regímenes de dosificación empleados. Una posible razón de esto es la falta relativa del epítipo objetivo en estas condiciones. Los niveles de anticuerpo 4E6G7 en las neuronas se correlacionan con la cantidad de Tau intracelular patológica. Cuando se añade primero el anticuerpo, para que sea efectivo debe ser retenido en la celda hasta la adición del PHF 24 horas después. Si, sin embargo, hay escasez del objetivo, el anticuerpo permanecerá sin unir y será más propenso a la degradación o al reciclaje fuera de la célula. Aunque el anticuerpo 4E6G7 fue ineficaz en estas condiciones, los resultados presentados anteriormente no indican que no se pueda emplear en la terapia profiláctica para la tauopatía, ya que los anticuerpos circulantes podrían prevenir el inicio de la enfermedad al eliminar los agregados de Tau en etapa temprana. Los anticuerpos exógenos tienen una semivida de una a tres semanas y se podrían usar dosis más bajas en individuos presintomáticos en riesgo.

Ejemplo 8

Estudio agudo y a largo plazo de la eficacia del anticuerpo 4E6G7 y sus fragmentos de unión a Tau

La eficacia terapéutica del anticuerpo 4E6G7 se evaluó utilizando dos modelos de ratón diferentes, en condiciones de tratamiento agudo y a largo plazo. Como se describe a continuación, este anticuerpo de afinidad bastante baja proporcionó beneficios cognitivos después del tratamiento agudo y a largo plazo, ambos se asociaron con la eliminación de la proteína Tau patológica. Se utilizaron dos modelos, ratones hTau y hTau/PS1: ratones hTau (Jackson Laboratories, número de inventario 004808; Andorfer, C. *et al.* (2003) "Hyperphosphorylation And Aggregation Of Tau In Mice Expressing Normal Human Tau Isoforms," J. Neurochem. 86:582-590), expresan proteína Tau humana no mutada en un fondo Tau murino nulo y desarrollan patología Tau y se forman ovillos con la edad. Este modelo se usó para evaluar los beneficios terapéuticos de la inmunoterapia pasiva aguda con el anticuerpo 4E6G7 en relación con los controles de IgG. Los ratones hTau/PS1 se obtuvieron cruzando ratones hTau con ratones que expresaban la mutación PS1 (M146L; Duff, K. *et al.* (1996) "Increased Amyloid-Beta 42(43) In Brains Of Mice Expressing Mutant Presenilin 1," *Nature* 383:710-713) y este cruce se mantuvo sobre un fondo defectivo en Tau murina. Este último modelo ha acelerado la patología Tau (Boutajangout, A. *et al.* (2010) "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline In A New Tangle Mouse Model," J. Neurosci. 30:16559-16566). Este modelo se utilizó para evaluar los beneficios de la inmunización pasiva a largo plazo con los mismos anticuerpos.

A. Metodología de evaluación conductual/cognitiva

Barra giratoria: Esta prueba se utiliza para medir la coordinación motora y el equilibrio de las extremidades anteriores y posteriores. Este procedimiento fue diseñado para evaluar el comportamiento motor sin una práctica de confusión. Primero se habituó a los ratones en cuatro ensayos para alcanzar un nivel basal de rendimiento el primer día y se probaron en cuatro ensayos de seguimiento al día siguiente con 15 minutos entre ensayos (SDI Rotor-Rod System de San Diego Instruments). Los animales se colocaron en la barra (3,6 cm de diámetro) con una velocidad inicial establecida en 1,5 rpm que luego se elevó cada 30 segundos en 0,5 rpm. Se colocó un cojín de espuma suave con una cubierta de plástico debajo de la barra para evitar que se produjeran daños. La barra se limpió con etanol al 70 %

y luego con agua después de cada sesión. Para evaluar el rendimiento, la velocidad de la barra se registró cuando el ratón se cayó o se dio la vuelta (aferrándose) desde la parte superior del cilindro giratorio.

Actividad locomotora: Los ratones fueron habituados primero en una cámara circular de actividad de campo abierto (55,8 cm de diámetro) en grupo/jaula durante 15 minutos y luego cada ratón se analizó individualmente durante 15 minutos en la misma cámara al día siguiente. Después de cada sesión, el campo se limpió con etanol al 70 % y luego con agua. Una cámara sobre la cámara registró automáticamente los movimientos horizontales en cada dimensión (es decir, x,y) midiendo el movimiento del animal (sistema de seguimiento de vídeo EthoVision de Noldus Information Technology). Los resultados se informan como la distancia recorrida (cm), el tiempo medio de reposo y la velocidad (promedio y máxima) del ratón.

Laberinto simétrico de campo cerrado (CFSM): Este aparato es un campo rectangular, cuadrado de 65 cm con paredes de 10 cm de alto dividido en cuadrados de 36 cm y cubierto por una cubierta de Plexiglas® transparente. Dos cajas, cada una de 16 x 23 x 10 cm, se fijaron al cuadrado en sus esquinas diagonales. El laberinto simétrico es una modificación de los tipos de pruebas Hebb-Williams y Rabinovitch-Rosvold (Pritchett, K. *et al.* (2004) "Hebb-Williams Mazes," *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 43(5):44-45; Meunier, M. *et al.* (1986) "The Hebb-Williams Test To Assess Recovery Of Learning After Limbic Lesions In Mice," *Physiol. Behav.* 37(6):909-913; Rabinovitch, M.S. *et al.* (1951) "A Closed-Field Intelligence Test For Rats," *Can. J. Psychol.* 5(3):122-128). Brevemente, la principal diferencia es que cada caja final funciona como caja de inicio y caja objetivo. Los ratones corren en direcciones opuestas en ensayos alternativos, eliminando así el manejo entre ensayos que debería minimizar el estrés. Las barreras se colocan en el campo en patrones simétricos, para que los ratones enfren los mismos giros en cualquier dirección dentro de un problema dado. El día 0, los ratones se adaptaron a un programa de restricción de agua (2 horas de acceso diario al agua) y se habituaron al mismo entorno que se usó para la prueba. El día 1, todos los ratones recibieron agua con sabor a sacarina, teñida con colorante alimentario verde durante 10 minutos en cada caja. El día 2, se colocaron en la caja de inicio y se les permitió explorar el campo y entrar en la caja objetivo donde disponían de recompensa agua con sabor a sacarina (0,05 ml). La puerta de cada caja se abrió y cerró manualmente para permitir la entrada y salida. Cuando los ratones corrían de manera fiable desde la caja de inicio hasta la caja objetivo, se les sometió a cuatro ensayos de práctica en la misma condición. El día 3, se les dio una sesión de práctica sobre un problema simple donde se colocaron dos barreras en diferentes posiciones simétricas en el campo para obstruir el acceso directo a la caja objetivo. Esta prueba de práctica se repitió durante 4 ensayos. El día 4, las pruebas formales consistieron en tres barreras clasificadas según la mayor dificultad (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.* (2006) "Vaccination Of Alzheimer's Model Mice With Abeta Derivative In Alum Adjuvant Reduces A β Burden Without Microhemorrhages," *Eur. J. Neurosci.* 24:2530-2542). Los ratones recibieron cinco ensayos con un intervalo entre ensayos de 2 minutos. El rendimiento fue puntuado manualmente por el mismo observador en términos de errores (es decir, entradas y reentradas en zonas de error designadas) y el tiempo para completar cada ensayo.

En el estudio agudo, a continuación los ratones se dividieron en un grupo de control y un grupo de tratamiento que tenían puntuaciones de prueba promedio similares y varianza de grupo, teniendo en cuenta también su desempeño en las pruebas sensoriomotoras. Los ratones se volvieron a evaluar sin período de práctica después del tratamiento.

Para el estudio a largo plazo, los ratones solo se probaron al final del período de tratamiento y pasaron por tres pruebas diferentes, con graduación de dificultad ((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.* (2006) "Vaccination Of Alzheimer's Model Mice With Abeta Derivative In Alum Adjuvant Reduces A β Burden Without Microhemorrhages," *Eur. J. Neurosci.* 24:2530-2542).

Laberinto de brazo radial: Esta prueba se realizó según lo descrito por Boutajangout, A. *et al.* (2012) "Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer's Disease And Related Disorders," *Methods Mol. Biol.* 849:529-540. Brevemente, el aparato es un laberinto radial elevado de 8 brazos construido con Plexiglas®. Cada brazo mide 35 cm de largo y 7 cm de ancho con una taza de agua (1 cm de diámetro) colocada al final de cada brazo. Las paredes laterales de 15 cm de alto se extienden 12 cm en cada brazo para evitar que los animales se crucen entre los brazos. El área central es un cubo de forma octogonal de 14 cm de diámetro. Las puertas de guillotina de Plexiglas® transparente, se accionaban a distancia mediante un sistema de poleas de control de acceso a los brazos. El laberinto está elevado 75 cm sobre el nivel del suelo y está situado en una habitación en la que varios objetos distintivos de una ubicación constante sirven como pistas de laberinto adicionales. Antes de las pruebas, los ratones se adaptaron durante 5 días. Durante este período, los ratones recibieron sacarina al 0,1 % en agua durante 1 hora al día y luego se adaptaron 16 horas más tarde para acceder a la solución de azúcar de una taza colocada al final de cada brazo. Los dos primeros días de adaptación se realizaron en un laberinto en Y, que los ratones pudieron explorar libremente. Los siguientes tres días de adaptación se realizaron en el laberinto del brazo radial, en el que las puertas se subían y bajaban periódicamente para acostumar a los animales al sonido asociado a su funcionamiento. Se mantuvo el mismo programa de privación de agua durante el período de prueba de 9 días. Los ratones mantienen una buena salud con este horario. Cada ensayo de prueba se inició colocando el ratón en el área central y levantando todas las puertas. Cuando entraba un brazo, todas las puertas se bajaban. Después de que el ratón consumiera el agua con sacarina, la puerta de ese brazo se levantó permitiendo que el ratón regresara a la arena central. Después de un intervalo de 5 segundos, la siguiente prueba se inició levantando de nuevo todas las

puertas simultáneamente. Este procedimiento se continuó hasta que el animal hubo entrado en los 8 brazos o hasta que transcurrieron 10 minutos. Las sesiones diarias de adquisición continuaron durante 9 días. Se registró el número de errores (entradas a brazos previamente visitados) y el tiempo para completar cada sesión.

Ensayo de reconocimiento de objetos: Esta prueba se realizó según lo descrito por Boutajangout, A. *et al.* (2012) "Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer's Disease And Related Disorders," *Methods Mol. Biol.* 849:529-540. Brevemente, la prueba de reconocimiento espontáneo de objetos empleada mide los déficits en la memoria a corto plazo y se llevó a cabo en una caja cuadrada de campo abierto (48 cm cuadrados, con paredes de 18 cm de alto construidas con Plexiglas® negro), elevado a 50 cm del suelo. La intensidad de la luz se fijó en 30 lx. El día antes del ensayo, los ratones se habituaron individualmente en una sesión en la que se les permitió explorar la caja vacía durante 15 minutos. Durante las sesiones de entrenamiento, se colocaron dos objetos nuevos en esquinas diagonales en campo abierto y se permitió que el animal explorara durante 15 min. Para cualquier ensayo dado, los objetos en un par tenían 10 cm de altura y estaban compuestos del mismo material, por lo que no podían distinguirse fácilmente mediante señales olfativas. El tiempo dedicado a explorar cada objeto fue registrado por un sistema de rastreo (San Diego Instruments), y al final de la fase de entrenamiento, se retiró al ratón de la caja durante la duración del retraso de retención (RD = 3 h). Los ratones normales recuerdan un objeto específico después de un retraso de 3 horas y pasan la mayor parte de su tiempo investigando el objeto nuevo durante el ensayo de retención. Durante las pruebas de retención, los animales fueron colocados de nuevo en la misma caja, en la que uno de los objetos familiares anteriores utilizados durante el entrenamiento fue reemplazado por un objeto novedoso, y se permitió explorar libremente durante 6 minutos. Se usó un par de objetos diferente para cada ensayo para un animal dado, y el orden de exposición a los pares de objetos, así como la muestra designada y los objetos nuevos para cada par, se equilibraron dentro y entre los grupos. El tiempo dedicado a explorar los objetos nuevos y familiares se registró durante los 6 minutos. La puntuación porcentual de la memoria a corto plazo es el tiempo dedicado a explorar cualquiera de los dos objetos (sesión de entrenamiento) en comparación con el nuevo (sesión de retención).

Condicionamiento del miedo: La cámara de prueba (26 cm x 22 cm x 18 cm de alto) tenía laterales de Plexiglas® transparente y un suelo de rejilla que se usó para producir un leve impacto en los pies. La cámara se colocó dentro de una cámara insonorizada (dimensiones internas: 56 cm x 38 cm x 36 cm) que tenía una ventana a través de la cual se podían observar los ratones sin molestias (Coulbourn Habitest de Coulbourn Instrument). El día del entrenamiento, los ratones se colocaron en la cámara de prueba y se les permitió explorar durante 2 minutos. El estímulo condicionado (ES; se presentó un sonido de ruido blanco de 80 dB) durante 30 s y fue seguido inmediatamente por un leve impacto en el pie (2 s, 0,7 mA) que sirvió como estímulo no condicionado (ENC). Después de 2 minutos, los ratones recibieron un segundo emparejamiento EC-ENC. El sistema de monitor Freeze Frame (San Diego Instruments, San Diego CA) se usó para controlar el tiempo de las presentaciones de CS y US y para registrar el comportamiento de congelación. Durante el proceso de acondicionamiento, la respuesta al impacto del pie (típicamente carreras, saltos o vocalizaciones) también se registró. Se sometió a los ratones al ensayo del miedo contextual en 3 horas para la memoria a corto plazo y 24 horas para la memoria a largo plazo, durante el cual los ratones se colocaron en la cámara de prueba original durante 5 minutos sin EC y se registró el sonido y el comportamiento de congelación.

B. Estudio de eficacia aguda del anticuerpo 4E6G7 usando ratones hTau

Al comienzo del estudio de eficacia aguda en hTau, los ratones hTau tenían entre 11 y 12 meses de edad y se dividieron en dos grupos con un estado cognitivo y motor similar antes de recibir tres inyecciones de anticuerpos y volver a realizar las mismas pruebas de comportamiento además de una prueba de condicionamiento del miedo, seguido de extracción de cerebro para análisis de tejido. Los ratones pasaron por la adaptación y las pruebas previas con la barra rotatoria, pruebas simétricas de campo abierto y campo cerrado los días 1-10 (Boutajangout, A. *et al.* (2012) "Cognitive And Sensorimotor Tasks For Assessing Functional Impairments In Mouse Models Of Alzheimer's Disease And Related Disorders," *Methods Mol. Biol.* 849:529-540), seguido de una inyección de anticuerpos los días 11 y 14 y una nueva prueba los días 15-18. Se administró una tercera inyección el día 24, seguida de una prueba de condicionamiento del miedo los días 27-28 y perfusión el día 30.

Para el análisis de tejidos, se anestesió a los ratones con ketamina/xilazina (250 mg/50 mg por kg de peso corporal, i.p.), y se procesaron como describen Rajamohamedsait, H.B. *et al.* (2012) "Histological Staining of Amyloid and Pre-amyloid Peptides and Proteins in Mouse Tissue," *Methods Mol. Biol.* 849:411-424. Brevemente, los ratones fueron perfundidos con 25 ml de PBS durante 10 minutos. A continuación, se extrajo cuidadosamente el cerebro y el hemisferio izquierdo se congeló y almacenó a -80 °C hasta que se procesó para las transferencias Western. El hemisferio derecho se mantuvo en peryodato-lisina-paraformaldehído (PLP) al 2 % durante 24 horas, luego se colocó en una solución tampón de DMSO/glicerol durante al menos otras 24 horas o hasta que se seccionó. Se obtuvieron secciones coronales (40 µm de espesor) en un criostato de congelación y se colocaron en cinco series (200 µm de separación) en una solución crioprotectora de etilenglicol y se almacenaron a -30 °C hasta que se usaron para inmunohistoquímica. La inmunotinción se realizó con anticuerpos Tau monoclonales de ratón que tiñen la Tau patológica, PHF-1(1:1000), contra el epítipo ^(P)Ser396/^(P)404 epítipo y MC1 (1:100) que reconoce un epítipo conformacional.

El tejido cerebral del hemisferio izquierdo se pesó y homogeneizó en (5x v/w) tampón RIPA modificado (Tris-HCl

50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 µg/ml de mezcla completa de inhibidores de proteasa (Roche Applied Science)). A continuación, el homogeneizado se centrifugó (20 000 xg) durante 20 minutos a 20 °C y los sobrenadantes se recogieron como sobrenadante de baja velocidad (LSS). Después de la cuantificación de proteínas, los volúmenes se ajustaron para igual concentración de proteína con dilución en tampón O+ modificado (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, 5 % de glicerol, 2-mercaptoetanol, SDS al 2,3 %, EGTA 1 mM, fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, 1 µg/ml de inhibidor completo de proteasa, se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12 %. Para la fracción insoluble en sarcosilo, se añadió una solución de sarcosilo al 10 % al LSS y la muestra se mezcló durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 100 000 x g durante 1 hora a 20 °C. Luego, el sedimento se lavó en una solución de sarcosilo al 1 % y se centrifugó nuevamente a 100 000 x g durante 1 hora a 20 °C. A continuación, el sedimento se secó al aire durante 30 minutos, se mezcló con 50 µl en tampón O+ modificado, se agitó durante 1 minuto, luego se hirvió durante 5 minutos y se denominó "fracción de gránulos de sarcosilo (SP)".

Como lo muestran los errores de prueba, los ratones hTau que habían sido inmunizados con el anticuerpo 4E6G7 exhibieron mejoras significativas en la prueba CFMS (p<0.01) (**Figura 12, Panel A**), mientras que los ratones de control no (**Figura 12, Panel B**). Ambos grupos de ratones desempeñaron de manera similar en las pruebas de función motora (pruebas de barra rotatoria y de campo abierto), lo que sugiere que las mejoras en las funciones cognitivas fueron resultado directo de la inmunización, pero no los efectos secundarios de los cambios en la función motora. Sin embargo, tanto los ratones inmunizados como los de control no mostraron ninguna mejora en las pruebas de condicionamiento del miedo después del tratamiento.

C. Estudio de eficacia a largo plazo del anticuerpo 4E6G7 utilizando ratones hTau/PS1

Las inmunizaciones comenzaron cuando los ratones tenían 8-9 meses de edad y continuaron semanalmente durante trece semanas. El mes anterior al sacrificio, los ratones pasaron por una batería de pruebas cognitivas (laberinto de brazos radiales, pruebas simétricas de campo cerrado de diferentes dificultades y prueba de reconocimiento de objetos, como se ha descrito anteriormente), así como pruebas sensoriomotoras (barra rotatoria y de campo abierto, como se ha descrito anteriormente) para verificar que tales déficits no fueran una variable de confusión en la evaluación cognitiva.

Se descubrió que los ratones inmunizados funcionaban sustancialmente mejor que los ratones de control en el laberinto de brazos radiales (p<0.0001; post-hoc, p<0,01-0,001 los días 2, 3, 5-9) (**Figura 13, Panel A**), el CFMS con 35-69 % menos de errores en tareas simples, intermedias y complejas (p<0,05-0,003) (**Figura 13, Paneles B-D**), y la tarea de reconocimiento de objetos (63 % del tiempo dedicado a un objeto nuevo frente al 46 % de los controles, p <0,05; **Figura 13, panel E**). Los grupos no diferían en varias tareas sensoriomotoras, lo que indica que las sólidas mejoras cognitivas no pueden explicarse por los efectos sensoriomotores, lo que fortalece aún más los resultados.

La inmunohistoquímica se realizó como se describe en el Estudio de eficacia aguda. El análisis cuantitativo de secciones de cerebro teñidas con PHF-1 reveló una reducción del 61 % en Tau patológica en la corteza piriforme en los ratones inmunizados, en comparación con los controles inyectados con IgG. **La Figura 14, Los Paneles A-C** muestran secciones de cerebro teñidas con PHF-1 para ratones de control (**Figura 14, Panel A**) y ratones hTau/PS1 inmunizados con el anticuerpo 4E6G7 (**Figura 14, Panel B**). **La Figura 14, Panel C**, muestra un análisis cuantitativo de la tinción con PHF-1 de células cerebrales de ratones control e inmunizados.

Ejemplo 9

El anticuerpo 4E6G7 exhibe propiedades que no se observan con otros anticuerpos dirigidos al epítipo ^(P)Ser404 de Tau

Para demostrar aún más las características novedosas del anticuerpo 4E6G7, sus características se compararon con las de un anticuerpo anti-Tau de control (**anticuerpo 6B2G12**; también designado como Anticuerpo 6B2) que también se había producido contra el epítipo ^(P)Ser404 de Tau (Krishnaswamy, S. *et al.* (2014) "Antibody-Derived *in vivo* Imaging of Tau Pathology," J. Neurosci. 34(50): 16835-16850); 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(49):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). Tanto el anticuerpo 4E6G7 como el anticuerpo 6B2G12 son capaces de entrar en las neuronas y colocalizarse con tau (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).

En cultivos de cortes de cerebro, ambos anticuerpos reducen la fosfo-tau soluble después de 6 semanas de tratamiento. Sin embargo, a pesar de haber sido provocados contra el mismo epítipo, los dos anticuerpos muestran múltiples características funcionales diferentes. Sin embargo, se ha descubierto que solo el anticuerpo 4E6G7, y no el anticuerpo 6B2G12, reduce de forma aguda los niveles de tau en las neuronas primarias a través de un mecanismo intracelular (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(49):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). Los dos anticuerpos muestran diferentes características de unión, siendo el anticuerpo 4E6G7 fosfoselectivo y teniendo el anticuerpo 6B2G12 propiedades conformacionales influidas por la fosforilación y una aparente mayor afinidad por tau (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).

El anticuerpo 4E6G7, pero no el anticuerpo 6B2G12, mejora de forma aguda la cognición en ratones hTau y reduce la proteína fosfo-Tau soluble. Como lo muestran los errores de prueba, el tratamiento agudo de ratones hTau con el anticuerpo 4E6G7 condujo a mejoras significativas en la cognición, el aprendizaje espacial y la memoria según lo determinado en la prueba CFSM (48 % menos errores en la prueba posterior frente a la prueba previa; 13,6 (errores promedio) \pm 1,2 (SEM) a 7,1 \pm 0,9, $p < 0,01$), mientras que los ratones de IgG control no mejoraron en comparación con su rendimiento previo a la inyección (**Figura 15, Panel A**) Estas diferencias no estaban relacionadas con el sexo. Los machos tratados con el anticuerpo 4E6G7 (52 % menos de errores; 14,6 \pm 0,8 a 7,0 \pm 1,4, $p < 0,01$) funcionaron de manera similar a las hembras tratadas con el anticuerpo 4E6G7 (44 % menos de errores; 12,7 \pm 2,2 a 7,1 \pm 1,2, $p < 0,05$). El ANOVA de dos vías de medidas repetidas reveló un efecto de tratamiento ($p = 0,0018$), pero no un efecto de sexo ($p = 0,5145$). En cambio, el tratamiento con el anticuerpo 6B2G12 no produjo mejoras en esta prueba (**Figura 15, Panel B**).

También se identificaron diferencias adicionales en las propiedades de estos anticuerpos. Como se ha indicado anteriormente, se descubrió que la incubación con PHF derivado de EA a 1 $\mu\text{g/ml}$ o a 10 $\mu\text{g/ml}$ induce toxicidad en las neuronas primarias según lo determinado por el ensayo de LDH (véase, por ejemplo, las **Figuras 1-2**) e inmunotransferencia de NeuN (véase, por ejemplo, las **Figuras 3-4**), y se descubrió que el anticuerpo 4E6G7 prevenía estos efectos; sin embargo, se descubrió que el anticuerpo 6B2G12 no podía prevenir estos efectos. De forma similar, se descubrió que el tratamiento con el anticuerpo 4E6G7 (a 10 $\mu\text{g/ml}$ o 1 $\mu\text{g/ml}$) previene los cambios en los niveles de tau causados por la exposición a PHF (véase, por ejemplo, las **Figuras 5-6**), mientras que se descubrió que el tratamiento con el anticuerpo 6B2G12 no tuvo efecto. Además, se descubrió que el anticuerpo 4E6G7 podía prevenir el aumento de Tau fosforilada que se desencadena por la exposición a 1 $\mu\text{g/ml}$ o 10 $\mu\text{g/ml}$ de PHF, véase, por ejemplo, las **Figuras 7-8**; se descubrió que el anticuerpo 6B2G12 no podía evitar dicho aumento.

Ninguno de los anticuerpos mostró beneficios en una prueba de condicionamiento del miedo. Ambos grupos de tratamiento de ratones funcionaron de manera similar a los controles de IgG en las pruebas de función motora (pruebas de barra rotatoria y de campo abierto), lo que sugiere que las mejoras en las funciones cognitivas mediadas por el anticuerpo 4E6G7 eran resultado directo de la inmunización, pero no los efectos secundarios de los cambios en la función motora.

Ejemplo 10

El anticuerpo 4E6G7 reconoce principalmente PHF solubilizado

Para seguir examinando la base de las diferentes propiedades del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12, la unión de los anticuerpos a los péptidos tau, PHF solubilizado y otras fracciones de tau, se caracterizó en ensayos biacore, de transferencia por puntos y ELISA.

Ensayo Biacore

La unión del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 a los péptidos tau correspondientes a la región 396/404 de la proteína tau se examinó usando un ensayo biacore. Ninguno de los anticuerpos mostró unión a P-Ser396, lo que difiere de los ensayos ELISA publicados previamente (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). Sin embargo, para todos los demás péptidos epitópicos, El anticuerpo 6B2G12 produjo valores de K_D sustancialmente más bajos (10^{-9} - 10^{-10} M) que los vistos con el anticuerpo 4E6G7 (10^{-7} M), lo que indica una afinidad mucho mayor por el epítipo del inmunógeno (**Tabla 5**). Usando ELISA, se descubrió que el anticuerpo 4E6G7 se unía muy mal al péptido P-Ser396 que recubría la placa, sin embargo, el anticuerpo 6B2G12 mostró unión. Esto puede deberse a los cambios conformacionales que se producen en el péptido cuando se une a la placa o a las diferencias que se producen cuando se inmoviliza el anticuerpo. Se observó una falta similar de unión del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 al péptido P-Ser396 en solución en ELISA de competencia, lo que confirma la precisión de los datos de biacore. Estos hallazgos enfatizan que se deben usar diversos métodos al evaluar la afinidad del anticuerpo.

Tabla 5		
K_D (Biacore)	Anticuerpo 4E6G7	Anticuerpo 6B2G12
Péptidos de 30 aminoácidos		
Tau379-408 [P-Ser396/404]	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,95 \times 10^{-10}$
Tau379-408	$2,12 \times 10^{-7}$	$2,51 \times 10^{-9}$

(continuación)

Tabla 5		
Péptidos de 23 aminoácidos		
Tau386-408 [P-Ser396/404]	$4,69 \times 10^{-7}$	$2,39 \times 10^{-9}$
Tau386-408 [P-Ser404]	$2,78 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-9}$
Tau386-408 [P-Ser396]	ND	ND

Ensayos de transferencia por puntos

- 5 La unión del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 a PHF se ensayó mediante una transferencia por puntos de diferentes fracciones de tau (**Figura 1, Figura 16, Panel A**). Las fracciones de PHF solubilizado, solubles en sarcosilo e insolubles en sarcosilo del mismo cerebro humano con EA se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa, que luego se incubó con el anticuerpo 4E6G7 o el anticuerpo 6B2G12 (**Figura 16, Panel A**). El anticuerpo 4E6G7 tenía mayor afinidad por el PHF solubilizado, pero el anticuerpo 6B2G12 se unía mejor a la fracción insoluble de sarcosilo. Ninguno de los anticuerpos se unió bien a la fracción soluble de sarcosilo. Tanto el anticuerpo 4E6G7 como el anticuerpo 6B2G12 mostraron una unión limitada a las muestras de control mediante transferencia por puntos (**Figura 16, Panel B**). No se observó reactividad visible en la fracción soluble en sarcosilo y solo reactividad mínima en las otras dos fracciones. Obsérvese que el tejido de control tenía una tau patológica muy limitada, si es que tenía alguna, y que el material granulado era mucho menor que en el tejido AD y probablemente contiene varias proteínas. Se transfirió la misma cantidad de proteína para EA y tejido de control.

Ensayos ELISA

- 20 Se realizaron dos ensayos ELISA diferentes para evaluar la unión del anticuerpo 4E6G7 y el anticuerpo 6B2G12 a diferentes fracciones de tau del cerebro con EA y de control. En el primero, la placa estaba recubierta con material de las fracciones soluble en sarcosilo, PHF solubilizado o insoluble en sarcosilo (1 µg/pocillo) y se añadieron diluciones de anticuerpo.

- 25 Cuando las placas se recubrieron con el PHF solubilizado (**Figura 16, Panel C**), el anticuerpo 6B2G12 mostró una unión significativamente mayor a los pocillos recubiertos con material de cerebro con EA que el control para todas las diluciones hasta 1/125 mil ($p < 0,0001-0,05$) y una unión significativamente mayor que el anticuerpo 4E6G7 a EA o control a 1/200 - 1/ 5 mil ($p < 0,0001$). Por el contrario, el anticuerpo 4E6G7 no mostró una unión significativamente mayor a la tau de EA frente a la tau de control en ninguna de las diluciones.

- 30 En placas recubiertas con tau soluble en sarcosilo (**Figura 16, Panel D**), se detectó una unión baja incluso a las concentraciones de anticuerpo más altas. A la dilución 1/200, el anticuerpo 6B2G12 mostró una unión significativamente mayor a la tau de EA que a la tau del cerebro de control, y también una unión más alta que el anticuerpo 4E6G7 a la tau de EA o de control ($p < 0,01$, 0,05 y 0,05 respectivamente). Ninguna de las otras diluciones o condiciones mostró diferencias significativas entre las muestras.

- 35 Finalmente, cuando las placas se recubrieron con la tau insoluble en sarcosilo (**Figura 16, Panel E**), el anticuerpo 6B2G12 mostró una unión significativamente mayor que el anticuerpo 4E6G7 a tau de EA en las diluciones 1/200-1/125 mil ($p < 0,0001-0,05$) y también una unión significativamente mayor a tau de EA en las mismas diluciones ($p < 0,0001-0,05$). De nuevo, no hubo diferencia significativa en la unión a EA frente al control con el anticuerpo 4E6G7.

- 40 A continuación, se realizó un ELISA de competición para determinar la unión de anticuerpos a PHF en solución. En este ensayo, las placas se recubrieron con PHF solubilizado como se ha descrito anteriormente, pero antes de que se añadieran los anticuerpos, se incubaron alícuotas durante 1 hora con concentraciones crecientes de PHF solubilizado (0,01-1 µg/ml). En estas condiciones, la unión al PHF solubilizado inhibió marcadamente la unión del anticuerpo 4E6G7 al PHF revestido en la placa, pero la unión del anticuerpo 6B2G12 no se vio afectada. A la concentración más alta de PHF, la unión del anticuerpo 4E6G7 a los pocillos se redujo en un 85 %. Se determinó que el valor de la CI50 era 71 nM (**Figura 16, Panel F**). Por el contrario, el anticuerpo 6B2G12 no mostró una unión reducida a los pocillos a ninguna concentración de PHF. Estos datos indican que los dos anticuerpos se unen a diferentes especies de tau dentro del material PHF derivado de EA; el anticuerpo 4E6G7 contra PHF solubilizado y el anticuerpo 6B2G12 contra PHF agregado.

- 50 Los datos de unión de ELISA y de transferencia por puntos, particularmente cuando se considera con los resultados de los análisis confocales y bioquímicos, sugieren que la eficacia del anticuerpo 4E6G7 (y la falta del mismo para el anticuerpo 6B2G12) puede explicarse por su respectivo grado de interacción/neutralización de PHF. El ensayo de transferencia por puntos y los datos de ELISA muestran que, aunque tanto el anticuerpo 4E6G7 como el anticuerpo 6B2G12 se unen a PHF, la afinidad y las especies preferidas difieren, con el anticuerpo 6B2G12 que se une potencialmente a una forma tau más agregada pero menos tóxica (**Figura 16, Panel A**).

- 60 En contraste con los resultados obtenidos con el anticuerpo 6B2G12, en todos los ensayos, el anticuerpo 4E6G7 mostró menos unión a tau agregada y unión preferente a PHF solubilizado. A pesar de la fuerte unión a la fracción de

PHF solubilizada en las transferencias de puntos en relación con las muestras de control, en los ensayos ELISA, el anticuerpo 4E6G7 mostró una capacidad limitada para unirse a tau que se añadió a los pocillos. Los complejos Ac-PHF no se ven con la incubación conjunta del anticuerpo 6B2G12 y PHF porque este último está en su forma solubilizada en los medios de cultivo que no se unen al anticuerpo 6B2G12. **(Figura 16, Panel F).** (La solubilidad de la fracción de PHF en concentraciones experimentales se confirmó mediante ultracentrifugación). Los cambios de pH en los endosomas/lisomas pueden promover la agregación, lo que da como resultado una mezcla de formas solubles e insolubles de PHF y, por lo tanto, la unión de ambos anticuerpos en estas vesículas (la condición PHF → Ac). Sin embargo, solo la unión del anticuerpo 4E6G7 a la forma PHF solubilizada es beneficiosa, mientras que la unión por el anticuerpo 6B2G12 no tiene efecto. Esta aclaración detallada tiene implicaciones importantes para el desarrollo de inmunoterapias tau y para comprender la patogenia de las tauopatías, porque indica que la eficacia terapéutica está asociada con la capacidad de unirse a PHF soluble (o solubilizado).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula basada en anticuerpo capaz de unirse a un epítipo ^(p)Ser404 de Tau fosforilado, en la que dicha molécula comprende una cadena polipeptídica variable ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:9** y una cadena polipeptídica variable pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de **SEC ID NO:13**; y en la que dicho epítipo está dentro de la secuencia:
 TDHGAEIVYK^(P)SPVVSGDT^(P)SPRHL (**SEQ ID NO:8**)
 que consiste en los aminoácidos 386-408 de Tau, en donde los restos en la posición 11 y 19 de la **SEC ID NO:8**, que corresponden a las posiciones 396 y 404 de Tau son fosfoserinas.
2. La molécula de la reivindicación 1, que es un anticuerpo.
3. La molécula de la reivindicación 1, que es un scFv.
4. La molécula scFv de la reivindicación 3, que comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO:17**.
5. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está marcada de forma detectable.
6. La molécula marcada de la reivindicación 5, en la que el marcador detectable es un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un marcador paramagnético, un marcador radioisotópico o un marcador enzimático.
7. Uso *ex vivo* o *in vitro* de la molécula marcada de la reivindicación 5 o 6 para detectar o medir la presencia o la cantidad de un epítipo Tau fosforilado como se define en la reivindicación 1 en una muestra biológica de un sujeto humano, en el que dicha detección o medición comprende la obtención de imágenes *ex-vivo*.
8. Un método *ex-vivo* o *in vitro* para detectar o medir la presencia o cantidad de un epítipo de Tau fosforilado como se define en la reivindicación 1 en una muestra biológica de un sujeto humano, en el que dicha detección o medición comprende formación de imágenes *ex vivo* usando la molécula de la reivindicación 5 o 6.
9. La molécula de la reivindicación 5 o 6 para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, y en el que el sujeto es un ser humano.
10. Un medicamento que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en una cantidad efectiva para tratar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo de parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica y en el que el sujeto es un ser humano; y en el que el medicamento comprende además uno o más vehículos, diluyentes y/o estabilizantes.
11. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o el medicamento de la reivindicación 10 para su uso en medicina para un sujeto humano.
12. La molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o el medicamento de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, y en el que el sujeto es un ser humano.
13. Un kit para detectar o medir la presencia o la cantidad de una proteína Tau fosforilada como se define en la reivindicación 1 en el cerebro de un sujeto humano o para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía en un sujeto que tiene una afección seleccionada entre el grupo que consiste en demencia frontotemporal, parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, demencia con ovillos únicamente, demencia con granos argirófilos,

demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad neuronal motora no guamaniana con ovillos neurofibrilares, lesión cerebral traumática aguda, encefalopatía traumática crónica, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación y complejo parkinsonismo-demencia de esclerosis lateral amiotrófica, en donde el sujeto es un ser humano; y en el que dicho kit comprende la molécula de la reivindicación 5 o 6.

14. La molécula para el uso de la reivindicación 9, para su uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

15. El medicamento de la reivindicación 10, en el que la molécula está en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad de Alzheimer.

16. La molécula para el uso de la reivindicación 12 o el medicamento para el uso de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

17. El kit de la reivindicación 13, para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

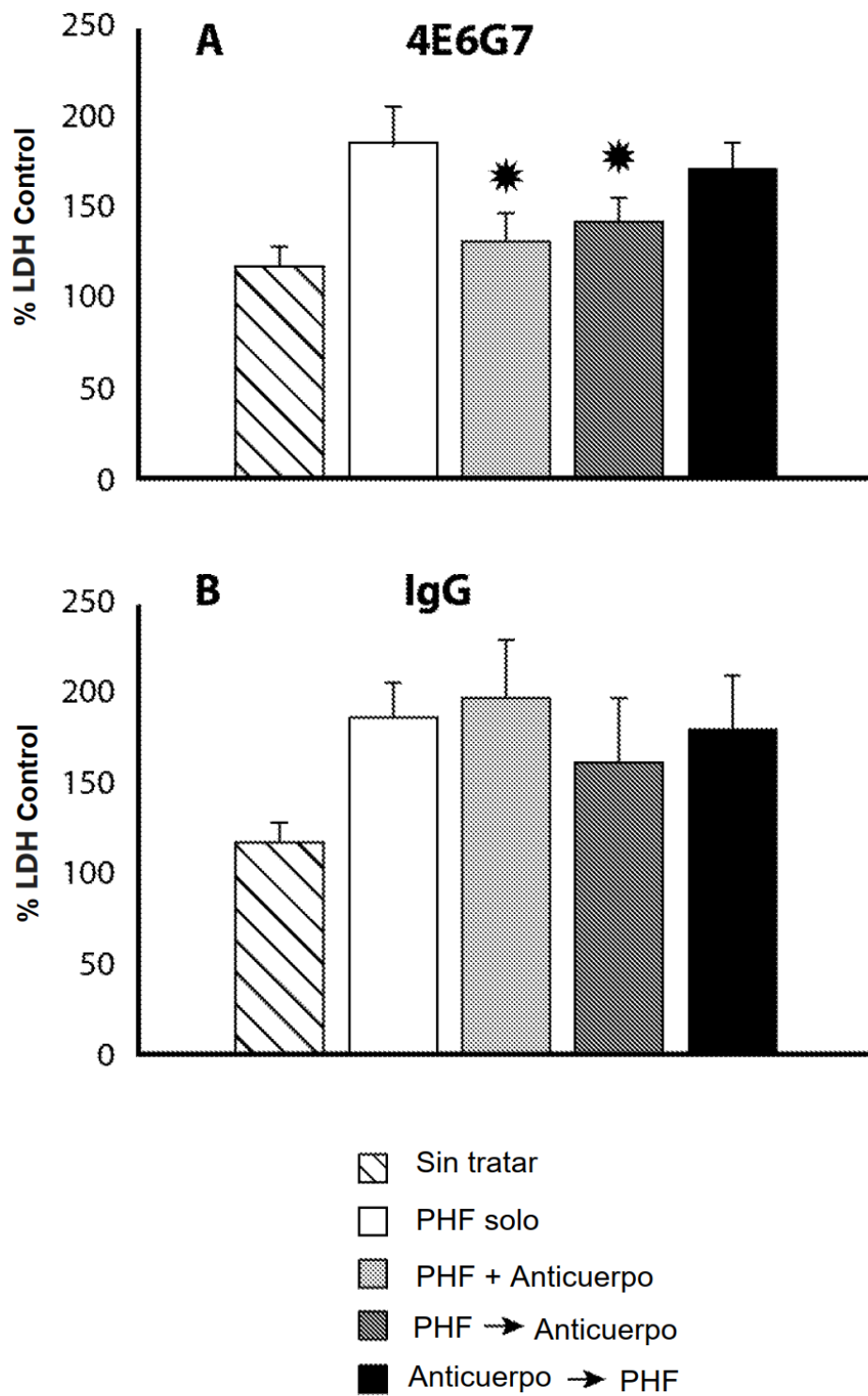


Figura 1

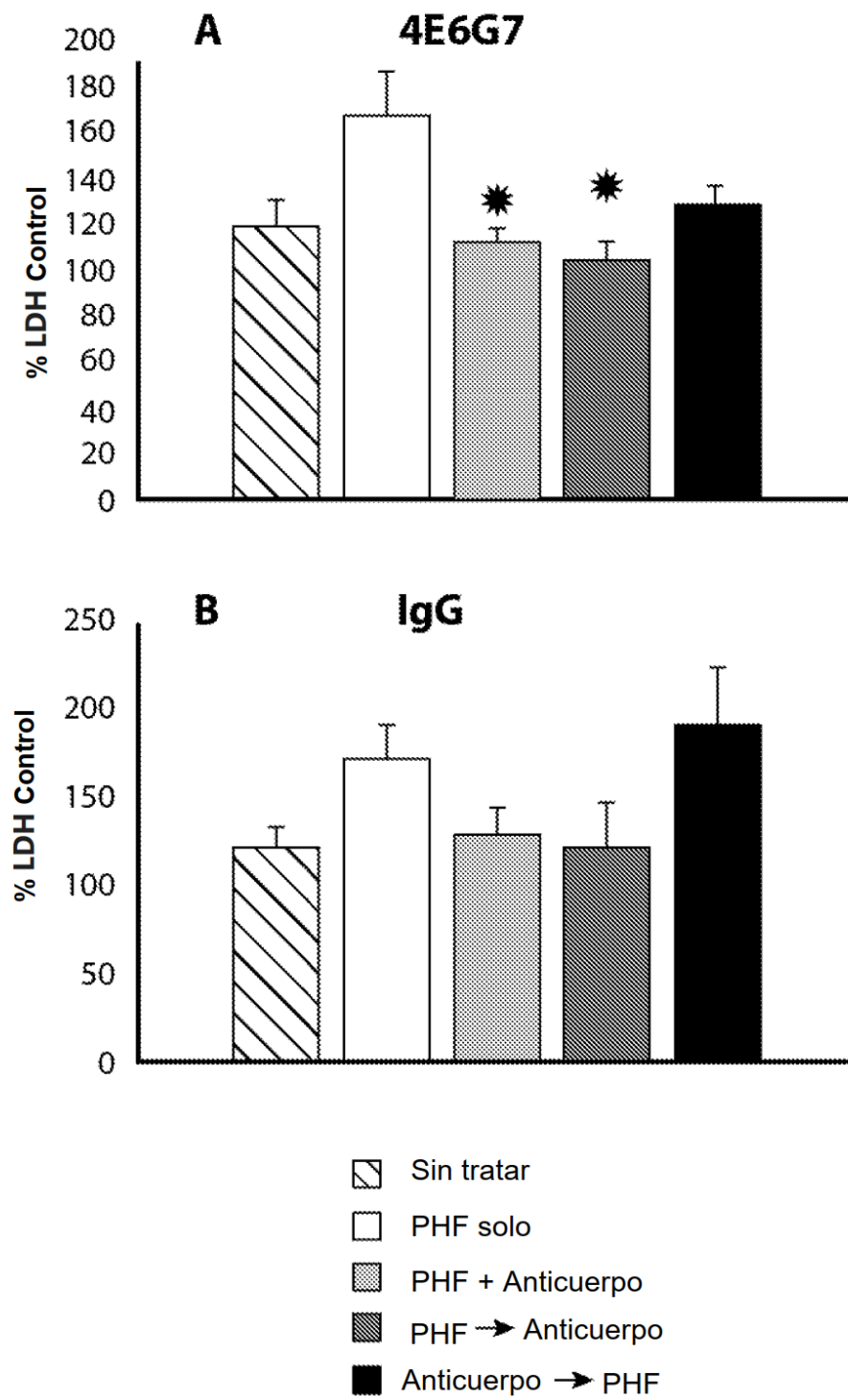


Figura 2

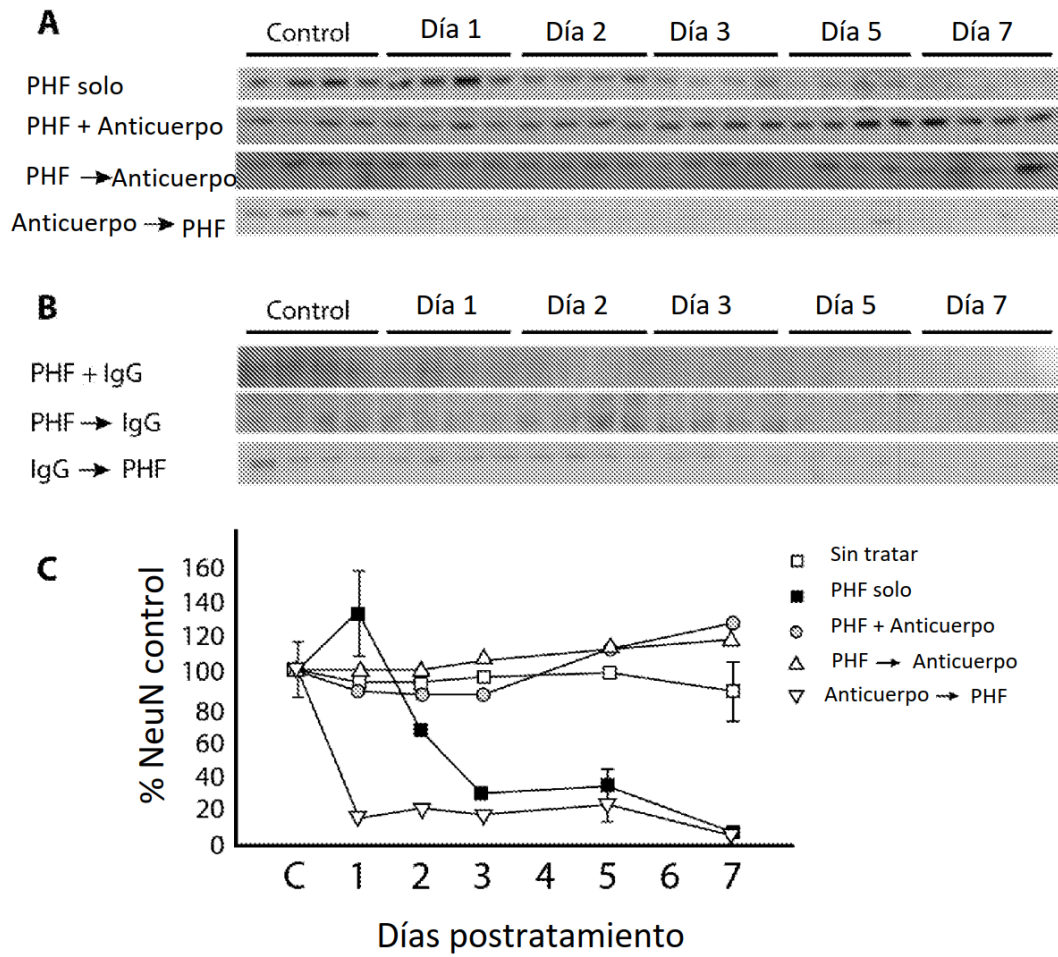


Figura 3

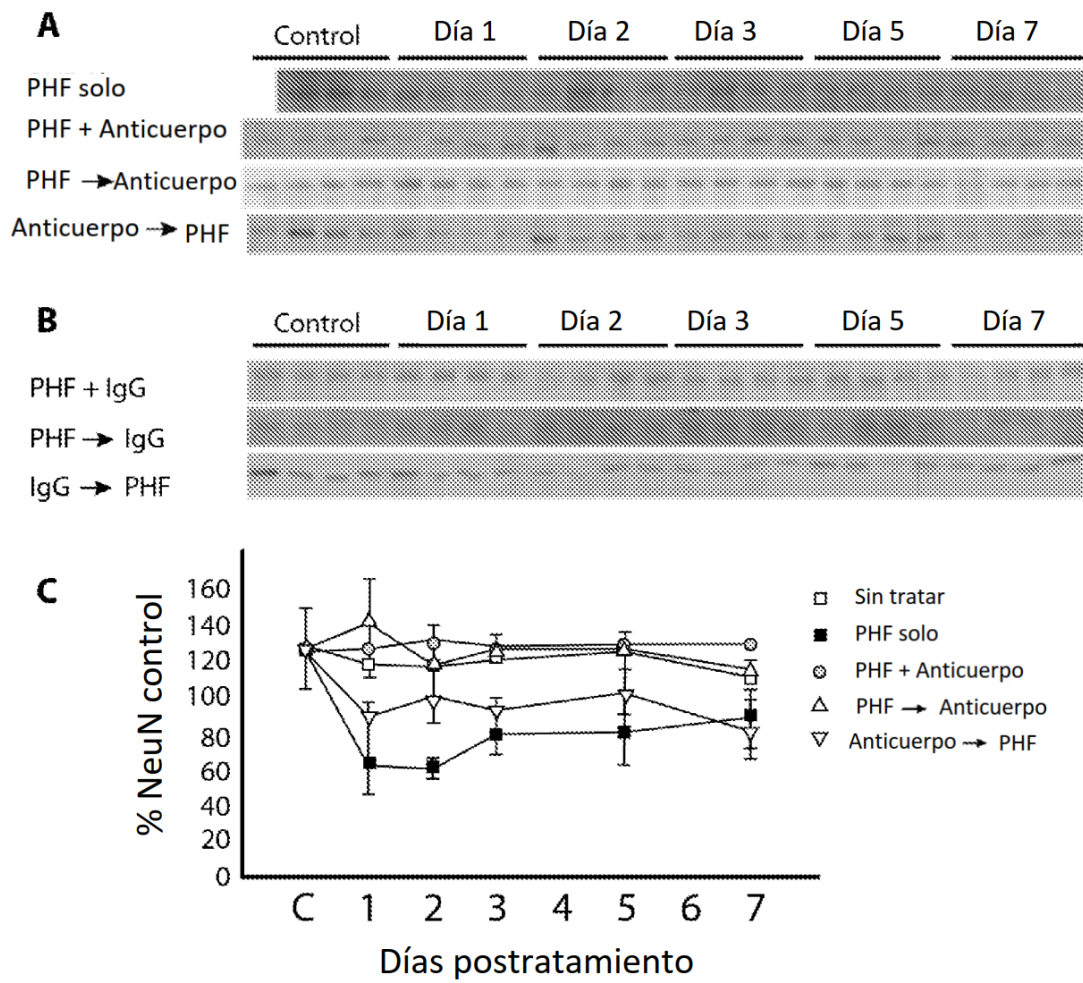


Figura 4

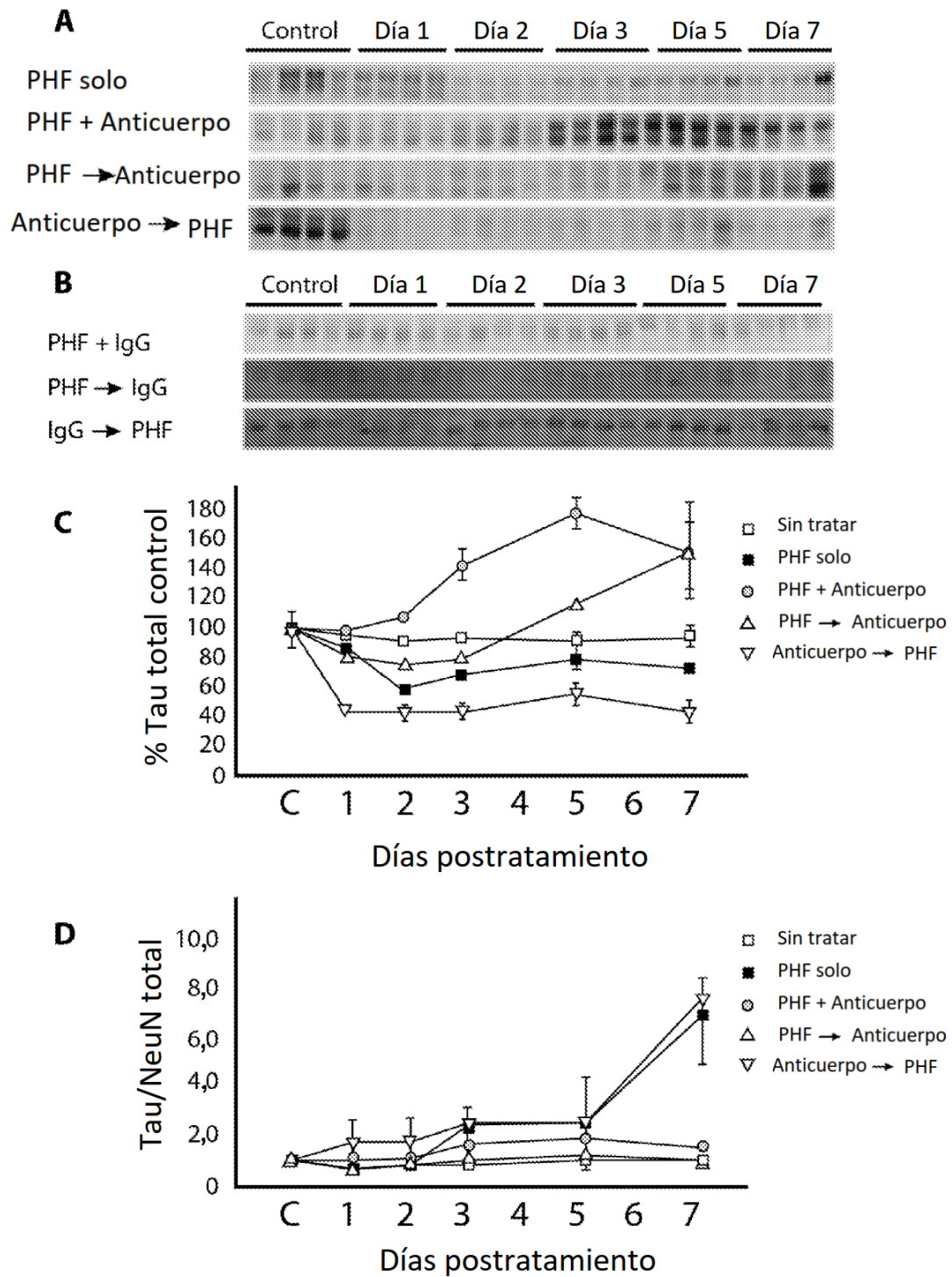


Figura 5

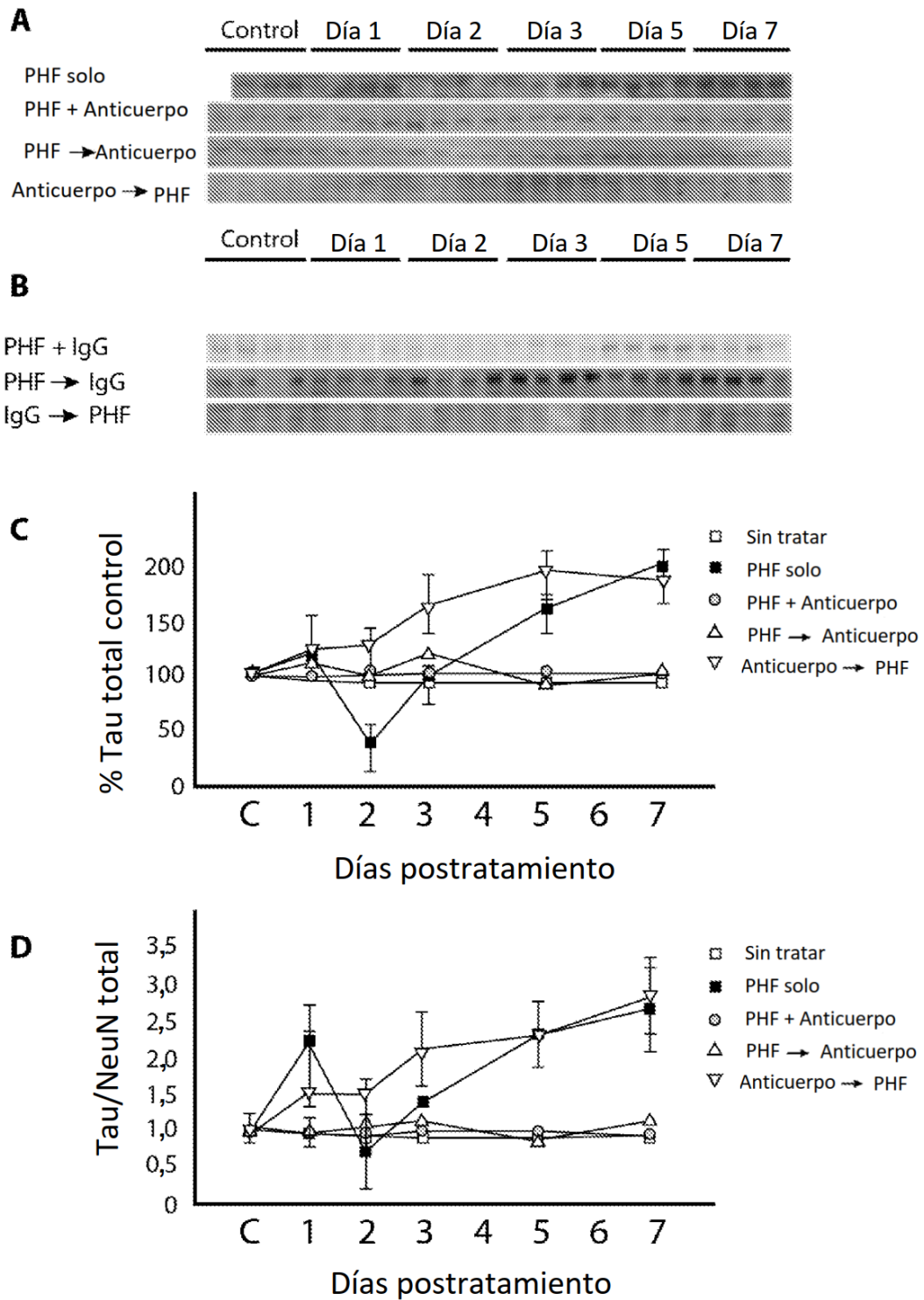


Figura 6

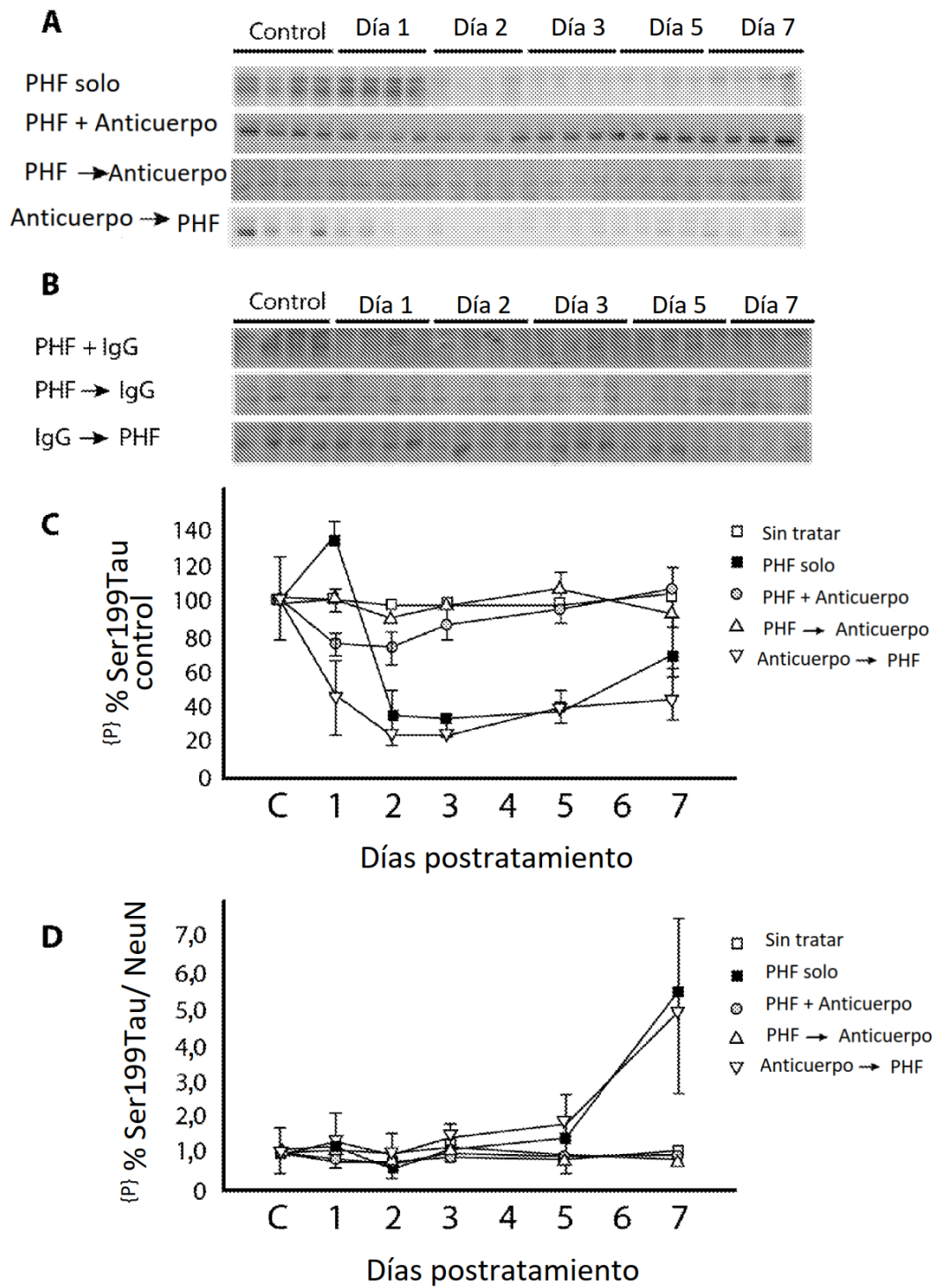


Figura 7

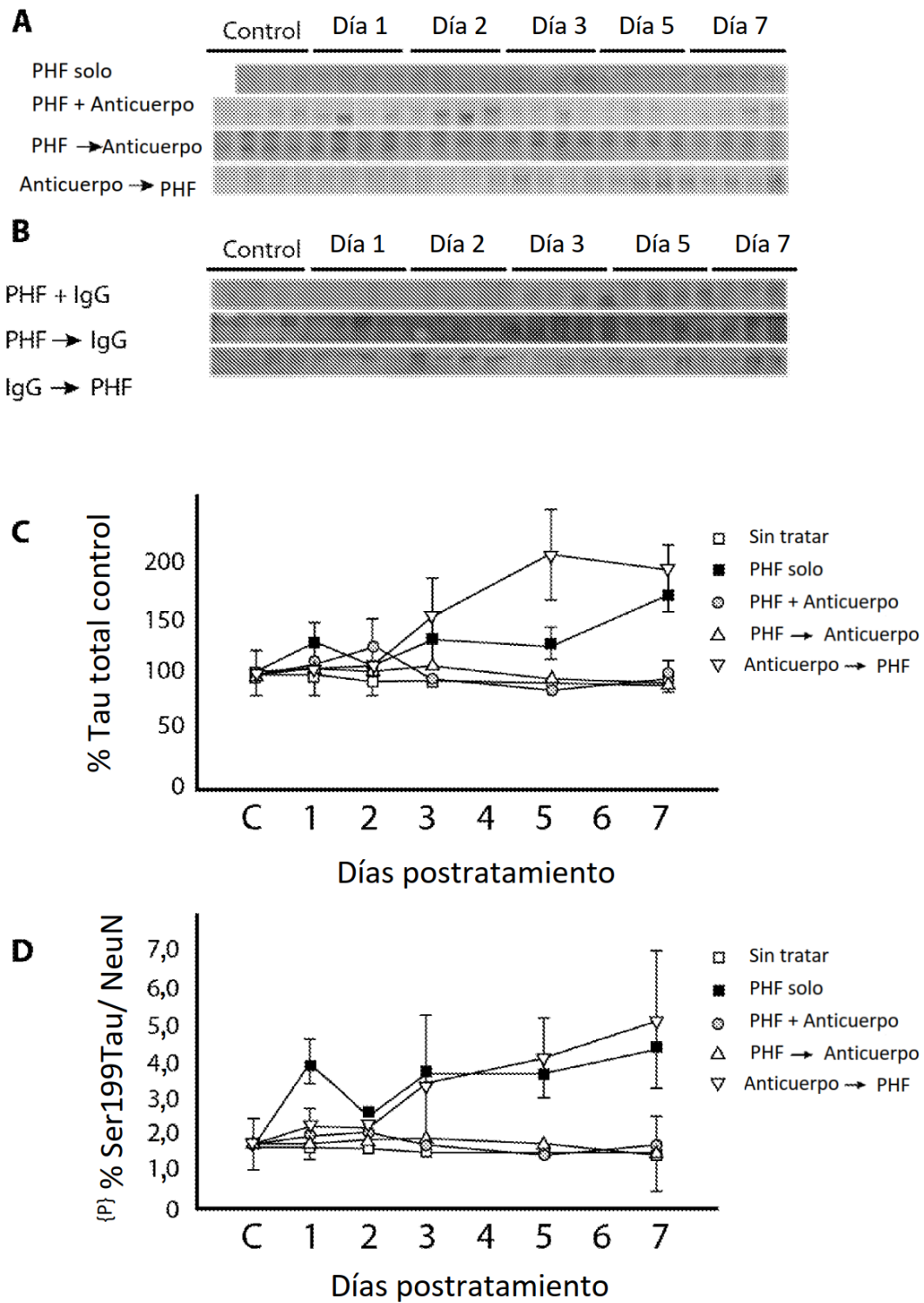


Figura 8

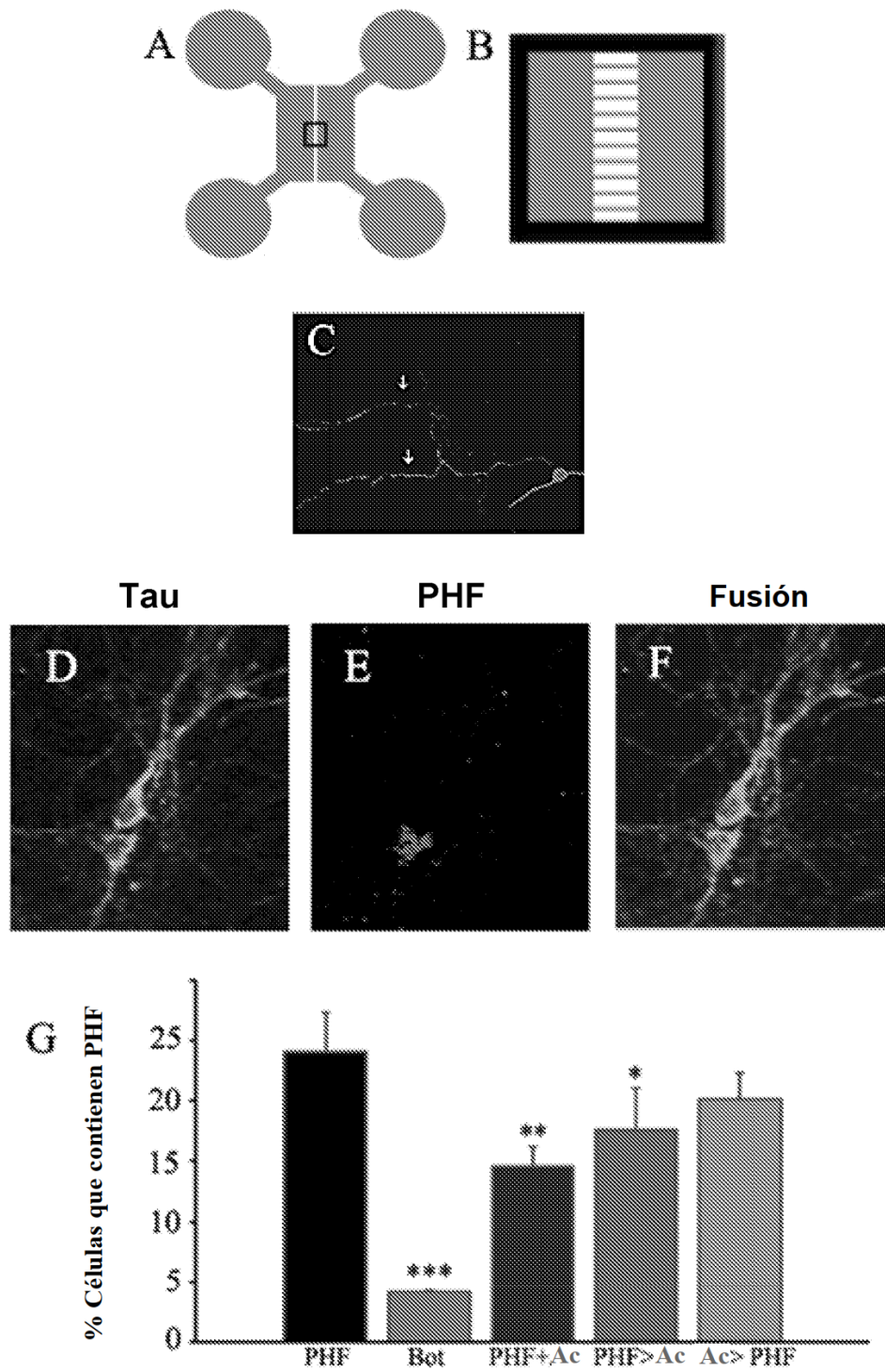


Figura 9

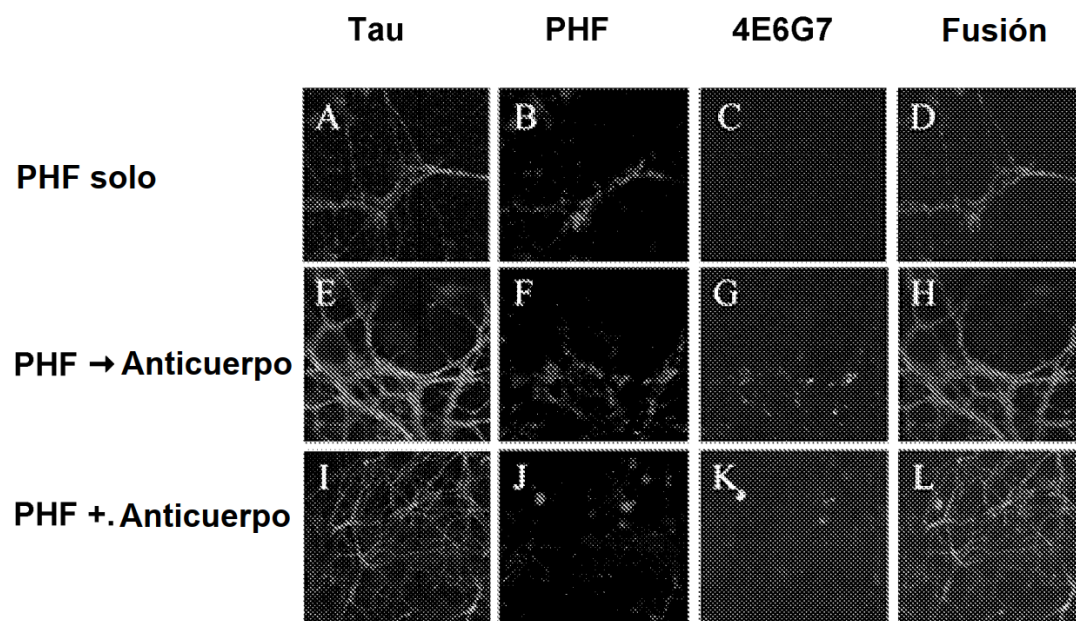


Figura 10

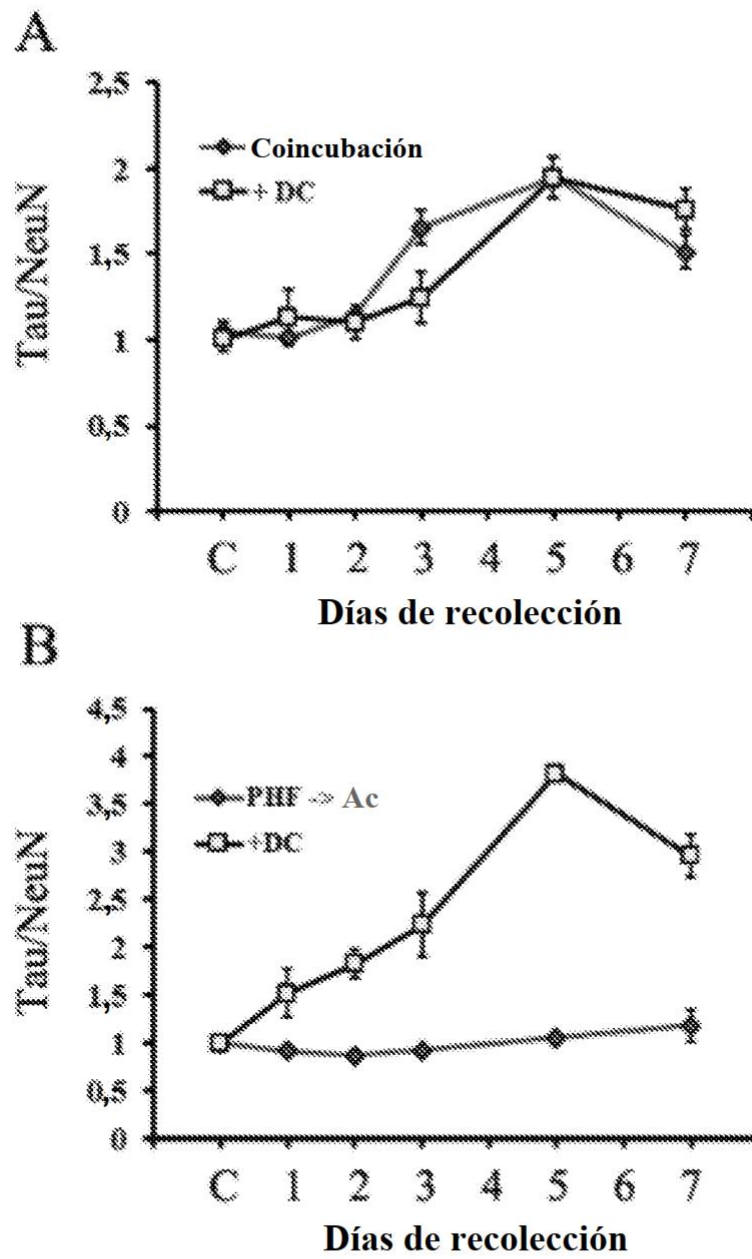


Figura 11

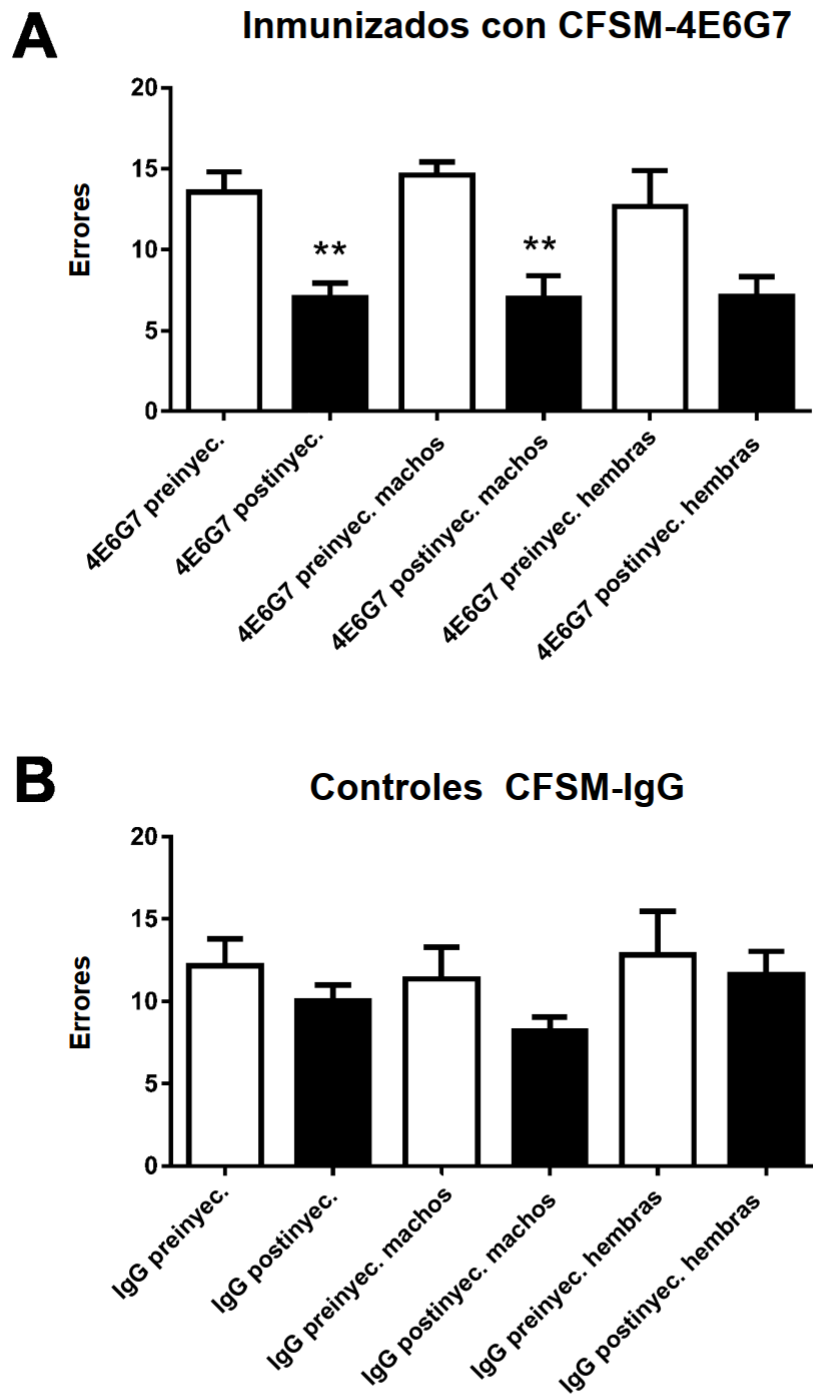


Figura 12

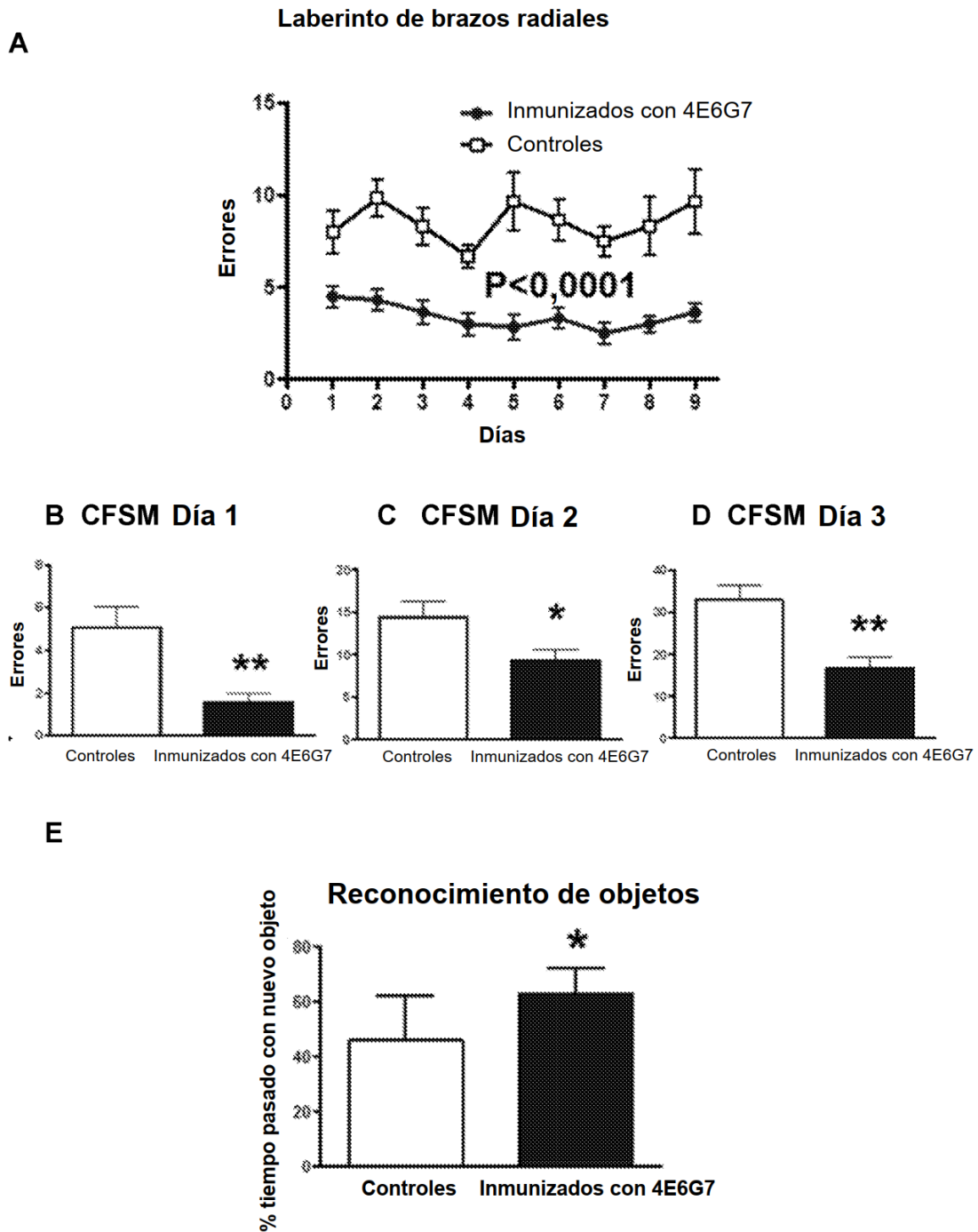


Figura 13

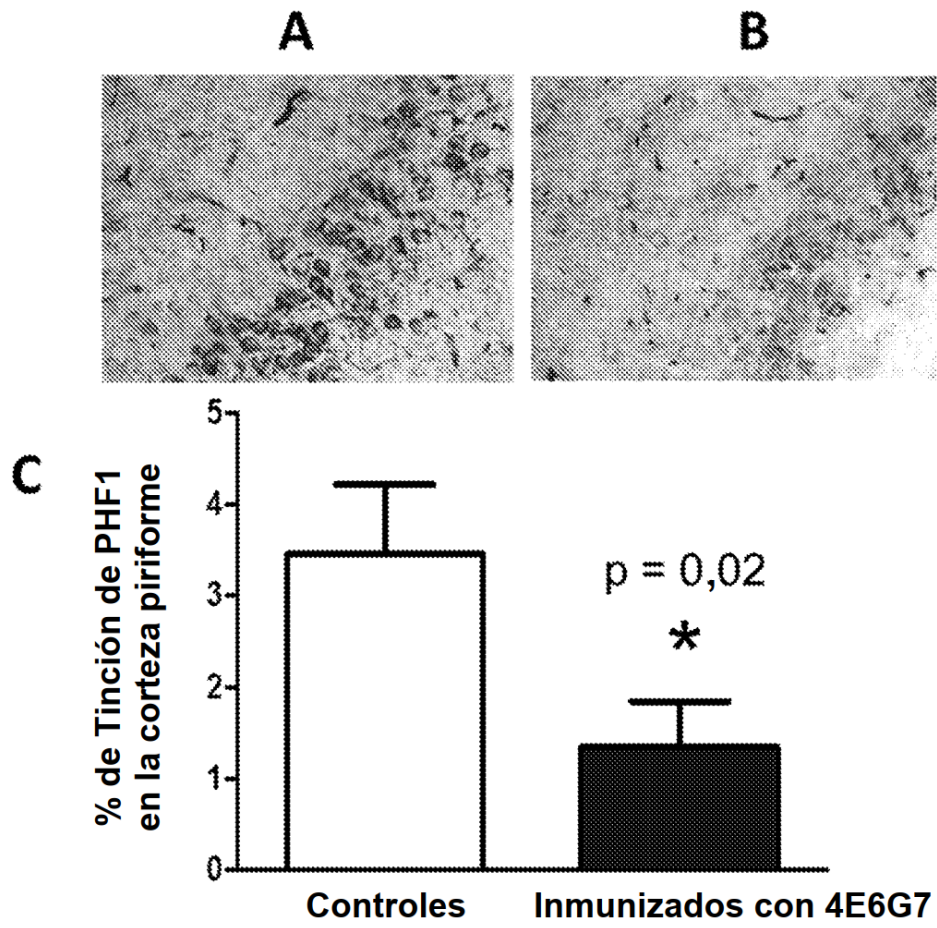
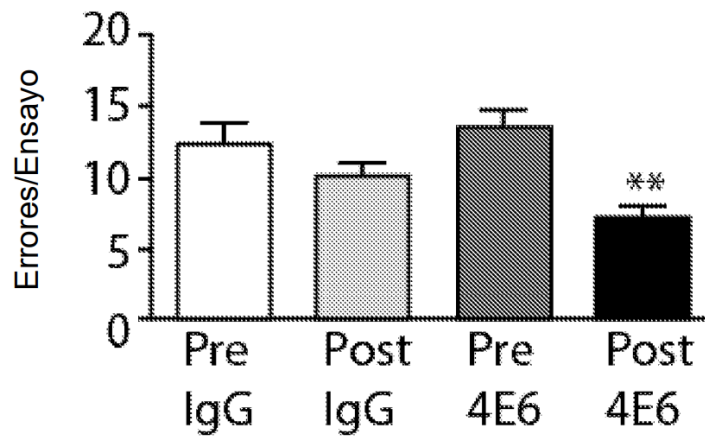


Figura 14

Panel A: Anticuerpo 4E6G7 en el laberinto CSF antes frente a después del tratamiento



Panel B: Anticuerpo 6B2G12 en el laberinto CSF antes frente a después del tratamiento

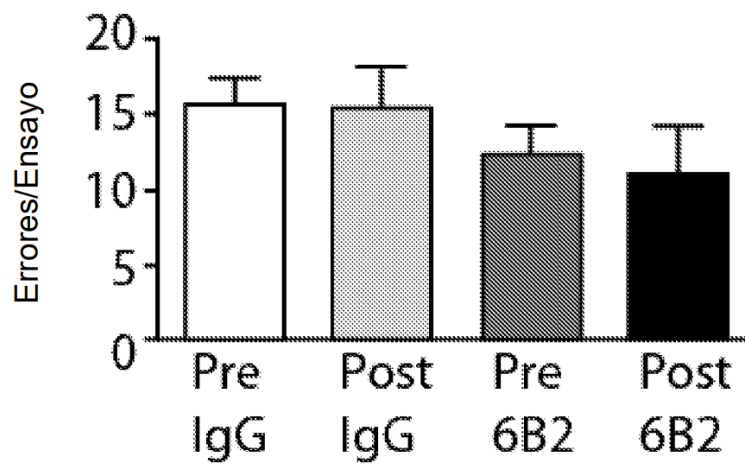


Figura 15

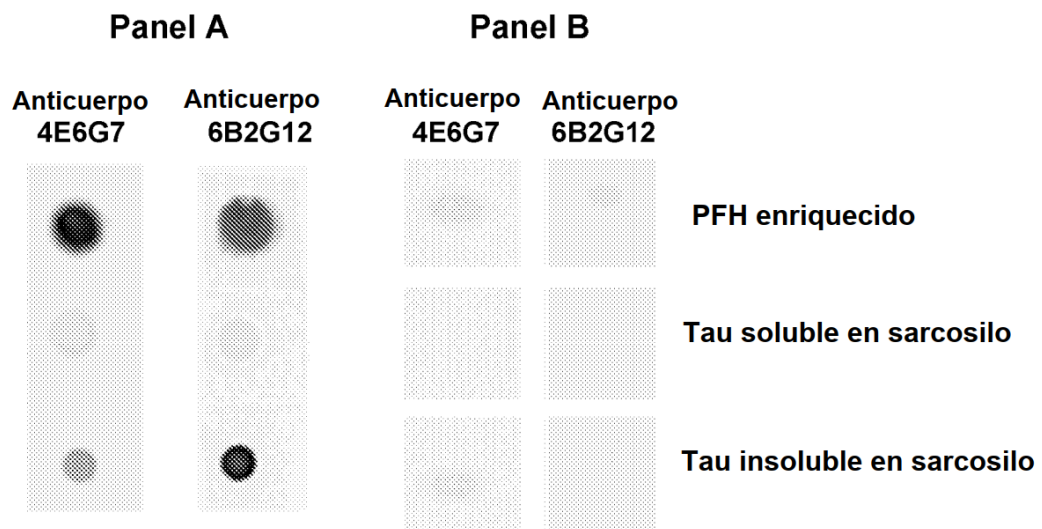
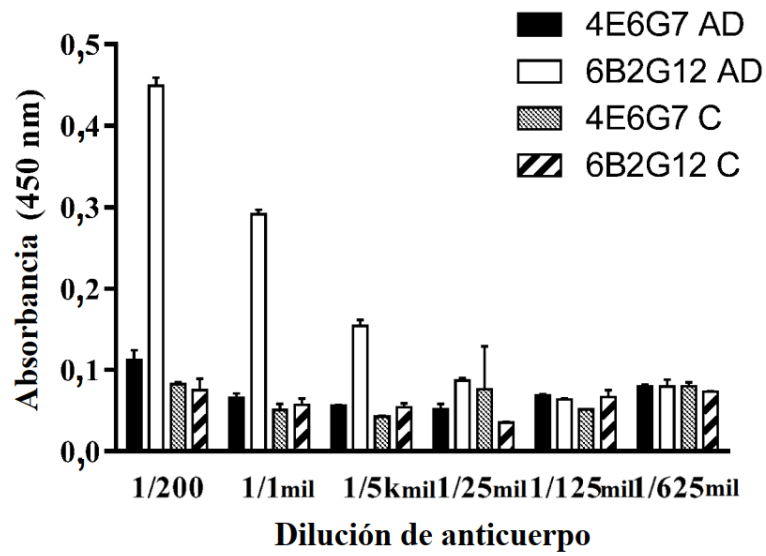


Figura 16, Paneles A y B

Panel C



Panel D

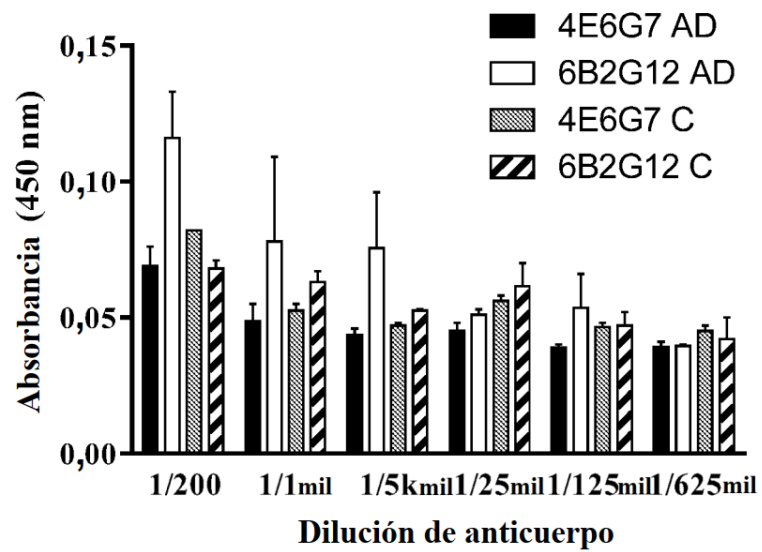
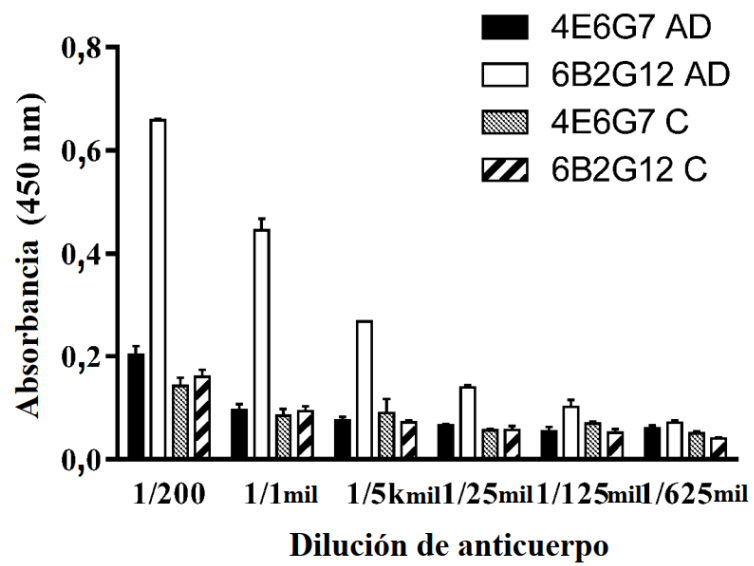


Figura 16, Paneles C y D

Panel E



Panel F

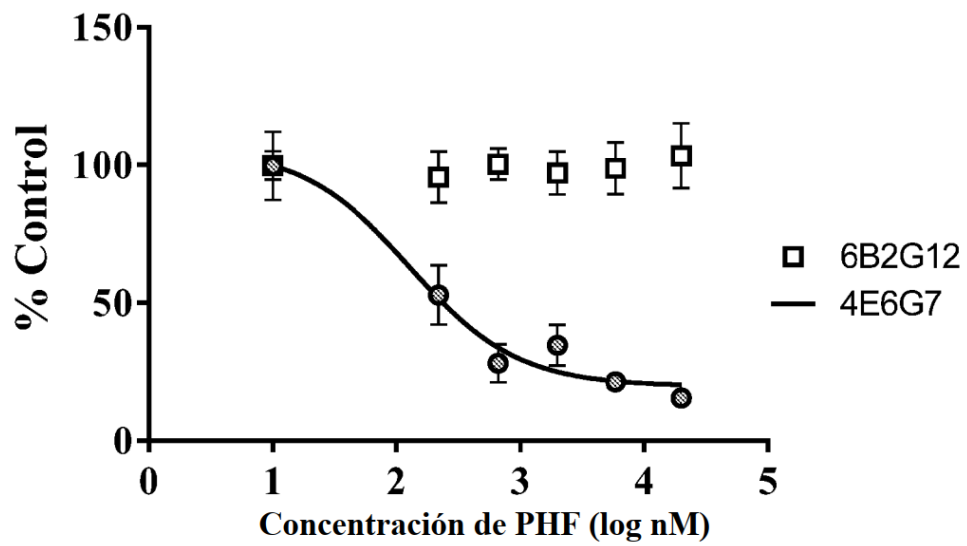


Figura 16, Paneles E y F