

ANTICUERPOS ANTI-TAU HUMANIZADOS

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad bajo 35 U.S.C. §119(e) No. de acta de los EE.UU. 62/170,036, presentada el 27 de junio de 2014, No. de acta de los EE.UU. 62/080.903, presentada el 17 de noviembre de 2014, y No. de acta de los EE.UU. 62/018,436, presentada el 2 de junio de 2015, los contenidos completos de las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] El material del listado de secuencias adjunto se incorpora en esta solicitud a través de la presente documentación a modo de referencia. El archivo de texto del listado de secuencias adjunto, de nombre C2N1120_4WO_Sequences_Listing, se creó el 26 de junio del 2015, y tiene un tamaño de 9 kb. Se puede acceder a este archivo usando Microsoft Word en una computadora que use Windows OS.

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención se relaciona con el campo de los anticuerpos humanizados y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a tau, y con métodos para usar dichos anticuerpos para tratar tauopatías. En particular, la presente invención se relaciona con un anticuerpo humanizado y fragmentos de unión a antígeno que se unen a epitopes específicos de tau y previenen el establecimiento de semillas de tau.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0004] Las tauopatías tienen en común la acumulación en el cerebro de proteína tau insoluble e hiperfosforilada. Más de 20 diferentes trastornos neurodegenerativos se caracterizan por algún grado de degeneración neurofibrilar y pueden clasificarse como tauopatías (Williams 2006). Las tauopatías prototípicas, tales como la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la degeneración corticobasal (CBD) se caracterizan por inclusiones de tau que son las lesiones únicas o bien las predominantes del sistema nervioso central. Las tauopatías prototípicas se diferencian de las otras tauopatías en donde se hallan agregados de tau en presencia de otras características neuropatológicas, tales como las placas de beta amiloide (A) halladas en la enfermedad de Alzheimer (AD) o los cuerpos de Lewy que se hallan en la enfermedad de Parkinson (PD). En estas tauopatías no prototípicas, es más incierto saber si la patología debida a tau representa el conductor primario de la enfermedad o si la misma es secundaria a otros plegamientos proteicos anómalos y a neurodegeneración.

[0005] La parálisis supranuclear progresiva (PSP, también conocida como síndrome de Steele-Richardson-Olszewski) es un trastorno neurodegenerativo progresivo, con una incidencia anual estimada de entre 5 y 7 por cada 100.000 (Golbe 2014). En de los Estados Unidos, la enfermedad afecta a aproximadamente 20.000 individuos. No existe una disparidad evidente geográfica, étnica, de género, o racial en la frecuencia de la PSP. La PSP inicialmente se puede presentar con síntomas clínicos similares a otros trastornos del cerebro, incluyendo a enfermedad de Parkinson idiopática. Por esta razón, el diagnóstico correcto de la PSP a veces se retrasa, teniendo lugar usualmente entre 1 y 3 años después del primer inicio de los síntomas clínicos.

El inicio de los síntomas ocurre con más frecuencia entre las edades de 50 y 70 años, y a pesar de que el curso clínico es variable, la supervivencia típica desde el momento del inicio de los síntomas es de entre 5 y 9 años (Houghton, 2007). A pesar de que existe una heterogeneidad en la presentación clínica, el síndrome de PSP más común y descrito inicialmente, ahora denominado como Síndrome de Richardson, es la presencia de una inestabilidad postural prominente y una rigidez axial que conduce a caídas, parálisis supranuclear de la mirada que causa un rango de deterioros de la visión, demencia fronto subcortical, y disfagia que conduce a aspiración. El curso de la enfermedad es progresivo y uniformemente fatal (Williams and Lees 2009).

[0006] Desde el punto de vista patofisiológico, la PSP se caracteriza por la acumulación anormal de agregados insolubles hiperfosforilados de proteína tau en neuronas y células de la glía en el tronco del encéfalo, cerebelo, ganglios basales, y corteza cerebral (Williams and Lees 2009). El grado y distribución de la agregación de tau en la PSP se correlaciona fuertemente con la sintomatología de la PSP durante la vida (Schofield y col. 2012). Los criterios de investigación del National Institute of Neurological Disorders and the Society for Progressive Supranuclear Palsy (NINDS-SPSP) que describen el Síndrome de Richardson son altamente predictivos de la patología subyacente de PSP (Litvan y col. 1996). Una pérdida de neuronas en varias regiones del cerebro acompaña a las marañas neurofibrilares (NFT) que se componen de agregados de tau. También surgen múltiples anormalidades de neurotransmisores, que incluyen a aquellas que afectan a los sistemas específicos dopaminérgico, colinérgico, GABAérgico, y noradrenérgico.

[0007] En la actualidad no existen tratamientos aprobados para la PSP (Stamelou y col. 2010). Los resultados negativos de los estudios de eficacia terapéutica en PSP impiden la recomendación de una terapia estándar basada en evidencias (Boxer y col. 2014). En ausencia de toda terapia eficaz modificadora de la enfermedad o neuroprotectora, la PSP representa una necesidad médica urgente incumplida.

[0008] La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva crónica común en donde existe una pérdida irreversible de funciones cognitivas y de comportamiento. La enfermedad puede mantenerse por más de 10 años, avanzando desde síntomas leves a manifestaciones extremadamente severas. Se dice que la AD afecta a aproximadamente el 10% de la población por sobre la edad de 65, y más del 30% de la población por arriba de la edad de 80. La enfermedad de Alzheimer se presenta a sí misma patológicamente como placas amiloides extracelulares y marañas neurofibrilares intracelulares. Las marañas neurofibrilares se componen, por ejemplo, de proteína tau unida a microtúbulos, la que se ensambla en hélices apareadas y filamentos rectos. Se ha sugerido que estas entidades pueden estar funcionalmente conectadas, a pesar de que no están claros los mecanismos por los que la deposición de amiloide promueve el ensamblaje patológico de filamentos de tau, o *vice versa*.

[0009] Las estructuras neurofibrilares intracelulares de las tauopatías (marañas neurofibrilares, neuritas distróficas, y redes de neutrofilos) tienen filamentos helicoidales apareados (PHF). La subunidad proteica mayor de las PHF es la proteína tau asociada a microtúbulos en forma anormalmente hiperfosforilada. Las neuronas con cambios neurofibrilares degeneran, y el grado

de esta degeneración se correlaciona directamente con el grado de demencia en los individuos afectados.

[0010] Otras tauopatías conocidas que tienen inclusiones celulares filamentosas que contienen proteína tau asociada a microtúbulos incluyen a la enfermedad de Pick (PiD), un grupo de trastornos relacionados que se denominan colectivamente como demencia frontotemporal con Parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística (DP), enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSSD), enfermedad de cuerpos de Lewy, encefalopatía traumática crónica (CTE), y enfermedad de Huntington. A pesar de que la etiología, los síntomas clínicos, los hallazgos patológicos y la composición bioquímica de las inclusiones celulares filamentosas en estas enfermedades son diferentes, existe una evidencia emergente que sugiere que los mecanismos involucrados en la asociación de las proteínas celulares normales para formar las diversas inclusiones filamentosas son comparables. Se cree que una alteración inicial en la conformación de la proteína tau asociada a microtúbulos, que actúa como iniciadora de la generación de núcleos o semillas para el ensamblaje de filamentos, es una de las características claves. Este proceso puede estar influenciado por la modificación postraduccional de las proteínas normales, por la mutación o eliminación de ciertos genes y por factores que unen a las proteínas normales y que por lo tanto alteran su conformación.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0011] Como un aspecto de la presente invención, se provee un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a tau. El anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena

pesada (VH) y una región variable de cadena liviana (VL), y cada una de las regiones VH y VL tienen una secuencia que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se establecen en las Figuras 1 y 2. Más particularmente, la región VL puede tener una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3 y 4 [VK1, VK2, VK3, y VK4], y la región VH puede tener una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 5, 6, 7 y 8 [VH1, VH2, VH3, y VH4]. En algunas formas de realización, la región VL tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 [VK2] y la región VH tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 [VH1]. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región Fc, que puede ser de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas o variantes de las mismas, tales como una IgG4 humana que contiene una mutación de estabilización de bisagra S241P. El anticuerpo puede comprender una región constante de cadena liviana de isotipo humano kappa o variantes de la misma. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento es scFv o Fab. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento humanizado o un anticuerpo o fragmento quimérico. El anticuerpo o fragmento puede ser un anticuerpo monoclonal. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento compite con el HJ8.5 por la unión específica a proteína tau humana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento se une a proteína tau humana con una constante de disociación en equilibrio (K_d) de por lo menos $10^{-4}M$.

[0012] Como otro aspecto de la presente invención, se provee un anticuerpo mutiespecífico o fragmento de unión a antígeno que tiene una pluralidad de regiones de unión a antígeno. Por lo menos una región de unión a

antígeno del anticuerpo multiespecífico o fragmento se une a proteína tau humana. Como alternativa, se provee un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno que tiene dos regiones de unión a antígeno. Una de las regiones de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico o fragmento se une a proteína tau humana. Como alternativa, se provee un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno en donde un brazo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno compite con el HJ8.5 por la unión específica a proteína tau humana. Como alternativa, se provee un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno en donde un brazo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno está comprendido por una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena liviana (VL), en donde cada una de las regiones VH y VL tiene una secuencia que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se establecen en las Figuras 1 y 2.

[0013] Cualquiera de los anteriores anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno además pueden comprender una carga útil tóxica, opcionalmente un conjugado con fármaco, o un radionúclido.

[004] Como aún otro aspecto de la presente invención, se provee una molécula aislada de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los anteriores anticuerpos o fragmento de unión a antígeno, o un región VH o región VL establecida en las Figuras 1 o 2. Se puede proveer un vector (tal como un vector de expresión) que comprende dicha molécula de ácido nucleico. Se puede proveer una célula huésped aislada que comprende dicho vector. La célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota, tal como una célula de mamífero.

[0015] Como otro aspecto de la presente invención, se provee una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende cualquiera de los anteriores anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, o una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0016] Como aún otro aspecto de la presente invención, se provee una secuencia aislada de aminoácidos que contiene la secuencia de una de las cadenas livianas como se establece en las Figuras 1 y 2. Como alternativa o además, se provee una secuencia aislada de aminoácidos que contiene la secuencia de una de las cadenas pesadas como se establece en las Figuras 1 y 2.

[0017] Como un aspecto adicional de la presente invención, se provee un anticuerpo humanizado aislado o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos DQGGYT (SEQ ID NO: 9). El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede contener las CDR de las regiones VH y VL que son de un anticuerpo donante. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una región Fc, tal como una región Fc que es de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una variante de las mismas. La región Fc puede ser de una IgG4 humana o variante de la misma, tal como una IgG4 humana que contiene la mutación de estabilización de bisagra S241P. El anticuerpo puede comprender una región constante de cadena liviana de isotipo humano kappa o variantes de las mismas. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento es scFv o Fab. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento humanizado o un anticuerpo o fragmento quimérico. El anticuerpo o fragmento puede ser un

anticuerpo monoclonal. El anticuerpo o fragmento puede ser un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno en donde un brazo del anticuerpo o fragmento se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos DQGGYT (SEQ ID NO: 9). En algunas formas de realización, se provee un inmunoconjugado que comprende uno de los anteriores anticuerpos o fragmentos conectados a una porción detectable o terapéutica.

[0018] Como otro aspecto, se provee un anticuerpo humanizado aislado o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos GYTMHQDQ (SEQ ID NO: 10). El anticuerpo o fragmento puede tener las CDR de las regiones VH y VL de un anticuerpo donante. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento comprende una región Fc, tal como una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una variante de las mismas. La región Fc puede ser de una IgG4 humana y variantes de la misma que contienen la mutación de estabilización de bisagra S241P. El anticuerpo puede comprender una región constante de cadena liviana. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento es un scFv o Fab. También se provee un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno en donde un brazo del anticuerpo se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos GYTMHQDQ (SEQ ID NO: 10). En algunas formas de realización, un inmunoconjugado que comprende cualquiera de los anteriores anticuerpos o fragmentos se conecta a una porción detectable o terapéutica.

[0019] Como un aspecto adicional de la presente invención, se provee un método para prevenir o tratar una tauopatía en un sujeto, que comprende administrar a un humano que lo requiere una terapia por una tauopatía uno o

más de los anticuerpos o fragmentos descritos en la presente. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se administran bajo condiciones y en una cantidad eficaz como para prevenir o tratar la tauopatía. La tauopatía puede ser uno o más de enfermedad de Alzheimer (AD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (CBD), enfermedad de Pick (PiD), un grupo de trastornos relacionados que se denominan colectivamente como demencia frontotemporal con Parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística (DP), enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSSD), enfermedad de cuerpos de Lewy, encefalopatía traumática crónica (CTE), o enfermedad de Huntington.

[0020] Se provee un método para tratar una tauopatía que comprende administrar un anticuerpo anti-tau o fragmento a un sujeto que requiere tratamiento, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a tau y comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena liviana (VL), en donde cada una de las regiones VH y VL tiene una secuencia que se selecciona de las secuencias de aminoácidos que se establecen en las Figuras 1 y 2, y el anticuerpo o fragmento se administra en una dosis de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg al sujeto, como alternativa entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento tiene una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 1, 2, 3 y 4 [VK1, VK2, VK3, y VK4]; como alternativa o además, el anticuerpo o fragmento tiene una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos

que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 5, 6, 7 y 8 [VH1, VH2, VH3, y VH4].

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0021] La Figura 1 muestra las secuencias de región variable del anticuerpo murino HJ8.5 así como también 4 secuencias de variantes humanizadas para cada una de las cadenas pesadas y livianas (4 secuencias de VH y 4 de VL/VK). La Figura 1 muestra las secuencias para MuVL (SEQ ID NO:11); VK1 (SEQ ID NO:1); VK2 (SEQ ID NO:2); VK3 (SEQ ID NO:3); VK4 (SEQ ID NO:4); MuVH (SEQ ID NO:12); VH1 (SEQ ID NO:5); VH2 (SEQ ID NO:6); VH3 (SEQ ID NO:7); VH4 (SEQ ID NO:8).

[0022] La Figura 2A muestra la secuencia de la región variable humanizada y de región constante para la cadena pesada VH1 (SEQ ID NO:13). La Figura 2B muestra la secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena pesada VH2 (SEQ ID NO:14). La Figura 2C muestra la secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena pesada VH3 (SEQ ID NO:15). La Figura 2D muestra la secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena pesada VH4 (SEQ ID NO:16). La cadena pesada variable está injertada en la cadena pesada constante de la IgG4 humana que contiene una mutación de estabilización de bisagra S241P. La Figura 2E muestra la secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena liviana VL2 (SEQ ID NO:17). La Figura 2F muestra la secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena liviana VL2 (SEQ ID NO:18). La Figura 2G muestra la secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena liviana VL3 (SEQ ID NO:19). La Figura 2H muestra la

secuencia de la región variable humanizada y de la región constante para la cadena liviana VL4 (SEQ ID NO:20).

[0023] La Figura 3 muestra los datos de expresión de dos rondas de expresión transitoria de células transfectadas con polinucleótidos que codifican para las regiones VH y VK. Se resumen los resultados para 13 anticuerpos anti-tau humanizados en base a las diferentes combinaciones de regiones variables de cadena pesada y liviana humanizadas, con diferentes niveles de expresión observada.

[0024] La Figura 4 muestra los datos de un ensayo de potencia que evalúa la capacidad de los presentes anticuerpos anti-tau para competir con el HJ8.5 murino original (anticuerpo parental) por la unión a tau humana en un formato tipo ELISA.

[0025] La Figura 5 resume los resultados del análisis por resonancia de plasmón superficial (SPR), que determinan la cinética de unión de las seis construcciones humanizadas con mejor expresión contra tau humana.

[0026] La Figura 6 muestra la unión de cuatro variantes de anticuerpos humanizados a tau humana soluble en un ELISA estilo sándwich.

[0027] Las Figuras 7A a 7H muestran la unión de anticuerpos humanizados y control a tejido de ratones de tipo salvaje (tejido control negativo), ratones P301S (que expresan tau humana que tiene una mutación P301S y que desarrollan patología derivada de tau asociada con la edad), y humanos con enfermedad de Alzheimer o bien parálisis supranuclear progresiva (PSP). Figura 7A. Unión de quimera (control positivo) a tejido de ratón y de humano; Figura 7B. Unión de IgG4 humana no específica (control negativo) a tejido de ratón y de humano. Figura 7C. Unión de VH1/VK2 a tejido de ratón y de humano. Figura

7D. Unión de VH1/VK3 a tejido de ratón y de humano. Figura 7E. Unión de VH2/VK2 a tejido de ratón y de humano. Figura 7F. Unión de VH2/VK3 a tejido de ratón y de humano. Figura 7G. Unión de VH3/VK2 a tejido de ratón y de humano. Figura 7H. Unión de VH3/VK3 a tejido de ratón y de humano.

[0028] La Figura 8 muestra el mapeo de epítopo para el anticuerpo murino HJ8.5 contra la secuencia de aminoácidos de tau humana. La Figura 8 muestra las secuencias de tau humana, de mono rhesus y de ratón (SEQ ID NOs: 21, 22 y 23, respectivamente).

[0029] La Figura 9 muestra el mapeo de epítopo detallado basado en péptido de HJ8.5 y C₂N- 8E12. El mapeo indica que el epítopo de unión de C₂N- 8E12 es ₂₅DQGGYT₃₀ (SEQ ID NO: 9) y coincide con el epítopo del parental murino, HJ8.5. La Figura 9 muestra las secuencias de los péptidos PEP_2875800 a PEP_2875830 (SEQ ID NOs: 24 a 54, respectivamente).

[0030] La Figura 10 ilustra los resultados de unión para diferentes anticuerpos anti-tau humana a tau humana o de mono Rhesus. Los resultados demuestran que C₂N-8E12 y HJ8.5 no se unen a tau de Rhesus mientras que sí muestran unión positiva a tau humana. El HJ8.7 se une tanto a tau humana como de Rhesus.

[0031] La Figura 11 muestra la unión de anticuerpos humanizados anti-tau a tau en CSF de sujetos humanos con diversas tauopatías. Se evaluó la unión de C₂N-8E12 a tau en las muestras de CSF de los sujetos diagnosticados con una variedad de tauopatías.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0032] Existe una fuerte evidencia experimental y base lógica biológica para apoyar la estrategia de inmunoterapia contra tau como una forma de tratar

la patología de tau en la neurodegeneración. Primero, la tau normalmente es una proteína altamente soluble, nativamente no plegada e intracelular, de forma que es improbable que un anticuerpo extracelular afecte las funciones normales de tau. Segundo, el agravamiento de la patología relacionada con tau se correlaciona con disfunción neuronal progresiva, pérdida de sinapsis, y declinación funcional en humanos y en modelos de ratones transgénicos de tauopatía. Tercero, las bajo las condiciones patológicas, la proteína tau se pliega mal y se agrega en forma de marañas neurofibrilares intraneuronales (NFT) compuestas de fibrillas de tau patológica. En las tauopatías humanas, esta patología progresa desde una región a otra del cerebro en patrones específicos de la enfermedad. Los datos experimentales sugieren que los agregados de tau pueden dispersarse de célula a célula para inducir una agregación adicional de tau y una dispersión de la patología relacionada con tau en el cerebro. Estos datos sugieren que los agregados producidos en una célula se liberan al espacio extracelular y pueden promover la agregación en células vecinas o conectadas. Finalmente, existe un arte previo que demuestra que los anticuerpos anti-tau pueden prevenir o enlentecer la progresión de la patología relacionada con tau en el cerebro de ratones que portan una forma mutada de tau humana.

[0033] Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se ha modificado para reducir el riesgo de que anticuerpos no humanos produzcan una respuesta inmunológica en humanos después de la administración. Un anticuerpo humanizado, tal como se usa en la presente, se une inmuno específicamente al mismo epítopo o a uno similar en comparación con un anticuerpo no humano (anticuerpo donante). En algunas formas de realización un anticuerpo humanizado comprende una región

de esqueleto (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos que un anticuerpo humano y una región determinante de complementaridad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos que un anticuerpo no humano. El término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos los por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en donde todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones de esqueleto son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En la invención se provee un anticuerpo humanizado que comprende una nueva región de esqueleto.

[0034] En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana así como también por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena liviana humanizada. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En formas de realización

específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o cadena pesada humanizada.

[0035] El anticuerpo se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo a IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y de cualquier isotipo, incluyendo a título enunciativo no taxativo a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en el arte.

[0036] El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en: una Fv conectada por disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un fragmento variable de cadena individual (scFv), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un *diabody*, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo multiespecífico, un Fab (fragmento de unión a antígeno), un anticuerpo biespecífico, un F(ab')₂ (un fragmento de unión a antígeno de brazo dual típicamente preparado por clivaje de un anticuerpo con pepsina), un Fab' (el resultado de la división de un F(ab')₂ en dos fragmentos de unión a antígeno, típicamente por reducción suave), o un Fv (un fragmento variable de unión a antígeno).

[0037] El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y cadena liviana de una especie y secuencias de región constante de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y cadena liviana murinas conectadas a regiones constantes humanas.

[0038] Los términos "región VH", "región VL" o "región VK" se refieren a la región variable de la cadena pesada (VH), la región variable de la cadena

liviana lambda (VL) o la región variable de la cadena liviana kappa (VK), respectivamente. Las regiones VH y VL además se puede subdividir en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementaridad (CDR), interespaciadas por regiones que están más conservadas, llamadas regiones de esqueleto (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, acomodadas en dirección amino-terminal a carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

[0039] El término “esqueleto” o “secuencia de esqueleto” se refiere a el resto de las secuencias de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede estar determinada por diferentes sistemas, el significado de una secuencia de esqueleto está sujeto correspondientemente a diferentes interpretaciones. Las seis CDR (CDR-L1, -L2, y -L3 de la cadena liviana y CDR-H1, -H2, y -H3 de la cadena pesada) también dividen las regiones de esqueleto de la cadena liviana y de la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en donde la CDR1 se posiciona entre la FR1 y la FR2, la CDR2 entre la FR2 y la FR3, y la CDR3 entre la FR3 y la FR4. Sin especificar la subregión particular como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de esqueleto, según otros autores, representa la FR combinada dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina individual de origen natural. Una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región de esqueleto.

[0040] Muchas inmunoglobulinas humanizadas que se han descrito previamente (Jones y col., Verhoeyen y col., Riechmann y col.) han comprendido un esqueleto que es idéntico al esqueleto de una cadena particular de inmunoglobulina humana, la aceptora, y tres CDR de una cadena donante de inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo "humanizado anti-tau" se refiere a un anticuerpo que se ha generado a partir de un anticuerpo no humano (donante) capaz de unirse a tau, y dicha unión se transfiere a un anticuerpo humano (aceptor).

[0041] El término "CDR" se refiere a la región determinante de complementaridad dentro de las secuencias variables de un anticuerpo. Existen tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana, que se designan como CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. Las secuencias de aminoácidos de las CDR de las regiones VH y VL/K de la invención reivindicada se establecen en la Figura 1.

[0042] Tal como se usa en la presente, el término Fv de cadena individual, también denominado como anticuerpo de cadena individual, se refiere a construcciones modificadas de anticuerpo preparadas mediante los pasos de aislar los dominios de unión (tanto de cadena pesada como liviana) de un anticuerpo de unión, y proveer una porción de conexión que permite la conservación de la función de unión. Un péptido conector insertado entre las dos cadenas permite la estabilización de los dominios variables sin interferir con el plegado apropiado ni la creación de un sitio de unión activo. Este conector puede tener entre 5 y 30 aminoácidos de longitud y típicamente consiste en repeticiones de la secuencia de aminoácidos "GGGGS" ((Gly)4Ser) (SEQ ID NO: 55). Esto

forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solamente el dominio variable necesario para la unión al antígeno.

[0043] Los *diabodies*, *triabodies*, y *tetrabodies* y otras variantes superiores típicamente se crean mediante la variación de la longitud del péptido conector al que se hizo referencia previamente, de entre cero y varios aminoácidos. Las variantes son anticuerpos multivalentes, multiespecíficos en donde los dominios VH y VL se expresan sobre una cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando así a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., y col. (1994) Structure 2: 1121-1123). Dichas porciones de unión de anticuerpo son conocidas en el arte (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. p. 790 (ISBN 3-540-41354-5). Como alternativa, también es bien sabido en el arte que se pueden crear variantes de anticuerpos de unión multivalentes usando unidades de autoensamblaje conectadas al dominio variable.

[0044] Los anticuerpos biespecíficos, triespecíficos, o de múltiples especificidades se crean mediante la combinación de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo con las cadenas pesadas y livianas de uno o más de otros anticuerpos. Estas cadenas pueden estar conectadas en forma covalente. Por ejemplo, el término " anticuerpo biespecífico" se refiere a anticuerpos de longitud completa que se generan por tecnología de cuadroma (véase Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934): 537-40), por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (véase Staerz y col. (1985) Nature

314(6012): 628-31), o por *knob-into-hole* o estrategias similares que introducen mutaciones en la región Fc (véase Holliger y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14): 6444-6448), resultando en múltiples diferentes especies de inmunoglobulina de las cuales solamente una es el anticuerpo biespecífico funcional. Por su función molecular, un anticuerpo biespecífico se une a un antígeno (o epítopo) en uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC), y se une a un antígeno (o epítopo) diferente en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). Un anticuerpo biespecífico tiene dos brazos de unión a antígeno distintos (tanto en especificidad como en secuencias de CDR), y es monovalente para cada antígeno al que se une.

[0045] Se han construido una serie de anticuerpos murinos capaces de unirse a tau usando métodos conocidos en el arte. Véase Holtzman y col., WO2014/08404. Además, se han seleccionado estos anticuerpos para identificar anticuerpos con alguna actividad biológica específica que los haga candidatos adecuados para usos terapéuticos.

[0046] En un aspecto, la presente divulgación provee anticuerpos humanizados compuestos. La tecnología de Composite Human Antibody™ genera anticuerpos humanizados mediante la identificación de epítopos potenciales para células T en las secuencias de región variable (región V) del anticuerpo donante y modificando los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de tal forma que se elimina la unión a los epítopos potenciales para células T (véase EP2.388.871). Contrariamente a otras tecnologías de humanización que usan un esqueleto individual de región V de cadena liviana y cadena pesada humanas o esqueleto consenso humano como “aceptores” de cadena liviana y pesada para las respectivas regiones determinantes de

complementaridad (CDR) del anticuerpo donante (típicamente murino); los Composite Human Antibodies™ comprenden múltiples segmentos de secuencia (“compuestos”) derivados de regiones V de múltiples anticuerpos humanos no relacionados.

[0047] Se seleccionan segmentos de secuencia derivados de bases de datos de regiones V humanas no relacionadas después de determinar los aminoácidos que se consideran críticos para la unión a antígeno del anticuerpo de partida. Se filtran todos los segmentos de secuencia seleccionados derivados de las bases de datos de regiones V humanas según la presencia de epitopes potenciales para células T CD4+ usando herramientas *in silico* conocidas en el arte. Los Composite Human Antibodies™ retienen la afinidad y especificidad mejor que los anticuerpos humanizados estándares debido al ajuste fino de los segmentos de secuencia humana con todas las secciones de las regiones V del anticuerpo de partida. Los Composite Human Antibodies™ no tienen epitopes de células T y por lo tanto se consideran tanto humanizados como desinmunizados.

[0048] En una forma de realización las regiones variables murinas de un anticuerpo donante reemplazan a las regiones variables humanas en una IgG aceptora humana resultando en un anticuerpo quimérico.

[0049] En una forma de realización adicional las secuencias murinas de CDR de un anticuerpo donante reemplazan a las secuencias de CDR en una IgG aceptora humana para crear un anticuerpo humanizado. Se incorporan cambios adicionales al anticuerpo humanizado para eliminar los epitopes potenciales para células T y los residuos de esqueleto considerados críticos para mantener las características de unión del anticuerpo donante. Las personas con experiencia

en el arte han de saber que se pueden usar otros métodos tales como el injerto de CDR para humanizar un anticuerpo.

[0050] En una forma de realización adicional se humanizan anticuerpos no humanos capaces de unirse a tau humana.

[0051] Los presentes anticuerpos pueden exhibir afinidad de unión alterada y/o inmunogenicidad alterada en comparación con los anticuerpos donantes. En algunas formas de realización, anticuerpos quiméricos o humanizados tienen sustancialmente la misma afinidad de unión que el anticuerpo donante con respecto a un epítopo de tau.

[0052] En una forma de realización adicional, un fragmento variable de cadena individual basado en un anticuerpo humanizado como se describe en la presente, por ejemplo, anticuerpo anti-tau humanizado, puede unirse como monómero.

[0053] En una forma de realización adicional se puede conseguir una unión multivalente usando fragmentos de anticuerpo mediante el uso de *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies*, y otras variantes de orden mayor, que se pueden preparar.

[0054] En una forma de realización adicional, se pueden combinar las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo humanizado anti-tau con las cadenas pesadas y livianas de otros anticuerpos para formar anticuerpos biespecíficos u otros multiespecíficos adicionales.

[0055] Además los anticuerpos humanizados de la invención, por ejemplo, los anticuerpos humanizados anti-tau también pueden estar en la forma de un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fab, un monómero Fab', un dímero F(ab)'₂, o una molécula inmunoglobulina completa.

[0056] En una forma de realización, la invención provee un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos DQGGYT (SEQ ID NO: 9). Este péptido es un epítopo nuclear para los anticuerpos descritos en la presente como C2N-8E12 o HJ8.5. En un aspecto de la invención, el péptido incluye a $X_{(0-8)}$ DQGGYTX₍₀₋₈₎ (SEQ ID NO: 56) en donde X es cualquier aminoácido. Mientras que el ejemplo ilustrativo muestra 15 meros (véase la Figura 11), las personas con experiencia en el arte han de reconocer que en la invención se incluyen péptidos de diferentes longitudes. En consecuencia, los presentes anticuerpos o fragmentos se pueden unir específicamente a un epítopo que contiene la secuencia de aminoácidos DQGGYT (SEQ ID NO: 9). El epítopo puede ser un epítopo lineal o conformacional y puede tener entre aproximadamente 6 y 22 aminoácidos de longitud.

[0057] En otras formas de realización, los presentes métodos se relacionan con el tratamiento de una tauopatía con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde el anticuerpo o fragmento se administra en una dosis a un sujeto que tiene una tauopatía.

[0058] Las dosis adecuadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se pueden expresar en términos de mg de fármaco por kg de peso corporal del sujeto. Las dosis adecuadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno incluyen por lo menos aproximadamente 0,1 mg/kg, como alternativa aproximadamente 0,2 mg/kg, como alternativa aproximadamente 0,25 mg/kg, como alternativa aproximadamente 0,3 mg/kg, como alternativa aproximadamente 0,5 mg/kg, como alternativa aproximadamente 0,75 mg/kg, como alternativa aproximadamente 1 mg/kg, como alternativa aproximadamente 1,25 mg/kg, como alternativa aproximadamente 1,5 mg/kg, como alternativa

aproximadamente 2 mg/kg, como alternativa aproximadamente 5 mg/kg, como alternativa aproximadamente 7,5 mg/kg, como alternativa aproximadamente 10 mg/kg, como alternativa aproximadamente 12,5 mg/kg, como alternativa aproximadamente 15 mg/kg, como alternativa aproximadamente 20 mg/kg, como alternativa aproximadamente 25 mg/kg, como alternativa aproximadamente 30 mg/kg, como alternativa aproximadamente 50 mg/kg, como alternativa aproximadamente 100 mg/kg. Las dosis adecuadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden ser como máximo de aproximadamente 250 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 200 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 175 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 150 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 125 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 100 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 75 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 50 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 25 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 20 mg/kg, como alternativa como máximo de aproximadamente 15 mg/kg. Cualquiera de los mínimos y máximos anteriores pueden ponerse juntos para definir un rango (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg), con la condición de que el valor mínimo del rango sea inferior que el valor máximo del rango.

[0059] Las dosis adecuadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se pueden expresar en términos de mg de fármaco administrado a un sujeto. Las dosis adecuadas del anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno incluyen por lo menos aproximadamente 2,5 mg, como alternativa por

lo menos aproximadamente 5 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 10 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 15 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 20 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 25 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 30 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 40 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 50 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 60 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 70 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 80 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 90 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 100 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 125 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 150 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 175 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 200 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 250 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 100 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 125 mg, como alternativa por lo menos aproximadamente 300 mg. Las dosis adecuadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno pueden ser como máximo de aproximadamente 2500 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 2000 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 1500 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 1000 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 750 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 500 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 400 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 300 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 275 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 250 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente

200 mg, como alternativa como máximo de aproximadamente 150 mg. Cualquiera de los valores mínimos y máximos anteriores pueden ponerse juntos para definir un rango (por ejemplo, entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 2500 mg, con la condición de que el valor mínimo del rango sea menor que el valor máximo del rango.

[0060] C₂N-8E12 es un anticuerpo anti-tau humana humanizado recombinante de IgG4. El esqueleto de IgG4 del C₂N-8E12 contiene una mutación de estabilización de bisagra S241P que minimiza la formación de medios anticuerpos. El C₂N-8E12 se une a los aminoácidos 25 a 30 en la tau humana (DQGGYT) (SEQ ID NO: 9), una secuencia que está presente en todas las variantes de corte y empalme de la tau humana, así como también en los fragmentos amino terminales de tau. El anticuerpo se une tanto a tau monomérica como a tau agregada en el tejido cerebral humano de pacientes con tauopatías. El C₂N-8E12 es altamente estable con muy poca agregación o degradación. Las propiedades físicas generales del C₂N-8E12 se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1

Peso molecular	145,72 kDa
Estereoquímica	L-aminoácidos
Apariencia	Líquido transparente, incoloro a amarillo
Solubilidad	~130 mg/mL

[0061] A pesar de que la invención se ha descrito en referencia a los ejemplos adjuntos, ha de comprenderse que las modificaciones y variaciones están abarcadas dentro del espíritu y alcance de la invención. Lo que sigue son

ejemplos ilustrativos de la invención y se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

Ejemplo 1

[0062] Este ejemplo describe el trabajo y los resultados para la humanización del anticuerpo murino anti-tau HJ8.5. El trabajo resultó en cuatro regiones variables de cadena liviana humanizadas (VL o VK) y cuatro regiones variables de cadena pesada humanizadas (VH).

[0063] La humanización generalmente se refiere a técnicas para reducir la inmunogenicidad potencial asociada con el uso de un anticuerpo monoclonal no humano para un tratamiento crónico. Dos métodos típicamente usados para reducir la inmunogenicidad son el injerto de CDR y la desinmunización. El anticuerpo murino HJ8.5 se desinmunizó usando un método desarrollado por Antitope.

[0064] El injerto de CDR es una estrategia de modificación de proteínas. Brevemente, la misma se basa en una comprensión de la arquitectura básica de un anticuerpo y su conservación a través de las especies. Los anticuerpos murinos y humanos comparten una arquitectura común / conservada. La estructura del anticuerpo se divide en regiones constantes y variables. La región variable se puede dividir además en las llamadas regiones de esqueleto y regiones de CDR. Puede verse que la región variable está compuesta por cuatro esqueletos (Fwk) y tres CDR. El acomodamiento de los esqueletos y CDR es el mismo en los dominios variables de cadena liviana y pesada.

[0065] En el injerto de CDR, las regiones constantes no humanas se reemplazan por regiones constantes humanas, dando origen al llamado anticuerpo quimérico. Además, las regiones de CDR murinas se transfieren a

regiones de esqueleto humano; el dominio variable resultante es una mezcla de esqueletos humanos y CDR murinas. Como paso final, se transfieren varios residuos de esqueleto murino, que se cree que tienen un rol crítico para mantener la afinidad (no mostrado).

[0066] Desinmunización: la tecnología Composite Human Antibody™ de Antitope es una tecnología de desinmunización que se usa en conjunto con la identificación de las CDR y de aminoácidos claves en el esqueleto que se cree que tienen un rol en la unión. Los anticuerpos totalmente humanizados resultantes retienen la afinidad de unión y la especificidad del anticuerpo monoclonal de partida y también están desprovistos de epitopes de células T CD4+, lo que evita una inmunogenicidad indeseable en los humanos.

[0067] Los Composite Human Antibodies™ se generan por la combinación de múltiples segmentos de secuencias de anticuerpo humano de la base de datos de Antitope que comprende en el orden de 100.000 secuencias de regiones variables de anticuerpos humanos totalmente no relacionados. El modelado inicial de las secuencias de región variable del anticuerpo HJ8.5 se usa para identificar los aminoácidos críticos para la unión del anticuerpo, que luego se usan para limitar la selección de los segmentos de secuencias humanas. Luego se analizan los segmentos de secuencias individuales y los empalmes entre segmentos adyacentes usando dos tecnologías *in silico* registradas (iTope™ y TCED™) para la selección de secuencias de región variable totalmente humanas que están desprovistas de epitopes de células T CD4+. El ADN que codifica para las regiones variables de los Composite Human Antibodies se sintetiza, se clona en un vector de expresión con regiones

constantes humanas y se transfecta a células de mamífero para la producción de los anticuerpos humanizados.

[0068] Humanización de HJ8.5: se produjeron modelos estructurales de las regiones V del anticuerpo murino HJ8.5 anti-Tau412 usando Swiss **PDB** y se analizaron para identificar los aminoácidos “limitantes” importantes en las regiones V que probablemente eran esenciales para las propiedades de unión del anticuerpo. A partir del análisis, se identificaron varios residuos de esqueleto limitantes como candidatos para su inclusión en las regiones V totalmente humanizadas. Se seleccionaron segmentos de secuencias de región variable humanas que incluían a uno o más de estos residuos.

[0069] Se seleccionó un grupo preliminar de segmentos de secuencias humanas que se podían usar para crear los anticuerpos HJ8.5 totalmente humanizados, y se analizaron usando la tecnología iTope™ para el análisis *in silico* de la unión de los péptidos a alelos de MHC humana de clase II (Perry y *col* 2008), y usando la TCED™ (T Cell Epitope Database) de epitopes de células T relacionados con secuencias de anticuerpos conocidos (Bryson y *col* 2010). Se descartaron los segmentos de secuencia que se identificaron como unidores significativos de línea germinal no humana a MHC humana de clase II o que presentaron hallazgos de puntuación significativa contra la TCED™. También se analizaron las combinaciones de segmentos de secuencia para asegurar que los empalmes entre los segmentos no contenían epitopes potenciales para células T. Luego se combinaron para la síntesis los segmentos seleccionados para producir secuencias de regiones V de cadena pesada y liviana. Para el HJ8.5, se diseñaron y construyeron cuatro cadenas VH y cuatro cadenas Vk.

[0070] La Figura 1 muestra las secuencias de región variable del anticuerpo murino HJ8.5 así como también 4 secuencias de variantes humanizadas para cada una de las cadenas pesadas y livianas (4 secuencias VH y 4 VLNK). Las secuencias de aminoácidos de estas cuatro cadenas VH y cuatro cadenas VK se establecen en la Figura I. Las secuencias de CDR, según la definición de Kabat y col, están destacadas en color rojo (con subrayado). Los cambios de esqueleto desde la secuencia original de ratón están destacados en color azul y en negrita.

[0071] La Tabla B-1 resume el número de cambios en la región de esqueleto que se introdujeron en cada variante de los dominios variables de cadena pesada y liviana.

Tabla B-1

Dominio Variable	Número de esqueletos canes
VH1	4
VH2	5
VH3	10
VH4	11
VK1	6
VK2	7
VK3	11
VK4	12

[0072] La Figura 2 muestra las secuencias de las secuencias de región variables y constantes humanizadas para cada una de las cadenas pesadas y livianas (4 secuencias VH y 4 VL/VK). La cadena pesada variable se injerta a la cadena pesada constante de la IgG4 humana que contiene la mutación de estabilización de bisagra S241P. La cadena liviana variable se injerta a la cadena liviana constante de la cadena liviana kappa humana. Esta tabla también presenta una lista de los puntos isoeléctricos (PI) y pesos moleculares (PM) teóricos.

[0073] La Figura 3 muestra datos de expresión de 2 rondas de expresión transitoria de células transfectadas con polinucleótidos que codifican para regiones VH y VK. Se resumen los resultados para 13 anticuerpos anti-tau humanizados. Las diferentes combinaciones de cadenas pesadas y livianas resultaron en niveles de expresión marcadamente diferentes observados. En la Ronda 1, se combinaron entre sí todas variantes de regiones VH y VL (se muestran solamente los resultados de 13 de los 16 que se ensayaron. En la Ronda 2, se ensayaron las 6 combinaciones con mejor expresión de la Ronda 1. La expresión se muestra como µg de anticuerpo medido por mL de medio de cultivo. Los niveles de expresión más altos son ventajosos debido a que ellos resultan en que el anticuerpo se pliega correctamente, se secreta según lo esperado, y es no tóxico y en general estable.

[0074] La Figura 4 muestra datos de un ensayo de potencia. Para caracterizar aún más las variantes anticuerpo humanizado anti-tau, el ensayo de potencia evalúa la capacidad de los anticuerpos para competir con el anticuerpo HJ8.5 murino original (anticuerpo parental) por la unión a tau humana en un formato tipo ELISA. El formato del ensayo implica recubrir la placa de ELISA con

tau humana y luego permitir que los anticuerpos de prueba, así como también HJ8.5 biotinilado, compitan por la unión a tau. El ensayo permite medir el valor de IC50 relativa para cada variante de anticuerpo humanizado. Los valores de IC50 se normalizan al del HJ8.5 quimérico para permitir hacer comparaciones entre las placas. Estos datos demuestran que el proceso de humanización no ha cambiado significativamente la unión de los anticuerpos humanizados a tau humana.

Ejemplo 2

[0075] Este estudio describe el uso de Biacore T200 para medir y comparar las características de unión de la interacción entre seis anticuerpos monoclonales completamente humanizados (VH1/VK2, VH1/VK3, VH2/VK2, VH2/VK3, VH3/VK2 y VH3/VK3, descritos previamente en el Ejemplo 1) y un anticuerpo monoclonal quimérico basado en HJ8.5 con la proteína recombinante tau humana-412. El objetivo de este estudio fue usar el instrumento de resonancia de plasmón superficial Biacore T200 para la caracterización cinética de alta resolución de las interacciones entre Tau-412 y estos siete mAb.

[0076] Se almacenaron los anticuerpos a 4 °C. La Tau-412 se almacenó a -20 °C según las instrucciones del fabricante. Una vez reconstituida, la solución de Tau-412 se almacenó en hielo y se usó antes de las 24 horas. Se congelaron alícuotas de Tau-412 reconstituida antes de los 30 minutos de su reconstitución y se almacenaron a -20 °C.

[0077] El instrumento Biacore se corrió con el Biacore T200 Evaluation Software V1.1 (Uppsala, Suecia). Todos los materiales fueron de Biacore a menos que se indique otra cosa:

Series S CM5 Sensor Chips	BR-1006-68
Conjunto de componentes de acoplamiento de amina	BR-1000-50
Acetato 10 mM a pH 4,5	BR-1003-51
Solución amortiguadora de corrida HBS-EP	BR-1006-69
Glicina-HCl 10 mM pH 1,5	BR-1003-54
Glicina-HCl 10 mM pH 2,0	BR-1003-55
Proteína A (Sigma)	P6031
MgCl ₂ 4 M hexahidratado (Sigma)	M9272-500G

[0078] Todos los experimentos se desarrollaron con el programa Biacore 'wizard'. Se usaron los siguientes métodos de Biacore: Inmovilización; Cinética/Afinidad; y Desorb y Sanitización.

[0079] Antes de correr cualquiera de las muestras, y durante el estudio, se llevó a cabo una verificación del sistema (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Todas las verificaciones de sistema fueron satisfactorias (bomba de reactivo, Refractómetro, Inyecciones, Ruido, Mezclado y Selector de Solución amortiguadora) indicando que el instrumento estaba respondiendo según los criterios del fabricante.

[0080] Ante la inserción de un chip de CM5/Proteína A, se cebó el sistema y luego se normalizó con solución de normalización de BIA (Biacore Preventative Maintenance Kit 2). Todas las muestras se corrieron a 25 °C con un soporte para muestras incubado a 5 °C. El chip se agregó al sistema con HBS-EP usado como solución amortiguadora de corrida.

[0081] Se almacenaron los mAb tal como se los recibió y se diluyeron a 100 nM para todas las corridas de normalización (captura). Se reconstituyó el antígeno Tau-412 a partir de polvo seco usando agua Milli-Q a una concentración

final de 1 mg/mL; se llevaron a cabo diluciones adicionales para las corridas de cinética. La masa y el peso molecular de la Tau-412 usados en el cálculo de la concentración fueron provistos por el fabricante del reactivo (100 µg/vial y 42,9 kDa). No se agregó proteína vehículo a esta solución. Los viales de antígeno solamente se reconstituyeron cuando así se requirió y se almacenaron en su forma de polvo a -20 °C hasta su uso. Una vez reconstituida, la solución de antígeno se mantuvo en hielo y se usó dentro de las 24 horas.

[0082] Para este estudio se seleccionó un ensayo de captura con Proteína A. El desempeño de la superficie de Proteína A fue superior a las superficies de anti-humano, proteína A/G, proteína G y proteína L, que también se ensayaron. El chip de Proteína A se preparó mediante inmovilización usando química estándar de acoplamiento de amina. La inmovilización se llevó a cabo a una concentración de proteína de 5 µg/mL en solución amortiguadora de acetato 10 mM a pH 4,5 a un nivel de respuesta blanco de 500 RU en un chip sensor CM5 Series S (Biacore).

[0083] Los niveles de respuesta final para el chip de Proteína A 'Todos' y las F_c designadas se muestran en la Tabla G-1.

Tabla G-1

	Ligando	Nivel de respuesta final (RU)
F_c1	Proteína A	697,1
F_c2	Proteína A	691,4
F_c3	Proteína A	708,3
F_c4	Proteína A	704,6

[0084] Para las medidas cinéticas, la cantidad de ligando inmovilizado/capturado necesita ser limitada para evitar los efectos de transferencia de masa en la superficie del chip. Para los experimentos cinéticos, una superficie idealmente debe tener un nivel máximo de unión de analito (R_{max}) de entre 50 y 100 RU. Por lo tanto la cantidad de ligando a inmovilizar se calcula usando la Ecuación 1:

$$\text{Capacidad de unión de analito (RU)} = \frac{\text{PM de analito}}{\text{PM de ligando}} * \text{Ligando inmovilizado (RU)} * S_m$$

[0085] Usando un PM promedio de 42,9 kDa (datos provistos por el fabricante del reactivo) para el analito Tau-412, 150 kDa para el ligando (valor estimado para los anticuerpos) (mAb), 100 RU para R_{max} , y la estequiometría (S_m) de 1, se configuró un blanco de 300 RU para la captura de todos los anticuerpos de ensayo. Los niveles de captura que se obtuvieron en el estudio variaron entre -280 y 400 RU. Para la segunda y la tercera corrida, se ajustó la cantidad de anticuerpo inyectado para que sea más cercano al nivel de captura deseado de 300 RU.

[0086] La unión no específica puede deberse al analito o contaminantes del analito interactuando con el ligando (no específico y difícil de detectar), proteína de captura, o la superficie del chip sensor. El análisis de la respuesta de la superficie de F_c1 blanco después de una inyección de 300 segundos de concentración relativamente elevada (40 nM) de Tau-412, no se observó NSB con la superficie de carboxi-dextrano, ni con la superficie de captura de Proteína A. A concentraciones de Tau-412 > 100 nM, se observó NSB significativa con la

superficie del chip de carboxi-dextrano; sin embargo no se requirieron concentraciones en este rango para el posterior análisis cinético.

[0087] Se realizó un reclutamiento de regeneración y las condiciones óptimas para la regeneración de anticuerpos quiméricos y anticuerpos VH1/VK2 en la superficie de Proteína A fueron las siguientes. Tres inyecciones de 240 segundos de 10 mM Glicina-HCl pH 1,7 seguido por una inyección de 300 segundos de MgCl_2 4M todas a 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se introdujo un segundo paso de espera de 600 segundos después de la última inyección de regeneración para permitir que la superficie se estabilice antes de comenzar el ciclo de unión.

[0088] No se realizó reclutamiento de solución amortiguadora ya que las pruebas iniciales indicaron que la solución amortiguadora “HBS-EP” generó un sistema reproducible para el análisis cinético.

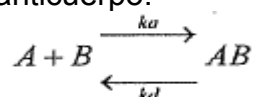
[0089] El rendimiento de la superficie se analizó por inyección control repetidas de Tau-412 2,5 nM al inicio, repartidas en el tiempo y al final de una corrida cinética. Se observó unión estable a lo largo de la corrida cinética destacando lo adecuado del sistema para el análisis cinético.

[0090] La limitación del transporte de masa se produce cuando la tasa de asociación contiene un componente significativo asociado con la tasa de transporte del analito hacia y desde la superficie del chip. Cuando se encuentra que la transferencia de masa es significativa el análisis cinético resultante podría no ser preciso. Cuando se disminuye la densidad del ligando inmovilizado, o se aumenta la tasa de flujo, pueden reducirse las limitaciones de transporte de masas. A partir de experiencia previa con el uso de superficies de baja densidad y antígenos de peso molecular similar, se seleccionó una tasa de flujo de $\mu\text{l}/\text{min}$ para este estudio.

[0091] Se usó un experimento control de reacción vinculada para evaluar la interacción ligando-analito para confirmar las desviaciones de un modelo de unión 1 a 1. El analito se inyecta sobre la superficie durante periodos diferentes de tiempo (tiempos de contacto) y se analiza la tasa de disociación para determinar si varía durante el tiempo de contacto. Si se observa dicha relación, indica que se está produciendo un segundo evento de interacción después del evento inicial de unión que genera un complejo estabilizado en la superficie.

[0092] A partir de experiencia previa con el uso de formatos de ensayo de captura, la estequiometría de unión evidente de 1,5 y que un modelo 1 a 1 podría ajustarse con confianza a los datos cinéticos resultantes, no se realizaron controles de reacción vinculados ya que no había evidencia adicional para avalar interacciones cinéticas más complejas.

[0093] Se usó un modelo de unión 1 a 1 para ajustar los datos cinéticos resultantes (Ecuación 2). Debido a variaciones en la cantidad de anticuerpo capturado se ajustó el parámetro R_{max} a local en oposición al análisis global para cada análisis cinético de anticuerpo.



[0094] Caracterización del anticuerpo: La caracterización y los experimentos control realizados para la superficie de captura de Proteína A sugirieron que este era un sistema adecuado para determinar los valores cinéticos para las interacciones de Tau-412. La estequiometría de unión se evaluó por inyección de una concentración saturante de Tau-412 (1000 nM) sobre 277 RU de VH1/VK2 capturado en una superficie de Proteína A superficie. Dos inyecciones secuenciales de Tau-412 1000 nM parecieron alcanzar una unión saturada a 122 RU. Esto dio como resultado una estequiometría de unión

de 150%, que es mayor que la esperada para una unión de molécula de anticuerpo a una molécula de Tau-412. Las razones para esto podrían incluir la unión del anticuerpo a dos moléculas de Tau- 412 u oligomerización con Tau-412 en la superficie del chip.

[0095] Los datos cinéticos se obtuvieron a una tasa de flujo de 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ para minimizar cualquier efecto potencial de transferencia de masa. En la corrida cinética se programaron dos repeticiones del blanco (sin antígeno) y la concentración de 2,5 nM del analito con el objetivo de confirmar la estabilidad de la superficie y del analito respecto a los ciclos cinéticos. Para las corridas cinéticas iniciales, se corrieron diluciones a la mitad de Tau-412 desde 40 nM a 0,156 nM. Para el análisis cinético y en las corridas siguientes, se seleccionó un rango de analito entre 20 nM y 0,625 nM. Este rango cubrió concentraciones múltiples de analito por encima y por debajo de la K_D informada.

[0096] La fase de asociación se monitoreó durante 500 segundos para permitir que algunas de las concentraciones más altas de analito alcancen el estado estacionario. Con el objetivo de observar una suficiente disminución en la señal ($>10\%$) durante la fase de disociación del ciclo cinético, se midió la disociación durante 1200 segundos. Como se describe en la Sección 5, se dejó que se estabilicen los F_c s durante 600 segundos después de cada paso de regeneración. La señal del canal de referencia F_{c1} se sustrajo de la de F_{c2} , F_{c3} y F_{c4} .

[0097] En la **Tabla F-2** se muestran los parámetros cinéticos para la interacción de Tau-412 con los 7 mAb medidos usando el sistema de captura con Proteína A en el Biacore T200. Para corregir las diferencias en el nivel de captura del anticuerpo entre cada ciclo de unión, se usó un parámetro R_{max}

local en el modelo de unión 1 a 1. El análisis cinético se llevó a cabo en tres corridas independientes usando preparaciones frescas de Tau-412 y anticuerpo. La corrida 1 y las corridas 2+3 usaron diferentes viales del antígeno Tau-412; por lo tanto los errores reportados asociados con la respuesta promedio probablemente representen la variación en la preparación del analito y las diferencias en la preparación del ensayo y corrida. De la corrida 1 y de las corridas 2+3, se ajustó la cantidad de anticuerpo inyectado para probar de acercarse a los niveles de captura de 300 RU blanco. Para la corrida 1, se corrió el anticuerpo quimérico por triplicado y en la **Tabla F-2** se muestra el análisis de los tres conjuntos de datos.

El % CV para la K_D derivada de estos tres conjuntos de datos fue 4,3% indicando que los resultados estuvieron dentro de la variabilidad del ensayo.

Tabla F-2

Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (K_D)	Chi ²	Apéndice II
VH1/VK2	A11/1	2.80×10^5	4.40×10^7	6.11×10^{-4}	2.80×10^{-7}	2.18		1.28	A3-4
VH1/VK2	A11/3	3.25×10^5	1.00×10^8	6.32×10^{-4}	8.20×10^{-7}	1.95		0.44	A5-6
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		3.02×10^5	3.19×10^4	6.21×10^{-4}	1.48×10^{-5}	2.06	0.17		
Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (KD)	Chi ²	Apéndice II
VH1/VK3	A11/1	2.80×10^5	9.10×10^7	6.26×10^{-4}	8.50×10^{-7}	2.24		0.99	A7-8
VH1/VK3	A11/2	2.95×10^5	4.40×10^7	5.72×10^{-4}	2.70×10^{-7}	1.94		0.52	A9-10
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		2.87×10^5	1.07×10^4	5.99×10^{-4}	3.76×10^{-5}	2.09	0.21		
Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (KD)	Chi ²	Apéndice II
VH2/VK2	A11/1	2.62×10^5	4.30×10^7	6.28×10^{-4}	2.80×10^{-7}	2.40		0.83	A11-12
VH2/VK2	A11/2	2.84×10^5	4.10×10^7	5.87×10^{-4}	2.60×10^{-7}	2.06		0.70	A13-14
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		2.73×10^5	1.59×10^4	6.08×10^{-4}	2.94×10^{-5}	2.23	0.24		
Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (KD)	Chi ²	Apéndice II
VH2/VK3	A11/1	2.68×10^5	8.80×10^7	6.53×10^{-4}	9.00×10^{-7}	2.44		1.11	A15-16
VH2/VK3	A11/2	2.92×10^5	4.40×10^7	5.33×10^{-4}	2.60×10^{-7}	1.83		0.50	A17-18
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		2.80×10^5	1.71×10^4	5.93×10^{-4}	8.44×10^{-5}	2.13	0.43		
Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (KD)	Chi ²	Apéndice II
VH3/VK2	A11/1	2.62×10^5	3.20×10^7	5.46×10^{-4}	2.20×10^{-7}	2.08		0.45	A19-20
VH3/VK2	A11/2	2.90×10^5	3.70×10^7	4.85×10^{-4}	2.20×10^{-7}	1.67		0.71	A21-22
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		2.76×10^5	1.99×10^4	5.15×10^{-4}	4.28×10^{-5}	1.88	0.29		
Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (KD)	Chi ²	Apéndice III
VH3/VK3	A11/1	2.54×10^5	3.10×10^7	5.59×10^{-4}	2.00×10^{-7}	2.20		0.80	A23-24
VH3/VK3	A11/2	2.76×10^5	3.80×10^7	4.54×10^{-4}	2.20×10^{-7}	1.65		0.80	A25-26
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		2.65×10^5	1.56×10^4	5.07×10^{-4}	7.40×10^{-5}	1.92	0.39		
Ligando	Chip	k_a (1/Ms)	SE(k_a)	k_d (1/s)	SE(k_d)	K_D (nM)	SD (KD)	Chi ²	Apéndice II
Quimérico	A11/1	7.18×10^5	1.60×10^3	1.60×10^{-3}	2.40×10^{-5}	2.23		1.17	A27-29
Quimérico	A11/2	7.22×10^5	3.00×10^3	1.30×10^{-3}	3.50×10^{-5}	1.79		0.97	A30-31
Quimérico	A11/3	7.23×10^5	2.60×10^3	1.40×10^{-3}	3.30×10^{-5}	1.94		0.49	A32-33
		k_a (1/Ms)	SD(k_a)	k_d (1/s)	SD(k_d)	K_D (nM)	SD(K_D) (nM)		
Promedio		7.21×10^5	2.87×10^3	1.43×10^{-4}	1.54×10^{-4}	1.99	0.22		

[0098] Los valores de Chi² muestran cuán bien se ajustan los datos de asociación y disociación al modelo de unión 1 a 1 propuesto – cuanto menor el valor mejor el ajuste. Los valores de SE asociados para las constantes de velocidad representan la incertidumbre asociada con el ajuste de los datos al modelo descrito, y no representan la incertidumbre total para los valores

cinéticos verdaderos. Los datos de respuesta promedio representan los valores cinéticos promedio y la SD asociada de 2, o 3 análisis independientes.

[0099] Con el uso de los valores promedio de K_D de la **Tabla F-2**, los anticuerpos pueden clasificarse en base a afinidad como a continuación: $VH3/VK2 > VH3/VK3 > \text{quimérico} > VH2/VK3 > VH1/VK3 > VH1/VK2 > VH2/VK2$. El % CV asociado con los parámetros cinéticos promedio variaron en un rango entre 10 y 20%, y por lo tanto es probable que todos los anticuerpos tengan afinidades similares y que las diferencias sean puramente un resultado de la variación del ensayo. En general, las diferencias en la unión entre los anticuerpos pueden atribuirse a la variación del ensayo, y se cree que no hay diferencias significativas en los valores de K_D de los anticuerpos humanizados en comparación con el anticuerpo quimérico.

[00100] Se muestra una comparación de los valores cinéticos determinados con el uso del ensayo de captura con Proteína A en el Biacore T200 para la interacción entre los anticuerpos y Tau-412. El anticuerpo quimérico parece presentar un perfil de unión significativamente diferente cuando se compara con los anticuerpos humanizados, a pesar que las afinidades son similares. Un gráfico de K_d versus K_a muestra los valores cinéticos relativos de los anticuerpos ensayados y las interacciones de Tau-412 determinadas usando el ensayo de captura en Proteína A en el Biacore T200. Las diagonales punteadas representan las líneas de isoafinidad. Por favor observar que los ejes presentan diferentes rangos de datos, con el objetivo de mejorar la claridad de los anticuerpos humanizados en el gráfico.

[0100] La Figura 5 resume los resultados del análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR), determinando la cinética de unión de las 6 mejores

construcciones expresantes humanizadas contra tau humana. El anticuerpo de ensayo se inmoviliza en el chip SPR con diferentes concentraciones de tau humana y luego se deja fluir sobre el chip. Se calculan las tasas de asociación y disociación así como también la afinidad en base a los eventos de unión medidos para cada una de las variantes. La variante quimérica también se ensayó.

[0101] Ejemplo 3

En la Figura 6 se muestra la unión de cuatro variantes de anticuerpos humanizados a tau humana soluble en un ELISA estilo sandwich. Los métodos de ensayo que se basan en la adsorción pasiva tienen el potencial de crear resultados de unión artefacto. Para evitar esta posibilidad, se empleó un método en solución para medir la actividad de unión de las variantes de anticuerpos humanizados. En este formato de ensayo, el antígeno (tau humana) es capturado por un anticuerpo monoclonal anti-tau humana que reconoce un epítipo diferente de HJ8.5. La consecuente unión de los anticuerpos humanizados anti-tau a la tau humana capturada depende de la concentración del antígeno, mientras que los controles de isotipo IgG4 no muestran nada de unión. Este ensayo demuestra que la unión de los anticuerpos humanizados anti-tau a la tau humana es específica y que los anticuerpos se unen a la tau humana soluble.

[0102] Ejemplo 4

En la Figura 7 (A-H) se muestra la unión de anticuerpos humanizados y control a tejido de ratones de tipo salvaje (tejido control negativo), ratones P301S (que expresan tau humana que tiene una mutación P301S y desarrollan una patología derivada de tau asociada con la edad), y de humanos con enfermedad de Alzheimer o parálisis supranuclear progresiva (PSP). El objetivo de este

estudio fue confirmar que los anticuerpos humanizados retienen la capacidad de unirse a tau agregada en tejido en comparación a la forma quimérica de HJ8.5. Las figuras muestran imágenes representativas de tinción de cerebros de humano y de ratón con diferentes variantes de anticuerpo HJ8.5 humanizado. Se ensayaron ratones P301S a los 4 y 9 meses de edad, y ambos puntos en el tiempo muestran agregados patológicos de tau, teniendo los ratones de 9 meses de edad una patología más relacionada con tau que los ratones de 4 meses de edad. Para la tinción en humanos, se examinó una muestra de tejido de cerebro de un sujeto con PSP, y una muestra de tejido de cerebro de un sujeto con AD. La Figura 7A ilustra la tinción con HJ8.5 quimérico para el tejido de ratón y de humano con AD. La Figura 7B ilustra la tinción con un anticuerpo control negativo (IgG4 humana no específica). Las Figuras 7C-7H ilustran la tinción con los seis anticuerpos humanizados. Todas las variantes humanizadas del anticuerpo murino HJ8.5 se unen a agregados de tau encontrados en cerebro de ratón P301S así como también a agregados de tau encontrados en el tejido de cerebro de sujetos diagnosticados con AD o PSP.

[0103] Ejemplo 5

En la Figura 8 se muestran los epitopes de HJ8.5 en tau humana. El epitope se mapeó usando presentación en levaduras. Para este método, se expresaron diferentes péptidos cubriendo la secuencia de tau humana usando levaduras. Se midió la unión del anticuerpo HJ8.5 a levaduras en cultivo por inmunofluorescencia. Se observó la unión a levaduras, expresando variantes de tau que incluían los primeros 34 aminoácidos, pero no se observó unión si la levadura solamente expresaba los primeros 32 aminoácidos de tau. Esto sugiere que el epitope está en los primeros 34 aminoácidos. Además, HJ8.5 se une si el

péptido incluye los aminoácidos 27 a 135 pero no lo hace si el péptido abarca los aminoácidos 30 a 135. Esto sugiere que el epítopo incluye aminoácidos más allá del aminoácido 27. En base a estos datos el epítopo está contenido en la secuencia 27-34 de tau humana (GYTMHQDQ) (SEQ ID NO: 10). En la Figura 8 también se muestran las secuencias de tau de mono rhesus y de ratón y se destaca en rojo los cambios de aminoácidos respecto a la tau humana.

[0104] En la Figura 9 se muestra con mayor detalle, el mapeo de epítopo en base a péptidos de HJ8.5 y C₂N-8E12. Se creó una biblioteca de péptidos de 15mers lineales que abarcan la secuencia completa de tau humana (IN4R, 412 aminoácidos). Además también se produjeron versiones de alanina doble en donde estos péptidos en los cuales se cambiaron los aminoácidos 10 y 11 a alanina. Para la biblioteca de alanina doble, cualquier alanina de origen natural en la posición 10 u 11 se mutó a glicina. Todos los péptidos se colocaron individualmente en un arreglo de péptidos y se probaron con HJ8.5 o C₂N-8E12 y se midió la unión. El o los epítopos de unión a tau de ambos anticuerpos se mapearon de manera confiable usando estos arreglos de péptidos. El epítopo de unión de C₂N-8E12 es ₂₅DQGGYT₃₀ (SEQ ID NO: 9) y coincide con el epítopo del parental murino, HJ8.5. La unión de HJ8.5 y C₂N-8E12 a los péptidos tau se vio severamente comprometida cuando los aminoácidos D, Q, Y, o T en el epítopo fueron reemplazados por alanina, sugiriendo que cumplen un rol crucial en la unión del anticuerpo. Sin embargo, cuando las dos glicinas centrales en el epítopo fueron reemplazadas por alanina, la unión de anticuerpos a los péptidos tau no se vio tan severamente comprometida (PEP 2875811). Esto probablemente no sea una indicación de que estos aminoácidos no son importantes para la unión sino que sea debido a la naturaleza conservadora de

las sustituciones entre los aminoácidos Alanina y Glicina. El epítopo mapeado usando estos métodos más detallados es levemente diferente del que fue mapeado usando la expresión en levaduras (Figura 8). Esta diferencia se atribuye a la diferencia en los ensayos de unión, con el uso de péptidos más grandes en el sistema de expresión en levaduras. La metodología de arreglo de péptidos 15mer es considerada superior respecto a la metodología de expresión en levaduras.

Ejemplo 6

[0105] En la Figura 10 se ilustran los resultados de unión de diferentes anticuerpos anti-tau humana a tau de humano o de mono rhesus. Se ensayaron los anticuerpos murinos anti-tau humana HJ8.5 y HJ8.7 junto con la variante humanizada VH1/VK2 (también referida como C₂N-8E12). En la Figura 8 se muestra que hay una única diferencia de aminoácido en la posición 32 entre tau de humano y de rhesus, en la secuencia del epítopo de unión reivindicada GYTM(H/L)QDQ (SEQ ID NO: 57). En la Figura 8A se muestra que hay una única diferencia de aminoácido en la posición 27 entre tau de humano y de rhesus, en la secuencia del epítopo de unión reivindicada DQ(G/E)GYT (SEQ ID NO: 58). Con el objetivo de determinar si estas diferencias de aminoácidos entre las dos especies de tau, impacta en la capacidad de los anticuerpos HJ8.5 / C₂N-8E12 para unirse, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se midió la unión de C₂N-8E12, HJ8.5 (precursor murino de C₂N-8E12), y HJ8.7 (anticuerpo murino anti-tau humana que se une a un epítopo de tau cuando la secuencia de aminoácidos de humano y de rhesus está 100% conservada) a tau de humano y de rhesus por recubrimiento de placas de ELISA de 96 pocillos con tau de humano o de rhesus a diferentes concentraciones. Los resultados de los inventores

demuestran que C₂N-8E12 y HJ8.5 no se unen a tau de rhesus a la vez que muestran unión positiva a tau humana. Como era esperado, HJ8.7 se une a tau de humano y de rhesus.

[0106] Ejemplo 7

En la Figura 11 se muestra la unión de anticuerpo humanizado anti-tau a tau en CSF de sujetos humanos con diferentes tauopatías. La unión de C₂N-8E12 a tau en muestras de CSF de sujetos diagnosticados con una variedad de tauopatías así como también con sujetos control normales con la misma edad y jóvenes. Se usó un ELISA estilo sandwich para demostrar la unión de C₂N-8E12 a tau en CSF de humano de sujetos con AD, CBD, FTD o PSP así como también controles con la misma edad y jóvenes/adultos. Se usó C₂N-8E12 como el anticuerpo de recubrimiento para capturar a tau en muestras de CSF. Se usó el anticuerpos monoclonal murino biotinilado dirigido contra tau HJ8.7 como el anticuerpo de detección. Los pocillos recubiertos con la IgG4 humana control actuó como el control negativo para los experimentos. Se observó una gran diferencia en la señal de los pocillos recubiertos con C₂N-8E12 respecto a los pocillos recubiertos con IgG4 control, demostrando la unión específica de C₂N-8E12 a tau en muestras de CSF humanas. Mediante la inclusión de una curva estándar (tau recombinante), es posible obtener información cuantitativa de la concentración de tau en estas muestras de CSF.

Ejemplo 8

[0107] Este estudio es un estudio de fase 1 randomizado, doble ciego, controlado por placebo, de dosis única creciente (SAD) para ser realizado en hasta diez centros (10). Está diseñado para evaluar la seguridad, tolerabilidad,

inmunogenicidad, y PK de la administración de dosis individual de C₂N-8E12 y para establecer la MTD a usar en estudios futuros de dosificación repetida.

[0108] El objetivo principal de este estudio es determinar la seguridad, tolerabilidad, inmunogenicidad, y dosis máximamente tolerada (MTD) de una dosis individual de C₂N-8E12 en sujetos con PSP. Las evaluaciones de seguridad incluirán el examen físico y neurológico, estudios de laboratorio de seguridad clínica, inmunogenicidad, eventos adversos, signos vitales y revisión de medicación concomitante.

[0109] Los objetivos secundarios son determinar: farmacocinética sistémica de dosis individual que incluye; concentración plasmática máxima después de la infusión individual; área bajo la curva (AUC) después de infusión individual; tiempo al cual se alcanza la máxima concentración después de la infusión; vida media terminal de C₂N-8E12; partición de C₂N-8E12 en el líquido cefalorraquídeo (CSF); y unión al blanco biológico mediante la medida de los niveles de tau soluble en sangre y CSF así como también por evaluación de la presencia de complejos de C₂N-8E12-tau.

[0110] Este estudio tiene como intención enrolar 32 sujetos con PSP (24 en la rama de tratamiento y 8 en la rama placebo). Los sujetos se enrolaron en 8 bloques de 4 pacientes, con un paciente en cada bloque randomizado a placebo y 3 a la estimación real de la MTD. Pueden enrolarse sujetos adicionales si se producen DLT. No puede omitirse ninguna dosis, salvo durante el proceso de escalado.

[0111] Se usará un método de reevaluación continua (CRM) para el escalado de dosis como se describe en la sección de diseño estadístico. Se usará un modelo logístico para identificar la probabilidad de DLT por dosis.

[0112] Se enviará el C₂N-8E12 al sitio clínico como un líquido congelado en botellas de uso individual con una concentración de 20 mg/ml. Cada botella contiene 300 mg de C₂N-8E12 y debe almacenarse congelada a entre -70°C y -80°C.

[0113] Los pacientes serán sometidos a una selección para evaluar si se cumplen los criterios de inclusión y exclusión. La selección también incluirá evaluaciones de sangre y CSF, y MRI. En el día de la dosificación (Día 0), se administrará una dosis individual de C₂N-8E12 mediante una vía IV y los sujetos serán monitoreados en una institución clínica durante 24 horas después de la administración de la dosis. Esto incluye muestras de sangre para evaluaciones de seguridad y PK. Durante los siguientes 3 días, así como también a la semana y dos semanas después de la infusión, se realizará el examen clínico adicional y toma de muestra de sangre. Se realizará una MRI de seguridad adicional y toma de muestra de CSF a los 4 días posteriores a la infusión. Los sujetos serán evaluados cada 28 días, durante no más de dos meses a partir de la fecha de dosificación (por ejemplo, día 56). Luego de eso, se continuará con medidas mensuales, hasta que se produzca el primero de cualquiera de los siguientes eventos: (i) C₂N-8E12 no se detecta más en sangre; (ii) el Patrocinador determina el final del estudio; (iii) el sujeto decide discontinuar antes de tiempo la participación en el estudio.

[0114] El objetivo del estudio de fase 1 incluye el establecimiento de una MTD determinado por evaluaciones de seguridad que incluyen pruebas de laboratorio clínico, exámenes físicos y neurológicos, y la aparición de eventos adversos para determinar un rango recomendado de dosis para la evaluación en la fase posterior de estudio 2/MAD. La asignación al azar de sujetos y la inclusión

de una rama placebo evita los sesgos y aumenta la probabilidad que los factores de riesgo conocidos y desconocidos se distribuyan por igual entre los grupos de tratamiento.

[0115] Un comité de monitoreo de seguridad de los datos (DSMC) revisará los datos de seguridad de manera continua. El comité de monitoreo de seguridad estará comprendido mínimamente por dos médicos independientes, un bioestadístico, un médico con experiencia en PSP, y un miembro sin voto del Patrocinador. Si algún sujeto individual del estudio experimenta un SAE, todos los datos de seguridad disponibles del sujeto se revisarán para determinar si el evento cumple con la definición de DLT, y si la MTD ha sido establecida. Si no se ha establecido la MTD, y el enrolamiento del paciente continúa, el DSMC proveerá recomendaciones al Patrocinador sobre si es necesaria cualquier otra acción o enmienda del protocolo para asegurar la seguridad de los pacientes enrolados posteriormente. El Patrocinador hará las determinaciones finales sobre cualquier enmienda al estudio o terminación preliminar.

[0116] Una toxicidad de dosis limitante se define como: (i) cualquier AE de Grado 3 o mayor para los Criterios de Toxicidad Común de Reumatología v2 para el cual hay una posibilidad razonable que C₂N-8E12 haya producido el evento; (ii) cualquier AE de Grado 2 en la clase de órgano del sistema de Criterios de Terminología Común de NCI para los eventos adversos v4.0. (CTCAE) de trastornos del sistema nervioso y psiquiátricos que es considerado clínicamente significativo y para el cual hay una posibilidad razonable que C₂N-8E12 haya producido el evento; o (iii) cualquier toxicidad relacionada con la infusión (por ejemplo, reacción alérgica / hipersensibilidad) producida durante la infusión de C₂N-8E12 o dentro de las 24 horas después de completar la infusión

que no resuelve rápidamente con una tasa de infusión reducida y/o cuidados paliativos.

[0117] Escalado de dosis: La asignación de sujetos a cohortes de dosis está controlada por las siguientes reglas: (1) En cada bloque de 4 pacientes, 1 paciente será asignado a la rama placebo; (2) Se requiere información de toxicidad completa para al menos 3 pacientes a un nivel de dosis antes del escalado a un nivel de dosis mayor; (3) El incremento máximo del escalado de una cohorte a la siguiente es 1 nivel de dosis; y (4) Por lo menos 12 sujetos (3 bloques) deben ser dosificados al nivel de dosis MTD.

[0118] En cada cohorte de 4 pacientes, los pacientes serán dosificados secuencialmente, con un intervalo máximo de por lo menos dos días entre la dosificación de sujetos consecutivos con el objetivo de proveer una medida adicional de garantía de seguridad.

[0119] La primera cohorte será asignada a d_1 . El modelo estadístico será actualizado después que la información de toxicidad completa esté disponible para cada cohorte. Por regla, puede enrolarse una cohorte adicional antes que se encuentre disponible la información completa para todos los sujetos en la cohorte más reciente. Se permiten datos de toxicidad incompletos para no más de 3 pacientes antes que se enrole y se clasifique al azar la próxima cohorte.

[0120] Cada cohorte posterior se asignará a la dosis que se estima que es la MTD de acuerdo con la definición precedente. En el evento de aumento lento, el modelo puede actualizarse a medida que cada paciente se enrola y que cada paciente posterior es dosificado con la MTD estimada actual.

[0121] Población del estudio: Este estudio enrolará sujetos masculinos y femeninos con parálisis supranuclear progresiva (PSP) con edad entre 50 y 85 años.

[0122] Criterios de inclusión: para la inclusión en el estudio, cada sujeto debe desear y tener la capacidad de brindar el consentimiento informado. Antes del inicio del protocolo de tratamiento, se confirmará que cada sujeto tenga la capacidad de proveer consentimiento para el protocolo de tratamiento. Los sujetos serán invitados a participar en el estudio, y después de firmar el formulario del consentimiento informado, se realizarán los procedimientos de selección. Si los sujetos no cumplen con los criterios de inclusión o cumplen cualquier criterio de exclusión, los sujetos no se enrolarán en la evaluación de selección o esquema de tratamiento.

[0123] Cada sujeto debe cumplir los siguientes criterios para ser enrolados en este estudio: hombre o mujer; entre 50 y 85 años de edad; cumple con los criterios NINDS-SPSP posibles o probables según la modificación para los ensayos clínicos NNIPPS y AL-108-231, que incluyen: (d) parálisis supranuclear de la mirada o velocidad sacádica disminuida, (ii) inestabilidad en la marcha o caídas en los primeros 3 años de síntomas; la MRI de cerebro en la Selección es consistente con PSP (< 4 microhemorragias, y sin accidente cerebrovascular o enfermedad severa de la materia blanca); Puntuación en la escala de PSP entre 20 y 50; capaz de proveer consentimiento informado para participar en basal o si no es capaz de proveer el consentimiento informado puede aprobar la participación y tiene un representante médico autorizado que puede proveer el consentimiento; tiene un acompañante de estudio que ve al paciente por lo menos 5 horas por semana, que puede acompañar al paciente a

las visitas y brindar el consentimiento para la participación en el estudio; se permiten otras terapias no biológicas concurrentes pero la dosis debe haber sido estable durante por lo menos 30 días antes del enrolamiento; capaz de caminar 5 pasos con asistencia mínima (estabilización de un brazo o uso de bastón/caminador); medicación estable para Parkinsonismo durante por lo menos 2 meses antes de la Selección; incluyendo, levodopa, agonistas de dopamina, rasagalina, inhibidores de la COMT, amantadina, memantina o inhibidores de colinesterasa; acepta hasta 3 punciones lumbares durante entre 4 y 18 meses, hasta 6 punciones lumbares si el sujeto va a participar en el estudio de fase I/SAD y en el estudio de fase 2/MAD; consentimiento informado escrito firmado y fechado obtenido del sujeto; acepta usar los métodos especificados de protocolo anticonceptivo (véase más adelante).

[0124] Los sujetos que cumplen con cualquiera de los criterios siguientes serán excluidos del estudio: signos de un trastorno neurológico progresivo que cumple mejor con los criterios para los tipos de trastornos neurológicos diferentes de PSP, que incluyen: (a) cumple los criterios para una probable enfermedad de Alzheimer o (b) cumple con los criterios de investigación para la demencia de Parkinson con cuerpos de Lewy, atrofia de sistemas múltiples (MSA), o esclerosis lateral amiotrófica (ALS); cualquier malignidad (diferente de carcinoma de célula basal no metastásica de la piel) en 5 años de estudio; disfunción renal o hepática clínicamente significativa al momento de la selección en base al juicio profesional del investigador; evento cardiovascular clínicamente significativo dentro de los tres meses previos a la entrada al estudio, en base al juicio profesional del investigador; resultados anormales de pruebas de laboratorio hematológico o químico clínicamente significativos durante la

selección, en base al juicio profesional del investigador; han recibido cualquier terapia con anticuerpo monoclonal para cualquier razón en los últimos 90 días o que recibió cualquier otro agente de investigación dentro de los 30 días previos o 5 vidas medias (lo que sea más prolongado). La administración previa de C₂N-8E12 no aplica a estos criterios de exclusión y, por lo tanto, no descalifica al sujeto de participar en el estudio de fase 2/MAD; actualmente en cualquier otra terapia biológica o inmunomoduladora; duración de la enfermedad mayor a 5 años desde el inicio de los síntomas; volumen del mesencéfalo > 8.600 mm³ durante el barrido MRI en la selección; sujetos que residen en una institución de cuidados médicos o para dementes; tiene evidencia clara de enfermedad de neuronas motoras durante el examen, consistente con patología ALS (esto ha sido descrito en portadores de C90RF72 con presentación CBS); diagnóstico de cualquier otro trastorno neurológico o psiquiátrico significativo que podría explicar los déficits cognitivos (por ejemplo, trastorno de convulsión activo, ataque cerebrovascular, demencia vascular), en base al juicio profesional del investigador; depresión mayor no tratada durante la evaluación inicial, en base al juicio clínico y resultados en GDS; historia de otra enfermedad psiquiátrica mayor; cualquier historia previa de intentos suicidas; deterioro cognitivo severo evaluado por MMSE (<17) que de acuerdo a la opinión del Investigador podría impedir la recolección de medidas de resultados; no ser capaz de participar en el protocolo de evaluación; valores significativos anormales en general de las muestras de sangre tomadas durante la selección que podrían poseer un riesgo de seguridad o interferir con la interpretación apropiada de los datos de estudio; historia actual o reciente (dentro de las cuatro semanas previas a la selección) de una infección bacteriana, fúngica, o micobacteriana; incapacidad para tolerar

un barrido por MRI durante la Selección o cualquier otra contraindicación para MRI; cualquier contraindicación o incapacidad para tolerar una punción lumbar durante la Selección, incluyendo el uso de medicación anticoagulante tal como warfarina. La administración diaria de 81 mg de aspirina o anticoagulante similar estará permitida siempre que la dosis sea estable durante 30 días previos a la Selección; Sujetos que, de acuerdo a la opinión del Investigador, no tienen la capacidad o no es probable que cumplan con el esquema de dosificación o evaluaciones del estudio; participación en otro ensayo clínico de intervención dentro de los 3 meses de la Selección; Tratamiento con otro fármaco de investigación dentro de los 30 días de la Selección; cualquier duración de QTcF preexistente que exceda los 450 ms; el sujeto es empleado o miembro de la familia del Patrocinador o miembro del personal del sitio de investigación o sus miembros de la familia.

[0125] Los sujetos deben estar de acuerdo con el uso (y/o que si pareja lo utilice) de métodos aceptables de anticoncepción comenzando en la visita basal y durante el estudio hasta 56 días después de la última dosis del fármaco del estudio en el último periodo de tratamiento. Los métodos aceptables de anticoncepción se enumeran más adelante.

[0126] Fármaco del estudio: El estudio de fase 1/SAD usará C₂N-8E12 de DP Lote # 1018775 – el material de Research Cell Bank (RCB) actualmente usado en el Expanded Access IND 119404. Está formulado en solución amortiguadora de acetato 25 mM a pH 5,5, y se provee en una concentración de 20 mg/ml. Placebo: el placebo está formulado de manera idéntica a C₂N-8E12 sin el fármaco activo del estudio.

[0127] Justificación de la dosis: La dosis de inicio máxima recomendada (MRSD) se calculó usando las guías de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para la Industria "Estimando la dosis segura de inicio en los ensayos clínicos para terapia en voluntarios sanos adultos".

De acuerdo a las guías, para proteínas terapéuticas de investigación con peso molecular > 100.000 Daltons que se administran IV, la MRSD debe estimarse por normalización entre especies en lugar de mediante el escalado por el área de superficie corporal. En base al nivel de efecto no observado (NOEL) observado de 250 mg/kg en el estudio toxicológico en ratones, un factor de seguridad estándar de 10 limita la dosis a 25 mg/kg.

[0128] La dosis de inicio para el estudio de fase I/SAD será 2,5 mg/kg dosificada IV. Esta dosis de inicio es 10 veces menor que la dosis de inicio máximamente permitida en base a un estudio toxicológico en ratones de 4 semanas y 6 veces menor que la actual dosis máxima (15 mg/kg) administrada en los protocolos de tratamiento de humanos para uso de acceso expandido y compasivo que involucran C₂N-8E12 (véase folleto del investigador).

[0129] En base a PK plasmática preliminar de un ensayo de paciente individual, es posible estimar el porcentaje de tau en el CSF que se une a C₂N-8E12 a diferentes tiempos después de una dosis de 2,5 mg/kg de C₂N-8E12. Para este cálculo, se asume que la concentración en CSF de anticuerpos humanizados es 0,1% de la concentración en plasma y que la concentración de tau en el CSF es 500 pg/ml. En base a estas suposiciones, una dosis de 2,5 mg/kg llevará a una concentración en CSF de C₂N-8E12 durante el primer mes que será entre 3 y 40 veces mayor que la concentración molar de tau en el CSF. En base a la K_D de C₂N-8E12, la dosis de 2,5 mg/kg llevará a que entre 3 y 26%

de tau en el CSF sea unido por el anticuerpo. Se ha realizado un modelado similar sobre los datos PK la mayor dosis administrada a humanos hasta la fecha (15 mg/kg) y se estimó que la unión promedio de tau en el periodo de 28 días es aproximadamente 50% (máximo 72% unido, mínimo 40%). Probablemente también habrá una abundancia de tau extracelular presente en el cerebro que no puede acceder al compartimento del CSF, pero a la cual el anticuerpo tiene la capacidad de unirse. Por lo tanto, el escalado de dosis procederá hasta 25 mg/kg para evaluar la seguridad de una dosis que posiblemente lleve a una unión al blanco significativa en el cerebro.

[0130] A menos que el investigador lo apruebe, durante el periodo de tratamiento, ningún sujeto del estudio debe recibir: ninguna otra terapia biológica o inmunomodulatoria; ningún otro agente de investigación; Warfarina; ningún anticoagulante (diferente de los 81 mg de aspirina diaria) para una condición para la cual la suspensión temporal del tratamiento antes de la toma de muestra del CSF podría proveer un riesgo médico.

[0131] Consentimiento informado: después de proveer el consentimiento informado, cada sujeto será sometido a evaluaciones de Selección para reconfirmar que los criterios de inclusión pueden cumplirse, y que no existen contraindicaciones para recibir el tratamiento bajo este protocolo. Específicamente, cada sujeto será evaluado durante la selección con un examen clínico y neurológico para confirmar el diagnóstico. Se hará una breve selección cognitiva con una escala de puntuaciones PSP y una escala de depresión con entrevista y se obtendrá un historial médico completo y de fármacos/medicación. Si el sujeto cumple con todos los criterios de inclusión y carece de criterios de

exclusión, se realizarán estudios adicionales. La visita de Selección se realizará entre los 28 días y 7 días antes de la visita Basal / Día 0.

[0132] Evaluaciones farmacocinéticas: Se recolectarán las muestras para el análisis PK a diferentes tiempos descritos en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Predosis	15 min (#)	3 horas	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas	168 horas	336 horas	28 días	Luego del día 28 (@)
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

(*) Si se produce una terminación temprana, se obtendrá una muestra de sangre final en la visita de terminación temprana para evaluación PK final;

(#) Dentro de 15 minutos del fin de la infusión;

(@) Posterior al día 28, las muestras para PK se tomarán cada 28 días hasta la aparición temprana de cualquiera de los siguientes eventos: (i) terminación del estudio; (ii) la ausencia de cualquier nivel detectable en sangre de C₂N-8E12.

[0133] Evaluación de eventos adversos: Se realizarán las siguientes evaluaciones de seguridad para monitorear los AE: signos vitales (presión sanguínea, pulso/frecuencia cardíaca, temperatura, frecuencia respiratoria, SPO₂); examen neurológico completo, incluyendo una evaluación cognitiva (pruebas de estado mental); pruebas de laboratorio: (1) panel hematológico: recuento completo de células sanguíneas (CBC) con diferencial, hematocrito, y hemoglobina (Hb), recuento de plaquetas; (2) panel químico: electrolitos en suero, glucosa, ácido úrico, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina,

proteínas totales, albúmina, bilirrubina (total, directa e indirecta), fosfatasa alcalina, lactato deshidrogenasa (LDH), enzimas hepáticas (AST, ALT y GGT), hierro, panel de colesterol, CPK, amilasa, y lipasa; (3) panel de coagulación: tiempo de protrombina (PT), INR, y tiempo de tromboplastina parcial (PTT); análisis urinario, incluyendo medida de Hb, glóbulos blancos, y contenido de proteínas; ECG – monitoreo continuo o ECG de 12 derivaciones; obtención de imágenes por MRI, incluyendo recuperación de la inversión atenuada de fluidos (FLAIR); una toma de muestra de CSF con medida de los recuentos de células (glóbulos blancos y rojos), proteína total y glucosa.

[0134] Determinación de C₂N-8E12 en plasma y CSF humanos: Se han desarrollado ELISA estilo sandwich para medir la concentración de C₂N-8E12 en plasma y CSF. Los Laboratorios Charles River han validado estos ensayos para usar en una variedad de matrices diferentes (véase la Tabla 4).

Tabla 4

# de estudio CRL	Título del estudio
20056682 completado	Validación de un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para la determinación de C ₂ N-8E12 en plasma de humano (K2EDTA)
20057088 en curso	Validación de un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para la determinación de C ₂ N-8E12 en líquido cefalorraquídeo de humano

[0135] Determinación de anticuerpos anti-C₂N-8E12 en plasma de humanos: Se recolectarán muestras de sangre para la evaluación del desarrollo del anticuerpo anti-fármaco (ADA) antes de la dosificación inicial y en el día 14 y 28 posterior a la administración del fármaco. Se realizará una medida final durante la terminación. Se ha desarrollado un ensayo de ELISA estilo en base a

ECL para medir la presencia de anticuerpos dirigidos contra C₂N-8E12 en plasma (ADA). Los Laboratorios Charles River han validado este ensayo para la detección de la respuesta a ADA en plasma humano (véase la Tabla 5).

Tabla 5

# de estudio CRL	Título del estudio
20056686 completado	Validación de un ensayo de electroquimioluminiscencia cualitativo para la detección de anticuerpos anti-C ₂ N-8E12 en plasma de humano (K2EDTA)

[0136] Las evaluaciones clínicas y funcionales incluyen la Escala de Calificación de Severidad de Suicidio de Colombia: Como un parámetro de seguridad, se usará la Escala de Calificación de Severidad de Suicidio de Colombia (C-SSRS) para el pensamiento suicida (Posner y col. 2011). Escala de depresión geriátrica: Similar a la C-SSRS, se usará la escala de depresión geriátrica (GDS) para evaluar el humor general durante el estudio. La escala de depresión geriátrica (GDS) es una evaluación de autoinforme de 30 puntos usada para identificar la depresión en los ancianos (Yesavage y col. 1983). Escala de puntuación PSP: La escala de puntuación PSP se usará (PSPRS) en la Selección para la inclusión así como también en el basal y final del estudio para evaluar los cambios en la escala en el tiempo (Golbe and Ohman-Strickland 2007). Impresión global clínica: Las puntuaciones de las impresiones globales clínicas de las escalas de cambio (CGic) y severidad (CGis) se usarán para evaluar la severidad de los síntomas. Actividades de Schwab y England de la vida diaria: La escala de actividades de Schwab y England de la vida diaria (SEADL) se usará como una manera de evaluar la capacidad de los sujetos para realizar las actividades diarias (Schwab and England 1969). Suma de puntuación

en recuadros de demencia clínica por demencia de lóbulo frontotemporal: La Suma de puntuación en recuadros de demencia clínica por demencia de lóbulo frontotemporal (CDR-SB-FTLD) es una versión de la prueba de evaluación cognitiva de CDR-SB que incluye la evaluación de la conducta, comportamiento, personalidad, y lenguaje (Knopman y col. 2008). Miniexamen del estado mental: El miniexamen del estado mental (MMSE) es un cuestionario confiable de 30 puntos que mide el deterioro cognitivo (Folstein, Folstein, and McHugh 1975).

[0137] Líquido cefalorraquídeo: se drenará el CSF desde el interespacio L3-4 por punción lumbar. Si la toma de muestra de CSF no es exitosa puede usarse una punción lumbar guiada por CT/fluoro de acuerdo al juicio del personal del sitio clínico local de acuerdo al protocolo local. Las pruebas de laboratorio de seguridad en CSF se analizarán localmente en el sitio clínico correspondiente después de cada punción lumbar/recolección de CSF. Estas medidas incluyen: recuentos de células (glóbulos blancos y rojos), proteína total y glucosa. Se analizarán otras medidas de CSF (por ejemplo, concentración de C₂N-8E12, unión al blanco y otros biomarcadores de laboratorio) por el laboratorio designado correspondiente.

[0138] Obtención de imágenes: El sujeto también recibirá un barrido por MRI basal con imágenes estructurales, FLAIR, ponderado por difusión y ponderado por susceptibilidad. Los análisis de imágenes posteriores a la dosificación se realizarán de acuerdo al Esquema de Eventos.

[0139] Análisis farmacogenómico exploratorio: Se recolectará una muestra de sangre para la extracción de ADN en basal. Todos los individuos serán sometidos a un análisis de secuencia de haplotipo MAPT extendido para determinar H1(A-D) y el estado de portador de H2. El ADN se extraerá de las

muestras y se enviará el ADN al centro farmacogenómico designado para este estudio.

[0140] Los sujetos se enrolarán en este estudio hasta la aparición temprana de cualquiera de los siguientes eventos: (i) ellos completa su participación y el Esquema completo de eventos; (ii) ellos o el investigador decide(n) terminar su participación; o (iii) el sujeto correspondiente experimenta cualquier DLT o cualquier SAE que un investigador considera interrumpir su participación en este estudio y excluye la elegibilidad para el estudio posterior de fase 2/MAD. Además, de acuerdo al juicio del Investigador, los sujetos que dejan de cumplir con cualquier criterio de inclusión, o cumplen uno o más criterios de exclusión durante el estudio, pueden ser determinados como no elegibles para continuar participando en el estudio o para la participación posterior en el estudio de fase 2/MAD.

ANTICUERPOS ANTI-TAU HUMANIZADOS

RESUMEN

Un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a tau, en donde el anticuerpo o fragmento comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena liviana (VL) que tiene las secuencias de aminoácidos detalladas en la presente. También se proveen métodos para prevenir o tratar una tauopatía en un sujeto, que comprende administrar a un humano que lo requiere una terapia para una tauopatía con uno o más anticuerpos o fragmentos como se describe en la presente, en donde los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno se administran bajo condiciones y en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la tauopatía.