

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 065**

51 Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2016 E 19184449 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3581245**

54 Título: **Anticuerpos contra tau y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.02.2015 US 201562121116 P

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

18.06.2024

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**ALVARADO, ALBERTO;
DRIVER, DAVID;
HAYASHI, MANSUO LU y
LU, JIRONG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 973 065 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra tau y usos de los mismos

La presente invención pertenece al campo de la medicina. En concreto, la presente invención se refiere a anticuerpos contra tau, a composiciones que comprenden dichos anticuerpos contra tau y a procedimientos de uso de dichos anticuerpos contra tau para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluidas la enfermedad de Alzheimer (EA), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la enfermedad de Pick (EP).

Tau es una proteína de unión a microtúbulos axonal que favorece el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos. La EA y la PSP son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas desde el punto de vista patológico por la agregación aberrante de tau. Más concretamente, en la EA y la PSP, se cree que la tau hiperfosforilada favorece la agregación de fibrillas de tau insolubles que conduce a la desestabilización de los microtúbulos y a la toxicidad neuronal. Estudios en cultivos celulares y en modelos murinos han demostrado que los agregados de tau se extienden por las uniones de las sinapsis neuronales y secuestran la tau monomérica (nativa o no agregada), lo que induce la formación de agregados de tau. La progresión neuroanatómica de la agregación y acumulación de tau en enfermedades neurodegenerativas, tales como la EA y la PSP, sugiere que la agregación de las fibrillas de tau se propaga a lo largo de las redes neuronales, provocando en última instancia la desestabilización de los microtúbulos y, en última instancia, el deterioro localizado de la función neuronal.

La densidad y la localización neuroanatómica de la agregación de tau se correlaciona claramente con los síntomas neurológicos de la EA y la PSP y la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, en la EA, tau forma ovillos neurofibrilares intraneuronales ("neurofibrillary tangles", NFT), que tienden a desarrollarse en secuencia desde las regiones transentorrinal, límbica y neocortical, y que se correlacionan con la gravedad de la demencia y el alcance de la pérdida neuronal. En la PSP, la agregación de tau se observa en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos dentro de regiones subcorticales y corticales, y se ha demostrado que la densidad de la tau agregada se correlaciona con la intensidad de la pérdida neuronal.

Se conocen anticuerpos contra tau. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 8 926 974 y las publicaciones internacionales n.ºs WO2011/026031, WO2012/049570 y WO2013/050567 divulgan anticuerpos contra tau y usos de anticuerpos contra tau para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la EA.

El documento WO 2014/100600 describe anticuerpos específicos de la tau humana y su uso en descripciones farmacéuticas y composiciones diagnósticas.

El documento WO 2014/059442 describe anticuerpos que reconocen específicamente la tau oligomérica, pero no se unen a la tau monomérica, a la tau fibrilar o a formas de tau no relacionadas con la enfermedad.

El documento WO 2012/149365 describe anticuerpos selectivos para dímeros de tau patológicos y su uso en el tratamiento, el diagnóstico y el seguimiento de taupatías.

D.L. Castillo-Carranza *et al.*, "Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles", vol. 34, n.º 12, 19 de marzo de 2014, págs. 4260-4272 describen la inmunización pasiva con un anticuerpo monoclonal contra un oligómero de tau. Analiza el papel de los oligómeros de tau en la progresión de la enfermedad y la validación de los oligómeros de tau como diana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Sin embargo, hasta la fecha no se ha aprobado ningún anticuerpo dirigido a tau para un uso terapéutico y actualmente no hay terapias modificadoras de la enfermedad aprobadas para la EA o la PSP. Así pues, sigue siendo necesario encontrar anticuerpos alternativos contra tau. En concreto, siguen siendo necesarios anticuerpos alternativos contra tau que se unan específicamente a los agregados de tau y que reduzcan la propagación de la formación de agregados de tau, la formación de NFT y la pérdida neuronal. Preferentemente, dichos anticuerpos tau también poseen buenas propiedades fisicoquímicas para facilitar el desarrollo, la fabricación y/o la formulación.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a tau humana y que comprende una región variable de cadena ligera ("light chain variable region", LCVR) y una región variable de cadena pesada ("heavy chain variable region", HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de complementariedad ("complementarity determining regions", CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3, y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la secuencia de aminoácidos de LCDR1 se indica en SEQ ID NO:3, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 se indica en SEQ ID NO:4, la secuencia de aminoácidos de LCDR3 se indica en SEQ ID NO:5, la secuencia de aminoácidos de HCDR1 se indica en SEQ ID NO:6, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 se indica en SEQ ID NO:7, y la secuencia de aminoácidos de HCDR3 se indica en SEQ ID NO:8. También se divulga, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo monoclonal que se une a la tau humana, que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la secuencia de aminoácidos de LCVR se indica en SEQ ID NO:9 y la secuencia de aminoácidos de HCVR se indica en SEQ ID NO: 10. Otra divulgación, pero que no forma parte de la invención es un anticuerpo monoclonal que se une a la tau humana, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la secuencia de aminoácidos de LC se indica en SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos de HC se indica en SEQ ID NO:2.

- 5 El anticuerpo monoclonal según la presente invención es un anticuerpo que se une a la tau humana. Otra divulgación más, pero que no forma parte de la invención, es un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo conformacional de la tau humana y, en una divulgación concreta, el epítipo conformacional de la tau humana incluye los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de la tau humana, en el que la secuencia de aminoácidos de la tau humana se indica en SEQ ID NO:13.
- La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo monoclonal de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en terapia y, en concreto, para su uso en el tratamiento de la EA, PSP o EP.
- 10 La presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal de la presente invención para su uso en terapia. Más concretamente, la presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal de la presente invención para su uso en el tratamiento de la EA, la PSP o la EP.
- Un aspecto de la divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico y vectores de expresión que codifican el anticuerpo monoclonal de la presente invención. En un aspecto de la divulgación, una molécula de ADN comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. También se proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. Se proporciona además una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En un aspecto concreto de la divulgación, la secuencia polinucleotídica codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 que se indica en SEQ ID NO:11, y la secuencia polinucleotídica codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 que se indica en SEQ ID NO:12.
- 15 Además, un aspecto de la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal preparado según un proceso, en el que dicho proceso comprende cultivar una célula hospedadora que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en condiciones tales que se exprese el anticuerpo monoclonal, y recuperar de dicha célula hospedadora un anticuerpo monoclonal que comprende una LC y una HC, en el que la secuencia de aminoácidos de LC se indica en la SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos de HC se indica en la SEQ ID NO:2.
- 20 Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina que comprende 2 HC y 2 LC interconectadas por enlaces disulfuro. La porción amino-terminal de cada LC y HC incluye una región variable de aproximadamente 100 a 120 aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno a través de las CDR que contiene. Las CDR están intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco ("framework regions", FR). Cada LCVR y HCVR se compone de 3 CDR y 4 FR, dispuestos desde el amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las 3 CDR de la LC se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3", y las 3 CDR de la HC se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3" Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La capacidad funcional de un anticuerpo para unirse a un antígeno concreto depende en gran medida de las seis CDR. La asignación de aminoácidos a dominios CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR de los anticuerpos de la presente invención se basa en la conocida convención de numeración de Kabat (Kabat, *et al.*, Ann. NY Acad. Sci., 190:382-393 (1971); Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de NIH n.º 91-3242 (1991)), y la convención de numeración de North (North *et al.*, A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)).
- 25 Las LC se clasifican como kappa o lambda, cada una de las cuales se caracteriza por una región constante concreta, tal como se conoce en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen LC kappa. Las HC se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo de un anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen HC de IgG. Los anticuerpos IgG pueden dividirse a su vez en subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En una realización concreta, los anticuerpos monoclonales de la presente invención son IgG4. La porción carboxi-terminal de cada HC define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En una realización concreta, los anticuerpos monoclonales de la presente invención tienen una o más modificaciones en la región constante de cada HC que reduce la función efectora. En una realización más concreta, los anticuerpos monoclonales de la presente invención son IgG4 y tienen modificaciones en la región constante de ambas HC que reducen la función efectora que incluye el aminoácido alanina en ambos residuos 230 y 231 (numeración de residuos basada en la HC ilustrada de SEQ ID NO:2). En una realización aún más concreta, los anticuerpos monoclonales de la presente invención son IgG4 y tienen modificaciones en la región constante de ambas HC que reducen la función efectora que incluye el aminoácido alanina en ambos residuos 230 y 231 y tienen otras modificaciones en la región constante de ambas HC que favorecen la estabilidad que incluye el aminoácido prolina en el residuo 224 y la delección del aminoácido lisina en el residuo 443 (numeración de residuos basada en la HC ilustrada de SEQ ID NO:2).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales ("mAb"). Los mAb para la presente invención son mAb completos que contienen 2 HC y 2 LC. Tal como se menciona en el presente documento, los mAb son anticuerpos derivados de una única copia o clon que incluye, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no el procedimiento por el que se produce. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse, por ejemplo, mediante tecnologías de hibridoma, tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación por fagos, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injerto de CDR, o combinaciones de tales tecnologías u otras conocidas en la técnica.

Los procedimientos de producción y purificación de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y., capítulos 5-8 y 15, ISBN 0-87969-314-2. Por ejemplo, se puede inmunizar a ratones con filamentos helicoidales apareados ("paired helical filaments", PHF) de tau humana procedentes de tejido cerebral de pacientes con EA (Jicha *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 15:48(2), 128-132 (abril, 1997)), y los anticuerpos resultantes pueden recuperarse, purificarse y las secuencias de aminoácidos pueden determinarse mediante procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención están diseñados para contener una o más regiones marco humanas que rodean las CDR derivadas de un anticuerpo no humano. Las secuencias de la línea germinal del marco humano pueden obtenerse de ImMunoGeneTics (INGT) a través de su sitio web, <http://imgt.cines.fr>, o de *The Immunoglobulin FactsBook* por Marie-Paule Lefranc y Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Según realizaciones concretas de la presente invención, las regiones marco de HC y marco de LC de la línea germinal concretas para su uso en anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen 5-51 y A27, respectivamente.

En realizaciones concretas de la presente invención, el anticuerpo, o el ácido nucleico que lo codifica, se proporciona en forma aislada. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislado" se refiere a una proteína, un péptido o un ácido nucleico que no está acompañado o prácticamente no está acompañado de otras especies macromoleculares que se encuentran en un entorno celular.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden prepararse y purificarse utilizando procedimientos conocidos. Por ejemplo, las secuencias de ADNc que codifican una HC (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2) y una LC (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1) pueden clonarse e introducirse en un vector de expresión de GS (glutamina sintetasa). A continuación, el vector de expresión de inmunoglobulinas diseñado puede transfectarse de forma estable en células CHO. Tal como podrá apreciar un experto en la materia, la expresión de anticuerpos en mamíferos dará lugar a una glucosilación, normalmente en sitios de N-glucosilación altamente conservados en la región Fc. Los clones estables pueden verificarse para la expresión de un anticuerpo que se une específicamente a los agregados de tau. Los clones positivos pueden expandirse en medio de cultivo sin suero para la producción de anticuerpos en biorreactores. Los medios hacia los que se ha secretado un anticuerpo pueden purificarse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el medio puede aplicarse convenientemente a una columna de proteína A o G Sepharose FF que haya sido equilibrada con un tampón compatible, tal como solución salina tamponada con fosfato. La columna se lava para eliminar los componentes de unión no específica. El anticuerpo unido se eluye, por ejemplo, mediante un gradiente de pH y las fracciones de anticuerpo se detectan, por ejemplo, por SDS-PAGE, y luego se agrupan. El anticuerpo puede concentrarse y/o esterilizarse por filtración utilizando las técnicas habituales. Los agregados y multímeros solubles pueden eliminarse con eficacia mediante técnicas habituales, tales como la exclusión por tamaño, la interacción hidrofóbica, el intercambio iónico o la cromatografía en hidroxipatita. El producto puede congelarse inmediatamente, por ejemplo, a -70 °C, o liofilizarse.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de pacientes. Más concretamente, se prevé que los anticuerpos de la presente invención sirvan para tratar una clase de trastornos neurodegenerativos, denominados tauopatías, que incluyen la EA, la PSP y la EP. Aunque se prevé que los anticuerpos monoclonales de la presente invención sean útiles en el tratamiento de la EA, la PSP y la EP, dichos anticuerpos también pueden ser útiles en el tratamiento de otras tauopatías, incluida la encefalopatía traumática crónica. Tal como se utilizan indistintamente en el presente documento, "tratamiento" y/o "tratar" se refieren a todos los procesos en los que se puede ralentizar, interrumpir, cesar, controlar, detener o revertir la progresión de los trastornos descritos en el presente documento, pero no indican necesariamente una eliminación total de todos los síntomas del trastorno. El tratamiento incluye la administración de un anticuerpo de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o una afección en un ser humano que se beneficiaría de una reducción en la propagación de al menos una de la formación de agregados tau, la formación de NFT y la pérdida neuronal, e incluye: (a) inhibir la progresión de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el trastorno o aliviar sus síntomas o complicaciones.

Tal como se utilizan indistintamente en el presente documento, los términos "paciente", "sujeto" e "individuo" se refieren a un ser humano. En determinadas realizaciones, el paciente se caracteriza además por padecer una enfermedad, un trastorno o una afección (por ejemplo, un trastorno neurodegenerativo) que se beneficiaría de una reducción en la propagación de al menos una de la formación de agregados tau, la formación de NFT y la pérdida neuronal. En otra realización, el paciente se caracteriza además por estar en riesgo de desarrollar un trastorno, una enfermedad o una afección neurodegenerativos que se beneficiaría de una reducción en la propagación de al menos una de la formación de agregados tau, la formación de NFT y la pérdida neuronal.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "unirse (o se une)" a tau se refiere a una interacción de un anticuerpo con un epítipo del agregado de tau humana. Más preferentemente, el epítipo es un epítipo conformacional de la tau humana. En una realización concreta, el término "unirse (o se une)" a tau se refiere a una interacción con un epítipo conformacional que incluye los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 del agregado de tau humana (numeración de residuos basada en la tau humana ilustrada de SEQ ID NO:13). Debe entenderse que existen variaciones conocidas de la proteína tau humana, por ejemplo, resultantes de variantes de corte y empalme. Tales variaciones conocidas, sin embargo, poseen el epítipo conformacional que incluye los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de SEQ ID NO:13. Las variantes conocidas, sin embargo, pueden dar lugar a una numeración de residuos alterada para los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de SEQ ID NO:13. Aunque la numeración de los residuos puede verse alterada en algunas variantes, los aminoácidos que componen el epítipo siguen siendo los mismos. El término "epítipo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a sitios tridimensionales discretos de un antígeno que son reconocidos por los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención puede incorporarse en una composición farmacéutica que puede prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica y comprender un anticuerpo monoclonal de la presente invención y uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, Remington, *The Science and Practice of Pharmacy*, 22ª edición, Loyd V., ed., Pharmaceutical Press, 2012, que ofrece un compendio de técnicas de formulación conocidas en general por los profesionales). Los vehículos adecuados para composiciones farmacéuticas incluyen cualquier material que, cuando se combina con el anticuerpo monoclonal de la presente invención, conserva la actividad de la molécula y no es reactivo con el sistema inmunitario del paciente.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de la presente invención puede administrarse a un paciente en riesgo de padecer o que padece enfermedades o trastornos, tales como los descritos en el presente documento, por vías parentales (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o transdérmica). Una composición farmacéutica de la presente invención contiene una cantidad "eficaz" o "terapéuticamente eficaz", tal como se utilizan indistintamente en el presente documento, de un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Una cantidad eficaz se refiere a una cantidad necesaria (en dosis y durante periodos de tiempo y por el medio de administración) para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal puede variar en función de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo monoclonal para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo monoclonal de la presente invención es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Anticuerpo contra tau diseñado

Se encontraron problemas significativos asociados con la estabilidad química y física al construir un anticuerpo monoclonal contra tau de la presente invención. Los problemas encontrados incluyen baja afinidad de unión, inmunogenicidad, agregación, dimerización de HC, así como desamidación, oxidación, isomerización y plegamiento incorrecto de la región variable.

Por ejemplo, el anticuerpo IgG1 murino MC-1 ("MC-1") (Albert Einstein College of Medicine, Jicha *et al.*, 1997), que reconoce un epítipo conformacional de la proteína tau en los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 (numeración de residuos basada en la proteína tau humana ilustrada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13) se humanizó inicialmente mediante la introducción de las tres CDR de HC murinas MC-1 en múltiples genes de la línea germinal del marco de HC humano y las tres CDR de LC murinas MC-1 en múltiples genes de la línea germinal del marco de LC humano. Las construcciones humanizadas de MC-1 utilizaron 96 combinaciones diferentes de marcos de cadena pesada y ligera, que representaban cada una de las doce familias de la línea germinal de marcos de HC (marcos de HC humanos específicos: 1-24, 1-46, 1-69, 2-05, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04, 4-39, 5-51 y 6-01) y cada una de las ocho familias de la línea germinal de LC (marcos de LC humanos específicos: A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12, O11 y O-2). Los respectivos genes de la línea germinal del marco se clonaron en vectores de expresión de IgG4 humana de cadena pesada y ligera y se transfecaron en células HEK293 para su expresión y el análisis de la unión mediante ELISA. Aunque múltiples pares de marcos demostraron cierto nivel de unión a tau humana en ELISA, las construcciones de anticuerpos resultantes mostraron una miríada de problemas, entre ellos una escasa afinidad de unión, agregación, dimerización de HC y problemas de estabilidad química, tales como desamidación, oxidación e isomerización en las regiones variables.

Por lo tanto, se diseñaron modificaciones para desarrollar anticuerpos tau que poseyeran una afinidad de unión mejorada, eliminaran o redujeran la dimerización de HC, redujeran la inmunogenicidad y mejoraran la estabilidad química y física. Se diseñaron modificaciones de aminoácidos (en relación con MC-1, Jicha *et al.*, 1997) en HCDR2 y HCDR3, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El anticuerpo murino modificado se humanizó mediante la introducción de las tres CDR de HC en múltiples genes de la línea germinal del marco de HC humano y las tres CDR de LC en múltiples genes de la línea germinal del de LC humano, fundamentalmente como se ha descrito anteriormente. Además, se realizaron estudios exhaustivos de estabilidad de proteínas y se analizaron las propiedades de expresión y termoestabilidad de los anticuerpos monoclonales modificados, así como sus propiedades de afinidad de unión. Se identificó un anticuerpo monoclonal que contiene siete mutaciones en CDR (la posición de los aminoácidos se basa en la numeración lineal de residuos de aminoácidos de un anticuerpo ilustrado de la presente invención reflejada en la tabla 1: HCDR2 en N61E y E62K; HCDR3 en P103V y Y105D; LCDR1 en G34Q; LCDR2 en S57D; y LCDR3 en

H98L) que mejoraba la afinidad de unión, la estabilidad química y física, y la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales de la presente invención (en relación con MC-1, Jicha *et al.*, 1997). Ninguna de las modificaciones anteriores se identificó en las caracterizaciones de MC-1 o de las construcciones de anticuerpos MC-1 humanizados.

5 En la tabla 1 se presenta un anticuerpo monoclonal contra tau diseñado ilustrado de la presente invención. El anticuerpo monoclonal contra tau diseñado ilustrado incluye el marco de HC humano 5-51 y el marco de LC humano A27. La relación de las diversas regiones del anticuerpo monoclonal contra tau diseñado ilustrado es la siguiente (la numeración de aminoácidos aplica la numeración lineal; la asignación de aminoácidos a dominios variables se basa en el International Immunogenetics Information System® disponible en www.imgt.org; la asignación de aminoácidos a dominios CDR se basa en la conocida convención de numeración de North, con la excepción de HCDR2, que se basa en la conocida convención de numeración de Kabat):

Tabla 1: Regiones de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal contra tau diseñado ilustrado de la presente invención.

SEQ ID NO:2			SEQ ID NO:1		
	Región	Posiciones		Región	Posiciones
HCVR	FRH1	1-22	LCVR	FRL1	1-23
	HCDR1	23-35		LCDR1	24-39
	FRH2	36-49		FRL2	40-53
	HCDR2	50-66		LCDR2	54-61
	FRH3	67-96		FRL3	62-93
	HCDR3	97-105		LCDR3	94-102
	FRH4	106-116		FRL4	103-112
Constante	CH	117-442	Constante	CL	113-219

15 Los siguientes ejemplos y ensayos demuestran que los anticuerpos monoclonales de la presente invención son útiles para tratar trastornos neurodegenerativos asociados con la propagación de agregados de tau, tales como la EA, la PSP o la EP.

Ejemplos

Expresión del anticuerpo contra tau diseñado

20 Los anticuerpos monoclonales contra tau diseñados de la presente invención pueden expresarse y purificarse fundamentalmente como sigue. Se utiliza un vector de expresión de glutamina sintetasa (GS) que contiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO:11 (que codifica la secuencia de aminoácidos de LC de SEQ ID NO:1) y la secuencia de ADN de SEQ ID NO:12 (que codifica la secuencia de aminoácidos de HC de SEQ ID NO:2) para transfectar una línea de células de ovario de hámster chino ("Chinese hamster ovary", CHO) mediante electroporación. El vector de expresión codifica un promotor SV Early (virus de simio 40E) y el gen de la GS. La expresión de GS permite la síntesis bioquímica de glutamina, un aminoácido necesario para las células CHO. Tras la transfección, las células se someten a selección masiva con L-metionina sulfoximina (MSX) 50 µM. La inhibición de la GS por MSX se utiliza para aumentar la rigurosidad de la selección. Las células con integración del ADNc del vector de expresión en regiones transcripcionalmente activas del genoma de la célula hospedadora pueden seleccionarse frente a las células CHO de tipo salvaje, que expresan un nivel endógeno de GS. Las agrupaciones transfectadas se siembran a baja densidad para permitir el crecimiento casi clonal de células con expresión estable. Los pocillos maestros se analizan para determinar la expresión de anticuerpos y, a continuación, se escalan en cultivos en suspensión sin suero que se utilizarán para la producción. El medio aclarado, al que se ha secretado el anticuerpo, se aplica a una columna de afinidad de proteína A que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La columna se lava con NaCl 1 M para eliminar los componentes de unión no específica. El anticuerpo monoclonal contra tau unido se eluye, por ejemplo, con citrato de sodio a pH (aprox.) 3,5 y las fracciones se neutralizan con tampón Tris 1 M. Las fracciones de anticuerpos monoclonales contra tau se detectan, por ejemplo, mediante SDS-PAGE o exclusión analítica por tamaño, y luego se agrupan. Los agregados y multímeros solubles pueden eliminarse

con eficacia mediante técnicas habituales, tales como la exclusión por tamaño, la interacción hidrofóbica, el intercambio iónico o la cromatografía en hidroxiapatita. El anticuerpo monoclonal contra tau de la presente invención se concentra y/o se esteriliza por filtración utilizando técnicas habituales. La pureza del anticuerpo monoclonal contra tau tras estas etapas cromatográficas es superior al 95 %. El anticuerpo monoclonal contra tau de la presente invención puede congelarse inmediatamente a -70 °C o almacenarse a 4 °C durante varios meses.

Cinética y afinidad de unión

Se utiliza un ensayo de resonancia de plasmón superficial ("Surface Plasmon Resonance", SPR), medido con un instrumento BIACORE® 2000 (cebado con tampón de análisis HBS-EP+ (GE Healthcare, Hepes 10 mM, pH 7,4 + NaCl 150 mM + EDTA 3 mM + tensioactivo P20 al 0,05 %) a 25 °C) para medir la unión del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 tanto a tau monomérica humana (por ejemplo, nativa o no agregada) y agregados de tau humana (ambos con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:13). La unión de la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 cadena pesada, A27 cadena ligera) a la tau monomérica humana y al agregado tau humano se mide de la misma manera.

Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos y materiales proceden de BIACORE® AB (Upsala, Suecia). Para emplear una metodología de captura se utiliza un chip CM5 que contenía proteína A inmovilizada (generada mediante acoplamiento de amina NHS-EDC convencional) en las cuatro celdas de flujo (CF). Las muestras de anticuerpos se preparan a 0,5 µg/ml por dilución en tampón de análisis. La tau monomérica y la tau fibrilar se preparan a concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,82, 3,91, 1,95 y 0 (blanco) nM por dilución en tampón de análisis. Cada ciclo de análisis consiste en lo siguiente: (1) captura de muestras de anticuerpos en celdas de flujo separadas (CF2, CF3 y CF4); (2) inyección de 250 µl (300 s) de tau monomérica o agregado de fibrillas de tau en las CF respectivas a una velocidad de 50 µl/min; (3) retorno al flujo de tampón durante 20 min para controlar la fase de disociación; (4) regeneración de las superficies de los chips con una inyección de 25 µl (30 s) de glicina, pH 1,5; (5) equilibrio de las superficies de los chips con una inyección de 50 µl (60 s) de HBS-EP+.

Los datos de unión al agregado de tau se procesan utilizando la doble referencia convencional y se ajustan a un modelo de unión 1:1 utilizando el software Biacore 2000 Evaluation, versión 4.1, para determinar la tasa de asociación (k_{on} , unidades $M^{-1}s^{-1}$), la tasa de disociación (k_{off} , unidades s^{-1}) y $R_{m\acute{a}x}$ (unidades RU). La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculó a partir de la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$, y se expresa en unidades molares. Los datos de unión a tau monomérica no pueden determinarse con precisión mediante SPR como se ha descrito anteriormente debido a las rápidas tasas de activación y desactivación. Por lo tanto, la K_D para la unión a tau monomérica se obtiene utilizando un modelo de ajuste de unión en estado estacionario a partir de la representación gráfica de la concentración de antígeno frente a la unidad de respuesta. Los datos de unión resultantes se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Datos de unión SPR a tau humana monomérica y agregada.

		k_{on} (unidades $M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (unidades $M^{-1}s^{-1}$)	KD^* (nM)
mAb contra Tau ilustrado del ejemplo 1	Tau monomérica	No detectable	No detectable	235
	Agregado de tau	4,59e4	<1e-5	<0,22
Construcción de Ab MC-1 humanizado	Tau monomérica	No determinado	No determinado	550
	Agregado de tau	5,75e4	1,02e-4	1,77

* Los resultados de K_D se consideran relativos, ya que los resultados no están normalizados para tener en cuenta la influencia de la avidéz.

Los resultados proporcionados en la tabla 2 demuestran que el anticuerpo monoclonal contra tau del ejemplo 1 no posee una unión medible a tau monomérica, de modo que pueda determinarse con precisión un valor de afinidad mediante el análisis Biacore (debido a las rápidas tasas de activación y desactivación). Por el contrario, los resultados proporcionados en la tabla 2 demuestran que el anticuerpo monoclonal contra tau del ejemplo 1 posee una afinidad mejorada por el agregado de tau en comparación con la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado.

Se utiliza un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("Enzyme-Linked Immunosorbant Assay", ELISA) para determinar la afinidad de unión relativa del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 a las fibrillas de tau agregadas de homogeneizados de cerebro con EA. Los homogeneizados de cerebro con EA se preparan a partir de aproximadamente 80 g de corteza cerebral de pacientes con EA. Brevemente, se añade tampón (TBS/PMSF 1 mM/1X cóctel de inhibidores de proteasa Complete® (Roche, p/n. 11 697 498 001) e inhibidor de fosfatasa

(ThermoFischer, p/n. 78428)) al tejido cerebral con EA a razón de aproximadamente 10 ml/1 g (de tejido). El tejido se homogeneiza utilizando una Kinematica Polytron manual a velocidad 6-7. A continuación, se homogeneiza el tejido con una bomba de Parr (Parr Instrument, p/n. 4653) a 10342,14 kPa (1500 psi) de nitrógeno durante 30 min. El homogeneizado se centrifuga a 28 000 g (rotor Beckman J14) durante 30 min a 4 °C. Se recoge el sobrenadante, se agrupa y se pasa por una precolumna de 4 cm de altura de Sepharose 400 Superflow para eliminar los restos más grandes, y después se pasa por una columna MC1-Affigel 10 de 25 ml a un caudal de 50-60 ml por hora, con el fin de purificar las fibrillas de tau que se unen a MC1. Para maximizar la recuperación de la purificación, los sobrenadantes se reciclan a través de la columna MC-1 durante 18-20 horas a 4 °C. Se retira la precolumna y se lava la columna MC1 con TBS con al menos 40 volúmenes de columna. A continuación, los agregados de tau unidos se eluyen con 2 volúmenes de columna de KSCN 3 M, recogiendo en fracciones de aproximadamente 1 ml. La concentración de proteínas en cada fracción eluida se comprueba mediante el ensayo Bradford en placa de microvaloración. Las fracciones que contenían niveles positivos de proteínas se agrupan, se concentran a aproximadamente 2 ml utilizando Centricon (Millipore Ultracel-30K) a 4 °C, y se dializan utilizando un casete Slide-A-Lyzer (10 K valor de corte de peso molecular, 3-12 ml, Pierce) durante toda la noche contra 1 litro de TBS. La concentración de tau dentro de las fibrillas de tau purificadas a partir de homogeneizado de cerebro con EA se mide mediante ELISA de sándwich utilizando el anticuerpo de captura DA-9 y el anticuerpo de detección CP27.

Las fibrillas de tau purificadas (50 µl) en PBS se recubren sobre pocillos de placas de 96 pocillos (Costar, p/n. 3690) en una concentración correspondiente a 0,7 µg/ml de tau total. Las placas se incuban durante toda la noche a 4 °C, después se lavan tres veces con 150 µl de PBST (PBS que contiene Tween-20 al 0,05 %), se bloquean en 100 µl de BB3 (ImmunoChemistry Technology, p/n. 643) a temperatura ambiente durante al menos 1 h (normalmente 2 h). Tras el bloqueo, se retira el tampón de bloqueo de los pocillos. El anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 y una construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 de cadena pesada, A27 de cadena ligera) se diluyen en tampón caseína al 0,25 % hasta obtener una solución madre 1000 nM y, a continuación, se diluyen en serie 23 veces con diluciones dobles. Se añaden 50 µl de solución madre y anticuerpo diluido en serie (ya sea el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 o la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado) a pocillos separados y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se lava la placa cuatro veces con 200 µl de PBST por pocillo. Se añaden 50 µl de anticuerpos anti-IgG humana-HRP (diluidos a 1:4000 en tampón caseína al 0,25 %) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se lava la placa con 200 µl de PBST por pocillo 4 veces. Se añaden 50 µl de TMB/H₂O₂ y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Se detiene la reacción añadiendo 50 µl de solución de interrupción (H₂SO₄ 2 N) y se mide la señal colorimétrica a 450 nm. Los datos se introducen en el programa Prism 6 (GraphPad) y se generan los valores de CE₅₀ utilizando un ajuste de curva de regresión no lineal y una respuesta a la dosis sigmoidal. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación de la CE₅₀ de la unión a fibrillas de tau de EA purificadas

Anticuerpo ensayado	CE ₅₀ (pM)
mAb contra tau ilustrado del ejemplo 1	6,8
construcción de Ab MC-1 humanizado	409,1

Tal como se refleja en la tabla 3, el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado de la presente invención muestra una afinidad 60 veces mejorada (medida por CE₅₀) por las fibrillas de tau purificadas frente a la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado.

La selectividad del anticuerpo monoclonal contra tau del ejemplo 1 por los agregados de tau frente al monómero de tau se determina por ELISA directo. Siguiendo el procedimiento ELISA sustancialmente como se indicó anteriormente, se recubre tau recombinante (rTau) sobre placas de 96 pocillos en una concentración correspondiente a una concentración "alta" (1 µg/ml) o "baja" (15 ng/ml). Una alta concentración de rTau, cuando se recubre sobre placas de micropocillos, se agrega, simulando la unión a tau agregada. La baja concentración de rTau, cuando se recubre sobre placas de micropocillos, simula la unión al monómero de tau. Las placas, recubiertas con concentraciones altas o bajas de rTau, respectivamente, se exponen al anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1, y la unión del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado en las concentraciones respectivas de rTau se mide sustancialmente como se describió en el ensayo ELISA anterior. Los resultados aparecen en la tabla 4.

Tabla 4. Comparación de EC₅₀ de la unión a una concentración "alta" frente a una concentración "baja" de rTau

Concentración de monómero rTau	CE ₅₀ (pM)
"Alta" (1 µg/ml)	6,0

Concentración de monómero rTau	CE ₅₀ (pM)
"Baja" (15 ng/ml)	722,7

Tal como se refleja en la tabla 4, el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 demuestra una afinidad 120 veces mejorada (medida por CE₅₀) por la tau agregada frente a la tau monomérica.

Estudios *ex vivo* de la unión a la diana

5 La unión del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 a la tau agregada derivada de cerebros humanos se determina mediante tinción inmunohistoquímica de secciones cerebrales fijadas en formol e incluidas en parafina ("formalin-fixed paraffin-embedded", FFPE) obtenidas de un individuo "normal" (que muestra agregación mínima de tau); un paciente con EA (que muestra agregación intensa de tau y formación de NFT, así como patología de placas amiloides); un paciente con EP (que muestra agregación intensa de tau). La tinción también se realiza en secciones cerebrales derivadas de un ratón "control" de tipo salvaje que no posee tau humana con el fin de determinar los niveles de tinción inespecífica de fondo.

15 Las secciones FFPE se desparafinizan y se rehidratan. A continuación, se realiza la recuperación de antígenos (utilizando el sistema de módulos Lab Vision PT, Thermo Scientific) en las secciones, lo que incluye calentar las secciones en tampón citrato (Thermo Scientific, p/n. TA-250-PM1X) durante 20 minutos a 100 °C y, a continuación, enfriar las secciones en dH2O. A continuación, las secciones se exponen a las siete etapas de incubación siguientes (a temperatura ambiente): (1) 10 min en H2O2 al 0,03 %; (2) 30 min en dilución 1:20 de suero normal de cabra (Laboratorios Vector, p/n. S-1000) diluido en PBST; (3) 60 min en el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 o en la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 cadena pesada, A27 cadena ligera) (tanto el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado como la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado se normalizan a 1 mg/ml, luego se diluyen en PBST hasta una dilución de 1:4000 antes de la incubación con las secciones); (4) 30 min en anti-IgG4 humana de conejo (generado contra la región Fc del anticuerpo ilustrado) a una concentración de 1,1 µg/ml en PBST; (5) 30 min en dilución 1:200 de anti-IgG de conejo de cabra biotilado (Laboratorios Vector., p/n. BA-1000) diluido en PBST; (6) 30 min en solución de complejo de avidina-biotina (Vector Labs., p/n. PK-7100); (7) 5 min en 3,3'-diaminobencidina (Vector Labs., p/n. SK-4105). Las secciones se lavan entre cada una de las 7 etapas anteriores utilizando PBST. Tras las siete etapas de incubación anteriores, las secciones se contratiñen con hematoxilina, se deshidratan y se cubren con un cubreobjetos. Para las secciones de tejido de "control" de ratón, el protocolo anterior se modifica en la etapa de incubación (3) utilizando una dilución 1:8000 (en lugar de una dilución 1:4000) tanto del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado como de la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado; y sustituyendo las etapas de incubación (4) y (5) por una única dilución de 30 min 1:200 de anti-IgG humana de cabra biotilado (Vector Labs. p/n. BA-3000) en PBST.

30 Siguiendo procedimientos sustancialmente como los descritos anteriormente, se realiza un análisis de la unión del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 a la tau derivada de cerebros humanos. Los resultados aparecen en la tabla 5.

Tabla 5. Análisis semicuantitativo de la unión a tau agregada en secciones FFPE de cerebro con EA.

	Intensidad de los agregados de tau detectados, medidos según un esquema de puntuación semicuantitativo (intensos, +++; moderados, ++; leves, +; negativo, -)			
	Control de tipo salvaje (murino)	Control normal (humano)	Enfermedad de Alzheimer	Enfermedad de Pick
mAb contra Tau ilustrado del ejemplo 1	-	+	+++	+++
Construcción de Ab MC-1 humanizado	-	-	+	+

35 Los resultados proporcionados en la tabla 5 reflejan que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 muestra niveles significativamente más altos de tinción a la tau agregada, tanto de pacientes con EA como con EP, en secciones cerebrales del hipocampo en comparación con la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado. Los resultados proporcionados en la tabla 5 también demuestran que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 no muestra una unión no específica mayor que la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (el

anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado muestra unión a la cantidad mínima de tau agregada en secciones humanas de control normales). Además, dado que la EA y la EP se caracterizan por variantes de corte y empalme distintas del gen que codifica tau, estos resultados apoyan la conclusión de que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 se une específicamente al epítipo conformacional que comprende los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de la tau humana (numeración de residuos basada en la tau humana ilustrada de SEQ ID NO:13) común a los agregados de tau tanto de EA como de EP.

Neutralización *in vitro* de la propagación de agregados de tau

Se sabe que las preparaciones homogeneizadas de cerebro de ratones P301S de aproximadamente 5 meses de edad, en presencia de tau nativa no agregada, inducen la agregación de la tau nativa y demuestran un efecto de propagación de la agregación de tau. Las preparaciones de homogeneizado insoluble en sarcosilo de tejido cerebral de ratones P301S de 4,5 a 5 meses de edad se sometieron a ultrasonidos y se diluyeron con OPTI-MEM (GIBCO by Life Tech., p/n. 31985-062) para llevar la tau medida (por preparación) a una concentración final de 0,77 µg/ml. Cada preparación se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con uno de los anticuerpos monoclonales contra tau del ejemplo 1 (concentraciones: 21,00, 7,00, 2,33, 0,78, 0,26, 0,09, 0,03 y 0,01 µg/ml) o construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (concentraciones: 50,00, 16,67, 5,56, 1,85, 0,62, 0,21, 0,07, 0,02 y 0,01 µg/ml).

Se transfectan células HEK293 (una línea celular de riñón embrionario humano) por electroporación para expresar induciblemente una forma mutante de la tau humana (1N4L, que tiene una serina sustituida por prolina en el residuo 301 (P301S) (numeración de residuos basada en la tau humana ilustrada de SEQ ID NO:13)) (Falcon B., *et al.*, J. Biol. Chem., 290:1049-1065, 2015). Las células HEK293 transfectadas de forma estable se cultivan en placa a una concentración de 1×10^4 células/pocillo en los pocillos de una placa de 96 pocillos en medio completo (medio D-MEM (Invitrogen, p/n. 11965-092), suero fetal bovino al 10 % (Invitrogen, p/n. 16000), 1x penicilina-estreptomina (Invitrogen, p/n. 15140-122), blasticina 5 µg/ml (Invitrogen, p/n. R210-01), zeocina 200 µg/ml (Invitrogen, p/n. R250-01)). Las placas se incuban durante tres días a 37 °C. Tras la incubación, se añade tetraciclina 1 mg/ml en una dilución 1:1000 por pocillo (hasta una concentración final de 1 µg de tetraciclina/ml de medio) para inducir la expresión de la tau mutante. A continuación, se incuban las placas durante 24 horas a 37 °C. Tras la incubación, se retira el medio de cultivo y se añaden 50 µl de preparación de homogeneizado con una de las concentraciones respectivas de uno de los anticuerpos monoclonales contra tau del ejemplo 1 o de la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (preparada como se ha descrito anteriormente). Las placas se incuban durante tres horas, tras lo cual se retira la preparación de homogeneizado y se añaden a cada pocillo 100 µl de medio completo con tetraciclina 1 µg/ml y la misma concentración respectiva del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado o de la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado. Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C, tras lo cual se retira el medio y se añaden 100 µl de medio completo y la misma concentración respectiva del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado o de la construcción de anticuerpo MC-1 humanizado a los pocillos respectivos. Las placas se incuban durante 48 horas a 37 °C. Tras la incubación, se lavan las células con 200 µl de DPBS y se escurren.

Las células se resuspenden en 50 µl de tampón H (TBS, pH 7,4 con EGTA 2 mM, EDTA 5 mM, inhibidor de proteasas y fosfatasa (Thermo Scientific, p/n. 784420)) por pocillo y se sometieron a un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. La concentración de proteína total se mide mediante el ensayo de proteínas BCA™ (Thermo Scientific, p/n. PI-23227). Los niveles de agregados de tau se determinan mediante ELISA de sándwich. Se recubren placas de 96 pocillos con 50 µl de anticuerpo AT8 2 µg/ml a 4 °C durante la noche. Las placas se lavan tres veces con PBST y luego se bloquean con 100 µl de BB3 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepara una curva patrón utilizando extracto total de cerebro con EA mediante dilución en serie en tampón de caseína al 0,25 % utilizando diluciones dobles desde una concentración inicial de 40 µg/ml hasta una concentración final de 0,3125 µg/ml. Los lisados celulares se diluyen en tampón de caseína al 0,25 % hasta alcanzar una concentración total de proteínas de aproximadamente 0,1 mg/ml. A continuación, se añaden 50 µl de cada dilución de muestra patrón o de muestras celulares diluidas en pocillos separados de placas bloqueadas y se incuban a 4 °C durante toda la noche, tras lo cual las placas se lavan cuatro veces con PBST. El anticuerpo CP27 biotinilado se diluye 1:2000 en tampón de caseína al 0,25 % y se añaden 50 µl a los pocillos que contienen las muestras. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas, tras lo cual se lavan cuatro veces con PBST. Se diluye estreptavidina-HRP (Invitrogen, p/n. SNN2004) 1:5000 en tampón de caseína al 0,25 %, se añaden 50 µl a cada pocillo y se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras la incubación, las placas se lavan 4 veces con PBST y se añaden 50 µl de una mezcla 1:1 de H₂O₂ y TMB (Thermo Scientific, p/n. 34021). Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 10 min y la reacción se detiene añadiendo 50 µl de H₂SO₄. La señal colorimétrica se mide a 450 nm o 650 nm. Los niveles de tau positiva a AT8 se normalizan frente a los niveles de proteína total en cada muestra. Los valores normalizados para cada muestra se normalizan además con respecto a los niveles de tau positiva a AT8 en las muestras de control (no tratadas con anticuerpo). El porcentaje de inhibición de la propagación de agregados de tau en cada muestra se determina restando los valores normalizados adicionalmente de 100, y el valor del porcentaje de inhibición de cada muestra se introduce en el programa Prism 6 Software (GraphPad) aplicando un ajuste de curva de regresión no lineal y una respuesta a la dosis sigmoidal para generar los valores de CE₅₀. Los resultados aparecen en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de CE₅₀ representativos de la inhibición de la propagación de agregados de tau.

	Ab contra tau diseñado ilustrado del ejemplo 1	Construcción de Ab MC- 1 humanizado
CE₅₀ (que representa la inhibición de la propagación de agregados de tau positiva a AT8 (ng/ml))	16	476

Los resultados proporcionados en la tabla 6 reflejan que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 muestra una mejora de aproximadamente 30 veces en la inhibición de la propagación inducida de agregados de tau.

Neutralización *in vivo* de la propagación de agregados de tau

- 5 Se sabe que las preparaciones homogeneizadas de tronco encefálico de ratones P301S de aproximadamente 5 meses de edad, al ser inyectadas en el hipocampo de ratones P301S hembra normales de 10 semanas de edad, inducen la agregación de la tau nativa, no agregada, por lo que demuestran un efecto de propagación de la agregación de tau. Las preparaciones homogeneizadas de tejido de tronco encefálico de ratones P301S de 4,5 a 5 meses de edad se preparan sustancialmente de la misma forma que la descrita anteriormente.
- 10 Ratones P301S hembra normales de 10 semanas de edad reciben inyecciones en el hemisferio izquierdo del hipocampo de 5 µl de preparación homogeneizada de cerebro y: 7,5 µg de anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 (N = 12); o 7,5 µg de anticuerpo IgG4 humano de control (N = 11). Cuatro semanas después de la inyección, se sacrifica a los ratones y se recogen los hemisferios izquierdo y derecho, se incluyen en parafina y se montan secciones seriadas de 6 µm sobre portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos que contienen bregma (A-P = -2,30) se desparafinizan, se rehidrata el tejido incluido y se realiza la recuperación de antígenos calentando el portaobjetos hasta 100 °C durante 20 min en tampón citrato. Los portaobjetos se enfrían en dH₂O y se incuban a temperatura ambiente siguiendo las etapas siguientes: (a) 10 min en H₂O₂ (al 0,03 %); (b) 30 min en una dilución 1:20 de suero de cabra normal; (c) 60 min en una dilución 1:8000 de anticuerpo PG-5 (diluido en PBST) (anticuerpo PG-5 obtenido del laboratorio del doctor Peter Davies, del Albert Einstein College of Medicine de la Yeshiva University; el anticuerpo PG-5 se une específicamente a la serina en el residuo 409 de tau cuando está fosforilada, numeración de residuos basada en la tau humana ilustrada de SEQ ID NO:13); (d) 30 min en una dilución 1:200 de anticuerpo anti-IgG de ratón de cabra biotinilado (diluido en PBST); (e) 30 min en solución de complejo de avidina-biotina; y (f) 5 min en 3,3'-diaminobencidina. Se utiliza PBST para el lavado entre las etapas respectivas. Tras la incubación de 5 minutos en 3,3'-diaminobencidina, las secciones se contratiñen con hematoxilina, se rehidratan y se cubren con un cubreobjetos. La señal de tinción se mide con el escáner de portaobjetos Scanscope AT (Aperio) a 20 aumentos. La inmunoreactividad de PG-5 se cuantifica y se expresa en porcentaje utilizando el algoritmo de píxel positivo del software Imagescope (v. 11.1.2.780, Aperio). Los resultados aparecen en la tabla 7.
- 25

Tabla 7. Porcentaje medio de inmunoreactividad de PG-5 en el hipocampo izquierdo y derecho, respectivamente.

	(% de inmunoreactividad de PG-5)	
	Hipocampo izquierdo	Hipocampo derecho
mAb contra Tau ilustrado del ejemplo 1	2,52 ± 0,49 EEM	0,63 ± 0,13 EEM
Ab IgG4 de control	6,38 ± 0,93 EEM	1,88 ± 0,31 EEM

- 30 Los resultados proporcionados en la tabla 7 demuestran que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 reduce el nivel de agregación de tau tanto en el hipocampo izquierdo como en el derecho en comparación con el anticuerpo IgG4 de control. Tal como se muestra, el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado produce una reducción un 60,5 % mayor en la agregación de tau en el hipocampo izquierdo, y una reducción un 66,5 % mayor en la agregación de tau en el hipocampo derecho, respectivamente, en comparación con el anticuerpo IgG4 de control.
- 35 Estos resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado posee actividad neutralizante contra la propagación de la agregación de tau.

Análisis de la eficacia *in vivo* en el modelo murino Tg4510

- 40 Los ratones transgénicos Tg4510 expresan una forma mutante de tau humana (4R0N, que tiene una leucina sustituida por prolina en el residuo 301 (P301L); Ramsden M., *et al.*, J. Neuroscience, 25: 10637-10647 (2005) y Santacruz K., *et al.*, Science (2005); numeración de residuos basada en la tau humana ilustrada de SEQ ID NO:13). Los ratones Tg4510 presentan altos niveles de expresión de la tau humana mutante P301L en las regiones del hipocampo y la neocorteza, lo que demuestra una progresión de la agregación de tau dependiente de la edad.

Los anticuerpos tau de la presente invención pueden inducir una respuesta inmunogénica en ratones Tg4510. Por lo tanto, para probar el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales contra tau de la presente invención para la administración crónica en un modelo de roedor, se construye un anticuerpo contra tau murina sustituto dirigido al mismo epítipo conformacional y que refleja niveles similares de afinidad mejorada en relación con el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1. El anticuerpo contra tau sustituto tiene una afinidad (CE_{50}) por las fibrillas de tau de EA purificadas, medida por ELISA como se ha descrito anteriormente (para el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1), de 13,1 pM.

Ratones hembra Tg4510 de ocho semanas de edad se agrupan en 3 grupos distintos. Al primer grupo (N = 15) se le inyecta un anticuerpo IgG1 de ratón de control (15 mg/kg) dos veces por semana durante 9 semanas. Al segundo grupo (N = 15) se le inyecta dos veces por semana durante 9 semanas anticuerpo MC-1 recombinante (15 mg/kg) producido a partir de ascitis de ratón inyectado con hibridoma MC-1. Al tercer grupo (N = 15) se le inyecta anticuerpo contra tau murina sustituto (15 mg/kg) dos veces por semana durante 9 semanas. Tras la última administración, se sacrifica a los ratones y se recogen sus cerebros. Se recogen porciones de secciones de corteza e hipocampo, se incluyen en parafina y se montan secciones seriadas de 6 μ m sobre portaobjetos de vidrio para su uso en inmunohistoquímica.

El resto de la región de la corteza de los cerebros recogidos se homogeneiza mediante ultrasonidos en pulsos en un volumen de tampón H 10 veces mayor que el volumen de la corteza, se centrifuga a 21 000 g durante 20 min a 4 °C y se recoge una parte alícuota del sobrenadante de cada corteza y se determinan los niveles de proteínas totales mediante el ensayo de proteínas BCA™ (Thermo Scientific, p/n. PI-23227) según el protocolo del fabricante. El resto del sobrenadante se centrifuga a 100 000 g durante 1 hora a 4 °C, se desecha el sobrenadante y el precipitado insoluble obtenido se resuspende en tampón H (en un volumen equivalente a la mitad del volumen de sobrenadante desechado). El precipitado resuspendido se somete a ultrasonidos y los niveles de agregados de tau positiva a AT8 en cada precipitado se determinaron mediante ELISA utilizando el anticuerpo de captura AT8 y el anticuerpo de detección CP27 sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Los niveles de agregados de tau positiva a AT8 se normalizan frente a los niveles de proteína total.

De modo similar, el resto del hipocampo de los cerebros recogidos se homogeneiza con ultrasonidos en pulsos en un volumen de tampón H 10 veces mayor que el volumen del hipocampo, se centrifuga a 21 000 g durante 20 min a 4 °C y se recoge el sobrenadante de cada hipocampo y se determinan los niveles de proteínas totales. Los niveles de agregados de tau positiva a AT8 en el sobrenadante se determinan mediante ELISA utilizando el anticuerpo de captura AT8 y el anticuerpo de detección CP27 sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Los niveles de agregados de tau positiva a AT8 se normalizan frente a los niveles de proteína total. Los resultados aparecen en la tabla 8.

Tabla 8. Niveles de agregados de tau positiva a AT8 en homogeneizado cerebral de corteza e hipocampo medidos mediante ELISA.

	Nivel de agregados de tau positiva a AT8 (μ g/mg)	
	<u>Corteza</u>	<u>Hipocampo</u>
Ab contra tau murina sustituto	1416 \pm 195 EEM	386 \pm 71 EEM
Ab mlgG1 de control	1872 \pm 198 EEM	591 \pm 66 EEM
Ab mlgG1 rMC-1	1703 \pm 138 EEM	510 \pm 62 EEM

Los resultados proporcionados en la tabla 8 demuestran que el anticuerpo contra tau murina sustituto redujo los niveles de agregados de tau tanto en la corteza como en el hipocampo en un 24 % y 35 %, respectivamente, en relación con los ratones tratados con mlgG1 de control. Los resultados demuestran además que los ratones tratados con el anticuerpo MC-1 murino recombinante no mostraron una mejor reducción de los niveles de agregados de tau que los ratones tratados con mlgG1 de control.

El nivel de agregación de tau en la corteza y el hipocampo de las secciones incluidas en parafina preparadas a partir de los cerebros recogidos también se mide mediante inmunohistoquímica utilizando PG-5 sustancialmente como se ha descrito anteriormente. Los datos se normalizan mediante conversión a valores de \log_{10} y los resultados se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Valor medio de \log_{10} del % de inmunorreactividad de PG-5 en corteza e hipocampo.

	Agregado de tau (valor medio de \log_{10} del % de inmunorreactividad de PG-5)	
	Corteza	Hipocampo
Ab contra tau murina sustituto	0,74 ± 0,06	0,26 ± 0,07
Ab mlgG1 de control	0,90 ± 0,05	0,46 ± 0,05
Ab mlgG1 rMC-1	0,83 ± 0,04	0,34 ± 0,06

5 Los resultados proporcionados en la tabla 9 demuestran que el anticuerpo contra tau murino sustituto reduce el nivel de agregados de tau tanto en la corteza (en un 18 %) como en el hipocampo (en un 43 %) en relación con el anticuerpo mlgG1 de control, mientras que el anticuerpo MC-1 murino recombinante no mostró una reducción notable en el nivel de agregados de tau ni en la corteza ni en el hipocampo en relación con el anticuerpo mlgG1 de control.

Propiedades fisicoquímicas del anticuerpo monoclonal contra tau diseñado

El anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 muestra buena solubilidad, estabilidad química y estabilidad física.

Solubilidad:

10 Se desea una solubilidad suficientemente alta para permitir una administración cómoda. Por ejemplo, una dosis de 1 mg/kg administrada mediante una inyección de 1,0 ml en un paciente de 100 kg requerirá una solubilidad de 100 mg/ml. Además, también es deseable mantener el anticuerpo en estado monomérico sin agregación de alto peso molecular (APM) a alta concentración. La solubilidad del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 se analiza concentrando 15 mg del anticuerpo ilustrado con un filtro de corte de peso molecular 10 K (filtros Amicon U.C., Millipore, n.º de catálogo UFC903024) hasta un volumen inferior a 100 µl. La concentración final de la muestra se midió por absorbancia UV a A280 utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

15 Siguiendo procedimientos sustancialmente como los descritos anteriormente, el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 muestra una solubilidad superior a 140 mg/ml (a pH 6 en tampón citrato 10 mM); 177 mg/ml (a pH 6 en citrato 10 mM con NaCl 150 mM); y 170 mg/ml (a pH 7,4 en tampón PBS). Además, sólo hay niveles bajos de APM (de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5,4 %) a alta concentración y no se observa separación de fases.

Estabilidad química y física:

25 La estabilidad química facilita el desarrollo de formulaciones de fármacos con una vida útil suficiente. La estabilidad química del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 se evalúa formulando el anticuerpo contra tau ilustrado a una concentración de 1 mg/ml en citrato 10 mM y tampón a pH 4, 5, 6, o 7. Las muestras formuladas se incuban durante cuatro semanas a 4 °C, 25 °C o 40 °C en un estudio de degradación acelerada. Los cambios en el perfil de carga del anticuerpo, que reflejan cambios químicos, se evalúan mediante enfoque isoeléctrico capilar ("capillary isoelectric focusing", cIEF) de acuerdo con procedimientos convencionales.

30 Siguiendo procedimientos sustancialmente como los descritos anteriormente, el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 muestra los resultados de estabilidad química presentados en la tabla 10.

Tabla 10. Resumen del cambio en el % de pico principal a lo largo de cuatro semanas, en relación con las muestras incubadas a 4 °C, medido por cIEF y % de agregados de APM medido por SEC.

pH	Cambio en % del pico principal después de 4 semanas (respecto a 4 °C) 25 °C	Variación del % de agregados de APM (respecto a 4 °C) 25 °C	Variación del % de agregados de APM (respecto a 4 °C) 40 °C
4	-8,43	-0,1	49,8
5	-4,13	0,1	1,1
6	-3,95	-0,2	0,3

pH	Cambio en % del pico principal después de 4 semanas (respecto a 4 °C) 25 °C	Variación del % de agregados de APM (respecto a 4 °C) 25 °C	Variación del % de agregados de APM (respecto a 4 °C) 40 °C
7	-3,69	-0,2	0,9

- 5 Los resultados proporcionados en la tabla 10 demuestran que después de 4 semanas de almacenamiento a 40 °C, el anticuerpo contra tau ilustrado del ejemplo 1 tiene un porcentaje de disminución del pico principal de sólo 1,1 puntos porcentuales cuando se formula a pH 5, y una disminución de sólo 0,3 puntos porcentuales cuando se formula a pH 6 (un pH habitual utilizado en la formulación de anticuerpos). Además, el análisis de espectrometría de masas demuestra sólo una degradación mínima observada tras 4 semanas de almacenamiento a 40 °C (aproximadamente un 1,5 % de desamidación de LCDR1 con menos del 5 % de degradación en todas las secuencias de CDR), lo que indica que el anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 tiene suficiente estabilidad química para facilitar el desarrollo de formulaciones en solución con una vida útil adecuada.
- 10 A efectos de comparación, la estabilidad química y física de una construcción de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 cadena pesada, A27 cadena ligera) se realiza incubando el anticuerpo durante 2 semanas a 40 °C a pH 8. La construcción de anticuerpo MC-1 humanizado mostró una degradación química significativa, incluido un 12 % de desamidación de LCDR1, un 5 % de desamidación y un 10 % de isomerización en HCDR3 y un 3 % de oxidación en el marco de HC.
- 15 La afinidad de unión, tras un estudio de degradación acelerada de cuatro semanas del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1, se evalúa formulando el anticuerpo monoclonal ilustrado a una concentración de 1 mg/ml en citrato 10 mM y tampón a pH 4 o 6. Las muestras formuladas se incuban durante cuatro semanas a 4 °C o 40 °C en un estudio de degradación acelerada. Tras la incubación, se determina la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 por rTau (15 ng/ml) recubierto sobre placas de 96 pocillos mediante ELISA directo siguiendo el procedimiento de ELISA descrito sustancialmente antes. Los resultados del estudio de afinidad de unión descrito anteriormente, realizado por duplicado, figuran en la tabla 11.
- 20

Tabla 11. Comparación de CE₅₀ tras un estudio de degradación acelerada.

pH de la formulación	Temp. de incubación (°C)	CE ₅₀ (pM) Estudio 1	CE ₅₀ (pM) Estudio 2
4	40	414	277
6	4	926	636
6	40	754	667

- 25 La tabla 11 demuestra que la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1 a concentraciones bajas de rTau permaneció similar para muestras después de una degradación acelerada de cuatro semanas, en comparación con muestras de control incubadas a 4 °C.

Secuencias

SEQ ID NO: 1 - LC del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRF
 SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2 - HC del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

ES 2 973 065 T3

EVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGSDSIKY
EKNFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGNYVDDWGQGTLLVTVSSASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLG

SEQ ID NO: 3 - LCDR1 del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

RSSQSLVHSNQNTYLH

SEQ ID NO: 4 - LCDR2 del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

5 YKVDNRFS

SEQ ID NO: 5 - LCDR3 del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

SQSTLVPLT

SEQ ID NO: 6 - HCDR1 del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

KGSGYTFSNYWIE

10 SEQ ID NO: 7 - HCDR2 del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

EILPGSDSIKYEKNFKG

SEQ ID NO: 8 - HCDR3 del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

ARRGNYVDD

SEQ ID NO: 9 - LCVR del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

15 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRF
SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 10 - HCVR del anticuerpo monoclonal contra tau ilustrado del ejemplo 1

EVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGSDSIKY
EKNFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARRGNYVDDWGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 11 - Secuencia de nucleótidos que codifica la LC ilustrada (SEQ ID NO:1)

ES 2 973 065 T3

gaaattgtgttgacgcagtcctccaggcaccctgtctttgtctccagggaaagagccacc
ctctcctgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatcagaacacctatttacattgg
taccagcagaaacctggccaggetcccaggctcctcatctataaaagttgacaaccgattt
tctggcateccagacaggttcagtggcagtggtctctgggacagacttcaactctcaccatc
agcagactggagcctgaagattttgcagtgattactgttctcaaagtacactgggtccg
ctcacgttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtc
ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctg
ctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcaa
tcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc
agcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaaagtctacgctgcgaa
gtcaccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtg

SEQ ID NO: 12 - Secuencia de nucleótidos que codifica la HC ilustrada (SEQ ID NO: 2)

gaggtgcagctggtgcagtcctggagcagaggtgaaaaagccccggggagctctgaagatc
tcctgtaagggttctggctacacattcagtaactactggatagagtgggtgcgccagatg
ccccggaaaggcctggagtgatgggggagattttacctggaagtgatagattaagtac
gaaaagaatttcaagggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcaccgcctac
ctgcagtgagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagaaggggg
aactacgtggacgactggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcagcttctaccaag
ggccatcggtcttcccgtagcgcctgctccaggagcaccctccgagagcacagccgcc
ctgggctgctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggc
gccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
ctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaac
gtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaaatatgggtccc
ccatgccaccctgccagcaccctgaggccgccgggggaccatcagcttctcctgttcccc
ccaaaaccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtgggtg
gacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtg
cataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtggtgagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc
aaciaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccga
gagccacaggtgtacaccctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtaaaaggttctaccccagcgacatcgccgtggagtggaagcaat
gggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttc
ttcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctca
tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtct
ctgggt

SEQ ID NO: 13 - Secuencia de aminoácidos de la tau humana de longitud completa

ES 2 973 065 T3

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPG
SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
HVTQARMVSKSKDGTGSDDKAKAGADGKTKIATPRGAAPPQKQANATRIPAKTPPAPK
TPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAK
SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQPGGGKVQI INKKLDLSNVQSKCGSKDN IKHV
PGGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTS PRHLSNVSSSTG SIDMV
DSPQLATLADEV SASLAKQGL

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal que se une a la tau humana que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2, y LCDR3, y la HCVR comprende las CDR HCDR1, HCDR2, y HCDR3, en el que la secuencia de aminoácidos de LCDR1 se indica en SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 se indica en SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de LCDR3 se indica en SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de HCDR1 se indica en SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 se indica en SEQ ID NO: 7, y la secuencia de aminoácidos de HCDR3 se indica en SEQ ID NO: 8.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
3. Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 para su uso en terapia.
4. Un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Pick.