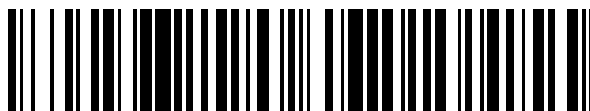


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 649**

51 Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2016 PCT/US2016/018419**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16137811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2016 E 16706741 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3261720**

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:

27.04.2020

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:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 756 649 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

- 5 La presente invención pertenece al campo de la medicina. En particular, la presente invención se refiere a anticuerpos contra tau, composiciones que comprenden tales anticuerpos contra tau y procedimientos de uso de tales anticuerpos contra tau para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (AD), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la enfermedad de Pick (PD).
- 10 Tau es una proteína de unión a microtúbulos axonales que promueve el montaje y la estabilidad de los microtúbulos. AD y PSP son enfermedades neurodegenerativas patológicamente caracterizadas por la agregación aberrante de tau. Más específicamente, en AD y PSP, se presume que tau hiperfosforilada promueve la agregación de fibrillas tau insolubles que conduce a la desestabilización de microtúbulos y toxicidad neuronal. Los estudios de cultivo de células y modelos murinos han demostrado que los agregados de tau se reparten por uniones de sinapsis neuronales y tau monomérica secuestrante (nativo o no agregado), induciendo la formación de agregados tau. La progresión neuroanatómica de la agregación de tau y la acumulación en enfermedades neurodegenerativas tales como AD y PSP sugiere que la agregación de fibrilar de tau se propaga a lo largo de las redes neuronales, en última instancia, lo que resulta en la desestabilización de los microtúbulos y función neuronal deteriorada en última instancia localizada.
- 15 20 La densidad y localización neuroanatómica de la agregación de tau se correlaciona fuertemente con los síntomas neurológicos de AD y PSP y la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, en AD, tau forma ovillos neurofibrilares intraneuronales (NFT), que tienden a desarrollar en secuencia desde regiones transitorias, a límbicas, a neocorticales y que se correlacionan con la gravedad de la demencia y la magnitud de la pérdida neuronal. En PSP, la agregación de tau se ve en las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos dentro de las regiones subcorticales y corticales y la densidad de tau agregada se ha demostrado que se correlaciona con la severidad de la pérdida neuronal.
- 25 30 Los anticuerpos contra tau son conocidos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 8,926,974 y la publicación internacional N.º W02011/026031, W02012/049570 y W02013/050567 divulgan anticuerpos contra tau y usos de los anticuerpos de tau para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como AD. El documento WO 2014/100600 describe anticuerpos humanos específicos de tau y su uso en la descripción farmacéutica y las composiciones de diagnóstico.
- 35 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 las formas de tau no patológicas.
- 40 El documento WO 2012/149365 describe anticuerpos selectivos para dímeros de tau patológicos y su uso en el tratamiento, diagnóstico y monitorización de taupatías.
- 45 D.L. Castillo-Carranza et al., "La inmunización pasiva con anticuerpo monoclonal oligomérico de tau revierte los fenotipos de taupatía sin afectar los ovillos neurofibrilares hiperfosforilados", vol. 34, n.º 12, 19 de marzo de 2014, páginas 4260-4272 describe la inmunización pasiva con el anticuerpo monoclonal oligomérico de Tau. Además, discute el papel de los oligómeros de tau en la progresión de la enfermedad y la validación de los oligómeros de tau como una diana para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 50 Sin embargo, hasta la fecha ningún anticuerpo de focalización tau ha sido aprobado para uso terapéutico y actualmente no hay ninguna terapia de modificación de enfermedad aprobada para AD o PSP. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de anticuerpos de tau alternativos. En particular, sigue existiendo una necesidad de anticuerpos de tau alternativos que se unen específicamente a los agregados de tau y que reducen la propagación de la formación de agregados tau, la formación de NFT y la pérdida neuronal. Tales anticuerpos de tau preferentemente también poseen buenas propiedades físico-químicas para facilitar el desarrollo, fabricación y/o formulación.
- 55 60 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a tau humana y que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y la HCVR comprende CDR HCDR1, HCDR2 y HCDR3. De acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de LCDR1 está dada por la SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de LCDR2 está dada por la SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de LCDR3 está dada por la SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos de HCDR1 está dada por la SEQ ID NO: 6, la secuencia de aminoácidos de HCDR2 está dada por la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de HCDR3 está dada por la SEQ ID NO: 8.
- 65 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a tau humana, que comprende una LCVR y una HCVR, en el que la secuencia de aminoácidos de la LCVR está dada

por la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de la HCVR está dada por la SEQ ID NO: 10. En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a tau humana, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la secuencia de aminoácidos de la LC está dada por la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la HC está dada por la SEQ ID NO: 2.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a tau humana. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo conformacional de tau humana. En una realización particular, el epítipo conformacional de tau humana incluye residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de tau humana, en el que la secuencia de aminoácidos de la tau humana está dada por la SEQ ID NO: 13.

10 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo monoclonal de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables farmacéuticamente aceptables. Además, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de AD, PSP, o PD que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento una composición farmacéutica de la presente invención.

15 Además, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Más particularmente, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de AD, PSP, o PD que comprende administrar a un paciente necesitado de dicho tratamiento una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal de la presente invención.

20 La presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal de la presente invención para uso en terapia. Más particularmente, la presente invención también proporciona el anticuerpo monoclonal de la presente invención para uso en el tratamiento de AD, PSP, o PD.

25 En una realización, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo monoclonal de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de AD, PSP, o PD.

30 La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico y vectores de expresión que codifican el anticuerpo monoclonal de la presente invención. En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En una realización particular, la secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que está dada por la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 que está dada por la SEQ ID NO: 12.

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula de mamífero que comprende la molécula de ADN de la presente invención, en la que la célula es capaz de expresar un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

40 Además, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal preparado de acuerdo con un proceso, en el que dicho proceso comprende cultivar una célula huésped que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, en condiciones tales que el anticuerpo monoclonal se expresa y recuperar dicha célula huésped de un anticuerpo monoclonal que comprende una LC y una HC, en el que la secuencia de aminoácidos de la LC está dada por la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la HC está dada por la SEQ ID NO: 2.

45 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal según la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal según la presente invención para su uso en terapia.

55 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal de la presente invención es para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Pick.

60 Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina que comprende 2 HC y 2 CL interconectadas por enlaces disulfuro. La porción amino terminal de cada una de LC y HC incluye una región variable de aproximadamente 100-120 aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno a través de las CDR contenidas en el mismo. Las CDR están intercaladas con regiones que están más

65

conservadas, denominadas regiones estructurales ("FR"). Cada LCVR y HCVR se compone de 3 CDR y 4 FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo 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 mayor parte de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La capacidad funcional de un anticuerpo para unirse a un antígeno particular está muy influenciada por las seis CDR. La asignación de aminoácidos de dominios CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR de los anticuerpos de la presente invención se basa en la convención numeración de Kabat (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N.º 91-3242 (1991)) y la convención de numeración North (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)).

Las LC se clasifican como kappa o lambda, que se caracterizan por una región constante particular como se conoce en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen kappa LC. La HC se clasifica como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD, o IgE, respectivamente. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen IgG HC. Los anticuerpos IgG pueden dividirse además en subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. En una realización particular, 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 particular, 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 particular, los anticuerpos monoclonales de la presente invención son IgG4 y tienen modificaciones en la región constante de ambas HC que reducen la función efectora incluyendo el aminoácido alanina en ambos residuos 230 y 231 (numeración de residuos basada en la HC ejemplificada de la SEQ NO: 2). En una realización aún más particular los anticuerpos monoclonales de la presente invención son IgG4 y tienen modificaciones en la región constante de cada HC que reducen la función efectora incluyendo el aminoácido alanina en ambos residuos 230 y 231 y que tienen modificaciones adicionales en la región constante de ambas HC que promueven la estabilidad incluyendo el aminoácido prolina en el residuo 224 y la supresión de la lisina en el residuo de aminoácido 443 (numeración de residuos basada en la HC ejemplificada de la SEQ ID NO: 2).

Los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales ("mAb"). Los mAbs para la presente invención son mAbs completos que contienen 2 HC y 2 LS. Como se hace referencia en la presente memoria, mAbs son anticuerpos derivados de una sola copia o clon incluyendo, por ejemplo, cualquier clon procarionota o eucariota fago y no el procedimiento por el cual se produce. Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos, por ejemplo, por las tecnologías de hibridoma, tecnologías recombinantes, tecnologías de visualización de fagos, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injerto de CDR, o combinaciones de tales u otras tecnologías conocidas en la técnica.

Los procedimientos de producción y purificación de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, 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, pueden ser inmunizados ratones con filamentos helicoidales pareados de tau humana ("PHF") a partir de tejido cerebral de pacientes caracterizados por tener AD (Jicha et al., J. Neurosci. Res., 15:48 (2), 128-132 de (Abril, 1997)) y los anticuerpos resultantes pueden ser recuperados, purificados y las secuencias de aminoácidos determinadas utilizando procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención están diseñados para contener una o más regiones flanqueantes humanas que rodean CDR derivadas de un anticuerpo no humano. Se pueden obtener secuencias de la línea germinal humana de marco de inmunogenética (IngT) a través de su página web, <http://imgt.cines.fr>, o de The Immunoglobulin FactsBook por Marie-Paule Lefranc y Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. De acuerdo con realizaciones particulares de la presente invención, en particular regiones de marco de la línea germinal HC y marco LC para su uso en anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen 5-51 y A27, respectivamente.

En realizaciones particulares de la presente invención, el anticuerpo, o el ácido nucleico que codifica el mismo, se proporciona en forma aislada. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aislado" se refiere a una proteína, péptido, o ácido nucleico que está libre o sustancialmente libre de otras especies macromoleculares que se encuentran en un entorno celular.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden preparar y purificar utilizando procedimientos conocidos. Por ejemplo, las secuencias de cADN que codifican una HC (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos dada por la SEQ ID NO: 2) y LC (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos dada por la SEQ ID NO: 1) se pueden clonar y fabricar en un vector de expresión GS (glutamina sintetasa). El vector de expresión de inmunoglobulina modificado puede entonces transfectarse de forma estable en células CHO. Como apreciarán aquellos con experiencia en la técnica, la expresión de mamífero de anticuerpos resultará en glicosilación, normalmente en sitios de N-glicosilación altamente conservados en la región Fc. Clones estables pueden ser verificados para la expresión de un anticuerpo que se une específicamente a los agregados de tau. Los clones positivos se pueden expandir en

medio de cultivo libre de suero para la producción de anticuerpos en biorreactores. Los medios, en los que un anticuerpo ha sido secretado, se pueden purificar por técnicas convencionales. Por ejemplo, el medio puede ser convenientemente aplicado a una columna de proteína A o G Sepharose FF que ha sido equilibrada con un tampón compatible, tal como solución salina amortiguada con fosfato. La columna se lava para eliminar los componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido se eluye, por ejemplo, mediante gradiente de pH y las fracciones de anticuerpos se detectan, tal como mediante SDS-PAGE y luego agrupan. El anticuerpo se puede concentrar y/o filtrar de manera estéril utilizando técnicas comunes. El agregado soluble y multimeros pueden ser eliminados eficazmente por técnicas comunes, incluyendo exclusión por tamaño, interacción hidrofoba, intercambio iónico, o cromatografía de hidroxapatita. El producto puede ser congelado inmediatamente, por ejemplo, a -70 °C, o se puede liofilizar.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden utilizar en el tratamiento de pacientes. Más particularmente se espera que los anticuerpos de la presente invención traten una clase de trastornos neurodegenerativos, denominados tauopatías, que incluye AD, PSP y PD. Aunque se espera que los anticuerpos monoclonales de la presente invención sean útiles en el tratamiento de AD, PSP y PD, tales anticuerpos también pueden ser útiles en el tratamiento de otras tauopatías, incluyendo la encefalopatía traumática crónica. Como se usa de manera intercambiable en la presente memoria, con los términos "tratamiento" y/o "tratar" y/o "tratando" se pretende referir a todos los procesos en los que puede haber una ralentización, interrupción, detención, control, interrupción o reversión de la progresión de los trastornos descritos en la presente memoria, 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 afección en un ser humano que se beneficiaría de una reducción en la propagación de al menos una de la formación de agregados tau, formación de NFT y pérdida neuronal, e incluye: (a) inhibir en forma adicional de la progresión de la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar los síntomas o complicaciones de los mismos.

Tal como se usa indistintamente en la presente memoria, el término "paciente", "sujeto" e "individuo" se refiere a un ser humano. En ciertas realizaciones, el paciente se caracteriza además con una enfermedad, trastorno, o afección (por ejemplo, un trastorno neurodegenerativo) que se beneficiaría de una reducción en la propagación de al menos uno de la formación de agregados de tau, formación de NFT y pérdida neuronal. En otra realización, el paciente se caracteriza además por estar en riesgo de desarrollar un trastorno neurodegenerativo, enfermedad o afección que se beneficiaría de una reducción en la propagación de al menos una de la formación de agregados tau, formación de NFT y pérdida neuronal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "unión" a tau se refiere a la interacción de un anticuerpo con un epítipo de tau agregada humana. Más preferentemente, el epítipo es un epítipo conformacional de tau humana. En una realización particular, el término "unión" a tau se refiere a una interacción con un epítipo conformacional que incluye residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de agregado tau humana (numeración de residuos basada en tau humana ejemplificada de la SEQ ID NO: 13). Se debe entender que se conocen variaciones de la proteína tau humana, por ejemplo, resultantes de variantes de empalme. Tales variaciones conocidas, sin embargo, poseen el epítipo conformacional incluyendo residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de la SEQ ID NO: 13. Variantes conocidas, sin embargo, pueden dar lugar a la numeración alterada de residuos para los residuos de aminoácidos 7-9 y 312-322 de la SEQ ID NO: 13. Aunque la numeración de los residuos puede ser alterada en algunas variantes, los aminoácidos que comprenden el epítipo siguen siendo los mismos. El término "epítipo", como se usa en la presente memoria se refiere a sitios discretos, tridimensionales de un antígeno que son reconocidos por los anticuerpos monoclonales de la presente invención.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede incorporar en una composición farmacéutica que se puede preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica y comprenden un anticuerpo monoclonal de la presente invención y uno o más vehículos y/o diluyentes aceptables 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 generalmente conocidas 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 inmune del paciente.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede administrar a un paciente en riesgo de, o que exhibe, enfermedades o trastornos como se describe en la presente memoria por vías parentales (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o transdérmica). Una composición farmacéutica de la presente invención contiene una cantidad "efectiva" o "terapéuticamente eficaz", como se usa indistintamente en la presente memoria, de un anticuerpo monoclonal de la presente invención. Una cantidad efectiva se refiere a una cantidad necesaria (en dosis y durante períodos de tiempo y para los medios de administración) para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad efectiva del anticuerpo monoclonal puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo monoclonal para producir una respuesta deseada en el individuo.

Una cantidad efectiva es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo monoclonal de la presente invención es superado por los efectos terapéuticamente benéficos.

Anticuerpo contra tau diseñado

Se encontraron problemas significativos asociados con la estabilidad química y física en la construcción de un anticuerpo monoclonal de tau de la presente invención. Los problemas encontrados incluyen baja afinidad de unión, inmunogenicidad, agregación, dimerización HC, así como desamidación, oxidación, isomerización y problemas de pliegue de 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 ejemplificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13), fue humanizado inicialmente por la manipulación de los tres CDR HC murinos MC -1 en múltiples genes de la línea germinal de marco HC humanos y las tres CDR MC-1 murino LC en múltiples genes de la línea germinal de marco LC humanos. Los constructos humanizados de MC-1 utilizan 96 combinaciones diferentes de marcos de cadena pesada y ligera, lo que representa cada uno de las doce familias de la línea germinal de marco HC (marcos 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 LC (marcos LC humanos específicos: A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12, O11 y O-2). Los respectivos genes de marco de la línea germinal fueron clonados en vectores de expresión de IgG4 humana de cadena pesada y ligera y se transfectaron en células HEK293 para la expresión y análisis de unión mediante ELISA. Aunque múltiples pares de marco demostraron un cierto nivel de unión a tau humana en ELISA, dando como resultado constructos de anticuerpos que muestran una gran variedad de cuestiones, incluyendo escasa afinidad de unión, agregación, dimerización HC y problemas de estabilidad químicos tales como desamidación, oxidación, e isomerización en las regiones variables.

Por lo tanto, fueron diseñadas modificaciones para desarrollar anticuerpos contra tau que poseen afinidad de unión mejorada, dimerización HC eliminada o reducida, inmunogenicidad reducida y mejora de estabilidad química y física. Modificaciones de aminoácidos (en relación con MC-1, Jicha et al., 1997) fueron diseñados en HCDR2 y HCDR3 y LCDR1, LCDR2 y LCDR3. El anticuerpo murino humanizado fue diseñado por manipulación de las tres CDR de HC en múltiples genes de la línea germinal de marco HC humanos y las tres CDR de LC en múltiples genes de la línea germinal de marco LC humanos esencialmente como se describe anteriormente. Además, se realizaron amplios estudios de estabilidad de proteínas y los anticuerpos monoclonales de manipulación fueron seleccionados para la expresión y propiedades de termoestabilidad, así como propiedades de afinidad de unión. Un anticuerpo monoclonal que contiene siete mutaciones CDR (posición de aminoácido basada en la numeración de residuos de aminoácido lineal de un anticuerpo ejemplificado de la presente invención reflejado en la tabla 1: HCDR2 en N61E y E62K; HCDR3 en P103V y Y105D; LCDR1 en G34Q; LCDR2 en S57D; y LCDR3 en H98L) se identificó como la mejora de la afinidad de unión, estabilidad química y física, e inmunogenicidad para los anticuerpos monoclonales de la presente invención (en relación con MC-1, Jicha et al, 1997). Ninguna de las modificaciones anteriores fue identificada en caracterizaciones de MC-1 o los constructos de anticuerpos humanizados de MC-1.

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

Tabla 1. Regiones de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal de tau diseñado ejemplificado 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

Los siguientes ejemplos y ensayos demuestran que los anticuerpos monoclonales de la presente invención son útiles para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos asociados con propagación de agregados de tau tales como AD, PSP, o PD. Sin embargo, debe entenderse que los siguientes ejemplos se exponen a modo de ilustración y no de limitación y que varias modificaciones pueden ser hechas por aquellos con experiencia en la técnica.

5

Ejemplos

Expresión de anticuerpo contra Tau diseñado

Los anticuerpos monoclonales tau diseñados de la presente invención se pueden expresar y purificar esencialmente como sigue. Un vector de expresión de glutamina sintetasa (GS) que contiene la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 11 (que codifica la secuencia de aminoácidos LC de la SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 12 (que codifica la secuencia de aminoácidos HC de la SEQ ID NO: 2) se utiliza para transfectar una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) mediante electroporación. El vector de expresión codifica un promotor temprano SV (virus de simio 40E) y el gen para GS. La expresión de GS permite la síntesis bioquímica de glutamina, un aminoácido requerido por las células CHO. Después de la transfección, las células se someten a selección a granel con sulfoximina L-metionina 50 μM (MSX). La inhibición de GS por MSX se utiliza para aumentar la rigurosidad de la selección. Las células con integración del vector de expresión cADN en regiones activas por transcripción del genoma de la célula huésped se pueden seleccionar contra células CHO de tipo silvestre, que expresan un nivel endógeno de GS. Las agrupaciones transfectadas se laminaron a baja densidad para permitir crecimiento próximo al clonal de células de expresión estable. Los pocillos maestros son examinados para detectar la expresión de anticuerpos y después ampliarse en cultivos en suspensión, libres de suero para ser utilizados para la producción. Un medio clarificado, en el que el anticuerpo ha sido secretado, se aplica a una columna de afinidad de proteína A que ha sido equilibrada con un tampón compatible, tal como solución salina amortiguada con fosfato (pH 7,4). La columna se lava con NaCl 1M para eliminar los componentes de unión no específicos. El anticuerpo monoclonal unido a tau se eluye, por ejemplo, con citrato de sodio a pH (aproximadamente) 3,5 y las fracciones se neutralizan con tampón de Tris 1M. Se detectan fracciones de anticuerpos monoclonales tau, tal como mediante SDS-PAGE o exclusión por tamaño analítica y luego se reúnen. Agregado soluble y multímeros pueden ser eliminados eficazmente por técnicas comunes, incluyendo exclusión por tamaño, interacción hidrofoba, intercambio iónico, o cromatografía de hidroxapatita. El anticuerpo monoclonal de tau de la presente invención se concentra y/o esteriliza por filtración utilizando técnicas comunes. La pureza del anticuerpo monoclonal de tau después de estas etapas de cromatografía es mayor que 95%. El anticuerpo monoclonal de tau de la presente invención puede ser congelado inmediatamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ o se almacenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante varios meses.

Cinética de unión y afinidad

El ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR), medido con un instrumento BIACORE® 2000 (cebado con HBS-EP + tampón de desarrollo (GE Healthcare, 10 mM Hepes pH 7,4 P20 + NaCl 150 mM + 3 mM EDTA + 0,05 % de tensioactivo) a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), se utiliza para medir la unión del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 tanto a tau monomérica humana como a agregados de tau humana (por ejemplo, nativo o no agregado) (teniendo ambos la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 13). La unión de constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 de la cadena pesada, A27 de la cadena ligera) a tau monomérica humana y tau agregada humana se mide de la misma manera.

Excepto cuando se indica, todos los reactivos y materiales son de BIACORE® AB (Upsala, Suecia). Un chip CM5 que contiene proteína A inmovilizada (generada mediante acoplamiento con amina estándar NHS-EDC) en las cuatro celdas de flujo (FC) se utiliza para emplear una metodología de captura. Muestras de anticuerpo se preparan en 0,5 $\mu\text{g/ml}$ por dilución en tampón. Tau monomérica y 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. Cada ciclo de análisis consiste en: (1) captura de muestras de anticuerpo en células de flujo separadas (FC2, FC3 y FC4); (2) inyección de 250 μl (300 seg) de cualquier tau monomérica o tau agregada fibrilar respectiva FC a una tasa de 50 $\mu\text{l/min}$; (3) regreso a flujo de tampón durante 20 minutos para supervisar fase de disociación; (4) regeneración de las superficies de chips con 25 μl (30 seg) inyección de glicina, pH 1,5; (5) el equilibrio de las superficies de chips con una inyección de 50 μl (60 seg) de HBS-EP+.

Los datos de unión a agregados de tau se procesan utilizando el estándar de doble-referenciación y se ajustan a un modelo de unión 1:1 utilizando Biacore 2000 Evaluation, versión 4.1, para determinar la velocidad de asociación (K_{on} , unidades $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), velocidad de disociación (K_{off} , unidades s^{-1}) y R_{max} (unidades RU). La disociación constante de equilibrio (K_D) se calcula a partir de la relación $K_D = K_{off}/K_{on}$ y está en unidades molares. Los datos de unión a tau monomérica no pueden determinarse con precisión por SPR como se describe anteriormente debido a las rápidas velocidades de encendido y apagado. Por lo tanto, K_D para la unión a tau monomérica se obtiene mediante el uso de un modelo de ajuste de unión en estado de equilibrio del trazado de la concentración de antígeno vs la unidad de respuesta. Los datos de unión resultantes se proporcionan en la Tabla 2.

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

		k_{on} (unidades $M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (unidades $M^{-1}s^{-1}$)	K_D^* (nM)
5	mAb de Tau Ejemplificado del Ejemplo 1	Tau Monomérica	Indetectable	235
		Tau Agregada	4,59e4	<1e-5
10	Constructo de Ab MC-1 Humanizado	Tau Monomérica	No determinada	550
		Tau Agregada	5,75e4	1,02e-4
*Los resultados de K_D se consideran relativos dado que los resultados no están normalizados por la influencia de la avidéz.				

Los resultados proporcionados en la Tabla 2 demuestran que el anticuerpo monoclonal de tau del Ejemplo 1 no posee unión mensurable a tau monomérica tal que un valor de afinidad puede determinarse con precisión mediante análisis Biacore (debido a las velocidades rápidas de encendido y apagado). A la inversa, los resultados proporcionados en la tabla 2 demuestran que el anticuerpo monoclonal de tau del ejemplo 1 posee afinidad con tau agregada mejoró en comparación con el constructo de anticuerpo MC-1 humanizado.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se utiliza para determinar la afinidad de unión relativa del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 a tau agregada fibrilar de homogeneizados de cerebro de AD. Los homogeneizados de cerebro AD se preparan a partir de aprox. 80 g de corteza de pacientes con AD. Brevemente, tampón (cóctel inhibidor de proteasa Complete® TBS TBS/1mM PMSF/1X (Roche, p/n. 11 697 498 001) y el inhibidor de fosfatasa (ThermoFischer, p/n. 78428)) se añade al tejido de cerebro con AD en aproximadamente 10 ml/1g (tejido). El tejido se homogeneiza utilizando un Kinematica Polytron de mano a velocidad 6-7. El tejido se homogeneizó entonces adicionalmente utilizando una bomba Parr (Parr Instrument, p/n. 4653) a 1500 psi (10342,14 kPa) de nitrógeno durante 30 minutos. El homogeneizado se centrifugó a 28000 g (rotor Beckman J14) durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó, se agrupó y ejecutó sobre una columna de 4 cm de alta guardia de Sepharose 400 Superflow para eliminar los restos más grandes, luego se ejecutó a 25 ml de columna MC1-Affigel 10 a una velocidad de flujo de 50 - 60 ml por hora, con el fin de purificar tau fibrilar unido a MC1. Para maximizar la recuperación de la purificación, los sobrenadantes se reciclan a través de una columna de MC-1 en 18-20 horas a 4 °C. La columna de guarda se retira y la columna MC1 se lava con TBS con al menos 40 volúmenes de columna. La tau agregada unida se eluye a continuación con 2 volúmenes de columna de 3M KSCN, recogiendo en aprox. fracciones de 1 ml. La concentración de proteína en cada fracción eluida se comprueba mediante el ensayo de Bradford de placa de microtitulación. Las fracciones que contenían niveles de proteína positivas se agruparon, se concentraron a aproximadamente 2 ml utilizando Centricon (Millipore Ultracel-30K) a 4 °C y se dializaron utilizando una cinta Slide-A-Lyzer (10K MWCO 3-12m1•, Pierce) durante la noche contra 1 litro de TBS. La concentración de tau dentro de tau fibrilar purificada a partir de homogeneizado de cerebro de AD se mide por ELISA de emparedado utilizando anticuerpo de captura DA-9 y anticuerpo de detección CP27.

Tau fibrilar purificada (50 μ l) en PBS se recubrió en pocillos de placas de 96 pocillos (Coastar, p/n. 3690) a una concentración correspondiente a 0,7 μ g/ml de tau total. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C, después se lavaron tres veces con 150 μ l de PBST (PBS que contiene 0,05% de Tween-20), bloquearon en BB3 100N1 (ImmunoChemistry Technology, p/n. 643) a temperatura ambiente durante al menos 1 hora (normalmente 2 horas). Después del bloqueo, el tampón de bloqueo se eliminó de los pocillos. Anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 y un constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 de cadena pesada, A27 de cadena ligera) se diluyeron en 0,25% de tampón de caseína a 1000 nM de solución madre, después se diluyeron en serie 23 veces con diluciones dobles. Se añadieron 50 μ l de anticuerpo de solución madre y anticuerpo diluido en serie (ya sea monoclonal tau ejemplificado del Ejemplo 1 o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado) a pocillos separados y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente después de lo que la placa se lavó cuatro veces con PBST 200 μ l por pocillo. Se añadieron 50 μ l de anticuerpo de solución madre y diluido en serie (ya sea tau monoclonal ejemplificado del ejemplo 1 o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado) para separar los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, después de lo que la placa se lavó cuatro veces con 200 μ l por pocillo. Se añadieron 50 μ l de anticuerpo IgG-HRP anti-humano (diluido a 1:4000 en tampón de caseína 0,25%) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, después de lo que la placa se lavó cuatro veces con 200 μ l por pocillo. Se añadieron 50 μ l de TMB/H₂O₂ e incubaron durante aproximadamente 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de solución quelante (2N H₂SO₄) y la señal de colorimétrico se midió a 450 nm. Los datos se ingresan en el programa Prism 6 (GraphPad) y los valores EC₅₀ se generaron mediante un ajuste de la curva de regresión no lineal y respuesta de dosis sigmoidal. Los resultados se presentaron en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de unión EC₅₀ a Tau fibrilar AD purificada

Anticuerpo ensayado	EC ₅₀ (pM)
mAb de tau ejemplificado del Ejemplo 1	6,8
Constructo de Ab MC-1 humanizado	409,1

5

10

Como se refleja en la Tabla 3, el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado de la presente invención demuestra una afinidad mejorada 60 veces (según lo medido por EC₅₀) a fibrilar tau purificado sobre constructo de anticuerpo MC-1 humanizado.

15

20

La selectividad del anticuerpo monoclonal de tau del ejemplo 1 a tau agregada en comparación con monómero tau se determina mediante ELISA directo. Siguiendo el procedimiento ELISA sustancialmente según lo dispuesto anteriormente, tau recombinante (rTau) está recubierta en placas de 96 pocillos a una concentración correspondiente a cualquiera de una concentración "alta" (1 µg/ml) o concentración "baja" (15 ng/ml). A una concentración alta de rTau, cuando se recubre sobre placas de micro-pocillos, agregados, simula la unión a tau agregada. A una concentración baja de rTau, cuando se recubre sobre placas de micro-pocillos, simula la unión a monómero tau. Las placas recubiertas con concentraciones altas o bajas de rTau, respectivamente, están expuestas a anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 y la unión del anticuerpo monoclonal de tau se ejemplifica a las concentraciones respectivas de rTau que se miden sustancialmente como se describe en el ensayo de ELISA anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de Unión EC₅₀ a Concentración "Alta" vs. "Baja" de rTau

Concentración de monómero rTau	EC ₅₀ (pM)
"Alta" (1 µg/ml)	6,0
"Baja" (15 ng/ml)	722,7

25

30

Como se refleja en la Tabla 4, el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 demuestra una afinidad 120 veces mejorada (medida por EC₅₀) a tau agregada sobre tau monomérica.

Estudios de interacción objetivo ex vivo

35

40

La unión del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 a tau agregada derivada de cerebros humanos se determina mediante tinción inmunohistoquímica de secciones de cerebros embebidas en parafina fijadas en formalina (FFPE) obtenidas de: un individuo "normal" (que muestra agregación de tau mínima); un paciente con AD (que muestra agregación de tau severa y formación de NFT, así como patología de placa amiloide); un paciente con PD (que muestra agregación de tau severa). La tinción también se realiza en las secciones del cerebro derivadas de un ratón de tipo salvaje de "control" que no posee tau humana con el fin de determinar los niveles no específicos de tinción de fondo.

45

50

55

60

A las secciones FFPE se les quita la parafina y se rehidratan. A partir de entonces, se realiza la recuperación de antígeno (usando el sistema de módulos Lab Vision PT, Thermo Scientific) en las secciones que incluyen secciones de calentamiento en tampón de citrato (Thermo Scientific, p/n. TA-250-PM1X) durante 20 minutos a 100 °C y luego el enfriamiento de las secciones en dH₂O. Luego las secciones se exponen a las siete siguientes etapas de incubación (a temperatura ambiente.): (1) 10 min. en 0,03% de H₂O₂; (2) 30 min. en dilución 1:20 de suero normal de cabra (Vector Labs, p/n S-1000) diluido en PBST; (3) 60 min. en cualquiera de anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 de cadena pesada, A27de cadena ligera) (tanto el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado y constructo de anticuerpo MC-1 humanizado están normalizados a 1 mg/ml, después se diluyó en PBST a una dilución de 1:4000 antes de la incubación con secciones); (4) 30 min. en IgG4 anti-humana de conejo (contra la región Fc del anticuerpo ejemplificado) a una concentración de 1,1 µg/ml en PBST; (5) 30 min. en dilución 1:200 de IgG anti-conejo de cabra biotinilado (Vector Labs., p/n. BA-1000) diluido en PBST; (6) 30 min. en solución complejo avidina-biotina (Vector Labs, p/n PK-7100); (7) 5 min. en 3,3'-diaminobencidina (Vector Labs., p/n. SK-4105). Las secciones se lavaron entre cada uno de los 7 pasos anteriores utilizando PBST. Después de las siete etapas de incubación anterior, las secciones se someten a contra-tinción con hematoxilina, se deshidratan y recubren con el portaobjetos. Para las secciones de tejido "control" ratón el protocolo anterior se modifica en el paso de incubación (3) mediante el uso de una dilución 1:8000 (en oposición a una dilución 1:4000) de tanto el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado y constructo de anticuerpo MC-1 humanizado; y por la sustitución de los pasos de incubación (4) y (5) con una sola dilución de 30 minutos 1:200 de IgG anti-humana cabra biotinilada (Vector Labs. p/n. BA-3000) en PBST.

65

Luego de los procedimientos sustancialmente como se describen con anterioridad, se lleva a cabo un análisis de la unión de anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 a tau derivado de cerebros humanos. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis semi-cuantitativo de la unión a tau agregada en secciones de cerebro AD FFPE

5		Severidad de tau agregada detectada según lo medido por sistema de puntuación semicuantitativa (severo, +++; moderado, ++, leve, +; negativo, -)			
		Control WT (murina)	Control normal (humana)	Enfermedad de Alzheimer	Enfermedad de Pick
10	MAB de tau ejemplificado del Ejemplo 1	-	+	+++	+++
	Constructo de Ab MC-1 humanizado	-	-	+	+

15 Los resultados proporcionados en la Tabla 5 reflejan que el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 demuestra niveles significativamente más altos de tinción a tau agregada, tanto en pacientes con AD como PD, en secciones de cerebro de hipocampo en comparación con constructo de anticuerpo MC-1 humanizado. Los resultados proporcionados en la Tabla 5 demuestran también que el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 no demuestra unión no específica superior que constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado demuestra la unión a la cantidad mínima de tau agregada en las secciones humanas de control normales). Además, debido a que AD y PD se caracterizan por distintas variantes de empalme del gen que codifica tau, estos resultados respaldan una conclusión que ejemplifica que el anticuerpo monoclonal de tau 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 ejemplificada de la SEQ ID NO: 13) común a los agregados de tau tanto en AD como PD.

Neutralización *in vitro* de propagación de Tau agregada

30 Las preparaciones de homogeneizado de cerebro de ratones P301S de aproximadamente 5 meses de edad son conocidas, en presencia de tau nativa, no agregada, para inducir la agregación de la tau nativa y para demostrar un efecto de propagación como el de la agregación de tau. Preparaciones de homogeneizado de tejido cerebral insolubles en Sarkosyl de ratones P301S de 4,5 a 5 meses de edad se sometieron a ultrasonidos y se diluyeron con OPTI-MEM (GIBCO de Life Tech., p/n. 31985-062) para llevar la tau medida (por preparación) a una concentración final de 0,77 g/ml. Cada preparación se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con uno de anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 (a concentraciones: 21,00, 7,00, 2,33, 0,78, 0,26, 0,09, 0,03 y 0,01 µg/ml) o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (a concentraciones: 50,00, 16,67, 5,56, 1,85, 0,62, 0,21, 0,07, 0,02 y 0,01 µg/ml).

40 Células HEK293 (una línea celular de riñón embrionario humano) se transfectaron por electroporación para expresar induciblemente una forma mutante de tau humana (1 N4L, que tiene una serina sustituida por prolina en el residuo 301 (P301S) (numeración de residuos basada en la tau humana ejemplificada de la SEQ ID NO: 13)). (Falcon B., et al., J. Biol. Chem. 290:1049-1065, 2015). Células HEK293 transfectadas de manera estable se sembraron en placas 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 bovino fetal al 10% (Invitrogen, p/n. 16000), penicilina estreptomina 1x (Invitrogen, p/n. 15140-122), 5 µg/ml Blastisin (Invitrogen, p/n. R210-01), 200 µg/ml Zeocina (Invitrogen, p/n. R250-01)). Las placas se incubaron durante tres días a 37 °C. Después de la incubación, se añadió 1 mg/ml de tetraciclina en una dilución 1:1000 por pocillo (a una concentración final de 1 µg de tetraciclina/ml de medio) para inducir la expresión de tau mutante. Las placas se incubaron a continuación durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación, se retiró el medio de cultivo y se añadió 50 µl de preparado homogeneizado con una de las concentraciones respectivas de uno de anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (preparado como se ha descrito anteriormente). Las placas se incubaron durante tres horas, después de lo cual se eliminó el preparado homogeneizado y 100 µl de medio completo con 1 µg/ml de tetraciclina y la misma concentración respectiva de cualquiera de anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado se añadieron a cada pocillo respectivo. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, después de lo cual se retiró el medio y 100 µl de medio completo y la misma concentración respectiva de cualquiera de anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado o constructo de anticuerpo MC-1 humanizado se añadieron a los pocillos respectivos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron con 200 µl DPBS y se drenaron.

60 Las células se resuspendieron en tampón de 50 µl H (TBS pH 7,4 que contiene 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, inhibidor de la fosfatasa y proteasa (Thermo Scientific, p/n. 784420)) por pocillo y baño de ultrasonidos durante 10 minutos. La concentración total de proteína se mide por Ensayo de Proteína BCATM (Thermo Scientific, p/n. PI-23227). Los niveles de tau agregada son determinados por ELISA tipo emparejado. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 50 µl de 2 µg/ml de anticuerpo AT8 a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron tres veces con PBST, a continuación, se bloqueó con 100 µl de BB3 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se preparó una curva estándar

utilizando extracto total de cerebro con AD por dilución en serie en 0,25% de tampón de caseína utilizando diluciones de dos veces a partir de una concentración de partida de 40 µg/ml a una concentración final de 0,3125 µg/ml. Los lisados celulares se diluyeron en tampón de caseína 0,25% a una concentración total de proteína de aproximadamente 0,1 mg/ml. Se añadieron 50 µl de cada dilución de muestra estándar o de muestras de células diluidas a continuación en pocillos separados de placas bloqueadas y se incubaron a 4 °C durante la noche, después de lo cual las placas se lavaron cuatro veces con PBST. Anticuerpo CP27 biotinilado se diluyó 1:2000 en tampón de caseína 0,25% y luego se añadió 50 µl en los pocillos que contenían las muestras. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, después de lo cual se lavaron cuatro veces con PBST. Estreptavidina-HRP (Invitrogen, p/n. SNN2004) se diluyó 1:5000 en tampón de caseína 0,25% y a continuación se añadió 50 µl en cada pocillo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron 4 veces con PBST y se añadió 50 µl de una mezcla 1:1 de H₂O₂ y TMB (Thermo Scientific, p/n. 34021.) Se añade. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. y la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄. La señal colorimétrica se mide a 450 nm o 650 nm. Los niveles de tau AT8 positivos se normalizaron contra los niveles de proteína total en cada muestra. Los valores normalizados de cada muestra están más normalizados contra los niveles de tau AT8 positivos en muestras de control (no tratadas con anticuerpo). El porcentaje de inhibición de la propagación global de tau en cada muestra se determina restando los valores más normalizados de 100 y el porcentaje del valor de inhibición para cada muestra se ingresa en el programa de Software Prism 6 (GraphPad) por la aplicación de ajuste de curva de regresión no lineal y respuesta a dosis sigmoidal para la generación de valores de EC₅₀. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores representativos EC₅₀ de la inhibición de la propagación de tau agregada

	Ab de Tau Diseñado Ejemplificado del Ejemplo 1	Constructo de Ab MC-1 humanizado
EC₅₀ (que representa la inhibición de la propagación de Tau agregada AT8 positiva (ng/ml))	16	476

Los resultados proporcionados en la Tabla 6 reflejan que el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 demuestra una mejora de aproximadamente 30 veces en la inhibición de la propagación de tau agregada inducida.

Neutralización *in vivo* de propagación de Tau agregada

Es sabido que las preparaciones de tronco cerebral homogeneizado de ratones P301S de aproximadamente 5 meses de edad, tras la inyección en el hipocampo de ratones P301S hembras normales de 10 semanas de edad, inducen la agregación de tau nativa, no agregada, lo que demuestra un efecto de propagación como el de la agregación de tau. Las preparaciones de homogeneizado de tejido cerebral derivan de ratones P301S de 4,5 a 5 meses de edad y se preparan sustancialmente de la misma manera que se describió anteriormente.

Ratones P301S hembras normales de 10 semanas de edad se inyectan en el hemisferio izquierdo del hipocampo con preparación de homogeneizado de cerebro 5 µl y o bien: 7,5 µg anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 (N = 12); o 7,5 µg de anticuerpo IgG4 humano de control (N = 11). Cuatro semanas después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se recogieron los hemisferios izquierdo y derecho, se embebieron en parafina y secciones seriales de 6 µm se montaron sobre el portaobjetos de vidrio. A las rebanadas que contenían bregma (A-P = -2,30) se les quitó la parafina, el tejido embebido se rehidrató y la recuperación de antígenos se realizó calentando la rebanada a 100 °C durante 20 minutos en tampón de citrato. Las rebanadas se enfriaron en dH₂O y se incubaron a temperatura ambiente de acuerdo con las siguientes etapas: (a) 10 min. en (0,03%) H₂O₂; (b) 30 min. en una dilución 1:20 de suero normal de cabra; (c) 60 min. en una dilución 1:8000 de anticuerpo PG 5 (diluido en PBST) (anticuerpo PG-5 obtenido del laboratorio del Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, anticuerpo PG-5 se une específicamente a serina en el residuo 409 de tau cuando está fosforilado, numeración de residuo basada sobre la base de la tau humana ejemplificada de la SEQ ID NO: 13); (d) 30 min. en una dilución 1:200 de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra biotinilado (diluido en PBST); (e) 30 min. en complejo de solución avidina-biotina; y (f) 5 min. en 3,3'diaminobencidina. PBST se utiliza para el lavado entre las medidas respectivas. Después de 5 minutos de incubación en 3,3'diaminobencidina, las secciones se someten a contra-tinción con hematoxilina, luego se rehidratan y se recubren. La señal de tinción se mide por Scanscope AT Slide Scanner (Aperio) con magnificación 20x. La inmunorreactividad PG-5 se cuantifica y expresa como un porcentaje utilizando el algoritmo de pixel positivo de Imagescope Software (v. 11.1.2.780, Aperio). Los resultados se presentan en la Tabla 7.

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

	(% de Inmunorreactividad PG-5)	
	<u>Hipocampo izquierdo</u>	<u>Hipocampo derecho</u>
5 MAb de tau ejemplificado del Ejemplo 1	2,52 ± 0,49 SEM	0,63 ± 0,13 SEM
Ab IgG4 de Control	6,38 ± 0,93 SEM	1,88 ± 0,31 SEM

10 Los resultados proporcionados en la Tabla 7 demuestran que el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 reduce el nivel de agregación de tau, tanto en el hipocampo izquierdo y derecha en comparación con el anticuerpo IgG4 de control. Como se muestra, el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado produce una reducción 60,5% mayor en la agregación de tau en el hipocampo izquierdo y una reducción 66,5% mayor en la agregación de tau en el hipocampo derecho, respectivamente, en comparación con el anticuerpo IgG4 de control. Estos resultados demuestran que el anticuerpo monoclonal ejemplificado tau posee actividad neutralizante contra la propagación de la agregación de tau.

Análisis de eficacia in vivo en el modelo murino Tg4510

20 Los ratones transgénicos Tg4510 expresan una forma mutante de tau humana (4RON, que tiene una leucina sustituida por prolina en el residuo 301 (P301 L), Ramsden M., et al, J. Neuroscience, 25: 10637 a 10647 (2005) y Santacruz K., et al, Science (2005); numeración de residuos basada en la tau humana ejemplificada de la SEQ ID NO: 13). Los ratones Tg4510 exhiben altos niveles de expresión de la tau humana mutante P301 L en las regiones del hipocampo y neocórtex, lo que demuestra la progresión de la agregación de tau dependiente de la edad.

25 Los anticuerpos tau de la presente invención pueden inducir una respuesta inmunogénica en ratones Tg4510. Por lo tanto, con el fin de probar el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales tau de la presente invención para la administración crónica en un modelo de roedor, se construyó un anticuerpo **contra** tau murino sustituto dirigido al mismo epítipo conformacional y reflejando niveles similares de afinidad mejorada con respecto al anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1. El anticuerpo **contra** tau sustituto tiene una afinidad (EC₅₀) para tau fibrilar de AD purificada, medida por ELISA como se describió anteriormente (por ejemplificado anticuerpo monoclonal de tau de ejemplo 1), siendo 13,1 pM.

35 Ratones hembra Tg4510 de ocho semanas de edad se agrupan en 3 grupos separados. El primer grupo (N = 15) se inyecta con un anticuerpo IgG1 de ratón de control (15 mg/kg) dos veces a la semana durante 9 semanas. El segundo grupo (N = 15) se inyecta dos veces por semana durante 9 semanas con anticuerpo MC-1 recombinante (15 mg/kg) producido a partir de ascitis de ratón inyectados con hibridoma MC-1. El tercer grupo (N = 15) se inyecta con anticuerpo **contra** tau murino sustituto (15 mg/kg) dos veces a la semana durante 9 semanas. Tras la administración final, los ratones se sacrifican y se recolectan los cerebros. Las porciones de las secciones de corteza e hipocampo se recolectan, embeben en parafina y las secciones de serie de 6 µM se montan sobre un portaobjetos de vidrio para uso en inmunohistoquímica.

45 El resto de la región de la corteza de los cerebros recolectados se homogeneizan por sonicación de pulso en un volumen de tampón H 10 veces mayor que el volumen de la corteza, se centrifugaron a 21000 g durante 20 min. a 4 °C y una parte alícuota de sobrenadante de cada corteza se recolecta y los niveles de proteína total se determinan por ensayo de proteínas BCATM (Thermo Scientific, p/n. PI-23227) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El resto del sobrenadante se centrifuga a 100000 g durante 1 hora a 4 °C, se desechó el sobrenadante y el pellet insoluble obtenido se resuspendió en tampón H (en un volumen de 1/2 del volumen de sobrenadante descartado). El precipitado resuspendido es sonificado y los niveles agregados de tau AT8 positivo en cada sedimento se determinan por ELISA utilizando anticuerpo de captura AT8 y anticuerpo de detección CP27 sustancialmente como se describe anteriormente. Los niveles agregados de tau AT8 positivo se normalizan con respecto a los niveles de proteína total.

55 En forma similar, el resto de hipocampo de los cerebros recolectados se homogeneiza por sonicación de pulso en un volumen de tampón H 10 veces mayor que el volumen del hipocampo, se centrifuga a 21000 g durante 20 min. a 4 °C y el sobrenadante de cada hipocampo se recolecta y se determinan los niveles de proteína total. Los niveles agregados de tau AT8 positivo en el sobrenadante se determinaron por ELISA utilizando anticuerpo de captura AT8 y anticuerpo de detección CP27 sustancialmente como se describe anteriormente. Los niveles agregados de tau AT8 positivo se normalizan con respecto a los niveles de proteína total. Los resultados se proporcionan en la Tabla 8.

60

Tabla 8. Niveles de agregados tau AT8 positivo en la corteza e hipocampo cerebral homogeneizados medidos mediante ELISA

	Nivel de Tau agregada AT8-positivo ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	<u>Corteza</u>	<u>Hipocampo</u>
Ab de tau murino sustituto	1416 \pm 195 SEM	386 \pm 71 SEM
Ab de mlgG1 de control	1872 \pm 198 SEM	591 \pm 66 SEM
Ab de mlgG1 de rMC-1	1703 \pm 138 SEM	510 \pm 62 SEM

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

El nivel de agregación de tau en el hipocampo y la corteza de las secciones embebidas en parafina preparadas a partir de cerebros recolectados se mide también por inmunohistoquímica utilizando PG-5 sustancialmente como se describe anteriormente. Los datos se normalizan mediante la conversión a valores \log_{10} y los resultados se sintetizan en la Tabla 9.

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

	Tau agregada (valor \log_{10} medio de % de inmunorreactividad PG-5)	
	<u>Corteza</u>	<u>Hipocampo</u>
Ab de tau murino sustituto	0,74 \pm 0,06	0,26 \pm 0,07
Ab de mlgG1 de control	0,90 \pm 0,05	0,46 \pm 0,05
Ab de mlgG1 de rMC-1	0,83 \pm 0,04	0,34 \pm 0,06

Los resultados proporcionados en la Tabla 9 demuestran que el anticuerpo murino tau sustituto reduce el nivel de tau agregada, tanto en la corteza (18%) como hipocampo (43%) con respecto al anticuerpo mlgG1 de control mientras que el anticuerpo MC-1 murino recombinante no demostró una reducción destacable en el nivel de tau agregada en la corteza o hipocampo relativa para al anticuerpo mlgG1 de control.

Propiedades físico-químicas de anticuerpo monoclonal de Tau diseñado

El anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1 demuestra una buena solubilidad, estabilidad química y estabilidad física.

Solubilidad:

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

Luego de los procedimientos sustancialmente como se describe anteriormente, el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 muestra una solubilidad mayor que: 140 mg/ml (a pH 6 en tampón de 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 están presentes niveles bajos de HMW (de ~3 a ~5,4%) a una concentración elevada y no se observa separación de fases.

Estabilidad química y física:

La estabilidad química facilita el desarrollo de formulaciones de fármacos con suficiente vida útil. La estabilidad química del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 se evalúa mediante la formulación del anticuerpo **contra** tau ejemplificado a una concentración de 1 mg/ml en 10 mM de citrato y pH 4, 5, 6 o 7. 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 refleja los cambios químicos, se evaluaron utilizando enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) de acuerdo con procedimientos estándar.

Luego de los procedimientos sustancialmente como se describe anteriormente, el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 demuestra resultados de estabilidad química que se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Síntesis del cambio en % de pico principal en cuatro semanas, con relación a muestras incubadas a 4 °C, medido por cIEF y agregados HMW % medidos por SEC

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

Los resultados proporcionados en la Tabla 10 demuestran que después de un almacenamiento de 4 semanas a 40 °C, el anticuerpo contra tau ejemplificado del ejemplo 1 tiene un porcentaje de disminución de pico principal de sólo 1,1 puntos porcentuales cuando se formula a pH5 y una disminución de sólo 0,3 puntos porcentuales cuando se formula a pH 6 (a pH común utilizado en la formulación de anticuerpo). Además, el análisis de espectrometría de masas demuestra la degradación de sólo un mínimo observado después de 4 semanas de almacenamiento a 40 °C (-1,5% desamidación LCDR1 con degradación menor que 5% en todas las secuencias de CDR), lo que indica que el anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 tiene una estabilidad química suficiente para facilitar el desarrollo de formulaciones de solución con vida media adecuada.

Con fines de comparación, la estabilidad química y física de un constructo de anticuerpo MC-1 humanizado (que tiene la combinación de marco: 5-51 de cadena pesada, A27 de cadena ligera) se realiza incubando el anticuerpo durante 2 semanas a 40 °C a pH 8. El constructo de anticuerpo MC-1 humanizado mostró degradación química significativa incluyendo 12% de desamidación de LCDR1, 5% de desamidación y 10% de isomerización en HCDR3 y 3% en oxidación de marco HC.

La afinidad de unión, después de un estudio de degradación acelerada de cuatro semanas del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1, se evalúa mediante la formulación del anticuerpo monoclonal ejemplificado a una concentración de 1 mg/ml en 10 mM de citrato y pH amortiguado 4 o 6. Las muestras formuladas se incuban durante cuatro semanas a 4 °C o 40 °C en un estudio de degradación acelerada. Después de la incubación, la afinidad del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 a rTau (15 ng/ml) recubierto sobre placas de 96 pocillos de unión se determina mediante ELISA directo siguiendo el procedimiento ELISA sustancialmente como se describe anteriormente. Los resultados del estudio afinidad de unión anteriormente descrito, realizado por duplicado, se proporcionan en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de EC₅₀ luego de un estudio de degradación acelerada

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

La Tabla 11 demuestra que la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del ejemplo 1 a bajas concentraciones de rTau se mantuvo similar para las 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 de tau ejemplificado del Ejemplo 1

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRF
 SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
 SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 2 - HC del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGSDSIKY
5 EKNFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARRGNYVDDWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYS
LSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPKVDRKVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP
10 PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
15 LTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

SEQ ID NO: 3 - LCDR1 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
RSSQSLVHSNQNTYLH

SEQ ID NO: 4 - LCDR2 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
YKVDNRF

SEQ ID NO: 5 - LCDR3 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
SQSTLVPLT

SEQ ID NO: 6 - HCDR1 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
KSGYTFSNYWIE

SEQ ID NO: 7 - HCDR2 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
EILPGSDSIKYEKNFKG

SEQ ID NO: 8 - HCDR3 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
ARRGNYVDD

SEQ ID NO: 9 - LCVR del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRF
40 SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 10 - HCVR del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWMGEILPGSDSIKY
45 EKNFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARRGNYVDDWGQGLTVTVSS

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

gaaattgtggtgacgcagtcctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc
ctctcctgcagatctagtcagagccttgtagacagtaatcagaacacctatttacattgg
55 taccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctataaagttgacaaccgattt

60

ES 2 756 649 T3

tctggcatcccagacaggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatc
agcagactggagcctgaagatcttgcagtggtactgttctcaaagtacactgggtccg
5 ctcacgttcggcggagggaccaaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtc
ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctg
ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcaa
10 tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc
agcagcacctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctgcgaa
gtcaccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgc
15

SEQ ID NO: 12 - Secuencia de nucleótidos que codifica el HC ejemplificado (SEQ ID NO: 2)

gaggtgcagctgggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaagatc
20 tcctgtaagggttctggctacacattcagtaactactggatagagtgggtgcccagatg
cccgggaaaggcctggagtggatgggggagatcttacctggaagtgatagtattaagtac
gaaaagaatttcaagggccaggtcaccatctcagccgacaagtccatcagcacccgctac
25 ctgcagtgagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagaagggg
aactacgtggacgactggggccagggcacctggtcaccgtctcctcagcttctaccaag
ggcccatcggctcttcccgtagcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc
30 ctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctggtggaactcaggc
gccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc
35 ctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaac
gtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtccaaatatggtccc
40 ccatgcccaccctgcccagcacctgaggccgcccggggaccatcagcttctcctgttcccc
ccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtg
gacgtgagccaggaagacccccgaggtccagttcaactggtagctggatggcgtggaggtg
45 cataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggtctcc
aaciaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
50 gagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaat
gggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc
55 ttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaaatgtcttctca
tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctcctgtct
60 ctgggt

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

5 MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPG
SETS DAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPK
10 TPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK
SRLQTAPVMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
PGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKRDRVQSKIGSLDNI
15 THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSS TGSIDMV
DSPQLATLADEV SASLAKQGL

Listado de secuencias

20 <110> ELI LILLY Y LA COMPAÑÍA
<120> ANTICUERPOS CONTRA TAU Y USOS DE LOS MISMOS
25 <130> X20624
<150> US 62/121,116
<151> 2015-02-26
30 <160> 13
<170> PatentIn versión 3.5
35 <210> 1
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> LC del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1
<400> 1
45

ES 2 756 649 T3

<400> 2

5	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
	1				5					10					15	
10	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr
				20					25					30		
15	Trp	Ile	Glu	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
20	Gly	Glu	Ile	Leu	Pro	Gly	Ser	Asp	Ser	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asn	Phe
		50					55					60				
25	Lys	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
30	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
35	Ala	Arg	Arg	Gly	Asn	Tyr	Val	Asp	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
				100					105					110		
40	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
			115					120					125			
45	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
		130					135					140				

ES 2 756 649 T3

	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
	145					150					155					160
5	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
					165					170					175	
10	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
				180					185					190		
15	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
			195					200					205			
20	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro
		210					215					220				
25	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	225					230					235					240
30	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245						250					255	
35	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn
				260					265					270		
40	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
			275				280						285			
45	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
		290					295					300				
50	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
	305					310					315					320
55	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				325						330					335	
60	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu
				340					345					350		
65	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			355					360					365			
70	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
		370					375					380				
75	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
	385					390					395					400

ES 2 756 649 T3

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

5 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

10 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LCDR1 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

20 <400> 3

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15

25 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> LCDR2 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

35 <400> 4

Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser
 1 5

40 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LCDR3 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

45 <400> 5

Ser Gln Ser Thr Leu Val Pro Leu Thr
 1 5

50 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> HCDR1 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

60 <400> 6

Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Glu
 1 5 10

65 <210> 7
 <211> 17

ES 2 756 649 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HCDR2 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

<400> 7

10 Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Ile Lys Tyr Glu Lys Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HCDR3 del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

<400> 8

25 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Val Asp Asp
 1 5

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> LCVR del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

<400> 9

40 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser Gly Ile Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

65

ES 2 756 649 T3

<210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> HCVR del anticuerpo monoclonal de tau ejemplificado del Ejemplo 1

<400> 10

10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

20

Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

25

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Ile Lys Tyr Glu Lys Asn Phe
 50 55 60

30

Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35

Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Val Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

40

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica la LC ejemplificada (SEQ ID NO: 1)

50

<400> 11

ES 2 756 649 T3

5 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatc agaacaccta tttacattgg 120
 taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct ataaagttga caaccgattt 180
 tctggcatcc cagacagggt cagtggcagt gggctctggga cagacttcac tctcaccatc 240
 10 agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg tattactggt ctcaaagtac actggttccg 300
 ctcacgttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgga ccgtggctgc accatctgtc 360
 ttcactctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 15 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
 tccggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
 20 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgc 657

25 <210> 12
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica el HC ejemplificado (SEQ ID NO: 2)

30 <400> 12
 gaggtgcagc tggcgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 35 tcctgtaagg gttctggcta cacattcagt aactactgga tagagtgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggag attttacctg gaagtgatag tattaagtac 180
 gaaaagaatt tcaagggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 40 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaaggggg 300
 aactacgtgg acgactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttctaccaag 360
 ggcccatcgg tcttcccgtc agcgcctcgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 420
 45 ctgggctgcc tggcgaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgctgt gaactcaggc 480
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
 ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac 600
 50 gtagatcaca agcccagca caccaagggtg gacaagagag ttgagtccaa atatggtccc 660
 ccatgcccac cctgcccagc acctgaggcc gccgggggac catcagtctt cctgttcccc 720
 55 ccaaaacca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtgggtgtg 780
 gacgtgagcc aggaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 840
 60 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 900

ES 2 756 649 T3

gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 960
aacaaaggcc tcccgtctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020
5 gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1080
ctgacctgcc tggtaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgaggagtg ggaaagcaat 1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
10 ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca 1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct 1320
ctgggt 1326

<210> 13

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de Tau humana de longitud completa

<400> 13

25 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
30 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
35 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45
40 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 60
45 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80
50 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95
55 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110
60 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125
65 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

ES 2 756 649 T3

	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro
	145					150					155					160
5	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro
					165					170					175	
10	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly
				180					185					190		
15	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser
			195					200					205			
20	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys
		210					215					220				
25	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys
	225					230					235					240
30	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val
					245					250					255	
35	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly
				260					265					270		
40	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln
			275					280					285			
45	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly
		290					295					300				
50	Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser
		305				310					315					320
55	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln
					325					330					335	
60	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser
				340					345					350		
65	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn
			355					360					365			
70	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala
		370					375					380				
75	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser
	385					390					395					400

ES 2 756 649 T3

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

5 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

10 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

15

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo monoclonal que se une a tau humana que comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la secuencia de aminoácidos de la LCVR está dada por la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de la HCVR está dada por la SEQ ID NO: 10.
- 10 **2.** El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, que comprende una cadena ligera (LC) y una cadena pesada (HC), en el que la secuencia de aminoácidos de la LC está dada por la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la HC está dada por la SEQ ID NO: 2.
- 15 **3.** Una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 20 **4.** Una molécula de ADN según la reivindicación 3, en la que la secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 está dada por la SEQ ID NO: 11 y la secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 está dada por la SEQ ID NO: 12.
- 25 **5.** Una célula de mamífero que comprende la molécula de ADN según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en la que la célula es capaz de expresar un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 30 **6.** Un procedimiento de producción de un anticuerpo monoclonal que comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, comprendiendo el procedimiento cultivar la célula de mamífero según la reivindicación 5 en condiciones tales que el anticuerpo monoclonal se expresa y recuperar el anticuerpo monoclonal expresado.
- 35 **7.** Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal según una cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 40 **8.** Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en terapia.
- 45 **9.** Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de la enfermedad de Alzheimer, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Pick.