



MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3261720 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61P 25/28 (2006.01.01)  
A61K 39/00 (2006.01.01)  
C07K 16/18 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

<p>(21) Numărul de depozit: e 2018 0022</p> <p>(22) Data de depozit: 2016.02.18</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16706741.2, 2016.02.18</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3261720, 2019.09.18</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201562121116 P</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.02.26</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: US</p>	<p>(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 38/2019, 2019.09.18</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 02/2018, 2018.02.28</p>
<p>(71) Solicitant: Eli Lilly and Company, US</p> <p>(72) Inventatori: ALVARADO Alberto, US; DRIVER David, US; HAYASHI Mansuo Lu, US; LU Jirong, US</p> <p>(73) Titular: Eli Lilly and Company, US</p> <p>(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru</p>	

(54) Anticorpi anti-Tau și utilizările acestora

(57) Rezumat:

1

Anticorpi monoclonali anti tau umană agregată, compoziții cuprinzând astfel de anticorpi anti-tau, și metode de utilizare a astfel de anticorpi anti tau pentru tratamentul bolilor neurodegenerative incluzand boala

2

Alzheimer, Paralizia supranucleară progresivă, și Boala Pick.

Secvențe: 13

Revendicări: 9

MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

**(54) Antibodies to Tau and uses thereof****(57) Abstract:**

1  
Monoclonal antibodies to human tau  
aggregate, compositions comprising such tau  
antibodies, and methods of using such tau  
antibodies for the treatment of  
neurodegenerative diseases including

2  
Alzheimer-s disease, Progressive Supranuclear  
Palsy and Pick-s disease.  
Sequences: 13  
Claims: 9

**Descriere:****(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Prezentă invenție este în domeniul medicinei. În mod special, prezenta invenție se referă la anticorpi anti tau, compoziții cuprinzând astfel de anticorpi anti-tau, și metode de utilizare a astfel de anticorpi anti tau pentru tratamentul bolilor neurodegenerative incluzând boala Alzheimer (AD), Paralizia supranucleară progresivă (PSP), și Boala Pick (PD).

10 Tau este o proteină de legare a microtubulilor axonali care promovează asamblarea și stabilitatea microtubulilor. AD și PSP sunt boli neurodegenerative caracterizate patologic prin agregarea aberantă a tau. Mai specific, în AD și PSP, se crede că tau hiperfosforilată promovează agregarea fibrilelor tau insolubile conducând la destabilizarea microtubulilor, și toxicitate neuronală. Studiile pe culturi celulare și modele la murine au arătat că agregatele de tau se răspândesc peste joncțiunile sinapselor neuronale și sechestrează tau monomerică (nativă sau ne-agregată), inducând formarea agregatelor de tau. Progresul neuroanatomic al agregării și acumulării de tau în bolile neurodegenerative precum AD și PSP sugerează că agregarea fibrilelor tau se propagă de-a lungul rețelelor neuronale, în final conducând la destabilizarea microtubulilor și în final la funcție neuronală alterată localizată.

20 Densitatea și localizarea neuroanatomică a agregării tau se corelează puternic cu simptomele neurologice din AD și PSP și cu progresul bolii. De exemplu, în AD, tau formează ghemuri neurofibrilare intraneuronale (NFT), care tind să se dezvolte în secvență de la regiunile transentorinale, până la limbice, până la neocorticale, și care se corelează cu severitatea demenței și extinderea pierderii neuronale. În PSP, agregarea tau este observată în neuronii, astrocitele, și oligodendrocitele din regiunile subcorticale și corticale, și s-a arătat că densitatea de tau agregată se corelează cu severitatea pierderii neuronale.

25 Anticorpii anti tau sunt cunoscuți. De exemplu, Brevetul S.U.A. nr. 8.926.974, și Publicațiile internaționale numerele WO2011/026031, WO2012/049570, și WO2013/050567 divulgă anticorpi anti tau și utilizări ale anticorpilor anti tau pentru tratamentul bolilor neurodegenerative cum ar fi AD. WO 2014/100600 descrie anticorpii specifici pentru tau umană și utilizarea lor în compoziții de descriere farmaceutică și diagnostic.

30 WO 2014/059442 descrie anticorpi care recunosc specific tau oligomerică dar nu se leagă la tau monomerică, tau fibrilară sau formele non-boală ale tau.

WO 2012/149365 descrie anticorpi selectivi pentru dimerii patologici ai tau și utilizarea lor în tratamentul, diagnosticul și monitorizarea taupatiilor.

35 D.L. Castillo-Carranza et al, „Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles”, Vol. 34, nr.12, 19 martie 2014, paginile 4260-4272 descrie imunizarea pasivă cu anticorpii monoclonali anti Tau oligomerică. Aceasta discută rolul oligomerelor tau în progresul bolii și validarea oligomerelor tau ca țintă pentru tratamentul bolii Alzheimer.

40 Totuși, până în prezent nici un anticorp care țintește tau nu a fost aprobat pentru utilizare terapeutică și nu există în prezent terapii aprobate de modificare a bolii pentru AD sau PSP. Astfel, rămâne o necesitate pentru anticorpi alternativi anti tau. În particular, rămâne o necesitate pentru anticorpi alternativi anti tau care se leagă specific la agregatele de tau și care reduc propagarea formării agregatelor de tau, formarea de NFT și pierderea neuronală. Astfel de anticorpi anti tau preferabil posedă de asemenea proprietăți fizico-chimice bune pentru a facilita dezvoltarea, fabricarea, și/sau formularea.

45 Prezentă invenție furnizează un anticorp monoclonal care se leagă la tau umană și care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) și o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR), în care LCVR cuprinde regiunile determinante de complementaritate (regiunile CDR) LCDR1, LCDR2 și LCDR3 și HCVR cuprinde regiunile CDR HCDR1, HCDR2 și HCDR3. În conformitate cu realizările particulare din prezenta invenție secvența de aminoacizi a LCDR1 este dată de SEQ ID NO.3, secvența de aminoacizi a LCDR2 este dată de SEQ ID NO.4, secvența de aminoacizi a LCDR3 este dată de SEQ ID NO.5, secvența de aminoacizi a HCDR1 este dată de SEQ ID NO.6, secvența de aminoacizi a HCDR2 este dată de SEQ ID NO.7, și secvența de aminoacizi a HCDR3 este dată de SEQ ID NO.8.

55 În conformitate cu un prim aspect, prezenta invenție furnizează un anticorp monoclonal care se leagă la tau umană, cuprinzând o LCVR și o HCVR, în care secvența de aminoacizi a LCVR este dată de SEQ ID NO.9 și secvența de aminoacizi a HCVR este dată de SEQ ID nr. 10. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un anticorp monoclonal care se leagă la tau umană, cuprinzând un lanț ușor (LC) și un lanț greu (HC), în care secvența de aminoacizi a LC este dată de SEQ ID NO.1 și secvența de aminoacizi a HC este dată de SEQ ID NO.2.

60

Prezenta invenție furnizează un anticorp monoclonal care se leagă la tau umană. Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un anticorp monoclonal care se leagă la un epitop conformațional al tau umane. Într-o realizare particulară, epitopul conformațional al tau umane include resturile de aminoacizi 7-9 și 312-322 ale tau umane, în care secvența de aminoacizi a tau umană este dată de SEQ ID NO.13.

Prezenta invenție mai furnizează compoziții farmaceutice cuprinzând un anticorp monoclonal din prezenta invenție și unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic. Suplimentar, prezenta invenție furnizează o metodă de tratare a AD, PSP, sau PD cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei compoziții farmaceutice din prezenta invenție.

În plus, prezenta invenție furnizează o metodă de tratare a bolilor neurodegenerative. Mai exact, prezenta invenție furnizează o metodă de tratare a AD, PSP, sau PD cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente dintr-un anticorp monoclonal din prezenta invenție.

Prezenta invenție furnizează de asemenea anticorpul monoclonal din prezenta invenție pentru utilizare în terapie. Mai exact, prezenta invenție furnizează de asemenea anticorpul monoclonal din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul AD, PSP, sau PD.

Intr-o realizare, prezenta invenție furnizează utilizarea anticorpului monoclonal din prezenta invenție în fabricarea unui medicament pentru tratamentul AD, PSP, sau PD.

Prezenta invenție se referă de asemenea la molecule de acid nucleic și vectori de expresie care codifică anticorpul monoclonal din prezenta invenție. Într-o realizare, prezenta invenție furnizează o moleculă de ADN cuprinzând o secvență polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.1, și cuprinzând o secvență polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.2. Într-o realizare particulară, secvența polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.1 este dată de SEQ ID NO.11 și secvența polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.2 este dată de SEQ ID NO.12.

În conformitate cu un alt aspect din prezenta invenție, este furnizată o celulă de mamifer cuprinzând molecula de ADN din prezenta invenție în care celula este capabilă să exprime un anticorp monoclonal cuprinzând un lanț ușor având o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 1 și un lanț greu având o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 2.

Suplimentar, prezenta invenție furnizează un anticorp monoclonal preparat în conformitate cu un procedeu, în care procedeul menționat cuprinde cultivarea unei celule gazdă cuprinzând o secvență polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.1 și o secvență polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.2, în astfel de condiții încât anticorpul monoclonal să fie exprimat, și recuperarea din celula gazdă menționată a unui anticorp monoclonal cuprinzând un LC și un HC, în care secvența de aminoacizi a LC este dată de SEQ ID NO.1 și secvența de aminoacizi a HC este dată de SEQ ID NO.2.

În conformitate cu un alt aspect din prezenta invenție, este furnizată compoziția farmaceutică cuprinzând un anticorp monoclonal în conformitate cu prezenta invenție și unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic.

În conformitate cu un alt aspect din prezenta invenție, este furnizat un anticorp monoclonal în conformitate cu prezenta invenție pentru utilizare în terapie.

Preferabil, anticorpul monoclonal din prezenta invenție este pentru utilizare în tratamentul unei boli selectate dintre boala Alzheimer, Paralizia supranucleară progresivă și Boala Pick.

Așa cum s-a utilizat în acest document, un „anticorp” este o moleculă de imunoglobulină cuprinzând 2 HC și 2 LC interconectate prin legături de disulfură. Porțiunea amino terminală a fiecărui LC și HC include o regiune variabilă de aproximativ 100-120 aminoacizi responsabilă în primul rând pentru recunoașterea antigenului prin intermediul regiunilor CDR conținute în aceasta. Regiunile CDR sunt intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, denumite regiuni cadru („FR”). Fiecare LCVR și HCVR este compusă din 3 regiuni CDR și 4 FR, dispuse de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Cele 3 regiuni CDR ale LC sunt menționate ca „LCDR1, LCDR2, și LCDR3”, și cele 3 regiuni CDR ale HC sunt menționate ca „HCDR1, HCDR2, și HCDR3”. Regiunile CDR conțin majoritatea resturilor care formează interacțiuni specifice cu antigenul. Abilitatea funcțională a unui anticorp de a lega un antigen particular este larg influențată de cele șase regiuni CDR. Atribuirea aminoacizilor la domeniile CDR din regiunile LCVR și HCVR ale anticorpilor din prezenta invenție este bazată pe bine cunoscuta convenție de numerotare Kabat (Kabat, et al., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,

ediția a cincea, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nr. 91-3242 (1991)), și convenția de numerotare North (North et al., A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations, Journal of Molecular Biology, 406:228-256 (2011)).

5 LC sunt clasificate drept kappa sau lambda, care sunt fiecare caracterizate printr-o particulară regiune constantă așa cum se cunoaște în domeniu. Anticorpul monoclonal din prezenta invenție include LC kappa. HC sunt clasificate ca gama, mu, alfa, delta, sau epsilon, și definesc izotipul unui anticorp ca IgG, IgM, IgA, IgD, sau IgE, în mod respectiv. Anticorpul monoclonal din prezenta invenție include HC de IgG. Anticorpul IgG poate fi divizat suplimentar în subclase, de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Într-o realizare particulară, anticorpul monoclonal din prezenta invenție sunt IgG4. Porțiunea carboxi-terminală a fiecărui HC definește o regiune constantă responsabilă în primul rând pentru funcția efectoră. Într-o realizare particulară, anticorpul monoclonal din prezenta invenție are una sau mai multe modificări în regiunea constantă a fiecărui HC care reduce funcția efectoră. Într-o realizare mai particulară, anticorpul monoclonal din prezenta invenție sunt IgG4 și au modificări în regiunea constantă a ambelor HC care reduce funcția efectoră incluzând aminoacidul alanină la ambele resturi 230 și 231 (numerotare a resturilor bazată pe HC exemplificat din SEQ ID NO.2). Într-o realizare și mai particulară, anticorpul monoclonal din prezenta invenție sunt IgG4 și au modificări în regiunea constantă a ambelor HC care reduce funcția efectoră incluzând aminoacidul alanină la ambele resturi 230 și 231 și au modificări suplimentare în regiunea constantă a ambelor HC promovând stabilitate incluzând aminoacidul prolină la restul 224 și deleția aminoacidului lizină la restul 443 (numerotare a resturilor bazată pe HC exemplificat din SEQ ID NO.2).

20 Anticorpul din prezenta invenție sunt anticorpi monoclonali („mAb”). mAb pentru prezenta invenție sunt mAb compleți conținând 2 HC și 2 LC. Așa cum s-a menționat în acest document, mAb sunt anticorpi derivați dintr-o singură copie sau clonă incluzând, de exemplu, orice clonă eucariotă, procariotă sau bacteriofagă, și nu metoda prin care este produsă. Anticorpul monoclonal pot fi produși, de exemplu, prin tehnologiile hibridomului, tehnologiile recombinante, tehnologiile de afișare pe bacteriofagi, tehnologiile sintetice, de exemplu, grefarea CDR, sau combinațiile unor astfel de tehnologii sau altele cunoscute în domeniu.

25 Metodele de producere și purificare a anticorpilor sunt bine cunoscute în domeniu și pot fi găsite, de exemplu, în Harlow și Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., capitolele 5-8 și 15, ISBN 0-87969-314-2. De exemplu, pot fi imunizați șoareci cu filamente elicoidale pereche („PHF”) de tau umană din țesutul cerebral al pacienților caracterizați ca având AD (Jicha et al., J. Neurosci. Res., 15:48(2), 128-132 (April, 1997)), și anticorpul rezultat pot fi recuperati, purificați, și determinați secvențele de aminoacizi utilizând metode convenționale bine cunoscute în domeniu. Anticorpul monoclonal din prezenta invenție sunt proiectați să conțină una sau mai multe regiuni cadru umane înconjurând regiunile CDR derivate de la un anticorp non-uman. Secvențele liniei germinative de cadru uman pot fi obținute de la ImMunoGeneTics (INGT) prin website-ul lor, <http://imgt.cines.fr>, sau din Immunoglobulin FactsBook de Marie-Paule Lefranc și Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. În conformitate cu realizările particulare din prezenta invenție, regiunile particulare ale liniei germinative de cadru al HC și cadru al LC pentru utilizare în anticorpul monoclonal din prezenta invenție include 5-51 și A27, în mod respectiv.

30 În anumite realizări din prezenta invenție, anticorpul, sau acidul nucleic care îl codifică, este furnizat în formă izolată. Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „izolată” se referă la o proteină, peptidă, sau acid nucleic care este lipsit sau substanțial lipsit de alte specii macromoleculare găsite într-un mediu celular.

35 Anticorpul monoclonal din prezenta invenție pot fi preparați și purificați utilizând metode cunoscute. De exemplu, secvențele de ADN care codifică un HC (de exemplu secvența de aminoacizi dată prin SEQ ID NO.2) și un LC (de exemplu, secvența de aminoacizi dată prin SEQ ID NO.1) pot fi clonate și obținute prin inginerie într-un vector de expresie de GS (glutamină sintetază). Vectorul de expresie a imunoglobulinei obținute prin inginerie poate fi apoi transfectat stabil în celule CHO. După cum va aprecia o persoană calificată în domeniu, expresia la mamifere a anticorpilor va conduce la glicozilare, de obicei la situsuri de N-glicozilare înalt conservate în regiunea Fc. Clonele stabile pot fi verificate pentru expresia unui anticorp de legare specifică la agregatele de tau. Clonele pozitive pot fi expandate în mediu de cultură fără ser pentru producția anticorpilor în bioreactor. Mediul, în care a fost secretat un anticorp, poate fi purificat prin tehnici convenționale. De exemplu, mediul poate fi aplicat convenabil la o coloană cu Proteină A sau G Sefaroză FF care a fost echilibrată cu un tampon compatibil, cum ar fi soluție salină tamponată cu fosfat. Coloana este spălată pentru a îndepărta componentele de legare ne-specifică.

40 Anticorpul legat este eluat, de exemplu, prin gradient de pH și sunt detectate fracțiunile de anticorp, cum ar fi prin SDS-PAGE, și apoi reunite. Anticorpul poate fi concentrat și/sau filtrat

steril utilizând tehnici comune. Agregatul solubil și multimerii pot fi îndepărtați eficient prin tehnici comune, incluzând excluderea după dimensiune, interacțiunea hidrofobă, schimbarea de ioni, sau cromatografia cu hidroxiapatită. Produsul poate fi congelat imediat, de exemplu la -70°C, sau poate fi liofilizat.

5 Anticorpul monoclonal din prezenta invenție pot fi utilizați în tratamentul pacienților. Mai exact anticorpul din prezenta invenție sunt de așteptat să trateze o clasă de tulburări neurodegenerative, denumite tauopatii, care includ AD, PSP, și PD. Deși anticorpul monoclonal din prezenta invenție sunt de așteptat să fie utili în tratamentul AD, PSP, și PD, astfel de anticorpi pot fi utili de asemenea în tratamentul altor tauopatii, incluzând encefalopatia traumatică cronică. 10 Așa cum s-au utilizat interschimbabil în acest document, „tratament” și/sau „tratarea” și/sau „tratează” sunt intenționați pentru a se referi la toate procedeele în care poate exista o încetinire, întrerupere, arestare, controlare, oprire, sau inversare a progresului tulburărilor descrise în acest document, dar nu indică în mod necesar o eliminare totală a tuturor simptomelor tulburărilor. 15 Tratamentul include administrarea unui anticorp din prezenta invenție pentru tratamentul unei boli sau afecțiuni la un om care ar beneficia de o reducere a propagării a cel puțin uneia dintre formarea agregatelor de tau, formarea de NFT și pierderea neuronală, și include: (a) inhibarea progresului suplimentar al bolii, *adică*, oprirea dezvoltării sale; și (b) potolirea bolii, *adică*, determinarea regresiei bolii sau tulburării sau atenuarea simptomelor sau a complicațiilor acesteia.

20 Așa cum s-a utilizat interschimbabil în acest document, termenul „pacient”, „subiect”, și „individ”, se referă la un om. În anumite realizări, pacientul este caracterizat în plus cu o boală, tulburare, sau afecțiune (de exemplu, o tulburare neurodegenerativă) care ar beneficia de o reducere a propagării a cel puțin uneia dintre formarea agregatelor de tau, formarea de NFT, și pierderea neuronală. Într-o altă realizare, pacientul este caracterizat în plus ca fiind la risc de a 25 dezvolta o tulburare neurodegenerativă, boală, sau afecțiune care ar beneficia de o reducere a propagării a cel puțin uneia dintre formarea agregatelor de tau, formarea de NFT, și pierderea neuronală.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „leagă (sau se leagă la)” tau se referă la o interacțiune a unui anticorp cu un epitop al agregatului de tau umană. Mai preferabil, epitopul este un epitop conformațional de tau umană. Într-o realizare particulară, termenul „leagă (sau se 30 leagă la)” tau se referă la o interacțiune cu un epitop conformațional incluzând resturile de aminoacizi 7-9 și 312-322 ale agregatului de tau umană (numerotare a resturilor bazată pe tau umană exemplificată din SEQ ID NO.13). Trebuie să se înțeleagă că există variații cunoscute ale proteinei tau umane, de exemplu care rezultă din variantele de alipire. Astfel de variații cunoscute, totuși, posedă epitopul conformațional incluzând resturile de aminoacizi 7-9 și 312-322 din SEQ 35 ID NO.13. Variantele cunoscute, totuși, pot conduce la numerotare a resturilor modificată pentru resturile de aminoacizi 7-9 și 312-322 din SEQ ID NO.13. Deși numerotarea resturilor poate fi modificată la unele variante, aminoacizii cuprinzând epitopul rămân aceiași. Termenul „epitop” așa cum s-a utilizat în acest document se referă la situsuri discrete, tri-dimensionale ale unui antigen care sunt recunoscute de anticorpul monoclonal din prezenta invenție.

40 Un anticorp monoclonal din prezenta invenție poate fi încorporat într-o compoziție farmaceutică care poate fi preparată prin metode bine cunoscute în domeniu și cuprinde un anticorp monoclonal din prezenta invenție și unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic și/sau diluanți (de exemplu, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, ediția a 2-a, Loyd V., Ed., Pharmaceutical Press, 2012, care furnizează un compendiu cu tehnicile de formulare care 45 sunt cunoscute în general practicienilor). Purtătorii adecvați pentru compoziții farmaceutice includ orice material care, atunci când este combinat cu anticorpul monoclonal din prezenta invenție, păstrează activitatea moleculei și este ne-reactiv cu sistemul imunitar al pacientului.

O compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp monoclonal din prezenta invenție poate fi administrată la un pacient care riscă, sau care prezintă, bolile sau tulburările descrise în 50 acest document pe căi parenterale (de exemplu, subcutanat, intravenos, intraperitoneal, intramuscular, sau transdermal). O compoziție farmaceutică din prezenta invenție conține o cantitate „eficientă” sau „eficientă terapeutică”, așa cum s-a utilizat interschimbabil în acest document, dintr-un anticorp monoclonal al prezentei invenții. O cantitate eficientă se referă la o cantitate necesară (la dozajele și pentru perioadele de timp și pentru mijloacele de administrare) 55 pentru a obține rezultatul terapeutic dorit. O cantitate eficientă de anticorp monoclonal poate varia în conformitate cu factori cum ar fi starea de boală, vârsta, sexul, și greutatea individului, și abilitatea anticorpului monoclonal de a declanșa un răspuns dorit la individ. O cantitate eficientă este de asemenea una în care orice efecte toxice sau dăunătoare ale anticorpului monoclonal din prezenta invenție sunt depășite de efectele benefice terapeutice.

60

**Anticorpul anti tau obținut prin inginerie**

5 Au fost întâlnite probleme semnificative asociate cu stabilitatea chimică și fizică la  
 construirea unui anticorp monoclonal anti tau din prezenta invenție. Problemele întâlnite au inclus  
 afinitatea de legare redusă, imunogenitatea, agregarea, dimerizarea HC, precum și deamidarea  
 regiunii variabile, oxidarea, izomerizarea și pliarea defectuoasă.

10 De exemplu, anticorpul IgG1 murin MC-1 („MC-1”) (Albert Einstein College of  
 Medicine, Jicha et al., 1997), care recunoaște un epitop conformațional al proteinei tau la resturile  
 de aminoacizi 7-9 și 312-322 (numerotare a resturilor bazată pe proteina tau umană exemplificată  
 având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO.13), a fost inițial umanizat prin proiectarea celor  
 trei regiuni CDR ale HC murin de MC-1 în multiple gene de linie germinativă ale cadrului HC  
 uman și a celor trei regiuni CDR ale LC murin de MC-1 în multiple gene de linie germinativă ale  
 15 cadrului LC uman. Construcțiile umanizate ale MC-1 au utilizat 96 de combinații diferite de cadre  
 ale lanțului greu și ușor, reprezentând fiecare din cele douăsprezece familii de linie germinativă ale  
 cadrului de HC (cadre de HC uman specifice: 1-24, 1-46, 1-69, 2-05, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04,  
 4-39, 5-51, și 6-01) și fiecare din cele opt familii de linie germinativă ale LC (cadre de LC uman  
 specifice: A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12, O11, și O-2). Genele de linie germinativă ale cadrelor  
 20 respective au fost clonate în vectorii de expresie ai lanțului greu și ușor de IgG4 umană și  
 transfectate în celulele HEK293 pentru expresie și analiza legării prin ELISA. Deși mai multe  
 perechi de cadre au demonstrat un nivel de legare la tau umană în ELISA, construcțiile de anticorp  
 rezultate au afișat o mulțime de probleme incluzând afinitatea slabă de legare, agregarea,  
 dimerizarea HC, și probleme de stabilitate chimică cum ar fi deamidare, oxidare, și izomerizare în  
 regiunile variabile.

25 Modificările au fost prin urmare proiectate să dezvolte anticorpi anti tau care să posede  
 afinitate de legare îmbunătățită, dimerizare a HC eliminată sau redusă, imunogenitate redusă, și  
 stabilitate chimică și fizică îmbunătățită. Modificările de aminoacizi (față de MC-1, Jicha et al.,  
 1997) au fost proiectate în HCDR2 și HCDR3, și LCDR1, LCDR2, și LCDR3. Anticorpul murin  
 modificat a fost umanizat prin proiectarea celor trei regiuni CDR de HC în multiple gene de linie  
 30 germinativă ale cadrului de HC uman și a celor trei regiuni CDR de LC în multiple gene de linie  
 germinativă ale cadrului de LC uman în mod esențial cum s-a descris mai sus. Suplimentar, au fost  
 efectuate studii extensive ale stabilității proteinei și au fost evaluați anticorpii monoclonali obținuți  
 prin inginerie pentru proprietățile de expresie și termostabilitate precum și proprietățile afinității de  
 legare. Un anticorp monoclonal conținând șapte mutații ale CDR (poziția aminoacidului este  
 35 bazată pe numerotarea liniară a resturilor de aminoacizi a unui anticorp exemplificat din prezenta  
 invenție reflectată în Tabelul 1: HCDR2 la N61E și E62K; HCDR3 la P103V și Y105D; LCDR1  
 la G34Q; LCDR2 la S57D; și LCDR3 la H98L) a fost identificat ca îmbunătățind afinitatea de  
 legare, stabilitatea chimică și fizică, și imunogenitatea pentru anticorpii monoclonali din prezenta  
 invenție (față de MC-1, Jicha et al., 1997). Nici una dintre modificările de mai sus nu a fost  
 40 identificată în caracterizările MC-1 sau construcțiile anticorpului MC-1 umanizat.

Un anticorp monoclonal anti tau obținut prin inginerie exemplificat din prezenta invenție  
 este prezentat în Tabelul 1. Anticorpul monoclonal al tau obținut prin inginerie exemplificat  
 include cadrul de HC uman 5-51 și cadrul de LC uman A27. Relația diferitelor regiuni ale  
 anticorpului monoclonal anti tau obținut prin inginerie exemplificat este după cum urmează  
 45 (numerotarea aminoacizilor aplică numerotarea liniară; alocarea aminoacizilor la domenii variabile  
 este pe baza International Immunogenetics Information System® disponibil la [www.imgt.org](http://www.imgt.org);  
 alocarea aminoacizilor la domeniile CDR este pe baza bine cunoscutei convenții de numerotare  
 North, cu excepția HCDR2 care este pe baza bine cunoscutei convenții de numerotare Kabat):

50

**Tabelul 1: Regiunile aminoacizilor unui anticorp monoclonal anti tau obținut prin inginerie  
 exemplificat din prezenta invenție.**

SEQ ID NO:2			SEQ ID NO: 1		
	Regiune	Poziții		Regiune	Poziții
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

SEQ ID NO:2			SEQ ID NO: 1		
	Regiune	Poziții		Regiune	Poziții
	FRH4	106-116		FRL4	103-112
<b>Constantă</b>	CH	117-442	<b>Constantă</b>	CL	113-219

Următoarele Exemple și teste demonstrează că anticorpii monoclonali din prezenta invenție sunt utili pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative asociate cu propagarea agregatelor de tau cum ar fi AD, PSP, sau PD. Ar trebui să se înțeleagă totuși, că Exemplele următoare sunt stabilite cu scop de ilustrare și nu de limitare, și că pot fi făcute diferite modificări de către cineva cu calificare obișnuită în domeniu.

### Exemple

#### 10 Expresia anticorpului anti tau obținut prin inginerie

Anticorpii monoclonali anti tau obținuți prin inginerie din prezenta invenție pot fi exprimați și purificați în mod esențial după cum urmează. Un vector de expresie de glutamină sintetază (GS) conținând secvența de ADN din SEQ ID NO.11 (care codifică secvența de aminoacizi a LC din SEQ ID NO.1) și secvența de ADN din SEQ ID NO.12 (care codifică secvența de aminoacizi a HC din SEQ ID NO.2) este utilizat pentru a transfecta o linie celulară ovariană de Hamster chinezesc (CHO) prin electroporație. Vectorul de expresie codifică un promotor al SV Early (Virus Simian 40E) și gena pentru GS. Expresia de GS permite sinteza biochimică de glutamină, un aminoacid necesar celulelor CHO. După-transfectare, celulele suferă o selecție brută cu 50μM L-metionină sulfoximină (MSX). Inhibarea GS cu MSX este utilizată pentru a crește stringența selecției. Celulele cu integrarea ADNc al vectorului de expresie în regiunile active transcripționale ale genomului celulei gazdă pot fi selectate față de celulele CHO de tip sălbatic, care exprimă un nivel endogen de GS. Reuniunile transfectate sunt placate la densitate mică pentru a permite o creștere aproape de clonal a celulelor care exprimă stabil. Godeuri principale sunt evaluate pentru expresia anticorpului și apoi scalate în culturi fără ser, de suspensie pentru a fi utilizate pentru producție. Mediul clarificat, în care anticorpii au fost secretați, este aplicat la o coloană de afinitate cu Proteină A care a fost echilibrată cu un tampon compatibil, cum ar fi soluție salină tamponată cu fosfat (pH 7,4). Coloana este spălată cu 1M NaCl pentru a îndepărta componentele de legare ne-specifică. Anticorpii monoclonali legați la tau sunt eluați, de exemplu, cu citrat de sodiu la pH (aprox.) 3,5 și fracțiunile sunt neutralizate cu 1M Tampon Tris. Fracțiunile de anticorpii monoclonali anti tau sunt detectate, cum ar fi prin SDS-PAGE sau excluderea analitică după dimensiune, și apoi sunt reunite. Agregatul solubil și multimerii pot fi îndepărtați eficient prin tehnici comune, incluzând excluderea după dimensiune, interacțiunea hidrofobă, schimbul de ioni, sau cromatografia cu hidroxipatită. Anticorpii monoclonali anti tau din prezenta invenție este concentrat și/sau filtrat steril utilizând tehnici comune. Purity anticorpului monoclonal anti tau după aceste etape de cromatografie este mai mare de 95%. Anticorpii monoclonali anti tau din prezenta invenție poate fi congelat imediat la -70°C sau depozitat la 4°C timp de câteva luni.

#### 40 Cinetica și afinitatea legării

Testarea Rezonanței plasmonice de suprafață (SPR), măsurată cu un instrument BIACORE® 2000 (amorsat cu tampon de rulare HBS-EP+ (GE Healthcare, 10 mM Hepes pH7,4 + 150 mM NaCl + 3 mM EDTA + 0,05% surfactant P20) la 25°C), este utilizată pentru a măsura legarea anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 atât la tau umană monomerică (de exemplu, nativă sau ne-agregată) cât și la agregatele de tau umană (ambele având secvența de aminoacizi cum s-a stabilit în SEQ ID NO:13). Legarea constructului de anticorpii MC-1 umanizat (având combinația de cadru: 5-51 lanț greu, A27 lanț ușor) la tau umană monomerică și agregatul de tau umană este măsurată în aceeași manieră.

Cu excepția celor notate, toți reactivii și materialele sunt de la BIACORE® AB (Upsala, Suedia). Un cip CM5 conținând proteină A imobilizată (generat utilizând cuplarea standard cu amină NHS-EDC) pe toate cele patru celule de flux (FC) este utilizat pentru a folosi o metodologie de captare. Mostrele de anticorpii sunt preparate la 0,5μg/mL prin diluție în tampon de rulare. Tau monomerică și tau fibrilară sunt preparate la concentrații de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,82, 3,91, 1,95, și 0 (gol) nM prin diluție în tampon de rulare. Fiecare ciclu de analiză constă din: (1) captarea mostrelor de anticorpii pe celule separate de flux (FC2, FC3, și

FC4); (2) injectarea a 250 $\mu$ L (300 sec) din fie tau monomerică fie agregat fibrilar de tau peste FC respectivă la o rată de 50  $\mu$ L/min; (3) revenirea la fluxul de tampon timp de 20 de minute pentru a monitoriza faza de disociere; (4) regenerarea suprafețelor cipurilor cu o injecție de 25  $\mu$ L (30 sec) de glicină, pH1,5; (5) echilibrarea suprafețelor cipurilor cu o injecție de 50  $\mu$ L (60 sec) de HBS-EP+.

Datele legării la agregatul de tau sunt procesate utilizând dublă-referință standard și adaptate la un model de legare de 1:1 utilizand software-ul Biacore 2000 Evaluation, versiunea 4.1, pentru a determina rata de asociere ( $k_{on}$ ,  $M^{-1}s^{-1}$  unități), rata de disociere ( $k_{off}$ ,  $s^{-1}$  unități), și  $R_{max}$  (RU unități). Constanta de disociere la echilibru ( $K_D$ ) a fost calculată din relația  $K_D = k_{off}/k_{on}$ , și este în unități molare. Datele legării la tau monomerică nu pot fi determinate cu precizie prin SPR cum s-a descris mai sus din cauza ratelor rapide de asociere și disociere. Prin urmare,  $K_D$  pentru legarea la tau monomerică este obținută prin utilizarea unui model de adaptare a legării la starea stabilă din reprezentarea grafică a concentrației de antigen versus unitatea de răspuns. Datele de legare care rezultă sunt furnizate în Tabelul 2.

Tabelul 2: SPR legare date la both uman monomeric și agregă tau.

		$k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ unități)	$k_{off}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ unități)	$K_D^*$ (nM)
mAb anti tau exemplificat din Exemplul 1	Tau monomerică	Nedetectabilă	Nedetectabilă	235
	Agregat de tau	4,59e4	<1e-5	<0,22
Construct de Ab MC-1 umanizat	Tau monomerică	Nedeterminată	Nedeterminată	550
	Agregat de tau	5,75e4	1,02e-4	1,77

\*Rezultatele  $K_D$  sunt considerate relative deoarece rezultatele nu sunt normalizate pentru influența avidității.

Rezultatele furnizate în Tabelul 2 demonstrează că anticorpul monoclonal anti tau din Exemplul 1 nu posedă o legare măsurabilă la tau monomerică astfel încât o valoare a afinității poate fi determinată cu precizie prin analiză Biacore (din cauza ratelor rapide de asociere și disociere). Invers, rezultatele furnizate în Tabelul 2 demonstrează că anticorpul monoclonal anti tau din Exemplul 1 posedă o afinitate îmbunătățită la agregatul de tau în comparație cu constructul anticorpului MC-1 umanizat.

Testul cu imunosorbent legat de enzimă (ELISA) este utilizat pentru a determina afinitatea relativă de legare a anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 la fibrilele agregate de tau din omogenatele de creier cu AD. Omogenatele de creier cu AD sunt preparate din aprox. 80g de cortex din creierul pacienților cu AD. Pe scurt, se adaugă tampon (cocktail inhibitor de protează TBS/1mM PMSF/1X Complete® (Roche, p/n. 11 697 498 001) și inhibitor de fosfatază (ThermoFischer, p/n. 78428)) la țesutul cerebral cu AD la aproximativ 10ml/1g (țesut). Țesutul este omogenizat utilizând un Kinematica Polytron portabil la viteză 6-7. Țesutul este apoi omogenizat suplimentar utilizand Parr Bomb (Parr Instrument, p/n. 4653) la 1500 psi de azot timp de 30 de minute. Omogenatul este centrifugat la 28.000g (rotor J14 Beckman) timp de 30 min la 4°C. Supernatantul este colectat, reunit și rulat pe o coloană de protecție înaltă de 4 cm de Sepharose 400 Superflow pentru a îndepărta resturile mai mari, apoi este rulat pe o coloană de 25 ml MC1-Affigel 10 la un debit de 50 - 60 ml per oră, pentru a purifica fibrilele de tau cu legare la MC1. Pentru a maximiza recuperarea purificării, supernatanții sunt reciclați prin coloana cu MC-1 peste 18-20 ore la 4°C. Coloana de protecție este îndepărtată și coloana cu MC1 este spălată cu TBS cu cel puțin 40 de volume de coloană. Agregatele de tau legate sunt apoi eluate cu 2 volume de coloană de 3M KSCN, colectând în fracțiuni de aprox. 1 ml. Concentrația de proteină din fiecare fracțiune eluată este verificată prin testul Bradford în placă de microtitrare. Fracțiunile conținând niveluri pozitive de proteină sunt reunite, concentrate până la aproximativ 2ml utilizand Centricon (Millipore Ultracel-30K) la 4°C, și dializate utilizând o casetă Slide-A-Lyzer (10K MWCO 3-12ml, Pierce) peste noapte împotriva a 1 litru de TBS. Concentrația de tau din fibrilele de tau purificate din omogenatul de creier cu AD este măsurată prin ELISA tip sandwich utilizând anticorpul de captură DA-9 și anticorpul de detecție CP27.

Fibrilele de tau purificate (50 $\mu$ l) în PBS sunt acoperite pe godeurile plăcilor cu 96 de godeuri (Coastar, p/n. 3690) la o concentrație care corespunde cu 0,7  $\mu$ g/ml de tau totală. Plăcile sunt incubate peste noapte la 4°C, apoi spălate de trei ori cu 150 $\mu$ l de PBST (PBS conținând 0,05% Tween-20), blocate în 100 $\mu$ l BB3 (Immuno-Chemistry Technology, p/n. 643) la temperatura camerei timp de cel puțin 1 oră (uzual 2 ore). După blocare, tamponul de blocare este îndepărtat din godeuri. Anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 și un construct

- de anticorp MC-1 umanizat (având combinația de cadru: 5-51 lanț greu, A27 lanț ușor) sunt diluați în 0,25% tampon de cazeină până la un stoc de 1000nM, apoi diluați serial de 23 de ori cu diluții de două ori. 50μl de stoc și anticorp diluat serial (fie monoclonalul anti tau exemplificat din Exemplul 1 fie constructul de anticorp MC-1 umanizat) se adaugă la godeuri separate și se
- 5 incubează timp de 2 ore la temperatura camerei, după care placa este spălată de patru ori cu 200μl PBST per godeu. Se adaugă 50μl de anticorpi anti-IgG umană-HRP (diluți la 1:4000 în 0,25% tampon de cazeină) și se incubează timp de 1 oră la temperatura camerei, după care placa este spălată cu 200μl PBST per godeu de 4 ori. Se adaugă 50μl de TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și se incubează la
- 10 temperatura camerei timp de aproximativ 10 minute. Reacția este oprită adăugând 50μl soluție de oprire (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) și este măsurat semnalul colorimetric la 450nm. Datele sunt introduse în programul Prism 6 (GraphPad) și sunt generate valorile EC<sub>50</sub> utilizând o potrivire la curba de regresie neliniară și răspunsul la doză sigmoidal. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3. Compararea EC<sub>50</sub> din legarea la fibrilele de tau purificate din AD

Anticorpul testat	EC <sub>50</sub> (pM)
mAb anti tau exemplificat din Exemplul 1	6,8
construct de Ab MC-1 umanizat	409,1

15

Așa cum s-a reflectat în Tabelul 3, anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din prezenta invenție demonstrează o afinitate îmbunătățită de 60 de ori (după cum s-a măsurat prin EC<sub>50</sub>) la fibrilele de tau purificate față de constructul de anticorp MC-1 umanizat.

- 20 Selectivitatea anticorpului monoclonal anti tau din Exemplul 1 pentru agregatele de tau versus monomerul tau este determinată prin ELISA directă. Urmând procedura ELISA în mod substanțial cum s-a prevăzut mai sus, tau recombinantă (rTau) este acoperită pe plăci cu 96 de godeuri la o concentrație corespunzătoare fie unei concentrații „ridicate” (1μg/mL) fie unei concentrații „joase” (15ng/mL). Concentrația ridicată de rTau, atunci când este acoperită pe plăcile cu micro-godeuri, agregă, simulând legarea la tau agregată. Concentrația joasă de rTau, atunci
- 25 când este acoperită pe plăcile cu micro-godeuri, simulează legarea la monomerul tau. Plăcile, acoperite cu concentrațiile ridicate sau scăzute de rTau, în mod respectiv, sunt expuse la anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 și legarea anticorpului monoclonal anti tau exemplificat la concentrațiile respective de rTau este măsurată substanțial cum s-a descris în
- 30 testele ELISA de mai sus. Rezultatele sunt furnizate în Tabelul 4.

Tabelul 4. Compararea EC<sub>50</sub> din legarea la concentrație „ridică” vs. „joasă” a rTau

Concentrația monomerului rTau	EC <sub>50</sub> (pM)
„Ridică” (1μg/mL)	6,0
„Joasă” (15ng/mL)	722,7

- 35 Așa cum s-a reflectat în Tabelul 4, anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 demonstrează o afinitate îmbunătățită de 120 de ori (după cum s-a măsurat prin EC<sub>50</sub>) anti tau agregată față de tau monomerică.

### Studii ale angajamentului țintei ex vivo

- 40 Legarea anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 la tau agregată derivată din creier uman este determinată prin colorarea imunohistochimică a secțiunilor de creier fixate în formalină și înglobate în parafină (FFPE) obținute de la: un individ „normal” (afișând agregare minimă a tau); un pacient cu AD (afișând o agregare severă a tau și formare de NFT, precum și patologie cu placă amiloidă); un pacient cu PD (afișând agregare severă a tau). Colorarea este de asemenea efectuată pe secțiuni de creier derivate de la un șoarece de „control”
- 45 cu tipul sălbatic care nu posedă tau umană pentru a determina nivelurile de colorare ne-specifică a fundalului.

- 50 Secțiunile FFPE sunt de-parafinate și rehidratate. Apoi, este efectuată recuperarea antigenului (utilizând sistemul modulului Lab Vision PT, Thermo Scientific) asupra secțiunilor care include încălzirea secțiunilor în tampon de citrat (Thermo Scientific, p/n. TA-250-PMIX) timp de 20 de minute la 100°C apoi răcirea secțiunilor în dH<sub>2</sub>O. Secțiunile sunt apoi expuse la următoarele șapte etape de incubare (la temp. camerei): (1) 10 min. în 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (2) 30 min. în diluție de 1:20 de ser normal de capră (Vector Labs., p/n. S-1000) diluat în PBST; (3) 60 min. în fie anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 fie construct de anticorp MC-1 umanizat (având combinația de cadru: 5-51 lanț greu, A27 lanț ușor) (atât anticorpul monoclonal

- anti tau exemplificat cât și constructul de anticorp MC-1 umanizat sunt normalizați până la 1mg/ml, apoi diluați în PBST la o diluție de 1:4000 înainte de incubare cu secțiunile); (4) 30 min. în anticorp de iepure anti-IgG4 umană (crescut împotriva regiunii Fc a anticorpului exemplificat) la o concentrație de 1,1 μg/ml în PBST; (5) 30 min. în diluție de 1:200 de anticorp biotinitat de capră anti-IgG de iepure (Vector Labs., p/n. BA-1000) diluat în PBST; (6) 30 min. în soluție de complex avidină-biotină (Vector Labs., p/n. PK-7100); (7) 5 min. în 3,3'-diamino-benzidină (Vector Labs., p/n. SK-4105). Secțiunile sunt spălate între fiecare dintre cele 7 etape de mai sus utilizând PBST. După cele șapte etape de incubare de mai sus, secțiunile sunt contracolorate cu hematoxină, deshidratate și acoperite. Pentru secțiunile de țesut de „control” de șoarece protocolul de mai sus este modificat la etapa de incubare (3) prin utilizarea unei diluții de 1:8000 (spre deosebire de o diluție de 1:4000) atât a anticorpului monoclonal anti tau exemplificat cât și a constructului de anticorp MC-1 umanizat; și prin înlocuirea etapelor de incubare (4) și (5) cu o singură diluție de 30 min. de 1:200 de anticorp biotinitat de capră anti-IgG umană (Vector Labs. p/n. BA-3000) în PBST.
- Urmând procedurile în mod substanțial cum s-a descris mai sus, este efectuată o analiză a legării anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 la tau derivată din creier uman. Rezultatele sunt furnizate în Tabelul 5.

**Tabelul 5. Analiza semi-cantitativă a legării la tau agregată din secțiunile FFPE de creier cu AD.**

	Severitatea tau agregată detectată după cum s-a măsurat prin schema de notare semi-cantitativă			
	(severă, +++; moderată, ++; ușoară, +; negativă, -)			
	WT de control (murină)	Normală de control (umană)	Boală Alzheimer	Boală Pick
mAb anti tau exemplificat din Exemplul 1	-	+	+++	+++
Construct de Ab MC-1 umanizat	-	-	+	+

- Rezultatele furnizate în Tabelul 5 reflectă că anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 demonstrează niveluri semnificativ mai ridicate de colorare la tau agregată, atât de la pacienții cu AD cât și cu PD, în secțiunile de creier hipocampice în comparație cu constructul de anticorp MC-1 umanizat. Rezultatele furnizate în Tabelul 5 demonstrează de asemenea că anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 nu demonstrează o legare ne-specifică mai ridicată decât constructul de anticorp MC-1 umanizat (anticorpul monoclonal anti tau exemplificat demonstrează legarea la cantitatea minimă de tau agregată din secțiunile umane normale de control). Suplimentar, deoarece AD și PD sunt caracterizate prin variante distincte de îmbinare ale genei care codifică tau, aceste rezultate susțin concluzia că anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 se leagă specific la epitopul conformațional cuprinzând resturile de aminoacizi 7-9 și 312-322 de tau umană (numerotare a resturilor bazată pe tau umană exemplificată din SEQ ID NO.13) comun agregatelor de tau atât din AD cât și din PD.

#### **Neutralizarea in vitro a propagării agregatelor de tau**

- Preparatele de creier omogenizat de la șoarecii P301S în vârstă de aprox. 5 luni sunt cunoscute, în prezența nativei, ne-agregate tau, că induc agregarea nativei tau și că demonstrează un efect asemănător propagării agregării tau. Preparatele omogenizate sarcozil-insolubile de țesut cerebral de la șoarecii P301S în vârstă de 4,5 până la 5 luni sunt sonicate și diluate cu OPTI-MEM (GIBCO de Life Tech., p/n. 31985-062) pentru a aduce tau măsurată (per preparat) la o concentrație finală de 0,77 μg/ml. Fiecare preparat este incubat timp de 30 de minute la temperatura camerei cu unul dintre anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 (la concentrațiile: 21,00, 7,00, 2,33, 0,78, 0,26, 0,09, 0,03, și 0,01μg/ml) sau constructul de anticorp MC-1 umanizat (la concentrațiile: 50,00, 16,67, 5,56, 1,85, 0,62, 0,21, 0,07, 0,02 și 0,01μg/ml).
- Celulele HEK293 (o linie celulară de rinichi embrionar uman) sunt transfectate prin electroporație pentru a exprima inductibil o formă mutantă de tau umană (1N4L, care are o serină substituită pentru prolina de la restul 301 (P301S) (numerotare a resturilor bazată pe tau umană exemplificată din SEQ ID NO.13)). (Falcon B., et al., J. Biol. Chem. 290:1049-1065, 2015). Celulele HEK293 transfectate stabil sunt placate la o concentrație de 1x10<sup>4</sup> celule/godeu în godeurile unei plăci cu 96 de godeuri în mediu complet (mediu D-MEM (Invitrogen, p/n. 11965-092), 10% ser fetal bovin (Invitrogen, p/n. 16000), 1x pen. strep (Invitrogen, p/n. 15140-122), 5μg/ml Blastacin (Invitrogen, p/n. R210-01), 200μg/ml Zeocin (Invitrogen, p/n. R250-01)). Plăcile

sunt incubate timp de trei zile la 37°C. După incubare, se adaugă 1 mg/ml tetraciclină la o diluție de 1:1000 per godeu (până la o concentrație finală de 1 μg tetraciclină/ml mediu) pentru a induce expresia de tau mutantă. Plăcile sunt apoi incubate timp de 24 de ore la 37°C. După incubare, mediul de cultură este îndepărtat și se adaugă 50μl de preparat omogenizat cu una dintre

5 respectivele concentrații ale unuia dintre anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 sau constructul de anticorp MC-1 umanizat (preparat cum s-a descris mai sus). Plăcile sunt incubate timp de trei ore, după care preparatul omogenizat este îndepărtat și se adaugă 100μl de mediu complet cu 1μg/ml tetraciclină și aceeași concentrație respectivă din fie anticorpul monoclonal anti tau exemplificat fie constructul de anticorp MC-1 umanizat la fiecare godeu

10 respectiv. Plăcile sunt incubate timp de 24 de ore la 37°C, după care mediul este îndepărtat și se adaugă 100μl de mediu complet și aceeași concentrație respectivă fie din anticorpul monoclonal anti tau exemplificat, fie din constructul de anticorp MC-1 umanizat la godeurile respective. Plăcile sunt incubate timp de 48 de ore la 37°C. După incubare, celulele sunt spălate cu 200μl DPBS și drenate.

15 Celulele sunt resuspendate în 50μl de tampon H (TBS pH7,4 conținând 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, inhibitor de protează și fosfatază (Thermo Scientific, p/n. 784420)) per godeu și sonicate în baie timp de 10 minute. Concentrația de proteină totală este măsurată prin Testul de proteină BCA™ (Thermo Scientific, p/n. PI-23227). Nivelurile agregatului de tau sunt determinate prin ELISA tip sandwich. Plăcile cu 96 de godeuri sunt acoperite peste noapte la 4°C cu 50μl de

20 2μg/ml anticorp AT8. Plăcile sunt spălate de trei ori cu PBST, apoi blocate cu 100μl de BB3 timp de 1 oră la temperatura camerei. Este preparată o curbă standard utilizând extractul total de creier cu AD prin diluție serială în 0,25% tampon de cazeină utilizând diluții de două ori de la o concentrație de pornire de 40 μg/ml până la o concentrație finală de 0,3125 μg/ml. Lizatele celulare sunt diluate în 0,25% tampon de cazeină la o concentrație a proteinei totale de

25 aproximativ 0,1 mg/ml. 50 ul din fiecare diluție a mostrei standard sau din mostrele celulare diluate sunt apoi adăugați în godeuri separate de plăci blocate și incubate la 4°C peste noapte, după care plăcile sunt spălate de patru ori cu PBST. Anticorpul CP27 biotinitat este diluat la 1:2000 în 0,25% tampon de cazeină și apoi sunt adăugați 50μl în godeurile conținând mostrele. Plăcile sunt incubate la temperatura camerei timp de 2 ore, după care plăcile sunt spălate de patru ori cu PBST.

30 Streptavidin-HRP (Invitrogen, p/n. SNN2004) este diluată la 1:5000 în 0,25% tampon de cazeină și apoi sunt adăugați 50μl în fiecare godeu și plăcile sunt incubate la temperatura camerei timp de 1 oră. După incubare, plăcile sunt spălate de 4 ori cu PBST și se adaugă 50μl dintr-un amestec de 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> și TMB (Thermo Scientific, p/n. 34021). Plăcile sunt incubate la temperatura camerei timp de 10 min. și reacția este oprită prin adăugarea de 50μl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este măsurat semnalul

35 colorimetric la 450nm sau 650nm. Nivelurile de tau pozitivă la AT8 sunt normalizate față de nivelurile de proteină totală din fiecare mostră. Valorile normalizate pentru fiecare mostră sunt normalizate suplimentar față de nivelurile de tau pozitivă la AT8 din mostrele de control (netratate cu anticorp). Procentajul de inhibare a propagării agregatului de tau în fiecare mostră este determinat scăzând valorile normalizate suplimentar din 100 și procentajul valorii de inhibare

40 pentru fiecare mostră este introdus în programul Prism 6 Software (GraphPad) aplicând potrivirea la curba de regresie neliniară și răspunsul la doză sigmoidal pentru generarea valorilor EC<sub>50</sub>. Rezultatele sunt furnizate în Tabelul 6.

Tabelul 6. Valorile EC<sub>50</sub> reprezentând inhibarea propagării agregatului de tau.

	Ab anti tau exemplificat obținut prin inginerie din Exemplul 1	Constructul de Ab MC-1 umanizat
EC <sub>50</sub> (reprezentând inhibarea propagării agregatului de tau pozitivă la AT8 (ng/mL))	16	476

45

Rezultatele furnizate în Tabelul 6 reflectă că anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 demonstrează o îmbunătățire de aproximativ 30 de ori în inhibarea propagării induse a agregatului de tau.

#### 50 Neutralizarea in vivo a propagării agregatelor de tau

Preparatele stem de creier omogenizat de la șoarecii P301S în vârstă de aprox. 5 luni sunt cunoscute că, după injectare în hipocampusul șoarecilor P301S normali femele în vârstă de 10 săptămâni, induce agregarea nativei, ne-agregate tau, demonstrând un efect asemănător propagării

55 agregării tau. Preparatele omogenizate de țesut stem din creier de la șoarecii P301S în vârstă de 4,5 până la 5 luni sunt preparate substanțial la fel cum s-a descris mai sus.

5 Șoarecii P301S normali în vârstă de 10 săptămâni femele sunt injectați în emisfera stângă a hipocampusului cu 5μl de preparat din creier omogenizat și oricare dintre: 7,5μg de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 (N=12); sau 7,5μg anticorp IgG4 uman de control (N=11). La patru săptămâni după injecție, șoarecii sunt sacrificați și emisferile stângă și dreaptă sunt colectate, înglobate în parafină, și sunt montate secțiuni seriale de 6μm pe lame din sticlă. Lamele conținând bregma (A-P = -2,30) sunt de-parafinate, este rehidratat țesutul înglobat, și este efectuată recuperarea antigenului prin încălzirea lamei până la 100°C timp de 20 min. în tampon de citrat. Lamele sunt răcite în dH<sub>2</sub>O și incubate la temperatura camerei în conformitate cu următoarele etape: (a) 10 min. în (0,03%) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (b) 30 min. într-o diluție de 1:20 de ser normal de capră; (c) 60 min. într-o diluție de 1:8000 de anticorp PG-5 (diluât în PBST)(anticorp PG-5 obținut de la lab lui Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine din Yeshiva University; anticorpul PG-5 leagă specific serina la restul 409 de tau când este fosforilată, numerotare a resturilor bazată pe tau umană exemplificată din SEQ ID NO.13); (d) 30 min. într-o diluție de 1:200 de anticorp biotinat de capră anti-IgG de șoarece (diluât în PBST); (e) 30 min. în soluție a complexului avidină-biotină; și (f) 5 min. în 3,3'-diaminobenzidină. PBST este utilizat pentru spălarea între etapele respective. După incubarea de 5 min. în 3,3'-diaminobenzidină, secțiunile sunt contracolorate cu hematoxilină, apoi rehidratate și acoperite. Semnalul colorării este măsurat prin Scanscope LA Slide Scanner (Aperio) la o mărire de 20x. Imunoreactivitatea PG-5 este cuantificată și exprimată ca procentaj utilizând algoritmul de pixeli pozitivi din Imagescope Software (v. 11.1.2.780, Aperio). Rezultatele sunt furnizate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Media % de imunoreactivitate a PG-5 în hipocampusul stâng și drept, în mod respectiv.

	(% de imunoreactivitate a PG-5)	
	Hipocampus stang	Hipocampus drept
<b>mAb anti tau exemplificat din Exemplul 1</b>	2,52 ± 0,49 SEM	0,63 ± 0,13 SEM
<b>Ab IgG4 de control</b>	6,38 ± 0,93 SEM	1,88 ± 0,31 SEM

25 Rezultatele furnizate în Tabelul 7 demonstrează că anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 reduce nivelul agregatului de tau atât în hipocampusul stâng cât și drept în comparație cu anticorpul IgG4 de control. Așa cum se arată, anticorpul monoclonal anti tau exemplificat produce o reducere mai mare cu 60,5% a agregării tau în hipocampusul stâng, și o reducere mai mare cu 66,5% a agregării tau în hipocampusul drept, în mod respectiv, în comparație cu anticorpul IgG4 de control. Aceste rezultate demonstrează că anticorpul monoclonal anti tau exemplificat posedă activitate de neutralizare împotriva propagării agregării tau.

#### **Analiza eficacității in vivo la modelul murin de Tg4510**

35 Șoarecii Tg4510 transgenici exprimă o formă mutantă de tau umană (4R0N, care are o leucină substituită pentru prolină la restul 301 (P301L), Ramsden M., et al., J. Neuroscience., 25: 10637-10647 (2005) și Santacruz K., et al., Science (2005); numerotare a resturilor bazată pe tau umană exemplificată din SEQ ID NO.13). Șoarecii Tg4510 prezintă niveluri ridicate de expresie a tau umane mutante P301L în regiunile hipocampusului și neocortexului, care demonstrează progresul dependent de vârstă al agregării tau.

40 Anticorpul anti tau din prezenta invenție pot induce un răspuns imunogen la șoarecii Tg4510. Prin urmare, pentru a testa potențialul trapeutic al anticorpilor monoclonali anti tau din prezenta invenție pentru administrarea cronică la un model la rozător, un anticorp anti tau murină surogat este construit ținând același epitop conformațional și reflectând niveluri similare de afinitate îmbunătățită față de anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1. 45 Anticorpul anti tau surogat are o afinitate (EC<sub>50</sub>) către fibrilele de tau purificate din AD, măsurată prin ELISA cum s-a descris mai sus (pentru anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1), ca fiind de 13,1 pM.

50 Șoarecii Tg4510 femele în vârstă de opt săptămâni sunt grupați în 3 grupuri separate. Primul grup (N=15) este injectat cu un anticorp IgG1 de șoarece de control (15mg/kg) de două ori pe săptămână timp de 9 săptămâni. Al doilea grup (N=15) este injectat de două ori pe săptămână timp de 9 săptămâni cu anticorp MC-1 recombinant (15mg/kg) produs din ascită de șoarece injectat cu hibridom de MC-1. Al treilea grup (N=15) este injectat cu anticorp anti tau murină surogat (15mg/kg) de două ori pe săptămână timp de 9 săptămâni. După administrarea finală, șoarecii sunt sacrificați și creierele lor colectate. Sunt colectate porțiuni de cortex și secțiuni din hipocampus, sunt înglobate în parafină, și sunt montate secțiuni seriale de 6μm pe lame din sticlă 55 pentru utilizare imunohistochimică.

Restul regiunii de cortex din creierul colectat este omogenizat prin sonicare cu puls într-un volum de tampon H de 10 ori mai mare decât volumul cortexului, centrifugat la 21.000g timp de 20 min. la 4°C și o alicotă de supernatant din fiecare cortex este colectată și sunt determinate nivelurile de proteină totală prin Testul de proteină BCA™ (Thermo Scientific, p/n. PI-23227) în conformitate cu protocolul fabricantului. Restul de supernatant este centrifugat la 100.000g timp de 1 oră la 4°C, este eliminat supernatantul, și peletul insolubil obținut este resuspendat în tampon H (într-un volum ½ din volumul de supernatant eliminat). Peletul resuspendat este sonicat și nivelurile agregatului de tau pozitivă la AT8 din fiecare pelet sunt determinate prin ELISA utilizând anticorpul de captură AT8 și anticorpul de detecție CP27 substanțial cum s-a descris mai sus. Nivelurile agregatului de tau pozitivă la AT8 sunt normalizate față de nivelurile de proteină totală.

În mod similar, restul de hipocampus din creierul colectat este omogenizat prin sonicare cu puls într-un volum de tampon H de 10 ori mai mare decât volumul hipocampusului, este centrifugat la 21.000g timp de 20 min. la 4°C, și este colectat supernatantul de la fiecare hipocampus și sunt determinate nivelurile de proteină totală. Nivelurile agregatului de tau pozitivă la AT8 din supernatant sunt determinate prin ELISA utilizând anticorpul de captură AT8 și anticorpul de detecție CP27 substanțial cum s-a descris mai sus. Nivelurile agregatului de tau pozitivă la AT8 sunt normalizate față de nivelurile de proteină totală. Rezultatele sunt furnizate în Tabelul 8.

Tabelul 8. Nivelurile agregatului de tau pozitivă la AT8 din omogenatul de creier din cortex și hipocampus măsurate prin ELISA.

	Nivelul agregatului de tau pozitivă la AT8 (μg/mg)	
	Cortex	Hipocampus
Ab anti tau murină surogat	1416 ± 195 SEM	386 ± 71 SEM
Ab mIgG1 de control	1872 ± 198 SEM	591 ± 66 SEM
Ab mIgG1 rMC-1	1703 ± 138 SEM	510 ± 62 SEM

Rezultatele furnizate în Tabelul 8 demonstrează că anticorpul anti tau murină surogat a redus nivelurile agregatului de tau atât în cortex cât și în hipocampus cu 24% și 35%, în mod respectiv, față de șoarecii tratați cu mIgG1 de control. Rezultatele arată suplimentar că șoarecii tratați cu anticorp MC-1 murin recombinant nu au prezentat o reducere îmbunătățită a nivelurilor de agregat de tau față de șoarecii tratați cu mIgG1 de control.

Nivelul de agregare al tau în cortexul și hipocampusul din secțiunile înglobate în parafină preparate din creierul colectat este de asemenea măsurat prin imunohistochimie utilizând PG-5 substanțial cum s-a descris mai sus. Datele sunt normalizate prin conversie la valorile log<sub>10</sub> și rezultatele sunt rezumate în Tabelul 9.

Tabelul 9. Valoarea medie log<sub>10</sub> a % de imunoreactivitate a PG-5 în cortex și hipocampus.

	Agregat de tau (valoarea medie log <sub>10</sub> a % de imunoreactivitate a PG-5)	
	Cortex	Hipocampus
Ab anti tau murină surogat	0,74 ± 0,06	0,26 ± 0,07
Ab mIgG1 de control	0,90 ± 0,05	0,46 ± 0,05
Ab mIgG1 de rMC-1	0,83 ± 0,04	0,34 ± 0,06

Rezultatele furnizate în Tabelul 9 demonstrează că anticorpul anti tau murină surogat reduce nivelul agregatului de tau atât în cortex (cu 18%) cât și în hipocampus (cu 43%) față de anticorpul mIgG1 de control în timp ce anticorpul MC-1 murin recombinant nu a demonstrat o reducere notabilă a nivelului agregatului de tau din fie cortex fie hipocampus față de anticorpul mIgG1 de control.

#### Proprietățile fizico-chimice ale anticorpului monoclonal anti tau obținut prin inginerie

Anticorpul monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 demonstrează o bună solubilitate, stabilitate chimică, și stabilitate fizică.

#### **Solubilitatea:**

Este dorită o solubilitate suficient de ridicată pentru a permite o dozare convenabilă. De exemplu, o doză de 1 mg/kg administrată printr-o injecție de 1,0 mL la un pacient de 100 kg va necesita solubilitatea de 100mg/ml. În plus, menținerea anticorpului în stare monomerică fără agregare de masă moleculară mare (HMW) la concentrație ridicată este de asemenea dezirabilă. Solubilitatea anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 este analizată concentrând 15mg din anticorpus exemplificat cu un filtru de reducere a masei moleculare de 10 K (filtre Amicon U.C., Millipore, catalog # UFC903024) până la un volum de mai puțin de 100μl. Concentrația finală a mostrei a fost măsurată prin absorbantă cu UV la A280 utilizând un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Urmând procedurile substanțial cum s-a descris mai sus, anticorpus monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 afișează o solubilitate mai mare de: 140 mg/ml (la pH 6 în 10 mM tampon de citrat); 177 mg/ml (la pH 6 în 10 mM citrat cu 150 mM NaCl); și 170 mg/ml (la pH 7,4 în tampon PBS). În plus, numai niveluri joase de HMW (de la ~3 până la ~5,4%) sunt prezente la concentrație ridicată și nu este observată o separare a fazelor.

#### Stabilitatea chimică și fizică:

Stabilitatea chimică facilitează dezvoltarea de formulări medicamentoase cu suficientă durată de valabilitate. Stabilitatea chimică a anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 este evaluată prin formularea anticorpului anti tau exemplificat la o concentrație de 1 mg/ml în 10mM citrat și pH tamponat de 4, 5, 6, sau 7. Mostrele formulate sunt incubate timp de patru săptămâni la 4°C, 25°C, sau 40°C într-un studiu de degradare accelerată. Modificările în profilul de sarcină al anticorpului, reflectând modificările chimice, sunt evaluate utilizând focalizarea izoelectrică capilară (cIEF) în conformitate cu procedurile standard.

Urmând procedurile substanțial cum s-a descris mai sus, anticorpus monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 demonstrează rezultatele de stabilitate chimică prezentate în Tabelul 10.

Tabelul 10. Rezumatul modificării în % vârfului principal peste patru săptămâni, față de mostrele incubate la 4°C, măsurat prin cIEF și % agregatelor HMW măsurat prin SEC.

pH	Modificare în % varfului principal după 4 săptămâni (față de 4°C) 25°C	Modificare în % agregatelor HMW (față de 4°C) 25°C	Modificare în % agregatelor HMW (față de 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

Rezultatele furnizate în Tabelul 10 demonstrează că după 4 săptămâni de depozitare la 40°C, anticorpus anti tau exemplificat din Exemplul 1 are o scădere a procentajului vârfului principal de numai 1,1 puncte procentuale atunci când este formulat la pH5, și o scădere de numai 0,3 puncte procentuale atunci când este formulat la pH6 (un pH comun utilizat în formularea anticorpilor). În plus, analiza prin spectrometrie de masă demonstrează doar o degradare minimă observată după o depozitare de 4 săptămâni la 40°C (~1,5% deamidare a LCDR1 cu mai puțin de 5% degradare în toate secvențele CDR), care arată că anticorpus monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 are suficientă stabilitate chimică pentru a facilita dezvoltarea formulărilor de soluție cu durată de valabilitate adecvată.

Pentru scopul comparării, este desfășurată stabilitatea chimică și fizică a unui construct de anticorpus MC-1 umanizat (având combinația de cadru: 5-51 lanț greu, A27 lanț ușor) prin incubarea anticorpului timp de 2 săptămâni la 40°C la pH8. Constructul de anticorpus MC-1 umanizat a prezentat o degradare chimică semnificativă incluzând 12% deamidare a LCDR1, 5% deamidare și 10% izomerizare a HCDR3 și 3% oxidare a cadrului HC.

Afinitatea de legare, după un studiu de patru săptămâni de degradare accelerată a anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1, este evaluată prin formularea anticorpului monoclonal exemplificat la o concentrație de 1 mg/ml în 10mM citrat și pH tamponat de 4 sau 6. Mostrele formulate sunt incubate timp de patru săptămâni la 4°C sau 40°C într-un studiu de degradare accelerată. După incubare, afinitatea de legare a anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 la rTau (15 ng/ml) acoperită pe plăcile cu 96 de godeuri este determinată prin ELISA directă după procedura ELISA în mod substanțial cum s-a descris mai sus.

Rezultatele studiului afinității de legare descris mai sus, efectuat în duplicat, sunt furnizate în Tabelul 11.

Tabelul 11. Compararea EC<sub>50</sub> după un studiu de degradare accelerată.

5

pH-ul formulării	Temp. de incubare (°C)	EC (pM) Studiul 1	EC <sub>50</sub> (pM) Studiul 2
4	40	414	277
6	4	926	636
6	40	754	667

Tabelul 11 demonstrează că afinitatea de legare a anticorpului monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1 la concentrații scăzute de rTau a rămas similară pentru mostre după o degradare accelerată de patru săptămâni, în comparație cu mostrele de control incubate la 4°C.

10

### Secvențe

#### SEQ ID NO: 1 - LC de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLVHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRF

SGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV

FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL

15

SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

#### SEQ ID NO: 2 - HC de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLTKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWGMGEILPGSDSIKY

EKNFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYVCARRGNYVDDWGQGTTLVTVSSASTK

GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP

PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS

LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

#### SEQ ID NO: 3 - LCDR1 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

RSSQSLVHSNQNTYLH

20

#### SEQ ID NO: 4 - LCDR2 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

YKVDNRFS

#### SEQ ID NO: 5 - LCDR3 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

SQSTLVPLT

25

#### SEQ ID NO: 6 - HCDR1 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

KGSGYTFSNYWIE

#### SEQ ID NO: 7 - HCDR2 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

EILPGSDSIKYEKNFKG

#### SEQ ID NO: 8 - HCDR3 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

ARRGNYVDD

30

#### SEQ ID NO: 9 - LCVR de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRSSQSLVHSNQNTYLVHWYQQKPGQAPRLLIYKVDNRF

SGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCSQSTLVPLTFGGGTKVEIK

#### SEQ ID NO: 10 - HCVR de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

EVQLVQSGAEVKKPGESLTKISCKGSGYTFSNYWIEWVRQMPGKGLEWGMGEILPGSDSIKY

EKNFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYVCARRGNYVDDWGQGTTLVTVSS

**SEQ ID NO: 11 - Secvență de nucleotide care codifică LC exemplificat (SEQ ID NO:1)**

gaaattgtgttgacgcagctctccagggaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc  
ctctoctgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatcagaacacctatttacattgg  
taccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctataaagttgacaaccgattt  
tctggcatcccagacaggttcagtggaagtggtctgggacagacttcactctcaccatc  
agcagactggagcctgaagatthttgcagtgattactgttctcaaagtacactgggtccg  
ctcacgttcggcggaggaccaaggtggagatcaaacggaccgtggctgcaccatctgtc  
ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctg  
ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa  
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctc  
agcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaa  
gtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgctc

**SEQ ID NO: 12 - Secvență de nucleotide care codifică HC exemplificat (SEQ ID NO: 2)**

gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccggggagtctctgaagatc  
tctgttaaggttctggctacacattcagtaactactggatagagtgggtgcgccagatg  
cccgggaaaggcctggagtggatgggggagattttacctggaagtgatagattaagtac  
gaaaagaatttcaagggccaggtcaccatctcagccgacaagtcacatcagcaccgctac  
ctgcagtgagcagcctgaaggcctcggacaccgccatgtattactgtgcgagaaggggg  
aaactacgtggacgactggggccagggcaccctggtcacctctcctcagcttctaccaag  
ggcccatcggctcttcccgtagcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagccgcc  
ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctggtggaactcaggc  
gcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactcc  
ctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaac  
gtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcctaaatatggtccc  
ccatgcccaccctgccagcacctgagggcccgggggaccatcagctcttctcttcccc  
ccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgogtggtggtg  
gacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtg  
cataatgccaaagacaaagccgaggaggagcagttcaacagcacgtaaccgtgtggtcagc  
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaaacggcaaggagtacaagtgcaaggctctcc  
aaciaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga  
gagccacaggtgtacacctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagc  
ctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggaaagcaat  
gggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttc  
5 ttcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaaatgtcttctca  
tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtct  
ctgggt

**SEQ ID NO: 13 - Secvență de aminoacizi a tau umană, cu lungime completă**

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKE SFLQTP TEDGSEEPG  
SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG  
HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPK  
TPPSSGEPFKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK  
SRLQTAPVPMDDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV  
PGGGSVQIVYKPVDSLKVT SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNI  
THVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTS PRHLSNV SSTGSIDMV  
DSPQLATLADEV SASLAKQGL

**LISTĂ DE SECVENȚE**

5

<110> ELI LILLY ȘI COMPANIA

<120> ANTICORPI ANTI TAU ȘI UTILIZĂRI ALE ACESTORA

<130> X20624

10 <150> US 62/121.116

<151> 2015-02-26

<160> 13

<170> Patentin versiune 3.5

<210> 1

15 <211> 219

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> LC de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

<400>

```

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
          115          120          125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130           135           140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145           150           155           160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          165          170          175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
          180          185          190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          195          200          205
    
```

```

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210           215
    
```

- 5 <210> 2
- <211> 442
- <212> PRT
- <213> Secvență artificială
- <220>
- 10 <223> HC de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

20

<400>

2

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
130 135 140

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

21

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr  
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro  
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
385 390 395 400

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

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

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

<210> 3

5 <211> 16

<212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> LCDR1 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400> 3  
 5 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His  
 1 5 10 15  
 <210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 10 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> LCDR2 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400> 4  
 Tyr Lys Val Asp Asn Arg Phe Ser  
 1 5  
 15 <210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 20 <223> LCDR3 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400> 5  
 Ser Gln Ser Thr Leu Val Pro Leu Thr  
 1 5  
 <210> 6  
 <211> 13  
 25 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> HCDR1 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400>  
 Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Glu  
 1 5 10  
 30 <210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 35 <223> HCDR2 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400> 7  
 Glu Ile Leu Pro Gly Ser Asp Ser Ile Lys Tyr Glu Lys Asn Phe Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gly  
 <210> 8  
 40 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> HCDR3 de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400> 8  
 Ala Arg Arg Gly Asn Tyr Val Asp Asp  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 50 <213> Secvență artificială  
 <220>  
 <223> LCVR de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1  
 <400> 9

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

23

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

<210> 10

5 <211> 116

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> HCVR de anticorp monoclonal anti tau exemplificat din Exemplul 1

10 <400> 10

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 11

<211> 657

<212> ADN

15 <213> Secvență artificială

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

24

<220>  
<223> Secvență de nucleotide care codifică LC exemplificat (SEQ ID NO:1)  
<400> 11  
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
ctctcctgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatc agaacaccta tttacattgg 120  
taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctccctcatct ataaagttga caaccgattt 180  
tctggcatcc cagacaggtt cagtggcagt gggctcggga cagacttcac tctcaccatc 240  
agcagactgg agcctgaaga ttttgcaagt tattactggt ctcaaagtac actggttccg 300  
ctcacgttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgga ccgtggctgc accatctgtc 360  
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420  
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480  
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540  
agcagcacc c tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600  
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgc 657  
<210> 12  
5 <211> 1326  
<212> ADN  
<213> Secvență artificială  
<220>  
<223> Secvență de nucleotide care codifică HC exemplificat (SEQ ID NO: 2)  
10 <400> 12

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

25

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
tctctgtaagg gttctgggcta cacattcagt aactactgga tagagtgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggag attttacctg gaagtgatag tattaagtac	180
gaaaagaatt tcaagggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagaaggggg	300
aactacgtgg acgactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctcagc ttctaccaag	360
ggcccacatgg tcttcccgtc agcggcctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc	420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgctgtg gaactcaggc	480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac	600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagagag ttgagtcaa atatggtccc	660
ccatgcccac cctgcccagc acctgaggcc gccgggggac catcagtctt cctgttcccc	720
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg	780
gacgtgagcc aggaagaccc cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggtg	840
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	900
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	960
aacaaaggcc tcccgctctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1020
gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc	1080
ctgacctgcc tgggtcaaag cttctacccc agcgcacatc ccgaggagtg ggaaagcaat	1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc	1200
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca	1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct	1320
ctgggt	1326
<210> 13	
<211> 441	
5 <212> PRT	
<213> Secvență artificială	
<220>	
<223> Secvență de aminoacizi a tau umană, cu lungime completă	
<400> 13	

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

26

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

# MD/EP 3261720 T2 2019.12.31

27

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro  
 145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro  
 165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly  
 180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser  
 195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys  
 210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
 225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val  
 245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly  
 260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln  
 275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly  
 290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser  
 305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln  
 325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser  
 340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn  
 355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala  
 370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser  
 405 410 415

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 435 440

**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- D. L. CASTILLO-CARRANZA ET AL: "Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 34, no. 12, 19 March 2014 (2014-03-19), pages 4260-4272, XP055250997, US ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3192-13.2014
- WO-A2-2012/149365
- D. L. CASTILLO-CARRANZA ET AL: "Tau Immunotherapy Modulates Both Pathological Tau and Upstream Amyloid Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 35, no. 12, 25 March 2015 (2015-03-25), pages 4857-4868, XP055250966, US ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4989-14.2015
- WO-A2-2014/059442
- WO-A2-2014/100600

**(57) Revendicări:**

1. Un anticorp monoclonal care se leagă la tau umană cuprinzând o regiune variabilă a lanțului ușor (LCVR) și o regiune variabilă a lanțului greu (HCVR), în care secvența de aminoacizi a LCVR este dată de SEQ ID NO: 9 și secvența de aminoacizi a HCVR este dată de SEQ ID NO: 10.

2. Anticorpul monoclonal conform revendicării 1, cuprinzând un lanț ușor (LC) și un lanț greu (HC), în care secvența de aminoacizi a LC este dată de SEQ ID NO: 1 și secvența de aminoacizi a HC este dată de SEQ ID NO: 2.

3. O moleculă de ADN cuprinzând o secvență polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1, și cuprinzând o secvență polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 2.

4. O moleculă de ADN în conformitate cu revendicarea 3 în care secvența polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 1 este dată de SEQ ID NO: 11 și secvența polinucleotidică care codifică o polipeptidă având secvența de aminoacizi din SEQ ID NO: 2 este dată de SEQ ID NO: 12.

5. O celulă de mamifer cuprinzând molecula de ADN conform revendicării 3 sau revendicării 4, în care celula este capabilă să exprime un anticorp monoclonal cuprinzând un lanț ușor având o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 1 și un lanț greu având o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 2.

6. Un procedeu pentru producerea unui anticorp monoclonal cuprinzând un lanț ușor având o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 1 și un lanț greu având o secvență de aminoacizi din SEQ ID NO: 2, procedeul cuprinzând cultivarea celulei de mamifer conform revendicării 5 în astfel de condiții încât să fie exprimat anticorpul monoclonal, și recuperarea anticorpului monoclonal exprimat.

7. O compoziție farmaceutică cuprinzând un anticorp monoclonal din oricare dintre revendicarea 1 sau revendicarea 2 și unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți acceptabili farmaceutic.

8. Un anticorp monoclonal conform revendicării 1 sau revendicării 2 pentru utilizare în terapie.

9. Un anticorp monoclonal conform revendicării 1 sau revendicării 2 pentru utilizare în tratamentul unei boli selectate dintre boala Alzheimer, Paralizia supranucleară progresivă și boala Pick.