

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 686**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2011 E 11773704 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2625198**

54 Título: **Anticuerpos que reconocen fosfo-Tau**

30 Prioridad:

15.07.2011 EP 11174248

07.10.2010 EP 10186810

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

20.10.2015

73 Titular/es:

AC IMMUNE S.A. (50.0%)

EPFL Innovation Park, Building B

1015 Lausanne, CH y

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)

72 Inventor/es:

PFEIFER, ANDREA;

MUHS, ANDREAS;

VAN LEUVEN, FRED;

PIHLGREN, MARIA y

ADOLFSSON, OSKAR

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 548 686 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 que reconocen fosfo-Tau

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo o parte funcional de éste que se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos como se define en la reivindicación 1. La invención se refiere además a aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico de dicho anticuerpo o parte funcional.

10 Los ovillos neurofibrilares y fibrillas de neuropilema (NT) son los distintivos neuropatológicos principales de la Enfermedad de Alzheimer (AD). Están compuestos por la proteína asociada a microtúbulos tau que ha experimentado modificaciones posteriores a la traducción, incluyendo fosforilación, desamidación e isomerización en residuos de asparaginilo o aspartilo. Se originan por la agregación de proteína tau hiper-fosforilada y sus

15 confórmeros. AD comparte esta patología con muchas tauopatías neurodegenerativas, en particular con tipos especificados de demencia frontotemporal (FTD).
La proteína Tau es una proteína fácilmente soluble, "naturalmente no plegada" que se une con avidez a los microtúbulos (MT) para estimular su ensamblaje y estabilidad. Los MT tienen una gran importancia para la integridad del citoesqueleto de las neuronas - y de esta manera para la formación y funcionamiento apropiados de los circuitos

20 neuronales, por lo tanto para el aprendizaje y la memoria. La unión de tau a MT está controlada por fosforilación y desfosforilación dinámicas, como se demuestra principalmente in vitro y en células no neuronales. Debido al gran número de sitios de fosforilación posibles (>80), la contribución exacta de cada uno y la identidad de las quinasas responsables permanece en gran medida sin identificar in vivo.
En el cerebro de AD, la patología tau se desarrolla después de, y por lo tanto probablemente en respuesta a, la patología amiloide, lo que constituye la esencia de la hipótesis de la cascada amiloide. Esto se basa en y está

25 indicado por estudios en pacientes con AD y síndrome de Down, y está corroborado por estudios en ratones transgénicos con patología amiloide y tau combinada (Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muyliaert et al, 2006; 2008; Terwel et al, 2008).
El esquema de tiempo exacto de ambas patologías en los pacientes humanos con AD así como los mecanismos que ligan la patología amiloide a tau permanecen en gran medida desconocidos, pero se propone que implican la activación de rutas de señalización neuronales que actúan en o por GSK3 y cdk5 como las "quinasas tau" principales (revisado por Muyliaert et al, 2006, 2008).

La hipótesis de que la tauopatía no es un efecto secundario inocente sino un ejecutor patológico principal en AD se basa en observaciones genéticas, patológicas y experimentales sólidas que se corroboran entre sí completamente:

- 30 • en casos de AD familiar de inicio temprano que se deben a mutaciones en el precursor de la proteína amiloide (APP) o presenilina, la causa patogénica obligada es la acumulación amiloide, pero invariablemente la patología comprende tauopatía colateral, idéntica a la de los casos de AD esporádica de inicio tardío;
- la gravedad de la disfunción cognitiva y la demencia se correlaciona con tauopatía, no con patología amiloide, ejemplificado lo más recientemente por varios estudios de fase clínica -1 y 2 que incluyen formación de
- 35 imágenes PIB-PET para amiloide e identifican muchos "falsos positivos": individuos normales cognitivamente con alta carga amiloide cerebral;
- en FTD familiar, la tauopatía está provocada por tau mutante y causa neurodegeneración directamente, sin patología amiloide;
- en modelos experimentales en ratón, los defectos cognitivos causados por patología amiloide se alivian
- 40 casi completamente por la ausencia de proteína tau (Roberson et al, 2007).

Los argumentos combinados apoyan la hipótesis de que la proteína tau es un jugador principal en la muerte cognitiva en AD y tauopatías neurodegenerativas relacionadas.

Un tratamiento emergente prominente de AD es por inmunoterapia pasiva con mAb específicos, para aclarar los péptidos amiloides y sus agregados que se presume son neuro-tóxicos o sinapto-tóxicos.

45 La inmunoterapia dirigida a la patología tau, como se propone aquí, se anticipa que contrarresta los confórmeros de la proteína tau patológicos que se sabe o se postula que causan disfunción sináptica y neurodegeneración. La patología amiloide causada y los agregados intra-neuronales de proteína tau hiper-fosforilada se propone que actúan sinérgicamente en la cascada cognitiva y degenerativa de eventos patológicos que dan lugar de alteración cognitiva suave (MCI) a demencia grave de AD. La combinación de la medicación dirigida a tau con medicación

50 dirigida a amiloide (o cualquier otra) constituirá por lo tanto el tratamiento preferido y, sustancialmente más eficaz, de AD, en lugar de la mono-terapia actual.
Otras estrategias terapéuticas que están dirigidas a la proteína tau son escasas y principalmente comprenden:

- inhibidores de las quinasas que se piensa incrementan la fosforilación de tau hasta niveles patológicos
- compuestos que bloquean la agregación citoplásmica de proteína tau hiper-fosforilada.

Estas estrategias presentan varios inconvenientes de especificidad y eficacia, un problema que comparten con intentos de modificar el metabolismo de APP y amiloide, todos enfatizando la importancia de una búsqueda continua de opciones de tratamiento adicionales, incluyendo inmunoterapia frente a tau.

En la práctica no se han desarrollado esfuerzos para definir - mucho menos dirigir - los confórmeros patológicos de tau in vivo. En el estudio clínico de fase II A β 42, la patología de ovillo no parecía estar bien considerada ni analizada con mucha profundidad (Nicoll et al., 2003; Masliah et al., 2005). Por otra parte, la inmunoterapia experimental dirigida a amiloide en un modelo preclínico de ratón con patología semejante a AD combinada demostró también un efecto en la patología tau aunque los agregados de tau persistieron (Oddo et al., 2004).

Jicha et al (J Neuroscience, 1999, 19(17): 7486-7494) describe anticuerpo monoclonal PG-5, que reconoce la fosforilación dependiente de PKA de ser409 en tau. Por análisis inmunohistoquímico, se mostró que el anticuerpo PG-5 reaccionaba con la patología neurofibrilar tanto en la enfermedad de Alzheimer temprana como avanzada, pero no en tejido cerebral normal.

Se han lanzado algunas dudas sobre la factibilidad de abordar la proteína tau intra-celular por inmunoterapia. Éstas se han contrarrestado por el estudio experimental más reciente en un modelo de tauopatía en ratón (Asuni et al., 2007). Mostraron la reducción en la patología de ovillos y mejoras funcionales por la vacunación con un fosfo-péptido derivado de la proteína tau. Estos datos corroboran reportes previos de inmunoterapia dirigida a α -sinucleína en modelos de la Enfermedad de Parkinson (PD) y enfermedad de los cuerpos de Lewy (Masliah et al., 2005, 2011) y de superóxido dismutasa en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Urushitani et al., 2007). Estas enfermedades son ejemplos en los que las proteínas intra-celulares dan lugar a defectos sinápticos y neurodegeneración mediante mecanismos que todavía no se comprenden totalmente. Por otra parte, la proteína tau recombinante de longitud completa producida en y aislada de bacterias no parece adecuada como vacuna, aunque los adyuvantes usados, es decir, Freund's completo y toxina pertussis, podrían haber contribuido al resultado negativo de ese estudio Rosenmann et al., 2006).

Existe una necesidad no cubierta de inmunoterapias pasivas y/o activas que funcionen para contrarrestar los confórmeros de la proteína patológicos que se sabe - o se presume - que causan trastornos neurodegenerativos, tales como patología amiloide en AD causada, por ejemplo, por agregados intra-neuronales de proteína tau hiper-fosforilada que son tan típicos para AD como amiloide.

Esta necesidad no cubierta podría lograrse en el alcance de la presente invención proporcionando proteínas de unión que reconocen y se unen a fosfo-epítomos patológicos importantes de la proteína tau. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos específicos frente a fosfo-epítomos en la proteína tau lineales y conformacionales, simples y complejos, particularmente en la proteína tau agregada que se cree que son responsables de la sinapto- y neuro-toxicidad en las tauopatías, incluyendo AD.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere en una primera realización a un anticuerpo o parte funcional de éste que se une específicamente a un fosfo-epítomo en una proteína Tau de mamíferos, en el que dicho anticuerpo o parte funcional de éste tiene una alta afinidad de unión para proteína Tau soluble e insoluble, y modula los niveles de Tau soluble e insoluble, en el que el fosfo-epítomo es los aminoácidos 405-411 ó 405-412 que tienen una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409), y en el que el anticuerpo o parte funcional de éste se une a la proteína Tau de mamíferos con una constante de disociación de menos de 10 nM según se mide por resonancia de plasmón superficial, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste no se une al epítomo no fosforilado correspondiente. En particular, en una segunda realización, el anticuerpo de la invención o una parte funcional de éste según la realización 1 se une al fosfo-epítomo en la proteína Tau de mamíferos con una constante de disociación de menos de 5 nM. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un anticuerpo o parte funcional de éste según las realizaciones 1 ó 2, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste se une al fosfo-epítomo en la proteína Tau de mamíferos con una constante de velocidad de asociación de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ o mayor, particularmente con una constante de velocidad de asociación de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ o mayor.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo o parte funcional de éste según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la Tau de mamíferos es Tau humana.

El anticuerpo o parte funcional de éste según se describe en la realización 1 comprende en otra realización más:

a) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o

b) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con una secuencia de aminoácidos que es al

menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 27, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o

5 c) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o

10 d) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o

15 e) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o

20 f) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7, 8, ó 9, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, ó 3; o

g) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o

25 h) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o

i) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o

j) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

30 En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o parte funcional de éste según se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores, anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo completamente humano

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o parte funcional de éste según se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores, anticuerpo que es del isotipo IgG2a, IgG2b, o IgG3:

35 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte funcional de éste según se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo de la invención o parte funcional de éste o la composición farmacéutica de la invención según se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores puede usarse para tratar o aliviar los síntomas de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, en el que la enfermedad o trastorno neurodegenerativo está causado opcionalmente por o está asociado con la formación de lesiones neurofibrilares o una tauopatía.

40 En particular, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo se selecciona de Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, Síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral por proteína de príón, daño cerebral traumático y enfermedades o trastornos adicionales que no muestran una patología amiloide clara incluyendo, pero no limitado a, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no Guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con gránulos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración
45 Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos predominantes, Parkinsonismo Postencefálico, Distrofia aliotónica, y combinaciones de éstas.

50 En una realización de la invención, la administración del anticuerpo de la invención o parte funcional de éste o la composición farmacéutica de la invención según se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores,

resulta en el alivio de déficits cognitivos.

En una realización de la invención, el alivio de déficits cognitivos comprende una parada de la progresión de los déficits cognitivos y/o una restauración de la capacidad de memoria cognitiva.

5 La invención proporciona además una línea celular que produce el anticuerpo de la invención o parte funcional de éste según se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores.

10 En una realización, esta línea celular es una línea celular de hibridoma seleccionada de 3A8A12G7 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3086; 2B6A10C11 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3084; 3A8E12H8 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3085; 2B6G7A12 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3087; 6H1A11C11 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3080; y 6H1G6E6 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3088.

15 La invención proporciona además un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención o parte funcional de éste según se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores. El anticuerpo de la invención o parte funcional de éste según se describe en una cualquiera de las realizaciones anteriores puede usarse para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección asociado a la proteína tau, o para diagnosticar una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a la proteína tau, en un paciente que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo o parte funcional de éste a un epítipo de la proteína tau in situ que incluye las etapas de

20 a) poner en contacto la parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína tau con un anticuerpo de la invención o parte funcional de éste según se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores ;

b) permitir que el anticuerpo o parte funcional de éste se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;

c) detectar la formación del complejo inmunológico.; y

25 d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la parte o área específica del cuerpo;

en el que el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a una proteína tau incluye además la etapa de:

30 e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal, en el que un incremento en la cantidad de dicho complejo inmunológico comparado con un valor control normal indica que dicho paciente padece o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína tau.

La presente invención se refiere así además a un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección asociado a una proteína tau, o para diagnosticar una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a una proteína tau; en un paciente que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo o parte funcional de éste a un epítipo de la proteína tau en una muestra que incluye las etapas de

35 a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene la proteína tau con un anticuerpo de la invención o parte funcional de éste según se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores;

b) permitir que el anticuerpo o parte funcional de éste se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;

c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

40 d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la muestra;

en el que el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a una proteína tau incluye además la etapa de:

45 e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal, en el que un incremento en la cantidad de dicho complejo inmunológico comparado con un valor control normal indica que dicho paciente padece o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína tau.

50 Las realizaciones anteriores representan la presente invención y son el contenido de las reivindicaciones. Cualquiera de las siguientes descripciones del contenido que sean más amplias de lo que se reivindica no es parte de la invención reivindicada pero representa la descripción de antecedentes y sirve para poner la presente invención en contexto y para entender mejor la invención.

De acuerdo con esto, en la presente memoria se describe un péptido o proteína de unión o un funcional, particularmente de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o parte funcional de éste, péptido o proteína o anticuerpo de unión que reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente humana, o en un fragmento de ésta, particularmente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau agregada, particularmente a un confórmero de proteína Tau patológico, pero particularmente, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en el que dicho péptido o proteína o anticuerpo de unión tiene una alta afinidad de unión para proteína Tau soluble e insoluble, y modula los niveles de Tau soluble e insoluble, particularmente en el cerebro, particularmente con una constante de disociación de al menos 10 nM, particularmente de al menos 8 nM, particularmente de al menos 5 nM, particularmente de al menos 2 nM, particularmente de al menos 1 nM, particularmente de al menos 500 pM, particularmente de al menos 400 pM, particularmente de al menos 300 pM, particularmente de al menos 200 pM, particularmente de al menos 100 pM, particularmente de al menos 50 pM. El péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente el anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, o en un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero, particularmente, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en el que dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una constante de velocidad de asociación de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de entre $3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor; particularmente en $2-9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor; particularmente de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de $1-4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor. El péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente el anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de la proteína tau patológico, pero, particularmente, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en el que dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una alta afinidad de unión con una constante de disociación de al menos 4 nM y una constante de velocidad de asociación de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente una constante de disociación de al menos 3 nM y una constante de velocidad de asociación de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente una constante de disociación de al menos 2 nM y una constante de velocidad de asociación de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente una constante de disociación de al menos 1 nM y una constante de velocidad de asociación de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente una constante de disociación de al menos 200 pM y una constante de velocidad de asociación de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente una constante de disociación de al menos 100 pM y una constante de velocidad de asociación de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor.

El péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente el anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo de una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, como se muestra en SEQ ID NO: 67, seleccionada del grupo que consiste en Tau aa 15-20 que comprende una Tyr fosforilada en la posición 18 (Y18), Tau aa 405-412 que comprende una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409), Tau aa 405-411 que comprende una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409); y Tau aa 208-218 que comprende una Thr fosforilada en la posición 212 (pT212) y una Ser fosforilada en la posición 214 (pS214).

Un péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 15-20 con una Tyr fosforilada en la posición 18 (Y18).

Un péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 405-412 con una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409).

Un péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 405-411 con una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409). Un péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 208-218 con una Thr fosforilada en la posición 212 (pT212) y una Ser fosforilada en la posición 214 (pS214).

En la presente memoria se describe además un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene, particularmente en secuencia, una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 82, 73, 81, 93, 101, 106, o una secuencia de aminoácidos al menos 70%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al

5 menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, 74, 82, 94, 102, 107, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, 75, 83, 95, 103, 108, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, 70, 78, 89, 98, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, 71, 79, 90, 99, 115, o una secuencia de aminoácidos al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, 72, 80, 91, 100, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas.

25 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 32, 73, 81, o una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, 74, 82, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, 75, 83, o una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica a éstas; y/o un dominio de anticuerpo que contiene una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, 70, 78, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas; una CDR12 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, 71, 79, o una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, 72, 80, o una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a éstas.

40 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 32, 73, 81, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, 74, 82, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, 75, 83, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, 70, 78, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, 71, 79, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, 72, 80, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas.

55 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio (dominio de anticuerpo) de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 32, 73, 81, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, 74, 82, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, 75, 83, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de

aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, 70, 78, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, 71, 79, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, 72, 80, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas.

5 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 32, o una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas.

20 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 32, o una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a éstas; una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, o una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, o una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a éstas y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas.

35 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, 24, 27, 28, 29, 32, 73, 81, 93, 101, ó 106, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, 25, 30, 33, 74, 82, 94, 102, ó 107, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, 26, 31, 34, 75, 83, 95, 103, ó 108, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, 15, 18, 70, 78, 89, ó 98, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, 16, 19, 71, 79, 90, 99, ó 115, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, 17, 20, 72, 80, 91, ó 100.

45 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 21, o una secuencia de aminoácidos al menos 76%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23, o una secuencia de aminoácidos al menos 66%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 75%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, o una secuencia de aminoácidos al menos 88%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos al menos 66%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 75%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%,

particularmente al menos 99% idéntica a ésta.

5 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 27, o SEQ ID NO: 28, o una secuencia de aminoácidos al menos 88%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a éstas, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 26, o una secuencia de aminoácidos al menos 66%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 75%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13, o una secuencia de aminoácidos al menos 88%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos al menos 66%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 75%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta.

25 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, comprende un primer dominio de unión, en el que la CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, o una secuencia de aminoácidos al menos 88% idéntica a ésta.

30 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, comprende un primer dominio de unión, en el que la CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28, o una secuencia de aminoácidos al menos 88% idéntica a ésta.

35 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 31, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos al menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% idéntica a ésta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, o una secuencia de aminoácidos al menos 36%, particularmente al menos 40% particularmente al menos 50%, particularmente al menos 60%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 75%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta.

50 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% idéntica a ésta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos al menos 63%, particularmente al menos 70%, particularmente al menos 75%, particularmente al menos 80%, particularmente al menos 85%,

particularmente al menos 90%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% idéntica a ésta.

5 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 73, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 74, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a ésta y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 70, o una secuencia de aminoácidos al menos 95%, particularmente 98%, particularmente 99% idéntica a ésta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71, o una secuencia de aminoácidos al menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% idéntica a ésta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 72, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a ésta.

25 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 81, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 82, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 83, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a ésta y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 78, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 79, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 80, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a ésta.

40 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 93, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 94, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 95, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a una cualquiera de las CDR anteriores y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 90, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 91, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a una cualquiera de las CDR anteriores.

60 En la presente memoria, se describe además un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, péptido o anticuerpo de unión que reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 101, una CDR2 con la secuencia

de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 102, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 103, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a una cualquiera de las CDR anteriores y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 98, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 99, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 100, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a una cualquiera de las CDR anteriores.

Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:106, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:107, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 108, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a una cualquiera de las CDR anteriores y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 89, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 115, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 91, o una secuencia de aminoácidos al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a una cualquiera de las CDR anteriores.

En la presente memoria, se describe además un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, péptido o anticuerpo de unión que reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a éstas.

Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a éstas y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o una secuencia de aminoácidos al menos 91% idéntica a éstas.

Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión (dominio de anticuerpo) que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10,11, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, o una secuencia de aminoácidos al menos 91% idéntica a éstas.

En la presente memoria se describe además un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en

- 5 SEQ ID NO: 69, 77, 116/92, 97, 105, o una secuencia de aminoácidos particularmente al menos 85%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68, 76, 88, 96, 104, o una secuencia de aminoácidos al menos 80%, particularmente al menos 85%, particularmente al menos 86%, particularmente al menos 87%, particularmente al menos 88%, particularmente al menos 89%, particularmente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, particularmente al menos 95%, particularmente al menos 96%, particularmente al menos 97%, particularmente al menos 98%, particularmente al menos 99% ó 100% idéntica a éstas.
- 10 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión
- 15 que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% y 94%, respectivamente, idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos al menos 91% idéntica a ésta.
- 20 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión
- 25 que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a ésta.
- 30 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión
- 35 que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a ésta.
- 40 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión
- 45 que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos al menos 89% idéntica a ésta.
- 50 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión
- 55 que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, o una secuencia de aminoácidos al menos 98% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos al menos 87% idéntica a ésta.
- 60 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una

5 proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos al menos 93%, 94% ó 95% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76, o una secuencia de aminoácidos al menos 88%, 89% ó 90% idéntica a ésta.

10 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 116, 92, ó 118, o una secuencia de aminoácidos al menos 93%, 94% ó 95% idéntica a éstas; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, 91%, 92% ó 93% idéntica a ésta.

15 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 97, o una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 96, o una secuencia de aminoácidos al menos 86%, 88% ó 90% idéntica a ésta.

20 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, o un fragmento de ésta, particularmente a un confórmero de proteína tau patológico, pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 105, o una secuencia de aminoácidos al menos 98% ó 99% idéntica a ésta; y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 104, o una secuencia de aminoácidos al menos 88%, 89% ó 90% idéntica a ésta.

25 En la presente memoria se describe además un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, en el que dicho primer dominio de unión contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 21-34 y dicho segundo dominio de unión contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 12-20.

30 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 21-23 y SEQ ID NOS: 24-26, respectivamente, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 12-14.

35 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 27, 25, 26 y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 12-14.

40 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 28, 25 y 26, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 12-14.

45 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 29-31, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 15-17.

50 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 32-34, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 18-20.

55 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOS: 73-75, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se

muestran en las SEQ ID NOs. 70-72.

5 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOs: 81-83, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOs:78-80.

Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOs: 101-103, y un segundo dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOs 98-100.

10 Un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, que comprende un primer dominio de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOs: 89, 115, y 91, y un segundo de unión que contiene las CDR como se muestran en las SEQ ID NOs: 106-108.

15 En la presente memoria se describe además un péptido o proteína de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, péptido o anticuerpo de unión que reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de ésta, particularmente a un conformero de la proteína tau patológico; pero particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados en el que dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un

20 a. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; o un

b. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1; o un

25 c. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2; o un

d. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3; o un

e. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4; o un

30 f. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5; o un

g. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 69 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 68; o un

35 h. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 77 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 76; o un

i. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 116 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88; o un;

j. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 92 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 88; o un

40 k. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 97 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6; o un

l. primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 105 y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 104.

45 El péptido de unión como se describe en la presente memoria puede ser un anticuerpo, particularmente un anticuerpo del isotipo IgG2a, IgG2b o IgG3, particularmente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.

En la presente memoria se describe además un polinucleótido que codifica el péptido de unión de una cualquiera de las realizaciones anteriores.

50 En particular, dicho polinucleótido comprende una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en

- a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se representa en las SEQ ID NOs: 35-45, SEQ ID NOs: 84-87, SEQ ID NO: 109-112 y 117;
- 5 b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en las SEQ ID NOs: 35-45, SEQ ID NOs: 84-87, SEQ ID NO: 109-112 y 117;
- c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en las SEQ ID NOs: 35-45, SEQ ID NOs: 84-87, SEQ ID NO: 109-112 y 117;
- 10 d. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en las SEQ ID NOs: 35-45, SEQ ID NOs: 84-87, SEQ ID NO: 109-112 y 117;
- 15 e. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en las SEQ ID NOs: 35-45, SEQ ID NOs: 84-87, SEQ ID NO: 109-112 y 117;
- f. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en las SEQ ID NOs: 35-45, SEQ ID NOs: 84-87, SEQ ID NO: 109-112 y 117;
- 20 g. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos cuya cadena complementaria hibrida con la molécula de ácido nucleico de cualquiera de a) - f);
- h. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se desvía de la secuencia de nucleótidos definida en cualquiera de a) - g) por la degeneración del código genético,
- en el que dicha molécula de ácido nucleico como se define en cualquiera de a) - h) reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana o un fragmento de ésta, particularmente en la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, seleccionada del grupo que consiste en Tau aa 15-20 que comprende una Tyr fosforilada en la posición 18 (Y18), Tau aa 405-412 que comprende una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409), Tau aa 405-411 que comprende una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409); y Tau aa 208-218 que comprende una Thr fosforilada en la posición 212 (pT212) y una Ser fosforilada en la posición 214 (pS214), Tau aa 393-401, que comprende una Ser fosforilada en la posición 396 (pS896), Tau aa 396-401 que comprende una Ser fosforilada en la posición 396 (pS396), Tau aa 394-400 que comprende una Ser fosforilada en la posición 396 (pS396), Tau aa 402-406 que comprende una Ser fosforilada en la posición 404 (pS404), y Tau aa 393-400 que comprende una Ser fosforilada en la posición 396 (pS396), en el que, particularmente dicho péptido de unión tiene una alta afinidad de unión con una constante de disociación de al menos 10 nM, particularmente de al menos 8 nM, particularmente de al menos 5 nM, particularmente de al menos 2 nM, particularmente de al menos 1 nM, particularmente de al menos 500 pM, particularmente de al menos 400 pM, particularmente de al menos 300 pM, particularmente de al menos 200 pM, particularmente de al menos 100 pM, particularmente de al menos 50 pM y/o tiene una constante de velocidad de asociación de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de entre $3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o mayor, particularmente de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor; particularmente de $6 - 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor; particularmente de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de $1 - 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, particularmente de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o mayor, pero, particularmente no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítopos no relacionados.
- 25 En la presente memoria se describe además un péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una combinación de éstos, que es capaz de reconocer y de unirse específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente en la proteína Tau humana, particularmente una proteína tau asociada a microtúbulos, particularmente una proteína tau asociada a microtúbulos agregada e hiperfosforilada tal como la presente en filamentos helicoidales emparejados (PHF), que son las estructuras predominantes en los ovillos neurofibrilares, fibrillas del neuropilema y neuritas distróficas, pero, particularmente, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente; y/o a epítopos no relacionados.
- 30 45 50 En particular, la proteína tau humana es la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO:67.
- Los péptidos y anticuerpos de unión como se describen en la presente memoria pueden usarse así para reducir los niveles de proteína tau soluble total, particularmente de proteína tau soluble fosforilada, en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o hipocampo, de un mamífero o un ser humano que contiene niveles incrementados de proteína tau soluble y/o proteína tau soluble fosforilada.
- 55 Los péptidos y anticuerpos de unión como se describen en la presente memoria también pueden usarse así para reducir los niveles de filamentos helicoidales emparejados que contienen proteína tau hiperfosforilada (pTau PHF)

en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o hipocampo, de un mamífero o un ser humano que contiene niveles incrementados de dichos filamentos helicoidales emparejados de pTau (pTau PHF).

5 La reducción del nivel de proteína tau soluble total y/o proteína tau soluble fosforilada y/o filamentos helicoidales emparejados de pTau (pTau PHF) en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o hipocampo, de un mamífero o un ser humano que contiene niveles incrementados de dichas variantes de proteína tau, que contribuyen a las enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau en dicho mamífero o ser humano, puede dar lugar a una mejora y/o alivio de los síntomas asociados con dichas enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau.

10 Los péptidos y anticuerpos de unión como se describen en la presente memoria pueden usarse por lo tanto en terapia, incluyendo en terapia humana, para retrasar o parar la progresión de una enfermedad, trastorno o afección asociado con la proteína tau.

15 Los péptidos y anticuerpos de unión como se describen en la presente memoria pueden usarse además en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, capacidad de memoria de juicio situacional, aprendizaje, navegación especial, etc.

Los péptidos y anticuerpos de unión como se describen en la presente memoria pueden usarse en terapia, particularmente para uso en el tratamiento de tauopatías, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la proteína tau, o para aliviar los síntomas asociados con tauopatías.

20 Además, los péptidos y anticuerpos de unión como se describen en la presente memoria pueden usarse para retener o incrementar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que padece una tauopatía.

25 Los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-3A8-Ab1, y ACI-36-3A8-Ab2 se proporcionan en las SEQ ID NOs: 25, 26, 27, y SEQ ID NOs: 21, 22, 23, respectivamente, y/o al menos una o todas las CDR de cadena pesada de los anticuerpos ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-3A8-Ab1, y ACI-36-3A8-Ab2 como se proporciona en las SEQ ID NOs: 12, 13, 14, pueden usarse en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

30 Los anticuerpos que comprenden la cadena ligera de los anticuerpos ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-3A8-Ab1, y ACI-36-3A8-Ab2 se proporcionan en la SEQ ID NO: 8 y las SEQ ID NOs: 6, 7, respectivamente, y/o la cadena pesada de los anticuerpos ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-3A8-Ab1, y ACI-36-3A8-Ab2 se proporcionan en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente, pueden usarse en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

35 Los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos ACI-33-6C10-Ab1 y ACI-33-6C10-Ab2 como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 29, 30, 31, y/o al menos una o todas de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos ACI-33-6C10-Ab1 y ACI-33-6C10-Ab2 como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 15, 16, 17, pueden usarse en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

45 Los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 32, 33, 34, y/o al menos una o todas de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, pueden usarse en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

50 Los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2; ACI-35-4A6-Ab1; ACI-35-4A6-Ab2; ACI-35-1D2-Ab1; ACI-35-2G5-Ab1; como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 73-75, 81-83, 93-95, 101-103, 106-108 y/o al menos una o todas de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2; ACI-35-4A6-Ab1; ACI-35-4A6-Ab2; ACI-35-1D2-Ab1; ACI-35-2G5-Ab1; como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 70-72, 78-80, 89-91, 98-100, pueden usarse en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

55

- Los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas de las CDR de cadena ligera de los anticuerpos ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3 como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 106-108 y/o al menos una o todas de las CDR de cadena pesada de los anticuerpos ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; como se proporcionan en las SEQ ID NOs: 89, 115 y 91, pueden usarse en terapia, particularmente en terapia humana, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.
- La unión de los péptidos o anticuerpos según las realizaciones anteriores a ovillos de tau y pTau en cerebros puede determinarse aplicando ensayo de inmuno-reactividad de proteínas de secciones cerebrales seleccionadas y por transferencia Western de homogenados de cerebro, respectivamente, como se describe en los Ejemplos.
- En la presente memoria también se describe una composición farmacéutica que comprende un péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, como se describe en la presente memoria o una combinación de éstos, en una cantidad terapéuticamente efectiva junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- El péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria, o una combinación de éstos, puede usarse en terapia, particularmente en terapia humana para el tratamiento o alivio de los síntomas de enfermedades o trastornos asociados con la proteína tau incluyendo trastornos neurodegenerativos tales como tauopatías.
- Los péptidos de unión, anticuerpos y/o composiciones farmacéuticas como se describe en la presente memoria pueden usarse así para retrasar o parar la progresión de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la proteína tau, después de la administración de dichos péptidos de unión, anticuerpos y/o composiciones farmacéuticas a un animal, particularmente un mamífero, particularmente un ser humano, que padece dicha enfermedad o afección.
- Los péptidos de unión, anticuerpos y/o composiciones farmacéuticas pueden usarse además para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociadas la proteína tau, tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, capacidad de memoria, aprendizaje, navegación especial, etc, después de la administración de dichos péptidos de unión, anticuerpos y/o composiciones farmacéuticas a un animal, particularmente un mamífero, particularmente un ser humano, que padece dicha enfermedad o afección.
- El péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria, o una combinación de éstos, puede usarse en el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o están asociados con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la co-existencia de patologías tau y amiloide incluyendo, pero no limitado a, Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, Síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral por proteína de priones, daño cerebral traumático y enfermedades o trastornos adicionales que no muestran una clara patología amiloide incluyendo, pero no limitado a, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no Guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con gránulos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick, tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos predominantes, Parkinsonismo Postencefálico, Distrofia Miotónica.
- El péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria, o una combinación de éstos, puede usarse en el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.
- En la presente memoria se describe además un método para modular los niveles de Tau soluble y/o insoluble, particularmente en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que comprende administrar a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o ser humano, el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas.
- En un aspecto, la modulación se refiere a reducir los niveles de proteína tau soluble, particularmente de proteína tau soluble fosforilada, en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano que contiene niveles incrementados de proteína tau soluble y/o

proteína tau soluble fosforilada.

5 En la presente memoria se describe además un método para reducir los niveles de proteína tau insoluble, particularmente de filamentos helicoidales emparejados que contienen proteína tau hiperfosforilada (pTau PHF) en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que contiene niveles incrementados de proteína tau insoluble, particularmente de filamentos helicoidales emparejados de pTau (pTau PHF) que comprende administrar a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o ser humano, el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas.

10 En la presente memoria también se describe un método para retrasar o parar la progresión de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la proteína tau en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que comprende administrar a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o ser humano, que padece dicha enfermedad o afección, el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas.

15 En la presente memoria también se describe un método para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau tales como, por ejemplo, alteración o pérdida de funciones cognitivas incluyendo razonamiento, juicio situacional, capacidad de memoria, aprendizaje, navegación especial, etc., en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que comprende administrar a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o ser humano, que padece dicha enfermedad o afección, el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas.

25 Un método es para retener o incrementar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que padece una tauopatía.

Además, se describe un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la proteína tau incluyendo una enfermedad o trastorno neurodegenerativo tal como una tauopatía que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano, que padece dicha enfermedad o trastorno, el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas.

30 Además, se describe un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están causados por o están asociados con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la co-existencia de patologías tau y amiloide incluyendo, pero no limitado a, Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, Síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral por proteína de priones, daño cerebral traumático y enfermedades o trastornos adicionales que no muestran una clara patología amiloide incluyendo, pero no limitado a, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no Guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con gránulos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick, tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos predominantes, Parkinsonismo Postencefálico, Distrofia Miotónica, método que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un ser humano, que padece dicha enfermedad o trastorno, el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas.

45 Además, se describe un método para inducir una respuesta inmune pasiva en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que padece un trastorno neurodegenerativo tal como tauopatía mediante la administración a dicho animal o ser humano del péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las realizaciones anteriores, o una combinación de éstas .

55 En la presente memoria también se describe un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección asociado con la proteína tau en un paciente se proporciona que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un péptido de unión o un fragmento activo de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria a un epítipo de la proteína tau en una muestra o in situ que incluye las etapas de

- a. poner en contacto la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína tau con un péptido de unión o un fragmento de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria en el que dicho péptido de unión o anticuerpo o fragmento de éste se une a un epítipo de la proteína tau;
- 5 b. permitir que dicho péptido de unión, particularmente dicho anticuerpo, particularmente dicho anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico; y
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo.
- 10 En la presente memoria se describe además un método para diagnosticar una predisposición a enfermedad, trastorno o afección asociado con la proteína tau en un paciente se proporciona que comprende detectar la unión inmuno-específica de un péptido de unión o un fragmento activo de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria a un epítipo de la proteína tau en una muestra o in situ que incluye las etapas de
- 15 a. poner en contacto la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene el antígeno tau con un péptido de unión o un fragmento activo de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria, péptido o fragmento de éste que se une a un epítipo de la proteína tau;
- b. permitir que dicho péptido de unión, particularmente dicho anticuerpo, particularmente dicho anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, se una al antígeno de tau para formar un complejo inmunológico;
- 20 c. detectar la formación del complejo inmunológico; y
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno de tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo;
- e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con 2 valores controles normales; en el que un incremento en la cantidad de dicho agregado comparado con un valor control normal indica que dicho paciente padece o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína tau.
- 25 En la presente memoria también se describe un método para monitorizar enfermedad residual mínima en un paciente después de tratamiento con el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria en el que dicho método comprende:
- 30 a. poner en contacto la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene el antígeno tau con el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria, péptido o fragmento de éste que se une a un epítipo de la proteína tau;
- 35 b. permitir que dicho péptido de unión, particularmente dicho anticuerpo, particularmente dicho anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, se una al antígeno de tau para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico; y
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno de tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo,
- 40 e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal,
- en el que un incremento en la cantidad de dicho agregado comparado con un valor control normal indica que dicho paciente todavía padece una enfermedad residual mínima.
- Además, se describe un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que se está tratando con el péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria que comprende
- 45 a. poner en contacto la muestra o una parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene el antígeno tau con un péptido de unión o un fragmento activo de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste como se describe en la presente memoria, péptido o fragmento de éste que se une a un epítipo de la proteína tau;
- 50

- b. permitir que dicho péptido de unión, particularmente dicho anticuerpo, particularmente dicho anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, se una al antígeno de tau para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico; y
- 5 d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno de tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo,
- e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento,
- en el que una disminución en la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un alto potencial de capacidad de respuesta al tratamiento.
- 10 En la presente memoria se describe además un kit de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína tau que comprende un péptido de unión o un fragmento activo de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria.
- 15 El kit de ensayo comprende un contenedor que alberga uno o más péptidos de unión o fragmentos activos de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria e instrucciones para usar los péptidos de unión o anticuerpos para el propósito de unirse al antígeno tau para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de antígeno tau.
- 20 En la presente memoria se describe además un epítipo seleccionado del grupo que consiste en Tau aa 15-20 de la proteína tau humana mostrado en SEQ ID NO: 67 que comprende una Tyr fosforilada en la posición 18 (Y18), Tau aa 405-412 que comprende una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409), Tau aa 405-411 que comprende una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409); y Tau aa 208-218 que comprende una Thr fosforilada en la posición 212 (pT212) y una Ser fosforilada en la posición 214 (pS214).
- Uno de dichos epítipos consiste en Tau aa 15-20 con una Tyr fosforilada en la posición 18 (Y18).
- 25 Uno de dichos epítipos consiste en Tau aa 405-412 con una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409).
- Uno de dichos epítipos consiste en Tau aa 405-411 con una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409).
- En la presente memoria se describe además una línea celular que produce un péptido de unión o un fragmento activo de éste, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, como se describe en la presente memoria:
- 30 Una línea celular es la línea celular de hibridoma 6C10F9C12A11 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3079.
- Una línea celular es la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3081.
- 35 Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3080.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 6H1G6E6 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3088.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 2B6A10C11 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3084.
- 40 Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 2B6G7A12 depositada el 10 de marzo, 2010 como DSM ACC3087.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3086.
- 45 Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 3A8E12H8 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3085.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3082.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma 7C2(2)B9F11D5 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3083.

- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A4-4A6-48 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3136.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3137.
- 5 Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A6-2G5-41 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3138.
- Una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A4-2A1-18 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3139.
- 10 En una realización (103e), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A4-2A1-40 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3140.
- En una realización (103e), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A6-1D2-12 depositada el 6 de septiembre, 2011 como DSM ACC3141.
- 15 En la presente memoria se describe además: Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 6C10F9C12A11 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3079 usando
- a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 54 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión, y/o
- 20 b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3081 usando
- 25 a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 30 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3080 usando
- a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 50 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- 35 b. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 46 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 6H1G6E6 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3088 usando
- 40 a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 50 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- b. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 46 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 45 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 2B6A10C11 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3084 usando
- 50 a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 50 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o

b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 52 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.

Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 2B6G7A12 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSMAGG3087 usando

a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 50 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o

b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 52 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.

Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3086 usando

a₁. una mezcla de cebadores que comprende un cebadores 5' de SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; o

a₂. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 50 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión y/o

b. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 46 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.

Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 3A8E12H8 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM ACC3085 usando

a₁. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49 y un cebador 3' de SEQ ID NO 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; o

a₂. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 50 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o

b. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 46 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.

Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSM AC03082 usando

a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión;

b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 55 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.

Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma 7C2(2)B9F11D5 depositada el 25 de agosto, 2010 como DSMACC3083 usando

a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 57 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión;

b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 55 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 47 para la amplificación de un segundo dominio de unión.

Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma A4-2A1-18 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3139 usando

- a. una pareja de cebadores que comprende un cebador 5' de SEQ ID NO: 149 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51 para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 120, 123, 124, 136, 137, 138, 139, y 140 y un cebador 3' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID. NOs: 131, 134, y 141-148, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 5 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3137 usando
- 10 a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 51 y 169-174 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51, para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 124, 127, y 150-158 y un cebador 3' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 130, y 159-168, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 15 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma A4-2A1-40 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3140 usando
- 20 a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 178, 179 y 180 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51, para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 121, 127, 139, 154, 155, y 175 y un cebador 3' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 128, 129, 147, 176, y 177, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 25 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma A6-2G5-41 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3138 usando
- a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 51 y 188-192 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51, para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- 30 b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 120, 124, 126, 181, 182 y 183 y un cebador 3' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 144, 145 y 184-187, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 35 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR de ADN de la línea celular de hibridoma A4-4A6-48 depositada el 30 de agosto, 2011 como DSM ACC3136 usando
- a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 50 y 201-204 y un cebador 3' de SEQ ID NO: 51, para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- 40 b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 121, 137, 151 y 193-197 y un cebador 3' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 131, 141, 144, 166, 198, 199 y 200, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 45 Un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que está codificado por un polinucleótido localizado en un fragmento de nucleótido que puede obtenerse por amplificación por PCR del ADN de la línea celular de hibridoma A6-1D2-12 depositada el 6 de septiembre, 2011 como DSM ACC3141 usando
- a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 209-214, y 219-221 un cebador 3' de SEQ ID NO: 215, para la amplificación de un primer dominio de unión; y/o
- b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 216, 217 y 218 y un cebador 3' de SEQ ID NOs: 208, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 50 El anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de camélido, un fragmento divalente, o un anticuerpo modificado u obtenido por ingeniería.

El péptido de unión o parte funcional de éste puede ser un fragmento que comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera, particularmente una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NOS: 1-5 y/o una cadena ligera como se muestra en SEQ ID NOS: 6-11, particularmente un fragmento Fab o F(ab')₂.

5 En la presente memoria se describe además una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NOS: 1-5 y una cadena ligera como se muestra en SEQ ID NOS: 6-11.

También se describe un método para producir los péptidos de unión o anticuerpos como se describe en la presente memoria que comprende la etapa de cultivar la línea celular como se describe en la presente memoria en un medio de cultivo adecuado y, opcionalmente, purificar los péptidos de unión o anticuerpo de la línea celular o medio de cultivo.

10 Descripción breve de las figuras y secuencias

FIGURAS

La Figura 1 muestra la unión de anticuerpo a fosfo-Tau en secciones de cerebro de ratones biGT (bigénicos para Tau) usando TAUPIR.

15 La Figura 2 muestra la unión de anticuerpo a fosfo-Tau en secciones de cerebro de de pacientes con AP y tauopatía usando TAUPIR usando el anticuerpo ACI-36-3A8-Ab1.

La Figura 3 muestra el efecto de tratamiento con anticuerpo anti-Tau después de 1 semana de estudio in vivo en el epítipo de pTau put231 usando MSD.

La Figura 4 muestra un diagrama que demuestra cómo se prepararon los cerebros para fracciones de proteína Tau soluble e insoluble en sarcosil (SinT) .

20 La Figura 5 muestra los resultados de Transferencia Western para el epítipo de pTau después de tratamiento con anticuerpo anti-Tau para el estudio in vivo de 1 mes (Figura 5A, 5B, 5C, 5G, 5H, 5I) ó 3 meses (Figura 5D, 5E, 5F)

La Figura 6 muestra los resultados de Transferencia Western para el epítipo de pTau después de tratamiento con anticuerpo anti-Tau para el estudio in vivo de 3 meses usando ratones bigénicos biGT.

25 La Figura 7 muestra IHC después de tratamiento con anticuerpo anti-Tau por ACI-36-2B6-Ab1 en un estudio in vivo de 3 meses.

La Figura 8 muestra IHC después de tratamiento con anticuerpo anti-Tau por ACI-38-3A8-Ab1 en un estudio in vivo de 3 meses.

La Figura 9 muestra los resultados del laberinto acuático de Morris después de tratamiento con anticuerpo anti-Tau por ACI-36-2B6-Ab1 en un estudio in vivo de 3 meses.

30 La Figura 10 muestra los resultados del laberinto acuático de Morris después de tratamiento con anticuerpo anti-Tau por ACI-36-3A8-Ab1 en un estudio in vivo de 3 meses.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7.

35 SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-2B6-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma 2B6A10C11.

SEQ ID NO: 3 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.

40 SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.

45 SEQ ID NO: 5 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11 D5, respectivamente.

SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-AD} y ACI-36-3A8-Ab2_{VK-AD} producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.

- SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-G} y ACI-36-3A8-Ab2_{VK-G} producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.
- 5 SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-2B6-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 2B6A10C11 y 2B6G7A12, respectivamente.
- SEQ ID NO: 9 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.
- 10 SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.
- 15 SEQ ID NO: 11 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11D5, respectivamente.
- SEQ ID NO: 12 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1, ACI-36-3A8-Ab2, ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7, 3A8E12H8, 2B6A10C11, 2B6G7A12, 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.
- 20 SEQ ID NO: 13 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1, ACI-36-3A8-Ab2, ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7, 3A8E12H8, 2B6A10C11, 2B6G7A12, 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.
- 25 SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1, ACI-36-3A8-Ab2, ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7, 3A8E12H8, 2B6A10C11, 2B6G7A12, 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.
- 30 SEQ ID NO: 15 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.
- SEQ ID NO: 16 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.
- 35 SEQ ID NO: 17 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.
- SEQ ID NO: 18 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11 D5, respectivamente.
- 40 SEQ ID NO: 19 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11D5, respectivamente.
- 45 SEQ ID NO: 20 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11 D5, respectivamente.
- SEQ ID NO: 21 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-AD} y ACI-36-3A8-Ab2_{VK-AD} producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.
- 50 SEQ ID NO: 22 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-AD} y ACI-36-3A8-Ab2_{VK-AD} producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.
- SEQ ID NO: 23 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-AD} y ACI-36-3A8-Ab2_{VK-AD} producidos por la línea celular de hibridoma

ES 2 548 686 T3

3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.

SEQ ID NO: 24 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-G} y ACI-36-3A8-Ab2_{VK-G} producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.

- 5 SEQ ID NO: 25 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-G}, ACI-36-3A8-Ab2_{VK-G}, ACI-36-2B6-Ab1, ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7, 3A8E12H8, 2B6A10C11, 2B6G7A12, 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.

- 10 SEQ ID NO: 26 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1_{VK-G}, ACI-36-3A8-Ab2_{VK-G}, ACI-36-2B6-Ab1; ACI-36-2B6-Ab2, ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7, 3A8E12H8, 2B6A10C11, 2B6G7A12, 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.

- 15 SEQ ID NO: 27 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-2B6-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 2B6A10C11 y 2B6G7A12, respectivamente.

SEQ ID NO: 28 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.

- 20 SEQ ID NO: 29 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.

SEQ ID NO: 30 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.

- 25 SEQ ID NO: 31 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.

- 30 SEQ ID NO: 32 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11D5, respectivamente.

SEQ ID NO: 33 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11D5, respectivamente.

- 35 SEQ ID NO: 34 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11D5, respectivamente.

SEQ ID NO: 35 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.

- 40 SEQ ID NO: 36 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-2B6-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 2B6A10C11 y 2B6G7A12, respectivamente.

- 45 SEQ ID NO: 37 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.

SEQ ID NO: 38 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.

- 50 SEQ ID NO: 39 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11 D5, respectivamente.

SEQ ID NO: 40 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo

ES 2 548 686 T3

- monoclonal ACI-36-3A8-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.
- 5 SEQ ID NO: 41 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-3A8-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 3A8A12G7 y 3A8E12H8, respectivamente.
- SEQ ID NO: 42 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-2B6-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 2B6A10C11 y 2B6G7A12, respectivamente.
- 10 SEQ ID NO: 43 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-36-6H1-Ab1 y ACI-36-6H1-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 6H1A11C11 y 6H1G6E6, respectivamente.
- SEQ ID NO: 44 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-33-6C10-Ab2 y ACI-33-6C10-Ab1 producidos por la línea celular de hibridoma 6C10E5E9C12 y 6C10F9C12A11, respectivamente.
- 15 SEQ ID NO: 45 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-41-7C2-Ab1 y ACI-41-7C2-Ab2 producidos por la línea celular de hibridoma 7C2(1)F10C10D3 y 7C2(2)B9F11 D5, respectivamente.
- SEQ ID NO: 46 - 57 representa las secuencias de nucleótidos de los cebadores directos e inversos de VH/VK.
- SEQ ID NO: 58 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 379-408 [pS396, pS404]
- 20 SEQ ID NO: 59 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 5-20 [pY18]
- SEQ ID NO: 60 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 206-221 [pT212, pS214]
- SEQ ID NO: 61 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 196-211 [pS202, pT205]
- SEQ ID NO: 62 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 393-408 [pS396, pS404]
- SEQ ID NO: 63 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 401-418 [pS404, pS409]
- 25 SEQ ID NO: 64 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 200-216 [pS202+ pT205 y pT212+pS214]
- SEQ ID NO: 65 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 407-418 [pS409]
- SEQ ID NO: 66 representa la secuencia de aminoácidos de Tau 399-408 [pS404]
- SEQ ID NO: 67 representa la secuencia de aminoácidos de la isoforma más larga de Tau humana (441aa), también denominada Tau40
- 30 SEQ ID NO: 68 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A4-4A6-18;
- SEQ ID NO: 69 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A4-4A6-18.
- 35 SEQ ID NO: 70 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1
- SEQ ID NO: 71 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1
- SEQ ID NO: 72 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1
- 40 SEQ ID NO: 73 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1
- SEQ ID NO: 74 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1
- 45 SEQ ID NO: 75 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1

- SEQ ID NO: 76 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A6-1D2-12.
- SEQ ID NO: 77 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A6-1D2-12.
- 5 SEQ ID NO: 78 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1 D2-Ab1.
- SEQ ID NO: 79 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1 D2-Ab1.
- 10 SEQ ID NO: 80 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1 D2-Ab1.
- SEQ ID NO: 81 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1 D2-Ab1
- SEQ ID NO: 82 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1 D2-Ab1
- 15 SEQ ID NO: 83 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1 D2-Ab1
- SEQ ID NO: 84 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A4-4A6-18.
- 20 SEQ ID NO: 85 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A4-4A6-18.
- SEQ ID NO: 86 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A6-1D2-12.
- SEQ ID NO: 87 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A6-1D2-12.
- 25 SEQ ID NO: 88 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, y ACI-35-4A6-Ab2, respectivamente, producidos por la línea celular de hibridoma A4-2A1-18, A4-2A1-40 y A4-4A6-48, respectivamente.
- SEQ ID NO: 89 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, ACI-35-4A6-Ab2, ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.
- 30 SEQ ID NO: 90 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, y ACI-35-4A6-Ab2, respectivamente.
- SEQ ID NO: 91 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, ACI-35-4A6-Ab2, ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.
- 35 SEQ ID NO: 92 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2 producido por la línea celular de hibridoma A4-2A1-40.
- SEQ ID NO: 93 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2.
- 40 SEQ ID NO: 94 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2.
- SEQ ID NO: 95 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2.
- 45 SEQ ID NO: 96 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A6-2G5-08.
- SEQ ID NO: 97 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A6-2G5-08.
- SEQ ID NO: 98 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH)

del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

SEQ ID NO: 99 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

5 SEQ ID NO: 100 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

SEQ ID NO: 101 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

SEQ ID NO: 102 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

10 SEQ ID NO: 103 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

SEQ ID NO: 104 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente, producidos por la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 y A6-2G5-41, respectivamente.

15 SEQ ID NO: 105 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente, producidos por la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 y A6-2G5-41, respectivamente.

SEQ ID NO: 106 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.

20 SEQ ID NO: 107 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.

SEQ ID NO: 108 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.

25 SEQ ID NO: 109 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, y ACI-35-4A6-Ab2, respectivamente, producidos por la línea celular de hibridoma A4-2A1-18, A4-2A1-40 y A4-4A6-48, respectivamente.

SEQ ID NO: 110 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2 producido por la línea celular de hibridoma A4-2A1-40.

30 SEQ ID NO: 111 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB1 producido por la línea celular de hibridoma A6-2G5-08.

SEQ ID NO: 112 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB1 producido por la línea celular de hibridoma A6-2G5-08.

35 SEQ ID NO: 113 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (V) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente, producidos por la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 y A6-2G5-41, respectivamente.

SEQ ID NO: 114 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente, producidos por la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 y A6-2G5-41, respectivamente.

40 SEQ ID NO: 115 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3.

SEQ ID NO: 116 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A4-2A1-18.

SEQ ID NO: 117 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1 producido por la línea celular de hibridoma A4-2A1-18.

45 SEQ ID NO: 118 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab2 producido por la línea celular de hibridoma A4-4A6-48.

SEQ ID NO: 119 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) del anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab2 producido por la línea celular de hibridoma A4-4A6-48.

SEQ ID NO: 120 - 221 representa las secuencias de nucleótidos de los cebadores directos e inversos de VH/VK.

Definición de términos

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", tal y como se usan en la presente memoria, se pueden intercambiar y se definen para significar una biomolécula compuesta por aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

El término "péptidos," o "péptido de unión" se usan indistintamente en la presente memoria y se refieren a cadenas de aminoácidos (típicamente L-aminoácidos) cuyos carbonos alfa están unidos mediante enlaces peptídicos formados por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo del carbono alfa de un aminoácido y el grupo amino del carbono alfa de otro aminoácido. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (es decir, el amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como tal, el término "Extremo amino" (abreviado extremo N) se refiere al grupo amino alfa libre en el aminoácido en el amino terminal del péptido, o el grupo amino alfa (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra localización en el péptido. De manera similar, el término "extremo carboxi" (abreviado extremo C) se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido en el extremo carboxi de un péptido, o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra localización del péptido. Un péptido de unión puede constituir anticuerpos tales como anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, fragmentos divalentes, anticuerpos de camélido, etc, o partes funcionales de éstos como se define en la presente memoria.

Los términos "fragmento de éste" o "fragmento" tal y como se usan en la presente memoria se refieren a fragmento de péptido funcional que tiene esencialmente la misma actividad (biológica) que los péptidos definidos en la presente memoria (por ejemplo, como se muestra en SEQ ID NOs 59-66 en la Tabla 1 respectivamente), es decir, dichos fragmentos son aún capaces de incitar una respuesta inmune altamente específica, particularmente específica de conformación en un organismo, pero particularmente en un animal, particularmente un mamífero o un ser humano, que es altamente efectiva y capaz de prevenir o aliviar tauopatías, o los síntomas asociados con tauopatías. En particular, dichos fragmentos aún contienen el fosfo-epítipo o fosfo-epítipos patológicos específicos del péptido tau, tal y como se usa y define en la presente memoria.

Típicamente, los aminoácidos que constituyen un péptido se numeran en orden, empezando en el amino terminal e incrementando en la dirección hacia el carboxi terminal del péptido. Así, cuando se dice que un aminoácido "sigue a" otro, ese aminoácido está posicionado más cerca del carboxi terminal del péptido que el aminoácido precedente.

El término "residuo" se usa en la presente memoria para hacer referencia a un aminoácido que se incorpora en un péptido por un enlace amida. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido natural o, a no ser que esté limitado de otra manera, puede englobar análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales (es decir, miméticos de aminoácidos). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones en el núcleo del péptido muy conocidas para los expertos en la técnica.

La expresión "que consiste esencialmente en" se usa en la presente memoria para excluir cualesquiera elementos que alterarían sustancialmente las propiedades esenciales de los péptidos a los que se refiere la expresión. Así, la descripción de un péptido "que consiste esencialmente en..." excluye cualesquiera sustituciones, adicionales, o deleciones de aminoácidos que alterarían sustancialmente la actividad biológica de ese péptido.

Además, un experto en la técnica reconocerá que, como se ha mencionado anteriormente, las sustituciones, deleciones o adiciones individuales que alteran, añaden o delecionan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos del 5%, más típicamente menos del 1%) en una secuencia codificada son variaciones conservativamente modificadas en las que las alteraciones resultan en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Las expresiones "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que carece sustancialmente o esencialmente de componentes que lo acompañan naturalmente según se encuentra en su estado nativo. Así, los péptidos descritos en la presente memoria no contienen materiales asociados normalmente con su entorno in situ.

Típicamente, los péptidos inmunogénicos aislados descritos en la presente memoria son al menos aproximadamente 80% puros, habitualmente al menos aproximadamente 90%, y preferiblemente al menos aproximadamente 95% según se mide por intensidad de la banda en un gel teñido con plata.

5 La pureza u homogeneidad de las proteínas puede indicarse por varios métodos muy conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización después de tinción. Para determinados propósitos, se necesitará una alta resolución y se utiliza HPLC o medios similares para la purificación.

Cuando los péptidos inmunogénicos tienen una longitud relativamente corta (es decir, menos de aproximadamente 50 aminoácidos), frecuentemente se sintetizan usando técnicas de síntesis de péptidos químicas estándar.

10 La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es un método preferido para la síntesis química de los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria. Las técnicas para síntesis en fase sólida son conocidas para los expertos en la técnica.

15 Alternativamente, los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria se sintetizan usando metodología de ácido nucleico recombinante. Generalmente, esto implica crear una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido, poner el ácido nucleico en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar el péptido en un huésped, asilar el péptido o polipéptido expresado y, si se requiere, renaturalizar el péptido. Las técnicas suficientes para guiar a un experto en la técnica a través de dichos procedimientos se encuentran en la bibliografía.

20 Una vez expresados, los péptidos recombinantes pueden purificarse según procedimientos estándar, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y semejantes. Se prefieren las composiciones sustancialmente puras de aproximadamente 50 % a 95 % de homogeneidad, y lo más preferido es 80 % a 95 % o más de homogeneidad para uso como agentes terapéuticos.

25 Un experto en la técnica reconocerá que después de la síntesis química, expresión biológica o purificación, los péptidos inmunogénicos pueden poseer una conformación sustancialmente diferente a las conformaciones nativas de los péptidos constituyentes. En este caso, es necesario frecuentemente desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y después causar que el péptido se re-plegue en la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir re-plegamiento son muy conocidos para los expertos en la técnica.

30 La antigenicidad de la proteína purificada puede confirmarse, por ejemplo, demostrando reacción con suero inmune, o con antisuero producido frente a la proteína en sí misma.

Los términos "un", "una" y "el" tal y como se usan en la presente memoria se definen para significar "uno o más" e incluyen el plural a no ser que el contexto sea inapropiado.

35 Los términos "detectar" o "detectado" tal y como se usan en la presente memoria significan técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas tales como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a la determinación cualitativa o cuantitativa de la presencia o concentración de la biomolécula investigada.

Por "aislado" se quiere decir una molécula biológica que carece de al menos algunos de los componentes con los que aparece naturalmente.

40 Los términos "anticuerpo", "anticuerpos" o "partes funcionales de éstos" tal y como se usan en la presente memoria es un término reconocido en la técnica y se entiende que hace referencia a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de molécula de inmunoglobulina.

45 "Anticuerpos" se pretende que incluya en el alcance de la presente invención anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena única, biespecíficos, simianizados, anticuerpos humanos y humanizados, anticuerpos de camélido, fragmentos divalentes, así como partes funcionales o fragmentos activos de éstos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen fragmentos Fab y F(ab')₂, incluyendo los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

50 Estos fragmentos activos pueden derivar de un anticuerpo de la presente invención mediante varias técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales purificados pueden escindirse con una enzima, tal como pepsina, y someterse a filtración en gel por HPLC. La fracción apropiada que contiene los fragmentos Fab puede recogerse y concentrarse por filtración con membrana y semejantes. Para una descripción adicional de técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase por ejemplo, Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-

1019 (1982); Rousseaux et al. *Methods Enzymology*, 121:663-69, Academic Press, (1986).

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería con sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donante no humana, derivándose el resto de las partes derivadas de inmunoglobulina de la molécula de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s).

5 Un anticuerpo humanizado puede referirse además a un anticuerpo que tiene una región variable en la que una o más de sus regiones marco tienen aminoácidos humanos o de primate. Además, los residuos de soporte marco pueden alterarse para preservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son muy conocidos para los expertos en la técnica. (véase, por ejemplo, Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci USA*, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9:421 (1991)).

10 Un "anticuerpo humanizado" también puede obtenerse por una estrategia nueva de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales semejantes a humanos madurados por afinidad en animales grandes tales como, por ejemplo, conejos (<http://www.rcitech.com/bioventures/therapeutic.php>).

15 El término "anticuerpo completamente humano" o anticuerpo "humano" se pretende que haga referencia a un anticuerpo derivado de ratones transgénicos que portan genes de anticuerpo humano o de células humanas. Para el sistema inmune humano, sin embargo, la diferencia entre anticuerpos "completamente humanos", "humanos", y "humanizados" puede ser despreciable o no existente y como tal los tres pueden tener la misma eficacia y seguridad.

20 El término "anticuerpo monoclonal" también está muy reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce sólo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se preparan típicamente fusionando una célula B productora de anticuerpo normal de vida corta con una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (algunas veces referida como una célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

25 El término "antígeno" se refiere a una entidad o fragmento de ésta que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente un animal, más particularmente un mamífero incluyendo un ser humano. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de la antigenicidad o determinantes antigénicos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "soluble" significa parcialmente o completamente disuelto en una disolución acuosa.

30 También como se usa en la presente memoria, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias que incitan o aumentan la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas dirigidas frente a un agente inmunogénico y contribuyen a una respuesta inmune en seres humanos o animales.

Una respuesta inmune ocurre cuando un individuo produce anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas suficientes frente a composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno que se va a tratar.

35 El término "hibridoma" está reconocido en la técnica y se entiende por los expertos en la técnica que hace referencia a una célula producida por la fusión de una célula productora de anticuerpo y una célula inmortal, por ejemplo, una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpo. Véase la definición de "anticuerpo monoclonal" anterior y los Ejemplos siguientes para una descripción más detallada del método de fusión.

40 El término "vehículo" tal y como se usa en la presente memoria significa una estructura en la que puede incorporarse en o puede asociarse con péptido antigénico o construcción supramolecular, presentando o exponiendo de esta manera péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmune de un ser humano o animal. Cualquier partícula que puede usarse adecuadamente en terapia animal o humana tal como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado puede usarse como un vehículo en el contexto de la presente invención.

45 El término "vehículo" comprende además métodos de administración en los que las composiciones de construcción antigénica supramolecular que comprenden el péptido antigénico pueden transportarse a sitios deseados por mecanismos de administración. Un ejemplo de dicho sistema de administración utiliza metales coloidales tal como oro coloidal.

50 Las proteínas vehiculares que pueden usarse en las composiciones de construcción antigénica supramolecular de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, péptido de unión a maltosa "MBP"; albúmina de suero bovino "BSA"; hemocianina de lapa "KLH"; ovalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina de suero de cualquier especie; gama globulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas que portan antígenos Ia; y polímeros de aminoácidos D y/o L.

Además, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" se refiere a la

cantidad de péptido de unión que, cuando se administra a un ser humano o animal, es suficiente para resultar en un efecto terapéutico en dicho ser humano o animal. La cantidad efectiva la determina fácilmente un experto en la técnica según procedimientos rutinarios.

5 "pTau PHF", "PHF", y "fragmentos helicoidales emparejados" se usan en la presente memoria de manera sinónima y se refieren a parejas de filamentos de aproximadamente 10 nm enrollados en hélices con una periodicidad de 160 nm visible en el microscopio electrónico. La anchura varía entre 10 y 22 nm. Los PHF son las estructuras predominantes en ovillos neurofibrilares de la Enfermedad de Alzheimer (AD) y fibrillas del neuropilema. Los PHF también pueden observarse en algunas pero no todas las neuritas distróficas asociadas con placas neuríticas. El componente principal de PHF es una forma hiperfosforilada de proteína tau asociada a microtúbulos. Los PHF están compuestos por proteínas tau hiperfosforiladas antiparalelas unidas por disulfuro. PHF tau puede estar truncada de sus 20 residuos de aminoácidos C-terminales. Los mecanismos que subyacen la formación de PHF son inciertos pero la hiperfosforilación de tau puede desacoplarla de los microtúbulos, incrementando el conjunto soluble de tau.

15 En el alcance de la presente invención, se demostró que la respuesta inducida por anticuerpo a la composición antigénica según la invención es en gran medida independiente de las células T. Se usó un modelo de ratón desnudo a este respecto y los ratones desnudos se vacunaron y se midieron las respuestas de anticuerpo para evaluar la respuesta de anticuerpo específica A β inducida por la composición antigénica según la invención en los ratones desnudos inmunizados. Los ratones desnudos portan la mutación Foxn1nu y como consecuencia, tienen una función reducida de células T debido a la ausencia de un timo apropiado.

20 Una "cantidad farmacéuticamente efectiva" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una dosis del ingrediente activo en una composición farmacéutica adecuada para curar, o al menos parar parcialmente, los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se va a tratar o cualquier complicación asociada con ésta.

25 La presente invención se refiere a péptidos de unión como se proporciona en las reivindicaciones que reconocen y se unen a fosfo-epítomos patológicos importantes de la proteína tau. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos específicos frente a fosfo-epítomos en la proteína tau lineales y conformacionales, simples y complejos, que se cree que son responsables de la sinapto- y neuro-toxicidad en las tauopatías, incluyendo AD.

30 En la presente memoria se describe además un péptido de unión o una parte funcional de éste, particularmente de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o parte funcional de éste, péptido de unión o anticuerpo que reconoce y se une específicamente a un fosfo-epítomo en una proteína Tau de mamíferos, particularmente la proteína Tau humana, o a un fragmento de ésta, particularmente a un conformero patológico de proteína tau, pero particularmente, no se une al epítomo no fosforilado correspondiente y/o a epítomos no relacionados, en el que dicho péptido de unión o anticuerpo tiene una alta afinidad de unión con una constante de disociación de al menos 10 nM, particularmente de al menos 8 nM, particularmente de al menos 5 nM, particularmente de al menos 2 nM, particularmente de al menos 1 nM, particularmente de al menos 500 μ M, particularmente de al menos 400 pM, particularmente de al menos 300 pM, particularmente de al menos 200 pM, particularmente de al menos 100 pM, particularmente de al menos 50 pM.

35 La proteína "Tau soluble" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a proteínas que consisten tanto en proteína Tau/monómeros peptídicos completamente solubilizados o en péptidos/proteínas semejantes a Tau, o en péptidos /proteínas Tau modificados o truncados o en otros derivados de péptidos/monómeros proteicos de Tau, y en oligómeros de proteína Tau. "Tau soluble" excluye particularmente ovillos neurofibrilares (NFT).

40 "Tau insoluble" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau, o péptidos/proteínas semejantes a Tau, o péptidos/proteínas Tau modificados o truncados u otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son insolubles tanto in vitro en medio acuoso como in vivo en el cuerpo de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de Tau o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o derivados de éstos, que son insolubles en el cuerpo de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, respectivamente. "Tau insoluble" incluye particularmente ovillos neurofibrilares (NFT).

45 ""Tau monomérica" o "monómero de Tau" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a proteínas Tau completamente solubilizadas sin complejos agregados en medio acuoso.

50 "Tau agregada", "Tau oligomérica" y "oligómero de Tau" se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau, o péptidos/proteínas semejantes a Tau, o péptidos/proteínas Tau modificados o truncados u otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son insolubles o solubles tanto in vitro en medio acuoso como in vivo en el cuerpo de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, pero particularmente a múltiples monómeros agregados de Tau o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o derivados de éstos, que son insolubles o solubles en el cuerpo de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, respectivamente.

55 En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional de éste, o un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, según una cualquiera de las realizaciones descritas y

reivindicadas en la presente memoria, o una combinación de éstas, en una cantidad terapéuticamente efectiva junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc.

10 Los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, pueden prepararse en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable usando técnicas conocidas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención incluyendo cualesquiera anticuerpos funcionalmente equivalentes o partes funcionales de éstos, se combinan con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición terapéutica. Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc.

15 La formulación de la composición farmacéutica según la invención puede conseguirse según metodología estándar conocida para los expertos en la técnica.

20 Las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto en la forma sólida, líquida o en aerosol a una dosis farmacéuticamente efectiva adecuada. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas, y unidades de dosificación implantables. Las píldoras pueden administrarse oralmente. Las cremas terapéuticas pueden administrarse tópicamente. Las unidades de dosificación implantables pueden administrarse localmente, por ejemplo, en el sitio del tumor, o pueden implantarse para liberación sistemática de la composición terapéutica, por ejemplo, subcutáneamente. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para inyección intramuscular, subcutánea, intravenosa, intra-arterial, y formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones en aerosol incluyen formulaciones en inhalador para administración a los pulmones.

25 Las composiciones pueden administrarse por las rutas estándar de administración. En general, la composición puede administrarse por las rutas tópica, oral, rectal, nasal, interdérmica, intraperitoneal, o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, o intramuscular).

30 Además, la composición puede incorporarse en matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, implantándose los polímeros cerca de donde se desea la administración, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis única, administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y administración sostenida durante un periodo de tiempo predeterminado.

35 Una matriz de liberación sostenida, como se usa en la presente memoria, es una matriz hecha de materiales, habitualmente polímeros que son degradables por hidrólisis enzimática o ácido/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, actúan en la matriz enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida se elige de manera deseable por materiales biocompatibles tales como liposomas, poliláctidos (ácido poliláctido), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), copolímeros poliláctido co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitín, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliamino ácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno o alguno de poliláctido, poliglicólido, o poliláctido co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

40 Es muy conocido para los expertos en la técnica pertinente que la dosificación de la composición dependerá de varios factores tales como, por ejemplo, la afección que se va a tratar, la composición particular usada, y otros factores clínicos tales como peso, tamaño, sexo y condición general de salud del paciente, área corporal superficial, el compuesto o composición particular que se va a administrar, otros fármacos que se están administrando simultáneamente, y la ruta de administración.

45 La composición según la invención puede administrarse en combinación con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo tal como, por ejemplo, un compuesto conocido usado en la medicación de tauopatías y/o de amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con proteína amiloide o semejante a amiloide tales como la proteína β amiloide implicada en la Enfermedad de Alzheimer.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico por el mismo mecanismo o uno similar que la vacuna terapéutica según la invención o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

55 Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la neurotransmisión, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolina esterasa, bloqueantes de los canales de calcio, aminos biogénicas, tranquilizantes benzodiazepina, potenciadores de la síntesis, almacenamiento o liberación de acetilcolina, agonistas del receptor de acetilcolina postsináptico, inhibidores de monoamino oxidasa A ó B,

antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, antioxidantes, y antagonistas del receptor serotoninérgico.

5 En particular, el agente o compuesto biológicamente activo puede comprender al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos frente al estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de la reparación del ADN tal como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS),
 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de [beta]- y 7-secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, rompedores de lámina β , moléculas antiinflamatorias, "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil, y/o galantamina y otros fármacos y suplementos nutritivos tales como, por
 10 ejemplo, vitamina B 12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina,

La composición puede comprender niacina o memantina junto con un péptido de unión según la invención incluyendo anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Las composiciones pueden comprender además "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos incluyendo alucinaciones, delusiones, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia marcada, fracaso; tangencialidad), y comportamiento bizarro o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía, y retraimiento social, junto con los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de
 20 éstos, y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable

Otros compuestos que pueden usarse adecuadamente en composiciones además de anticuerpos según la invención, son los descritos, por ejemplo, en WO 2004/058258 (véanse especialmente las páginas 16 y 17) incluyendo dianas de fármaco terapéuticas (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanosulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores activados por un proliferador del peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes que disminuyen el colesterol (páginas 68-75); inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metales (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que incrementan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (véanse las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), pero
 30 especialmente los compuestos mencionados en las páginas indicadas anteriormente.

La materia proteinácea farmacéuticamente activa puede estar presente en cantidades entre 1 ng y 10 mg por dosis. Generalmente, el régimen de administración debe estar en el intervalo de entre 0,1 μ g y 10 mg del anticuerpo según la invención, particularmente en un intervalo 1,0 μ g a 1,0 mg, y más particularmente en un intervalo entre 1,0 μ g y
 35 100 μ g, con todos los números individuales encontrados en estos intervalos siendo también parte de la invención. Si la administración se produce a través de una infusión continua una dosificación más apropiada puede estar en el intervalo de entre 0,01 μ g y 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por hora con todos los números individuales encontrados en estos intervalos siendo también parte de la invención.

La administración será generalmente parenteral por ejemplo, intravenosa. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los disolventes no acuosos incluyen, sin estar limitado a, propilen glicol, polietilen glicol, aceite vegetal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los disolventes acuosos pueden elegirse del grupo que consiste en agua, disoluciones alcohol/agua, emulsiones o suspensiones incluyendo medio salino y tamponado. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de
 45 Ringer, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluido y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. También pueden estar presentes conservantes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender además vehículos proteináceos tales como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Pueden estar presentes agentes biológicamente activos adicionales en la composición farmacéutica de la invención dependiendo de su uso pretendido.
 50

Cuando la diana de unión está localizada en el cerebro, los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, deben atravesar la barrera hematoencefálica. Determinadas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de manera que los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos pueden introducirse fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica está intacta, existen varias estrategias conocidas en la técnica para transportar moléculas a través de ella, incluyendo; pero no limitado a, métodos físicos, métodos basados en lípidos, y métodos basados en receptores y canales.
 55

Los métodos físicos para transportar los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales o fragmento activo

de éstos a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no están limitados a, eludir la barrera hematoencefálica completamente, o crear aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de elusión incluyen, pero no están limitados a, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)) e implantar un dispositivo de administración en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers(TM), Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aperturas en la barrera incluyen, pero no están limitados a, ultrasonidos (véase, por ejemplo, Publicación de Patente U.S. No. 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1-989)), permeabilización, por ejemplo, con bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206, y 5.686.416), y transfección de neuronas que se extienden por la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el péptido de unión o fragmento de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Publicación de Patente U.S. No. 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de éstos a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no están limitados a, encapsular el péptido de unión según la invención incluyendo anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de éstos en liposomas que están acoplados con fragmentos activos de éstos que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 20020025313), y recubrir el péptido de unión según la invención incluyendo anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de éstos en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de patente U.S. No. 20040131692).

Los métodos basados en receptores y canales para transportar los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de éstos a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no están limitados a, usar bloqueantes glucocorticoides para incrementar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (por ejemplo, véase Publicaciones de Solicitud de Patente U.S. Nos. 2002/0065259, 2003/0162695, y 2005/0124533); activar canales de potasio (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2005/0089473), inhibir transportadores de fármaco ABC (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0073713); recubrir anticuerpos con una transferrina y modular la actividad del uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente No. 2003/0129186), y cationizar los anticuerpos (véase, por ejemplo, Patente U.S. No. 5.004.697).

Las administraciones únicas o repetidas de los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de éstos, o de una composición farmacéutica según la invención pueden proporcionarse a un sujeto durante un periodo de tiempo prolongado. La duración de la administración puede ser entre 1 semana y hasta 12 meses o más. Durante este tiempo, el péptido de unión, anticuerpo o composición farmacéutica pueden administrarse una vez a la semana, una vez cada dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, etc, o a una frecuencia mayor o menor dependiendo de las necesidades del sujeto que se va a tratar.

En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos ex vivo, composiciones para uso en métodos in situ y kits para la detección y diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con proteína tau, incluyendo enfermedades o trastornos neurodegenerativos tales como tauopatías que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la coexistencia de patologías tau y amiloide incluyendo, pero no limitado a, Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Greutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, Síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral por proteína de prión, daño cerebral traumático y enfermedades o trastornos adicionales que no muestran una patología amiloide clara incluyendo, pero no limitado a, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no Guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con gránulos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos predominantes, Parkinsonismo Postencefálico, Distrofia miotónica. Las anomalías patológicas pueden estar causadas por o asociadas con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en tauopatía.

Además, la presente invención proporciona métodos ex vivo, composiciones para uso en métodos in situ y kits para diagnosticar una predisposición a enfermedades, trastornos o afecciones asociados con proteína tau, incluyendo enfermedades o trastornos neurodegenerativos tales como tauopatías que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la coexistencia de patologías tau y amiloide, o para monitorizar enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, o una composición según la invención y como se describe en la presente memoria. Estos métodos incluyen métodos inmunológicos conocidos usados comúnmente para detectar o cuantificar sustancias en muestras biológicas o en una afección in situ.

El diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a proteína tau o de una predisposición a una enfermedad o afección asociada a proteína tau en un sujeto que lo necesita, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano incluyendo enfermedades o trastornos neurodegenerativos tales como tauopatías que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la coexistencia de patologías tau y amiloide, puede conseguirse detectando la unión inespecífica de un anticuerpo, particularmente de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo de éste, a un epítipo de la proteína tau en una muestra o in situ, que incluye poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína tau con un anticuerpo que se une a un epítipo de la proteína tau, permitir que el anticuerpo se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la muestra o parte o área corporal específica, opcionalmente comparar la cantidad del complejo inmunológico con un valor control normal, en el que un incremento en la cantidad del complejo inmunológico comparado con un valor control normal indica que el sujeto padece o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína tau.

La monitorización de enfermedad residual mínima en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano, después de tratamiento con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, o una composición según la invención puede conseguirse detectando la unión inespecífica de un anticuerpo, particularmente de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo de éste a un epítipo de la proteína tau en una muestra o in situ, que incluye poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína tau con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, que se unen a un epítipo de la proteína tau, permitir que los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos se unan a la proteína tau para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la muestra o parte o área corporal específica, opcionalmente comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal, en el que un incremento en la cantidad de dicho complejo inmunológico comparado con un valor control normal indica que el sujeto todavía padece una enfermedad residual mínima.

La predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano, a un tratamiento con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, o una composición según la invención puede conseguirse detectando la unión inespecífica de un anticuerpo, particularmente de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo de éste a un epítipo de la proteína tau en una muestra o in situ, que incluye poner en contacto la muestra o una parte corporal o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína tau con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, que se unen a un epítipo de la proteína tau, permitir que los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos se unan a la proteína tau para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la muestra o parte o área corporal específica, opcionalmente comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento, en el que una disminución en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que dicho paciente tiene un alto potencial de capacidad de respuesta al tratamiento.

Las muestras biológicas que pueden usarse en el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con la proteína tau, para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con la proteína tau, incluyendo enfermedades o trastornos neurodegenerativos tales como tauopatías que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la coexistencia de patologías tau y amiloide, o para monitorizar enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, o una composición según la invención y como se describe en la presente memoria son, por ejemplo, fluidos tales como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, mucosa, fluido cerebroespinal, fluido linfático y semejantes o muestras de tejido o células obtenidas de un organismo tal como tejido neural, cerebral, cardíaco o vascular. Para determinar la presencia o ausencia de la proteína tau en una muestra, puede usarse cualquier inmunoensayo conocido para los expertos en la técnica tal como, por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirectos que usan reactivos secundarios para la detección, ensayos ELISA y de inmunoprecipitación y aglutinación. Una descripción detallada de estos ensayos, se proporciona, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612, WO96/13590 de Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y WO96/29605.

Para el diagnóstico in situ, los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos o cualquier parte activa y funcional de éstos puede administrarse al organismo que se va a diagnosticar por métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, inyección intravenosa, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial de manera que pueda ocurrir una unión específica entre un anticuerpo según la invención con una región epitópica en la proteína amiloide. El complejo péptido de unión/antígeno puede detectarse convenientemente mediante un marcador unido al péptido de unión según la invención incluyendo anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento funcional de éstos o cualquier otro método de detección conocido en la técnica.

Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico o en aplicaciones para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada con proteína tau, incluyendo enfermedades o trastornos neurodegenerativos tales como tauopatías que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedades o trastornos que muestran la coexistencia de patologías tau y amiloide, o para monitorizar enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, o una composición según la invención y como se describe en la presente memoria se basan típicamente en antígenos, péptidos de unión, o reactivos secundarios marcados para la detección. Estas proteínas o reactivos pueden marcarse con compuestos conocidos generalmente para los expertos en la técnica incluyendo enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas incluyendo, pero no limitado a partículas coloreadas, tales como oro coloidal y lechos de látex. De éstos, el marcaje radiactivo puede usarse para casi todos los tipos de ensayos y con muchas variaciones. Los marcadores conjugados con enzima son particularmente útiles cuando debe evitarse la radiactividad o cuando se necesitan resultados rápidos. Los fluorocromos, aunque requieren un equipo más costoso para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los péptidos de unión útiles en estos ensayos son los descritos y reivindicados en la presente memoria incluyendo anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Alternativamente, los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, pueden marcarse indirectamente por reacción con sustancias marcadas que tienen una afinidad para inmunoglobulina, tal como proteína A o G o anticuerpos secundarios. Los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, pueden conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia marcada que tienen una afinidad para la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de éstos, pueden conjugarse con biotina y el conjugado péptido de unión/biotina detectarse usando avidina o estreptavidina marcada. De manera similar, los anticuerpos pueden conjugarse con un hapteno y el conjugado péptido de unión/hapteno detectarse usando péptido de unión anti-hapteno marcado.

Los expertos en la técnica conocerán éstos y otros marcadores adecuados que pueden emplearse según la presente invención. La unión de estos marcadores a péptidos de unión o fragmentos de éstos puede conseguirse usando técnicas estándar conocidas comúnmente para los expertos en la técnica. Las técnicas típicas se describen por Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), y Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 (Clin. Chim Acta 57:1-40). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en el último son el método de glutaraldehído, el método de peróxido, el método de dimaleimida, y otros.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de doble anticuerpo para detectar la presencia de un analito, en el que, el anticuerpo se marca indirectamente por reactividad con un segundo anticuerpo que se ha marcado con un marcador detectable. El segundo anticuerpo es preferiblemente uno que se une a anticuerpos del animal del que deriva el anticuerpo monoclonal. En otras palabras, si el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de ratón, el segundo anticuerpo marcado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo que se va a usar en el ensayo descrito en la presente memoria, este marcador es preferiblemente un lecho recubierto de anticuerpo, particularmente un lecho magnético. Para el anticuerpo que se va a emplear en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, el marcador es preferiblemente una molécula detectable tal como una sustancia radiactiva, fluorescente, electroquimioluminiscente.

Un sistema alternativo de doble anticuerpo, referido frecuentemente como sistemas de formato rápido porque están adaptados a determinaciones rápidas de la presencia del analito, también pueden emplearse en el alcance de la presente invención. El sistema requiere una alta afinidad entre el anticuerpo y el analito. La presencia de la proteína amiloide puede determinarse usando una pareja de anticuerpos, cada uno específico para proteína amiloide. Una de dichas parejas de anticuerpos se refiere en la presente memoria como un "anticuerpo detector" y el otro de dicha pareja de anticuerpos se refiere en la presente memoria como un "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede usarse como un anticuerpo de captura o un anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención también puede usarse tanto como anticuerpo de captura como detector, conjuntamente en un único ensayo.

Así, el método sandwich de doble anticuerpo puede usarse para detectar proteína amiloide en una muestra de un fluido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) se pone como un sandwich entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, estando inmovilizado el anticuerpo de captura de manera irreversible en un soporte sólido. El anticuerpo detector contendrá un marcador detectable, con el fin de identificar la presencia del sandwich anticuerpo-analito y así la presencia del analito.

Las sustancias de fase sólida ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, placas de microtitulación, tubos de ensayo de poliestireno, lechos magnéticos, de plástico o vidrio y portaobjetos que con muy conocidos en el campo de los radioinmunoensayos e inmunoensayos enzimáticos. Los métodos para acoplar anticuerpos a fases sólidas también son muy conocidos para los expertos en la técnica. Más recientemente, se han empleado como soportes sólidos varios materiales porosos tales como nilón, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para detectar la proteína tau en una muestra biológica que comprende una composición como se ha definido anteriormente. Además, la presente invención se refiere al último kit de diagnóstico que, además de una composición como se ha definido anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se ha definido anteriormente. El término "kit de diagnóstico" se refiere en general a cualquier kit de diagnóstico conocido en la técnica. Más específicamente, el último término se refiere a un kit de diagnóstico como se describe en Zrein et al. (1998).

Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevas inmunosondas y kits de ensayo para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con proteína tau, que comprenden anticuerpos según la presente invención. Para inmunosondas, los péptidos de unión se unen directamente o indirectamente a una molécula informadora adecuada, por ejemplo, una enzima o un radionúclido. El kit de ensayo incluye un contenedor que alberga uno o más anticuerpos según la presente invención e instrucciones para usar los anticuerpos para el propósito de unirse a antígeno tau para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de manera que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de la proteína tau.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Generación y cribado de hibridomas y anticuerpos

El objetivo de este estudio fue generar y cribar mAb anti-Tau (anticuerpos monoclonales). Se generaron hibridomas por fusión de bazo de ratones inmunizados con vacuna tau con una línea celular de mieloma. Los hibridomas se evaluaron para reactividad frente a proteína Tau de longitud completa tanto fosforilada como no fosforilada, así como los péptidos antigénicos Tau fosforilados y no fosforilados usados en la preparación de la vacuna. También se realizó el cribado de los hibridomas para reactividad del sobrenadante de los hibridomas para ovillos tau usando inmunohistoquímica en secciones de cerebro de ratones transgénicos para Tau.

1.1 Métodos

1.1.1 Fusión

Un ratón de tipo salvaje C57BL/6 vacunado con ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) se usó para producción de hibridoma. El ratón se reforzó con vacuna ACI-33 en el día 0 después de nuevo en el día 4 y la fusión se realizó en el día 7. Se fusionaron 173×10^6 (ACI-33), esplenocitos del ratón inmunizado con células de mieloma SP2-O-Ag14 a una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

Un ratón de tipo salvaje C57BL/6 vacunado con ACI-35 (Tau393-408 [pS396, pS404]) se usó para producción de hibridoma. El ratón se reforzó con vacuna ACI-35 en el día 0 después de nuevo en el día 4 y la fusión se realizó en el día 7. Se fusionaron 6×10^7 (ACE-35), esplenocitos del ratón inmunizado con 2×10^7 células de mieloma SP2-O-Ag14 a una proporción de 3 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

Un ratón de tipo salvaje C57BL/6 vacunado con ACI-36 (Tau401-418 [pS404/S409]) se usó para producción de hibridoma. El ratón se reforzó con vacuna ACI-36 en el día 0 después de nuevo en el día 4 y la fusión se realizó en el día 7. Se fusionaron 84×10^6 esplenocitos del ratón inmunizado con células de mieloma SP2-O-Ag14 a una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

Un ratón de tipo salvaje C57BL/6 vacunado con ACI-41 (mezcla de Tau206-221 [pT212/pS214] y Tau196-211 [pS202/pT205]) se usó para producción de hibridoma. El ratón se reforzó con vacuna ACI-41 en el día 0 después de nuevo en el día 4 y la fusión se realizó en el día 8. Se fusionaron 162×10^6 esplenocitos del ratón inmunizado con células de mieloma SP2-O-Ag14 a una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

Las cuatro fusiones resultaron en 8 placas de 96 pocillos y los clones se nombraron según la placa (1-8) después la fila (A-G) y finalmente la columna (1-12).

1.1.2 Método de cribado para seleccionar clones

Las 8 placas de 96 pocillos se cribaron en primer lugar dos veces para expresión de IgG. Los clones con expresión positiva se transfirieron a placas de 24 pocillos y los sobrenadantes de las células (=clones) de las células en crecimiento se ensayaron en un cribado de Tau por ELISA y un cribado por inmunohistoquímica, TAUPIR. Los sobrenadantes positivos en ELISA y/o TAUPIR se transfirieron a matraces T25 y los clones se cribaron de nuevo para expresión de IgG en un cribado de Tau por ELISA y cribado por TAUPIR.

1.1.3 Cribado de IgG

Las placas de Elisa se recubrieron con 50 ul/pocillo de anticuerpo anti-IgG de ratón (CER Groupe, Marloie, Bélgica) en tampón de recubrimiento durante 16 hrs a 4°C. Después de lavar las placas con PBS/Tween se aplicaron 100 ul/pocillo de una disolución bloqueante durante 1 hr a RT. Se incubaron 50 ul de sobrenadante de hibridoma no diluido durante 1 hr a RT. Después de una etapa de lavado, se aplicó una mezcla de anti-IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de ratón conjugado con Peroxidasa de Rábano (HRP) (Ab Serotec, Raleigh, NC, EEUU) a las placas durante 1 hr a

RT. Después de un lavado final, la detección se realizó con TMB (3-3',5,5'-tetrametilbenzidina), el sustrato fosfatasa para HRP, y las placas se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica).

1.1.4 Cribados de hibridomas para Tau por ELISA

- 5 El cribado de hibridomas por ELISA se realizó en péptido pTau (ACI-33, T1.5: Tau5-20 [pY18]; ACI-35, T3.5: Tau393-408[pS396/pS404]; ACI-36, T4.5: Tau401-418 [pS404/S409]; ACI-41, T8.5: Tau206-221 [pT212/pS214] y T9.5: Tau196-211 [pS202/pT205] PolyPeptide Laboratories, Hillerød, Dinamarca), correspondientes al péptido Tau (ACI-33, T1.6: Tau5-20; ACI-36, T4.6: Tau401-4; ACI-41, T8.6: Tau206-221 y T9.6: Tau196-211, PolyPeptide Laboratories, Hillerød, Dinamarca), proteína Tau de longitud completa fosforilada (441 aa) (proteína pTau, Vandebroek et al., 2005) y proteína Tau de longitud completa (441aa) (proteína Tau, SignalChem, Richmond, Canadá). Finalmente, se usó Albúmina de Suero Bovino (BSA) como control negativo.

- 15 Las placas se recubrieron con 10 µg/ml del péptido Tau correspondiente y 1 µg/ml de proteína Tau correspondiente toda la noche a 4°C. Después de lavar cada pocillo con PBS-0,05% Tween 20 y bloquear con 1% BSA en PBS-0,05% Tween 20, se añadieron el sobrenadante de hibridoma no diluido o control negativo de medio a las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Después de lavar, las placas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG total de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EEUU) durante 2 horas a 37°C. Después de lavar, las placas se incubaron con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato fosfatasa para AP, y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica).

- 20 1.1.5 Cribado de hibridoma por IHC: unión de anticuerpos anti-Tau a ovillos en secciones de cerebro de ratones transgénicos (TAUPIR)

Los experimentos TAUPIR se hicieron según el protocolo del EJEMPLO 3.1.2.

1.1.6 Cribado de IgG en matraces T25

- 25 Las placas Elisa se recubrieron con 5µg/ml de anticuerpo específico anti-fragmento F(ab')₂ de IgG de ratón (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EEUU) en tampón de recubrimiento carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Sigma, Buchs, Suiza) toda la noche a 4°C. Después de lavar las placas, se incubaron sobrenadante de hibridoma no diluido, anticuerpo IgG1 control positivo (6E10 a 1µg/ml: Covance, Emeryville, CA, EEUU) o control negativo (medio de cultivo solo) durante 1 hr a RT. Después de una etapa de lavado, se incubó el anticuerpo secundario específico anti-fragmento Fcy de IgG de ratón de cabra (subclases 1+2a+2b+3) conjugado con AP (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EEUU) en las placas durante 2 hrs a 37°C. Después de un lavado final, la detección se realizó con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato fosfatasa para AP, y las placas se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica).

1.2 Resultados

1.2.1 Hibridomas ACI-33

- 35 Los sobrenadantes de células de las 8 placas de 96 pocillos que resultan de la fusión se cribaron para producción de IgG. En los 768 pocillos (8x96 pocillos) ensayados, 277 pocillos fueron positivos para expresión de IgG y se transfirieron a placas de 24 pocillos. En las placas de 24 pocillos, 79 clones se crecieron y el sobrenadante de estas células se analizaron. Los clones positivos se transfirieron además a matraces T25 y los sobrenadantes se cribaron para producción de IgG, ELISA y TAUPIR (Tabla 2).

El clon 6C10 fue el único positivo en los 3 cribados y se seleccionó para subclonación.

- 40 1.2.2 Hibridomas ACI-36

- 45 Los sobrenadantes de células de las 8 placas de 96 pocillos que resultan de la fusión se cribaron para producción de IgG. En los 768 pocillos (8x96 pocillos) ensayados, 333 pocillos fueron positivos para expresión de IgG y se transfirieron a placas de 24 pocillos. En las placas de 24 pocillos, 75 clones se crecieron y el sobrenadante de estas células se analizaron. Los clones positivos se transfirieron además a matraces T25 y los sobrenadantes se cribaron para producción de IgG, ELISA y TAUPIR (Tabla 3).

- 50 Con el fin de seleccionar clones para las siguientes etapas, se realizó una clasificación de todos los sobrenadantes positivos para los cribados IgG/ELISA/TAUPIR tomando como base los resultados ELISA y TAUPIR. La clasificación de los resultados ELISA y TAUPIR se realizó como se explica en la sección de métodos. La tinción TAUPIR fue casi idéntica para los cinco primeros clones y esto se correspondió con los resultados ELISA. 4C12 se desechó ya que se encontró en la misma placa que 4C1 lo que incrementó la probabilidad de que los 2 clones fueran el mismo (que reconocen el mismo epitopo). Los 4 mejores clones seleccionados fueron 3A8, 2B6, 4C1 y 6H1. Los otros 6 clones (4C12, 2G1, 2F9, 7D6, 3B9, 4E12) se mantuvieron como apoyo.

Se realizó una clasificación de los 10 clones que mostraron positividad en el cribado ELISA y cribado TAUPIR para seleccionar los mejores (Tabla 4). En gris se resaltan los 5 mejores clones.

1.2.3 Hibridomas ACI-41

5 Los sobrenadantes de células de las 8 placas de 96 pocillos que resultan de la fusión se cribaron para producción de IgG. En los 768 pocillos (8x96 pocillos) ensayados, 215 pocillos fueron positivos para expresión de IgG y se transfirieron a placas de 24 pocillos. En las placas de 24 pocillos, 81 clones se crecieron y el sobrenadante de estas células se analizaron. Los clones positivos se transfirieron además a matraces T25 y los sobrenadantes se cribaron para producción de IgG, ELISA y TAUPIR (Tabla 5).

Los clones 5D10 y 7C2 fueron los únicos positivos en los 3 cribados y se seleccionaron para subclonación. El clon 5D10 sólo se une al péptido T8.5, mientras el clon 7C2 se une a los dos péptidos de la vacuna ACI-41 (T8.5 y T9.5) (véase la Figura 10 en la solicitud PCT PCT/EP2010/054418).

10 El subclon 5D10A4 que se origina de 5D10 fue específico para el péptido pTau.

1.3. Conclusión

Los anticuerpos generados han mostrado una alta especificidad para péptidos pTau con unión sólo marginal a péptidos no fosforilados.

15 A partir de las 4 fusiones (ACI-33, ACI-36, ACI-35 y ACI-41), se depositaron un total de 16 clones en DSMZ (tabla 1) y se seleccionaron para subclonación adicional.

Los clones madre positivos mencionados anteriormente se cultivaron adicionalmente en placas de 96 pocillos, después placas de 24 pocillos y finalmente en matraces T25. En cada etapa, los sobrenadantes de los clones de hibridoma se cribaron por ELISA, Taupir y Transferencia Western.

EJEMPLO 2: Clonación de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos

20 Se clonaron los genes de la región variable de cadena pesada y ligera de anticuerpo de las células de hibridoma y se determinaron las secuencias de ADN y la localización de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) así como las características de unión de los anticuerpos.

Se preparó ARN total de 3×10^6 células de hibridoma (1 vial) usando el mini kit Qiagen RNeasy (No de Cat: 74104). El ARN se eluyó en 50mL de agua y se evaluó en un gel de agarosa al 1,2%.

25 Se prepararon los ADNc de V_H y V_K usando transcriptasa inversa con cebadores de región constante de IgG y kappa. Los ADNc de primera cadena se amplificaron por PCR usando un conjunto grande de cebadores de secuencia señal. Los ADNc amplificados se purificaron por gel y se clonaron en el vector pGem[®] T Easy (Promega). Los clones de V_H y V_K obtenidos se cribaron para insertos del tamaño esperado. La secuencia de ADN de los clones seleccionados se determinó en ambas direcciones por secuenciación de ADN automatizada. Las localizaciones de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en las secuencias se determinaron con referencia a otras secuencias de anticuerpo (Kabat EA et al., 1991).

EJEMPLO 3: Estudios de unión I

35 El objetivo fue medir la unión a fofo-Tau (pTau) de los anticuerpos generados a partir de hibridomas subclonados derivados de ratones inmunizados con las vacunas tau liposomales. Para ensayar esto, se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para medir la unión de los anticuerpos purificados tanto a proteína Tau de longitud completa fosforilada como no fosforilada, así como los péptidos antigénicos Tau fosforilados y no fosforilados usados para la preparación de la vacuna liposomal.

40 El cribado se completó por otros dos métodos. Se hizo inmunohistoquímica (IHC) en secciones de cerebro de un animal transgénico para Tau (TAUPIR) usando un anticuerpo anti-tau como el anticuerpo primario. Además, se realizó una transferencia western (WB) en homogenados de proteína de cerebro de ratones transgénicos para Tau, usando un anticuerpo anti-tau como el anticuerpo de ensayo.

3.1 Métodos

3.1.1 Ensayo de unión a fosfo-Tau

45 Los anticuerpos anti-fosfo Tau (de ratón isotipo IgG3) se generaron a partir de ratones vacunados con tau liposomal. Las vacunas liposomales son preparaciones fosforiladas de un péptido fosfo-Tau (pTau). Los sub- clones de hibridoma que producen los anticuerpos anti-tau se seleccionaron por dilución limitante a partir de los clones madre. El isotipado se hizo para indicar la presencia de un clon de isotipo único. Los anticuerpos se produjeron en botellas de cultivo rotatorias, se purificaron por cromatografía de afinidad, se sometieron a filtración estéril en 0.22 μ m, y se cuantificaron. Para ensayar la unión del anticuerpo a Tau y pTau, se usó un ensayo ELISA. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 1 μ g/mL de proteína Tau de longitud completa (441 aa) (SignalChem, Richmond, Canadá) o proteína Tau de longitud completa fosforilada (441 aa) (Vandebroek et al., 2005). Además, las placas se recubrieron con 10 μ g/mL del péptido derivado de Tau. Para

ensayar la reactividad cruzada a secuencias Tau y pTau que no se usaron en la preparación de vacuna, las placas se recubrieron con 10 µg/mL de los péptidos siguientes: Tau5-20 (fosforilado o no en Y18), Tau393-408 (fosforilado o no en S396 y S404), Tau401-418 (fosforilado o no en S404 y S409), Tau206-221 (fosforilado o no en T212 y S214), y Tau196-211 (fosforilado o no en S202 y T205). El recubrimiento se hizo toda la noche en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C. Las placas se lavaron concienzudamente con 0,05% Tween20/PBS y se bloquearon con 1% albúmina de suero bovino (BSA) en 0,05% Tween20/PBS durante 1 hr a 37°C. El anticuerpo que se está ensayando se añadió en una serie de 8 ó 16 diluciones de dos veces entre 20 y 0 µg/mL, y se dejó incubando durante 2 hr a 37°C. Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente, y se añadió anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, Inglaterra) a una dilución 1/6.000 en 0,05% Tween20/PBS durante 2 hr a 37°C. Después de lavar, las placas se incubaron con disolución de sustrato fosfatasa p-nitrofenil fosfato disodio hexahidrato (pNPP; Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza), y se leyó a 405 nm después de una incubación de 2 ó 16 hr usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como densidad óptica (D.O.).

3.1.2 Unión de anticuerpo anti-Tau a ovillos de Tau en secciones de cerebro de un animal transgénico para Tau (TAUPIR)

Las secciones de cerebro usadas fueron de ratones transgénicos viejos (>18 meses de edad) doble transgénicos biGT (ratones transgénicos GSK-3β cruzados con ratones TPLH, que contienen la isoforma más larga (441 aa) de Tau humana con la mutación P301L). Además, también se usaron secciones de ratones con Tau inactivada (TKO; 6 meses de edad). Las secciones de cerebro se lavaron durante 5 min en PBS y se incubaron durante 15 min a RT en 1,5% H₂O₂ en PBS:MeOH (1:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Después de lavar las secciones 3 veces en PBST (PBS/0,1% TritonX100) se incubaron durante 30 min a RT en disolución de bloqueo PBST+10% FCS (suero de ternera fetal). La incubación con el anticuerpo anti-Tau que se está ensayando se hizo toda la noche a 4°C a las diluciones indicadas en PBST/10% FCS. Las secciones se lavaron a continuación 3 veces en PBST antes de incubarlo con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (adquirido en Dako, Glostrup, Dinamarca) en PBST/10% FCS durante 1 hora a RT. Antes de la detección, las secciones se lavaron 3 veces con PBST y se incubaron en 50 mM Tris/HCl pH7,6 durante 5 min. La detección se hizo incubando las secciones durante 3 min en Diaminobenzidina (DAB: 1 comprimido en 10 ml de 50 mM Tris.HCl + 3 ul H₂O₂ 30%; MP Biomedicals, Solon, OH, EEUU). La reacción se paró lavando las secciones 3 veces en PBST. Las secciones se transfirieron a placas de vidrio silanizadas y se secaron al aire en placa calefactora a 50°C durante 2 horas. La contratinción se hizo usando incubación con hematoxilina de Mayers (Fluka Chemie, Buchs, Suiza) durante 1 min, seguido de una etapa de lavado durante 4 min en agua del grifo. Las secciones se deshidrataron pasándolas en 50%, 70%, 90% y dos veces en 100% baño de etanol y después en Xilol 2 veces durante 1 min. Finalmente, las secciones se montaron con DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra) en cubreobjetos de vidrio.

Además, los sobrenadantes de hibridoma a una dilución 1/10 (todos los anticuerpos derivados de ACI-35 mostrados en la Tabla 1) se usaron para ensayar membranas que contienen proteínas de homogenado de cerebro separadas por SDS-PAGE de ratones transgénicos para Tau, ratones de tipo salvaje, o ratones inactivados para Tau.

3.1.3. Unión de anticuerpo anti-Tau a ovillos de Tau en secciones de cerebro de pacientes con AD y tauopatía (TAUPIR)

El ensayo para la inmunoreacción del anticuerpo anti-pTau ACI-36-3A8-Ab1 a pTau en cerebro humano se hizo por TAUPIR. Se desparafinaron secciones de cerebro en parafina pasándolas en Xilol 2 veces durante 5 min y 2 veces durante 1 min en 100% EtOH, seguido de un lavado de 1 min en 90%, 70%, y 50% EtOH y agua destilada, seguido de 2 veces de lavados de 5 min en PBS. Para la recuperación del antígeno, las secciones se trataron calentándolas durante 10 min en disolución de ácido cítrico 0,01 M en agua (pH 6,0) y enfriándolas durante 20 min. Las secciones se incubaron durante 15 min a RT en 1,5% H₂O₂ en PBS:MeOH (1:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Después de lavar las secciones 3 veces en PBST (PBS/0,05 Tween-20), se incubaron durante 30 min a RT en PBST + 10% suero de ternera fetal (FCS) como disolución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo primario anti-pTau ACI-36-3A8-Ab1 (410 ng/mL en tampón de bloqueo) se hizo toda la noche a 4°C. Las secciones se lavaron a continuación 3 veces en PBST antes de incubarlo con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido 1/500 en PBST/10% FCS durante 1 hora a RT. Antes de la detección, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron en 50 mM Tris/HCl pH 7,6 durante 5 min. La detección se hizo incubando las secciones durante 3 min en diaminobenzidina (DAB: 1 comprimido en 10 ml de 50 mM Tris-HCl + 3 µL H₂O₂ 30%; MP Biomedicals, Solon, OH, EEUU). La reacción se paró lavando las secciones 3 veces en PBS. La contratinción se hizo incubando con hematoxilina de Mayer (Fluka Chemie, Buchs, Suiza) durante 1 min, seguido de lavado durante 4 min en agua del grifo. Las secciones se deshidrataron pasándolas a través de 50%, 70%, 90% y dos veces en 100% baños de etanol, seguido de Xilol 2 veces durante 1 min.

Finalmente, las secciones se montaron con DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra) bajo cubreobjetos de vidrio. Las secciones teñidas se examinaron por microscopía de luz blanca y se tomaron imágenes digitales con una cámara 3CCD (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se capturaron y analizaron usando software especializado (IM500, Leica). Las imágenes se muestran con un aumento 20x1,6.

3.1.4. Transferencia Western (WB)

La unión del anticuerpo de ensayo a pTau en el extracto de cerebro de animal transgénico se hizo por WB. La homogeneización del cerebro de ratones de tipo salvaje FVB, TPLH, biGT y TKO se hizo en el tampón siguiente: 25 mM Tris/HCl pH7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 30 mM NaF, 0,2 mM Na₃VO₄, 1 nM Ácido okadaico, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 5 mM Na₄P₂O₇, 1 comprimido de mezcla completa de inhibidores de proteasa (CPIC) por 12 ml en total. Para obtener homogenado de cerebro total el cerebro se homogeneizó en hielo en 1 vol / peso de hemisferio (ml / g) con un tubo de vidrio semejante a homogeneizador con motor / émbolo de teflón a 700 rpm. Los homogenados de cerebro total se diluyeron a la mitad en tampón de muestra (125 mM Tris/HCl pH6,8, 4% (p/v) dodecil sulfato de sodio (SDS), 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol y 5% beta-mercapto-etanol), y se calentó rápidamente hasta 95°C. Las muestras se mantuvieron 5 min, se diluyeron ¼ en tampón de muestra, se calentaron de nuevo hasta 95°C y se enfriaron y centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min para aclarar los restos celulares que no se solubilizaron. Los sobrenadantes se recogieron y se cargaron en un gel de SDS-PAGE. La transferencia a membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL) se hizo en tampón de transferencia (25 mM Tris pH 8,6, 190 mM Glicina, 20% metanol). Las membranas se transfirieron a la disolución de bloqueo (0,1% Tween en TBS (50 mM Tris.HCl, pH7,6, 150 mM NaCl, y 5% polvo de leche en polvo) antes de incubación toda la noche a 4°C con el anticuerpo de ensayo diluido en la disolución de bloqueo. La incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido 1/10.000 en disolución de bloqueo se realizó a RT durante 1 hora. La detección se hizo usando los Reactivos de Detección de Transferencia Western ECI de GE Healthcare.

3.2 Resultados

3.2.1 Ensayos ELISA y TAUIR usando secciones de cerebro de ratones transgénicos para Tau positivos para ovillos

La unión de los anticuerpos se midió frente al péptido Tau fosforilado usado como el inmunógeno, y frente a la proteína Tau humana de longitud completa fosforilada. Ésta es la isoforma más larga de proteína Tau humana que consiste en 441 aminoácidos. También se incluyeron el péptido y proteína Tau humana de longitud completa no fosforilados correspondientes. Como se indica en la tabla 6 los anticuerpos demostraron una alta unión al péptido Tau fosforilado, con una unión sólo limitada o ausencia de ésta a la proteína Tau humana de longitud completa fosforilada. No se observó unión al péptido Tau no fosforilado o a la proteína Tau humana de longitud completa no fosforilada correspondientes. Esto demuestra una alta unión de anticuerpos anti-tau a los péptidos Tau humanos fosforilados.

Para ensayar la unión no específica a otras secuencias Tau fosforiladas y no fosforiladas, el anticuerpo se ensayó para unión a cinco péptidos Tau fosforilados y no fosforilados uno de los cuales se usó como la secuencia de péptido antigénico. No se observó reactividad cruzada a péptidos Tau fosforilados o no fosforilados, aparte del péptido usado en la vacuna, incluso a altas concentraciones de péptido.

La unión de anticuerpos anti-tau a pTau en cerebros de ratones transgénicos para Tau se evaluó por tinción TAUIR (Figura 1) y por WB (Figura 1). Los anticuerpos demostraron unión a ovillos de Tau y fibrillas de neuropilema presentes en la corteza e hipocampo en cerebros de ratones transgénicos para Tau (biGT). Las diluciones de anticuerpo usadas para el TAUIR variaron de 0,05 a 0,0033 ug/mL. También se usaron anticuerpos anti-tau como un anticuerpo primario en una WB usando homogenados de cerebro total de ratones de tipo salvaje FVB, TPLH, biGT y TKO, y se separaron por SDS-PAGE. Se usaron como controles dos anticuerpos anti-pTau comerciales, MC1 y Tau5. Todos los anticuerpos anti-tau se unieron a pTau presente en los cerebros de ratones transgénicos para Tau. Ensayo

En las membranas que contenían homogenados de proteína separados por SDS-PAGE de ratones transgénicos para Tau, ratones de tipo salvaje, y ratones con Tau inactivada, todos los anticuerpos ACI-35 (descritos en la Tabla 1) se unieron a bandas de proteína que tenían un patrón de migración a 46 kDa idéntico a Tau y pTau (datos no mostrados).

3.2.2 Estudio TAUIR en secciones de cerebro de pacientes con AD y tauopatía

La capacidad del anticuerpo ACI-36-3A8-Ab1 para unirse a agregados de Tau, alojados en secciones de cerebro humano de sujetos con tauopatías diagnosticadas, incluyendo AD, FAD, AGD, FTDP-17, CBD, y PSP, se examinó por inmunohistoquímica TAUIR (Figura 2). El anticuerpo anti-pTau ACI-36-3A8-Ab1 se unió a ovillos neurofibrilares que contienen pTau (NFT), fibrillas de neuropilema en secciones de cerebro humano, y otras formas de acumulaciones de pTau presentes en neuronas y tipos de células gliales. Más específicamente, ACI-36-3A8-Ab1 tiñó de manera prominente NFT, fibrillas de neuropilema, y neuritas distróficas que rodeaban placas amiloides de cerebros AD, lo que fue fácilmente aparente en los sujetos diagnosticados con AD y FAD. En secciones de cerebro de AGD, ACI-36-3A8-Ab1 tiñó tanto NFT como fibrillas de neuropilema, siendo visibles múltiples granos/gránulos argirofílicos (Figura 2,). La tinción de secciones de cerebro de PSP con ACI-36-3A8-Ab1 mostró NFT, fibrillas de neuropilema, y neuritas distróficas. Además, los astrocitos positivos para inclusiones semejantes a cuerpos de Pick y pTau en penacho se detectaron claramente, siendo una característica abundante en PSP, donde la tinción de pTau

se extiende a lo largo de la célula, incluyendo en procesos distales. En FTDP-17, el patrón de tinción también ilustró la heterogeneidad conocida de la enfermedad, detectándose no sólo NFT sino también neuronas acromáticas "hinchadas". El anticuerpo ACI-36-3A8-Ab1 también tiñó neuronas acromáticas hinchadas que eran débilmente positivas para Tau, la principal característica de CBD. Otra característica patológica importante de CBD, es decir inclusiones oligodendrogiales, denominadas cuerpos enrollados, también se detectaron bien por el anticuerpo ACI-36-3A8-Ab1. No se detectó tinción en un sujeto control negativo para AT8 mientras se identificó una tinción débil en un sujeto control positivo para AT8.

Usando TAUPIR en secciones de cerebro humano de sujetos diagnosticados previamente con diferentes formas de tauopatía, el anticuerpo anti-pTau ACI-36-3A8-Ab1 demostró una buena unión a varias características patológicas conocidas ricas en pTau presentes en los cerebros de estos sujetos.

EJEMPLO 4: Estudios de unión II

El objetivo del estudio fue determinar la afinidad de unión entre los anticuerpos anti-tau y el fosfo-péptido tau usando Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). El fosfo-péptido tau corresponde a la secuencia de péptido usada en la preparación de la vacuna para generar el anticuerpo anti-tau. Para estudiar esta interacción, los fosfopéptidos se inmovilizaron en la superficie de un chip sensor y la unión se monitorizó en tiempo real usando SPR cuando el anticuerpo pasa sobre el chip.

4.1 Métodos

4.1.1 Ensayo de unión SPR

Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un instrumento Biacore X (GE Healthcare). Los reactivos para la inmovilización (EDC, NHS y Etanolamina), chip sensor CM5 (carboximetil dextrano) así como el tampón de corrida HBS-EP se adquirieron en GE Healthcare. El fosfo-péptido tau se solubilizó en tampón PBS / acetato de sodio (10 mM, pH 5,0) en una proporción 1:1 (v/v) para proporcionar una concentración final de péptido de 250 µg/ml. Esta disolución de péptido se acopló a una celda de flujo (fc) 2 de un chip sensor CM5 que se preactivó usando EDC/NHS. Después del acoplamiento, se pasó etanolamina sobre la superficie y proporcionando un nivel de inmovilización final de 218 RU. Se ensayaron cinco concentraciones de los anticuerpos anti-tau por diluciones seriadas usando tampón de corrida. Las inyecciones se realizaron empezando a partir de la concentración más baja y se pasaron tanto sobre fc 1 como 2 a una velocidad de flujo de 30 µL/min durante 180 s. La celda de flujo 1 no estaba derivatizada y las respuestas se restaron de fc 2 para corregir para ruido del instrumento y cambios refractarios brutos. Después de terminar la inyección, las superficies se lavaron inmediatamente con tampón de corrida durante 300 s. Para eliminar anticuerpo unido remanente del chip, se realizó regeneración de la superficie inyectando un pulso (típicamente 3 µl) de 8 mM NaOH en agua que contenía 1M NaCl. El análisis cinético se realizó usando algoritmos para integración numérica y análisis global usando BIAevaluation 3.0. Los sensogramas obtenidos para las inyecciones de anticuerpo a diferentes concentraciones se superpusieron y las líneas base se ajustaron a cero. Para el ajuste de las curvas, todos los datos se ajustaron simultáneamente a un modelo homogéneo 1:1 (Langmuir).

Alternativamente, el péptido T3 biotilado inmovilizado (T3.30) se inmovilizó en un chip Estreptavidina Biacore SA (GE Healthcare) usando un instrumento Biacore X. Los anticuerpos se diluyeron en tampón de corrida HBS-EP (GE Healthcare) y se inyectaron a 50ul/min durante 120s seguido de 100s de disociación. La regeneración de la superficie se realizó usando un pulso (1-3 ul) de 16 mM NaOH. El ajuste se realizó usando BIAevaluation y asumiendo una interacción de unión 1:1 de Langmuir.

Péptidos usados

| | | |
|-------|--|-------------------|
| T1.5 | H-K(Ac)K(Ac)-RQEFVEMEDHAGTY[PO3H2]GL-K(Ac)K(Ac)-NH2 | lote AW11309D |
| T4.5 | H-K(Ac)K(Ac)-GDTS[PO3H2]PRHLS[PO3H2]NVSSTGSID-K(Ac)K(Ac)-NH2 | lote CF09168 |
| T3.30 | Biotina-LC conector-GVYKS[PO3H2]PWSGDTS[PO3H2]PRHL-NH2 | lote M189P9-P12-2 |

4.2 Resultados

La unión de los anticuerpos anti-tau al péptido fosforilado Tau se monitorizó en tiempo real usando SPR. Los análisis de las fases de asociación y disociación de la unión del anticuerpo pudieron usarse para determinar la constante de velocidad de asociación (k_a), constante de la velocidad de disociación (k_d) así como la constante de disociación K_D . El anticuerpo ACI-33-6C10-Ab1 se une específicamente al péptido T1.5 sobre la superficie de carboximetil dextrano no derivatizada en el intervalo 3,7 → 367 nM de anticuerpo. El análisis cinético de los sensogramas reveló una rápida constante de velocidad de asociación de $9,46 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de velocidad de disociación de $3,27 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 7). Se determinó que la constante de disociación K_D era por lo tanto 3,46 nM mostrando que el

anticuerpo reconoce el fosfopéptido T1.5 con una afinidad muy alta. Todos los anticuerpos ensayados presentaron una alta afinidad para sus fosfopéptidos respectivos usados para la inmunización y generación de hibridomas, pero presentaron poca afinidad para no fosfopéptidos.

EJEMPLO 5: Mapeo de epítomos de anticuerpos anti pTau

5 5.1 Métodos

El mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales anti-fosfo Tau de ratón se realizó por ELISA usando diferentes bibliotecas de fosfo y no fosfo péptidos. Las secuencias de aminoácidos de bibliotecas de péptidos usadas se muestran en la Tabla 8. Cada biblioteca consistió en péptidos biotinilados cortos que abarcaban las secuencias fosfo y no fosfo presentes en la vacuna peptídica. Las bibliotecas de péptidos se adquirieron en ANAWA Trading SA. El mapeo de epítomos se hizo según las instrucciones del fabricante (Mimotopes). Brevemente, se bloquearon placas recubiertas con estreptavidina (NUNC) con 0,1% BSA en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) toda la noche a 4°C. Después de lavar con PBS-0,05% Tween 20, las placas se recubrieron durante 1 hr a RT con los diferentes péptidos de cada biblioteca, diluidos en 0,1% BSA, 0,1% azida sódica en PBS hasta una concentración final de 10 µM. Después de lavar, las placas se incubaron durante 1 hr a RT con el anticuerpo que se iba a ensayar diluido hasta 40 ng/ml en 2% BSA, y 0,1 % azida sódica en PBS. Las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con AP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, Inglaterra) a una dilución 1/6.000 durante 1 hr a RT. Después un lavado final, las placas se incubaron con disolución de sustrato fosfatasa p-nitrofenil fosfato disodio hexahidrato (pNPP; Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza), y se leyó a 405 nm después de una incubación de 2 hr usando un lector de placas ELISA. La unión se consideró positiva si la densidad óptica (D.O.) estaba al menos 2 veces por encima de la D.O. de fondo.

5.2 Resultados

Como un resultado de los experimentos de mapeo de epítomos, pudieron identificarse epítomos incluyendo el residuo de aminoácidos fosforilado requerido (véase la tabla 9) al que se unen específicamente los anticuerpos descritos en la presente memoria.

- 25 • Tau aa 15-20, con requerimiento para pY18 (6C10F9C12A11; 6C10E5E9C12)
- Tau aa 405-412, con requerimiento para pS409 (6H1A11C11; 6H1G6E6)
- Tau aa 405-411, con requerimiento para pS409 (2B6A10C11; 2B6G7A12; 3A8A12G7; 3A8E12H8)
- Tau aa 208-218, con requerimiento para pT212 y pS214 (7C2(1)F10C10D3)
- Tau aa 393-401, con requerimiento para pS396 (A4-2A1-18; A4-2A1-40)
- 30 • Tau aa 396-401, con requerimiento para pS396 (A4-4A6-18)
- Tau aa 394-400, con requerimiento para pS396 (A6-1 D2-12)
- Tau aa 402-406, con requerimiento para pS404 (A6-2G5-08)
- Tau aa 393-400, con requerimiento para p396 (A6-2G5-30; A6-2G5-41)

EJEMPLO 6: Inmunización pasiva de 1 semana de ratones transgénicos para Tau

35 6.1. Métodos

Para todos los estudios in vivo, se usaron ratones transgénicos para Tau y se les administraron los anticuerpos de tratamiento como se muestra en la Tabla siguiente.

Ratones transgénicos y anticuerpos usados para los estudios in vivo

| Estudio no. | Modelo transgénico para Tau | Edad de los ratones al inicio del estudio (meses) | Duración estudio (semanas) | Anticuerpos administrados | Dosis (mg/kg) | Número de administraciones i.p. | Lectura |
|-------------|--|---|----------------------------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|-------------------|
| 1 | TMHT (hTau _W) ^{V337M/R406} | 6,3 | 1 | ACI-36-2B6-Ab1 | 0*, 3 ó 10 | 2 | MSD, IHC, WB |
| | | | | ACI-36-3A8-Ab1 | 0 ó 3 | | |
| 2 | TMHT (hTau _W) ^{V337M/R406} | 4,2 | 4 | ACI-36-2B6-Ab1 o ACI-36-3A8-Ab1 | 0, 1 ó 3 | 4 | MSD, IHC, WB, MWM |
| 3 | TMHT (hTau _W) ^{V337M/R406} | 3.0 | 12 | ACI-36-2B6-Ab1 o ACI-36-3A8-Ab1 | 0, 1 ó 3 | 13 | MSD, IHC, WB, MWM |
| 4 | biGT (hTau ^{P301L}) _W x hGSK3β | 4.5 | 12 | ACI-36-2B6-Ab1 o ACI-36-3A8-Ab1 | 0, 1 ó 3 | 13 | WB |

*control de vehículo para todos los estudios; intraperitonealmente (i.p.)

6.1.1. Ratones y tratamientos

Se usaron ratones Tg hembra y macho de 6,3 meses de edad (± 3 días) que sobreexpresaban la isoforma de TAU humana de longitud completa TAU441, que porta las mutaciones con cambio de sentido V337M y R406W bajo el control del promotor murino Thy-1 (ratones TMHT), para el Estudio no.1 (véase la Tabla anterior). Los ratones se sacrificaron por eutanasia 1 día después de la última administración para determinar la patología TAU en el cerebro.

6.1.2 Identificación y estabulación de los animales

En el curso de la obtención de biopsias de la cola para el genotipado, los animales se numeraron consecutivamente por marcaje en la oreja clásico. Todos los animales se re-genotiparon antes del inicio del estudio. Los ratones se mantuvieron según los Procedimientos de Operación Estándar JSW basados en estándares internacionales. Los animales se estabularon en jaulas individuales ventiladas en lechos de roedor estandarizados suministrados por Rettenmaier®. La temperatura se mantuvo a aproximadamente 24°C y la humedad relativa se mantuvo entre 40 a 70%. Los animales se estabularon bajo un ciclo de luz constante (12 horas luz/oscuridad). Los animales tuvieron disponible pienso de roedores estándar seco, peleteado (Altromin®) y agua de grifo normal ad libitum. Cada animal individual se evaluó regularmente para cualquier signo clínico que se indicaron en la hoja de datos del animal individual.

6.1.3 Sangrados in vivo

Siete días antes de la primera inmunización, se realizaron sangrados in vivo por muestreo mandibular de la vena/arteria facial. Las muestras de sangre son una mezcla de sangre venosa y arterial. Para obtener plasma, la sangre se recogió en tubos con heparina y se centrifugó (1.000 x g, 10 minutos, temperatura ambiente). El plasma se congeló en dos alícuotas hasta su uso.

6.1.4. Cuantificación inmunohistoquímica (IHC)

Se analizaron todos los hemisferios cerebrales congelados criogénicamente. Se cortaron sagitalmente 15 secciones criogénicas por nivel (conjuntamente 5 niveles), cada una con un grosor de 10µm (Leica CM 3050S). Los niveles cerebrales se eligieron según el atlas de morfología "The Mouse Brain" de Paxinos y Franklin (2a edición). El corte de los cinco niveles empezó con una loncha aleatoria después el muestreo continuó uniformemente y sistemáticamente, siempre reteniendo 15 lonchas por nivel en serie y desechando 150 µm entre los niveles. Para la determinación de la patología TAU en el hipocampo y la amígdala, se tiñeron 5 lonchas (1 de cada nivel) por región cerebral y animal usando anticuerpos AT180 (# MN1040, Thermo Scientific) y HT7 (# MN1000, Thermo Scientific). Los anticuerpos primarios se visualizaron con anticuerpo secundario acoplado con Cy-3 (Jackson Laboratories) y posteriormente se evaluaron las áreas inmunoreactivas usando software Image Pro Plus (v6.2).

Los objetos inmunoreactivos se midieron por encima de una restricción de tamaño (30 µm² en la amígdala, 7 µm² en el hipocampo) y por encima de un umbral de intensidad dinámica. El área total y la intensidad de los objetos y el umbral individual se archivaron automáticamente. Si se usó, se definió un umbral dinámico como "intensidad media en AOI más veces de factor la desviación estándar de intensidades de píxel en el AOI". En cualquier caso, los valores tenían que superar un umbral de ajuste mínimo. Los niveles de umbral exactos se proporcionan en la tabla siguiente.

| Umbrales | Mínimo | Factor dinámico |
|----------------|--------|-----------------|
| AT180 Amígdala | 25 | 2 |
| AT180 | 28 | - |
| Hipocampo | | |
| HT7 Amígdala | 35 | 2 |
| HT7 Hipocampo | 25 | 0,5 |

El tamaño de la región se midió por delineación manual del hipocampo y amígdala. Los datos del área HT7 y AT180 IR se normalizaron con el tamaño de las regiones.

Todos los datos relacionados con IHC con $n > 4$ siguieron una distribución Gaussiana según el ensayo de normalidad de Kolmogorov Smirnov y se representan como media + SEM. Para el grupo de vehículo que sólo consiste en cuatro animales, así demasiados pocos para ensayo de normalidad, se asumió distribución Gaussiana. Las diferencias de grupo se calcularon mediante una ANOVA paramétrica de una vía seguido de ensayo post hoc de

Newman Keuls, calculado con software GraphPadPrism. El nivel de error alfa se ajustó a 0,05.

La patología cerebral TAU se determinó en el hipocampo y amígdala por cuantificación inmunohistoquímica (IHC) usando los anticuerpos AT180 (anti-pTAU) y HT7 (anti-TAU). Además, los efectos del tratamiento en pTAU y TAU soluble en la corteza e hipocampo se midieron en la fracción de homogenado soluble usando tecnología dúplex MesoScale Discovery (MSD), ensayando para pTAU y TAU total.

Ninguno de los anticuerpos usados ni para los ensayos IHC o MSD tienen un epítipo que se superpone con los dos anticuerpos de tratamiento usados en este estudio.

6.1.5. Generación de fracción para la cuantificación de nivel de proteína Tau soluble en las fracciones cerebrales solubles de ratones Tg

Los ratones tratados según el método 6.1.1. se sacrificaron por eutanasia 1 día después de la segunda administración para determinar la patología Tau en el cerebro. Brevemente, se homogeneizaron muestras de corteza solubles de un hemisferio cerebral en 100 a 200 μ L de tampón de extracción frío (25 mM Tris-HCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β -glicerofosfato, 30 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , mezcla de inhibidores de proteasa y fosfatasa). Los homogenados se centrifugaron (74.200 x g durante 15 min a 4°C) y los sobrenadantes se usaron para el análisis de Tau soluble. La concentración de proteína total en las fracciones solubles de muestras de corteza se determinó por un ensayo de cuantificación de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU).

6.1.6. Análisis de la presencia de pTau por Transferencia Western

Para ensayar la inmunoreactividad en los cerebros de ratones a los que se administró ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2, dos anticuerpos que se ha indicado que se unen a epítipos pTau PHF (Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995; Hoffmann et al., 1997) se usaron en ensayos de transferencia Western (WB). Se diluyeron fracciones solubles de la corteza añadiendo un volumen igual de tampón de muestra A (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% [p/v] dodecil sulfato de sodio [SDS], 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol), y las muestras se calentaron hasta 95°C durante 10 min. Se cargaron 30 μ g de muestra en un gel 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, Basilea, Suiza) y se corrió en tampón MOPS SDS (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF 0,45 μ m en tampón de transferencia (25 mM Tris pH 8,6, 190 mM glicina, 20% metanol). Para verificar la transferencia de las proteínas, las membranas se tiñeron con Ponceau S durante 5 min, se lavaron, y se bloquearon durante 1 hora en tampón de bloqueo (5% BSA en TBS [50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl]). Las membranas se ensayaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo y 0,1% Tween. Los dos anticuerpos primarios específicos de pTau PHF usados para las WB fueron: anti-pS396 (epítipo PHF-13; AbCam, Cambridge, Reino Unido; usado a 3 μ g/mL), específico para Ser396 fosforilada (pS396) de pTau humana o murina (Hoffmann et al., 1997), y AD2 (epítipo PHF-1; BioRad, Reinach, Suiza; usado a 0,4 μ g/mL), específico para pS396 humana y murina y Ser404 fosforilada (pS404; Reig et al., 1995). Para las WB de Tau total, se usó Tau5 (0,5 μ g/mL), un anticuerpo que se une tanto a Tau humana como murina (BD Biosciences, Allschwil, Suiza). Después de incubar con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con 0,1% Tween en TBS, y se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-ratón-IRDye800 de cabra o anti-conejo-IRDye680 de cabra (ambos de Li-Cor Biosciences, NE, EEUU), ambos diluidos 1:15.000 en BB y 0,1% Tween. Las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz, se lavaron durante 15 min 3 veces con 0,1 % Tween en TBS, y durante 5 min 2 veces con TBS, y las bandas se cuantificaron usando el sistema de formación de imágenes con infrarrojo cercano Li-Cor Odyssey (Li-Cor). Las bandas se normalizaron respecto a la expresión de β -actina (AbCam; usado a 0,4 μ g/mL). Para verificar la identificación de las bandas de Tau transgénica humana frente a Tau endógena de ratón, las membranas se ensayaron con un anticuerpo específico para Tau humana total (Tau13, AbCam; no mostrado). Además, las membranas se ensayaron con un anticuerpo primario anti-ratón, para verificar que los anticuerpos de tratamiento, ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2, no estaban presentes en las muestras de ensayo desnaturalizadas en cantidad suficiente para interferir con la unión de anti-pS396 o AD2. No se detectaron anticuerpos de tratamiento intactos o desnaturalizados (resultados no mostrados) en las muestras usadas para este estudio.

6.1.7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando estadística de suma de rangos no paramétrico de Kruskal-Wallis, y si era significativo al nivel $P < 0,05$, se usó un ensayo post-hoc de Dunn comparando todos los grupos (GraphPad Prism, GraphPad Software, CA, EEUU). Los resultados se presentan como puntos de datos individuales mostrando media \pm SEM. Las diferencias con $P < 0,05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

6.2 Resultados

6.2.1. Patología cerebral TAU por cuantificación inmunohistoquímica (IHC)

Dos inyecciones i.p. de ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2 no mostraron ningún efecto adverso importante durante el periodo de estudio. La tinción para pT231 y pS235 usando AT180 por IHC, mostró área inmunoreactiva (IR) incrementada en la amígdala después de tratamiento con ACI-36-3A8-Ab2 (). Los ratones tratados con 3 mg/kg ACI-36-2B6-Ab2 tuvieron un área AT180 IR significativamente menor en el hipocampo ().

El tratamiento con ACI-36-3A8-AB2 incrementó AT180 IR pTAU comparado con el grupo PBS en la amígdala. En el hipocampo, el tratamiento con ACI-36-2B6-AB2 disminuyó pTAU. AT180 marca específicamente pTAU. La frecuencia de células AT180 IR disminuyó en ratones tratados con ACI-36-2B6-AB2. Este efecto fue mayor en el grupo de dosis baja (3 mg/kg) (ACI-36-2B6-AB2 LD). El patrón de tinción somal no fue diferente entre los grupos.

- 5 A la dosis más alta 10 mg/kg, se observó una tendencia no significativa para menos AT180 IR en el hipocampo para ambos ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2, cuando se compara con los ratones tratados con vehículo control. Cualitativamente, los animales tratados con ACI-36-2B6-Ab2 mostraron un menor número de neuronas hipocámpales con un marcaje altamente intenso de AT180.

6.2.2. Reducción del nivel de Tau total en fracción de cerebro después de inmunización pasiva

- 10 El efecto de los tratamiento en pTAU y TAU en la fracción de cerebro que contiene proteínas solubles se midió usando un ensayo dúplex MSD. Los niveles de TAU soluble total en la corteza se redujo significativamente en ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2 ($p < 0,01$; Figura 3 panel superior): Los niveles de pTAU soluble también se redujeron significativamente ($p < 0,05$; Figura 3 panel inferior), con la dosis 3 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab2 demostrando la mayor disminución ($p < 0,01$). La proporción de pTAU a TAU total permaneció inalterada.
- 15 Los niveles de TAU y pTAU solubles no cambiaron en las muestras del hipocampo (no mostrado aquí).

6.2.3. Efectos de la administración de ACI-36-286-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2 en presencia de epítomos fosfo-Tau presentes en filamentos helicoidales emparejados (PHF)

- 20 Estructuralmente, los ovillos neurofibrilares (NFT) consisten en filamentos helicoidales emparejados (PHF) compuestos por la proteína asociada a microtúbulos Tau, encontrada principalmente en un estado hiperfosforilado (Alonso et al., 1997). El objetivo de este estudio fue usar anticuerpos que reconocen pTau PHF para ensayar y cuantificar estos epítomos pTau PHF en los cerebros de ratones transgénicos para Tau, después de la administración de ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2.

- 25 Para medir los efectos de dos administraciones de ACI-36-2B6-Ab2 o ACI-36-3A8-Ab2 en la cantidad de fosfo epítomos Tau PHF bien documentados, se ensayaron fracciones solubles de corteza cerebral de ratones Tau Tg tratados con AD2 (epítomo PHF-1, pS396/pS404) y anticuerpo anti-pS396 (epítomo PHF-13, pS396) usando WB. La inmunoreactividad se cuantificó usando un sistema de formación de imágenes con infrarrojo. Los efectos del tratamiento con ACI-36-3A8-AB2 y ACI-36-2B6-AB2 en la inmunoreactividad de AD2 PHF en la corteza de ratones Tau Tg se determinó usando AD2 que ensaya pS396 y pS404, dos fosfo residuos PHF documentados de Tau previamente (Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995).

- 30 Las bandas, que indican pTau humana y de ratón fosforilada en S396 y S404 usando el anticuerpo AD2 (PHF-1), se cuantificaron usando un sistema de formación de imágenes con infrarrojo Li-Cor. Se determinan los valores para ratones individuales así como la media \pm SEM.

- 35 Se observó una tendencia no significativa para una reducción en inmunoreactividad de pTau positiva para AD-2 para la banda de pTau humana transgénica. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la cantidad de pTau de ratón positiva para AD2 en ratones tratados con 3 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab2, y una tendencia no significativa cuando se trataron bien con 10 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab2 o ACI-36-3A8-Ab2.

- 40 Cuando se usó un anticuerpo diferente que reconoce específicamente pTau pS396 para la tinción (Hoffmann et al., 1997), se observó un efecto incluso mayor. Los ratones tratados con 3 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab2 tenían significativamente menos pTau transgénica humana y endógena de ratón positiva para pS396, con una tendencia hacia la reducción cuando se trataron con 10 mg/kg ACI-36-2B6-Ab2 o ACI-36-3A8-Ab2. Para evaluar los efectos en Tau humana y de ratón total, que incluye tanto Tau no fosforilada como pTau total, las transferencias se ensayaron con el anticuerpo Tau5. Comparado con el control de vehículo, Tau total no se moduló por ACI-36-2B6-Ab2 o ACI-36-3A8-Ab2 administrados a 10 mg/kg, sin embargo, se observó una tendencia para Tau total reducida para ratones a los que se administró ACI-36-2B6-Ab2 a 3 mg/kg.

45 6.2.4 Resumen

- 50 Dos administraciones periféricas a ratones Tau Tg con el anticuerpo anti-pTAU ACI-36-3A8-Ab2 redujeron significativamente TAU soluble y pTAU soluble en la corteza cerebral. Dos administraciones periféricas a ratones Tau Tg con el anticuerpo anti-pTAU ACI-36-2B6-Ab2 redujeron significativamente TAU soluble y pTAU soluble en la corteza cerebral. Además, ACI-36-2B6-Ab2 redujo significativamente la inmunoreactividad de pTAU en el hipocampo. Estos resultados demuestran la capacidad de la inmunización pasiva anti-pTAU, usando los anticuerpos ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2, para reducir la tauopatía.

- 55 Dos administraciones periféricas de ACI-36-2B6-Ab2 a 3 mg/kg a ratones Tau Tg redujeron la presencia de epítomos pTau PHF en la corteza según se mide por transferencia Western. A una dosis mayor de 10 mg/kg, tanto ACI-36-2B6-Ab2 como ACI-36-3A8-Ab2 mostraron una tendencia hacia una inmunoreactividad reducida del epítomo pTau PHF. Estos resultados muestran que los anticuerpos ACI-36-2B6-Ab2 y ACI-36-3A8-Ab2 pueden usarse adecuadamente en inmunoterapia pasiva frente a tauopatías tales como Enfermedad de Alzheimer.

EJEMPLO 7: Tratamiento de 1 mes de ratones que sobreexpresan Tau humana

7.1 Métodos

7.1.1 Ratones y tratamientos

Se usaron ratones transgénicos para Tau y se les administró los anticuerpos de tratamiento como se muestra en la Tabla en el Método 6.1. (estudio no.2.)

7.1.2. Ensayo de comportamiento - Tarea de laberinto acuático de Morris (MWM)

Después de la última administración, se realizó una tarea de laberinto acuático (MWM) para ensayar el rendimiento de la memoria espacial en ratones tratados según 6.1.1. El ensayo MWM se realizó con todos los animales encerrados en la semana 4 después del inicio. El MWM consiste en una piscina circular blanca con un diámetro de 100 cm, llena con agua del grifo a una temperatura de 21 ± 2 °C. La piscina se divide virtualmente en cuatro sectores. Se pone una plataforma transparente (8 cm de diámetro) aproximadamente 0,5 cm debajo de la superficie del agua. Durante todas las sesiones del ensayo, la plataforma está localizada en el cuadrante suroeste de la piscina. Cada ratón tenía que realizar tres ensayos en cada uno de cuatro días consecutivos. Un único ensayo duró un máximo de un minuto. Durante este tiempo, el ratón tenía la posibilidad de encontrar la diana escondida diáfana. Después de cada ensayo, se dejó que los ratones descansaran en la plataforma durante 10-15 seg para orientarse en el entorno. Al menos una hora después del último ensayo en el día 4, los ratones tenían que cumplir un denominado ensayo de prueba (PT). Durante el PT, la plataforma se retiró de la piscina y se registró el número de cruces sobre la posición anterior de la diana por el experimentador junto con la permanencia en este cuadrante. Para la cuantificación de la latencia de escape (el tiempo [segundos] que el ratón necesita para encontrar la plataforma escondida y por lo tanto para escapar del agua), de la ruta (la longitud de la trayectoria [metros] para alcanzar la diana), de los cruces de la zona diana y de la permanencia en el cuadrante de la diana en el PT, se usó un sistema de seguimiento computerizado (Biobserve Software). Todos los animales tenían que realizar un ensayo visual después del PT en el último día para excluir la influencia de capacidades visuales insuficientes en los resultados de comportamiento.

7.1.3. Determinación de la patología cerebral TAU por cuantificación inmunohistoquímica (IHC)

Los ratones se sacrificaron por eutanasia 1 día después del MWM (1 semana después de la última administración) para determinar la patología Tau en el cerebro. La patología cerebral TAU se determinó en el hipocampo y amígdala por cuantificación inmunohistoquímica (IHC) usando los anticuerpos AT180 (anti-pTAU, pT231/pS235) y HT7 (anti-TAU específico humano). Además, los efectos del tratamiento en pTau soluble y Tau soluble en la corteza e hipocampo se midieron en fracción de homogenado usando tecnología dúplex MesoScale Discovery (MSD), ensayando para pTAU (pT231) y Tau total. Ninguno de los anticuerpos usados ni para los ensayos IHC o MSD tienen un epítipo que se superpone con el anticuerpo de tratamiento usado en este estudio.

7.1.4. Preparación de la muestra para el análisis de Tau soluble en la corteza e hipocampo

Los ratones se sacrificaron por eutanasia para recogida de tejidos, una semana después de la última administración del tratamiento. Se homogeneizaron la corteza e hipocampo en 100 a 200 μ L de tampón de extracción frío 1 (25 mM Tris-HCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β -glicerofosfato, 30 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , mezclas de inhibidores de proteasa y fosfatasa). Los homogenados se centrifugaron (74.200 g durante 15 min a 4°C) y los sobrenadantes se usaron para el análisis de Tau soluble en la corteza e hipocampo (Figura 4-1). Los sedimentos se resuspendieron en 100-200 μ L de tampón de extracción 2 (10 mM Tris HCl pH=7,4, 800 mM NaCl, 300 mM sacarosa, 1mM EGTA, mezclas de inhibidores de proteasa y fosfatasa) y se transfirieron a un tubo de 1,5 mL. Las disoluciones se centrifugaron (4.000 g durante 20 min a 4°C) y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de ultracentrifugación. Se añadió Sarcosil (una disolución acuosa al 30%) a una concentración final de 1% y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Después de centrifugar (74.200 g durante 30 min a 4°C) los sobrenadantes se desecharon y los sedimentos se re-suspendieron en tampón 100 μ L 3 (50 mM Tris-HCl, pH=7,4). Los sedimentos re-suspendidos se usaron como Tau insoluble en sarcosil (SinT) en la corteza e hipocampo. La concentración de proteína total en las muestras de fracciones solubles y SinT se determinó por un ensayo de cuantificación de proteínas BCA (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU).

7.1.5. Transferencias Western para pTau PHF y Tau

Para evaluar el efecto de la administración de ACI-36-2B6-Ab1 en la presencia de pTau PHF en la corteza e hipocampo cerebrales, dos anticuerpos que se ha indicado que se unen a epítipos pTau PHF (Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995; Hoffmann et al., 1997) se usaron en ensayos de transferencia Western (WB). Se diluyeron fracciones solubles y SinT de la corteza e hipocampo añadiendo un volumen igual de tampón de muestra A (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% [p/v] dodecil sulfato de sodio [SDS], 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol), y las muestras se calentaron hasta 95°C durante 10 min. Se cargaron 30 μ g de muestra en un gel 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, Basilea, Suiza) y se corrió en tampón MOPS SDS (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF 0,45 μ m en tampón de transferencia (25 mM Tris pH 8,6, 190 mM glicina, 20% metanol). Para verificar la transferencia de las proteínas, las membranas se tñieron con Ponceau S durante 5 min. Las membranas se lavaron, y se bloquearon durante 1 hora en tampón de bloqueo (5% BSA en TBS [50 mM

Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl]). Las membranas se ensayaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo y 0,1% Tween.

Los dos anticuerpos primarios específicos de pTau PHF usados para las WB fueron: anti-pS396 (epítipo PHF-13; AbCam, Cambridge, Reino Unido; usado a 3 µg/mL), específico para Ser396 fosforilada (pS396) de pTau humana o murina (Hoffmann et al., 1997), y AD2 (epítipo PHF-1; BioRad, Reinach, Suiza; usado a 0,4 µg/mL), específico para pS396 humana y murina y Ser404 fosforilada (pS404; Reig et al., 1995). Para la detección de efectos en diana, se usó ACI-36-2B6-Ab1 para ensayar a 1,6 µg/mL. Para las WB de Tau total, se usó Tau5, un anticuerpo que se une tanto a Tau humana como murina (BD Biosciences, Allschwil, Suiza) a 0,5 µg/mL. Todas las membranas se ensayaron adicionalmente para β-actina (AbCam; usada a 0,4 µg/mL) para normalizar para carga de proteína.

Después de incubar con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con 0,1% Tween en TBS, y se incubaron con los anticuerpos secundarios: anti-ratón-IRDye800 de cabra o anti-conejo-IRDye680 de cabra (ambos de Li-Cor Biosciences, NE, EEUU), ambos diluidos 1:15.000 en BB y 0,1% Tween. Las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz, se lavaron durante 15 min 3 veces con 0,1 % Tween en TBS, y durante 5 min 2 veces con TBS, y las bandas se cuantificaron usando el sistema de formación de imágenes con infrarrojo cercano Li-Cor Odyssey (Li-Cor). Las bandas de interés se normalizaron respecto a la expresión de β-actina. Para verificar la identificación de las bandas Tau humanas transgénicas frente a de ratón endógena, las transferencias se ensayaron con un anticuerpo específico para Tau humana total y no reacciona de manera cruzada con Tau murina (Tau13, AbCam; no mostrado). Además, las membranas se ensayaron con un anticuerpo primario anti-ratón, para verificar que el anticuerpo de tratamiento, no estaba presente en las muestras de ensayo desnaturalizadas en cantidad suficiente para interferir con la unión de los anticuerpos primarios de ensayo. No se detectaron anticuerpos de tratamiento intactos o desnaturalizados (resultados no mostrados) en las muestras usadas para este estudio. Los valores se expresan como inmunoreactividad (IR) arbitraria corregida para β-actina.

7.1.6. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando un ANOVA de una vía, seguido de ensayo post-hoc de comparación múltiple de Dunnett (GraphPad Prism, Software GraphPad, CA, EEUU) comparando cada tratamiento con ratones tratados control Tg. Los resultados se presentan como puntos de datos individuales mostrando media ± SEM. Las diferencias con $p < 0,05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas. Se excluyeron los valores únicos que se identificaron como valores atípicos significativos ($p < 0,05$) por ensayo de desviación estudentizada extrema de Grubb.

7.2 Resultados

7.2.1. Ensayo de comportamiento - tarea de laberinto acuático de Morris (MWM) después de inmunización pasiva

Cuatro inyecciones i.p. de ACI-36-2B6-Ab1 administradas semanalmente a 3 mg/kg ó 1 mg/kg durante un periodo de cuatro semanas no mostraron ningún efecto adverso importante.

Durante la última semana de tratamiento, se evaluaron el aprendizaje de navegación espacial y la memoria de los animales. Los animales tenían que cumplir 4 días de entrenamiento con 3 ensayos por día seguido de un ensayo de prueba y ensayo visual. Se evaluaron la latencia de escape (el tiempo [segundos] que el ratón necesita para encontrar la plataforma escondida y por lo tanto para escapar del agua), la ruta (la longitud de la trayectoria [metros] para alcanzar la diana), la velocidad de nado (calculada diariamente de ruta y latencia de escape), el número de los cruces de la zona diana y la permanencia en el cuadrante de la diana.

Los animales control Tg (grupo A) así como nTg (F) tratados con vehículo mostraron las curvas de aprendizaje esperadas cuando se evaluaron la latencia de escape y la longitud de la ruta de nado para alcanzar la plataforma durante los cuatro días de ensayo. Los animales Tg control (A) tenían una alteración del aprendizaje significativa como se muestra por curvas de aprendizaje más planas en latencias de escape y rutas de nado comparadas con los animales control nTg (F). Las latencias de escape y ruta de nado fueron significativamente mayores (ANOVA de Dos Vías) en los días 3 y 4 de entrenamiento ($p < 0,001$; post ensayo de Bonferroni). El tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1, baja o alta dosis (grupos B y C y D y E, respectivamente) no dio lugar a una mejora significativa de las capacidades de aprendizaje espacial comparado con los animales control Tg (grupo A) y mostró curvas de aprendizaje similares. Cuando se ajusta el rendimiento del día 1 de cada grupo a 100% y todos los días adicionales como porcentaje del día 1, puede verse una mejora para los ratones tratados con ACI-36-3A8-Ab1 (ambas dosificaciones). El efecto alcanzó significancia estadística para longitud de ruta de nado en el día 3 ($p < 0,01$ grupo D y $p < 0,05$ grupo E) y día 4 ($p < 0,05$ grupo D).

Para los ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 (ambas dosificaciones) puede verse una ligera mejora en la longitud de la ruta de nado, aunque sin significancia estadística.

No se detectaron diferencias entre los grupos de tratamiento en términos de velocidad de nado en los cuatro días de entrenamiento.

Los resultados del ensayo MWM demostraron tendencias hacia un aprendizaje espacial mejorado para los ratones

tratados con ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1.

7.2.2. Patología cerebral TAU por cuantificación inmunohistoquímica (IHC)

El anticuerpo AT180 tiñe pTAU endógena y humana (doblemente fosforilada en Thr231 y Ser235).

5 Se determinó AT180 IR en la amígdala e hipocampo después de inmunización con ACI-36-2B6-AB1 y ACI-36-3A8-AB1. Se midió el porcentaje de área de AT180 IR en la amígdala y el hipocampo.

10 La cantidad de pTAU intrasomal en controles nTg fue significativamente menor comparado con los grupos Tg ($p < 0,001$). En la amígdala, se observó una tendencia a incrementar pTAU somal para el tratamiento con 3 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab1. Por el contrario, ambas dosificaciones de ACI-36-2B6-Ab1 tendieron a disminuir pTAU comparado con los animales tratados con vehículo en el hipocampo. Las intensidades medias de tinción fueron comparables en todos los grupos transgénicos.

El tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 no alteró pTAU somal en el hipocampo y amígdala y los niveles neuronales de pTAU en la amígdala e hipocampo no se diferenciaron significativamente entre los grupos transgénicos tratados. La media y la suma de las intensidades de tinción fueron comparables en todos los grupos transgénicos.

15 Como el anticuerpo HT7 es específico para TAU humana, sólo se midió una pequeña señal en los controles nTg, que deriva de autofluorescencia de puntos de lipofuscina por encima de siete píxeles de tamaño. El tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 no alteró el área IR positiva de HT7 somal en el hipocampo () comparado con el control de vehículo (PBS). En la amígdala, los ratones que recibieron la menor dosis de ACI-36-2B6-Ab1 tendieron a tener niveles más altos de TAU humana total (Ensayo T: $p = 0,0954$) en términos de área IR (). Este incremento también fue cualitativamente visible como incremento del área de tinción y la intensidad de tinción en somas neuronales individuales. No se observaron diferencias inducidas por el tratamiento estadísticamente significativas en las neuronas hipocampales.

20 El tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 no alteró significativamente el área IR positiva para HT7 somal en la amígdala () y el hipocampo () comparado con el control de vehículo (PBS). La media y la suma de las intensidades de tinción fueron comparables en todos los grupos transgénicos (datos no mostrados).

25 La patología cerebral Tau no mostró un cambio en los niveles de Tau total o pTau en la fracción soluble del cerebro, sin embargo, la inmunotinción de secciones de cerebro demostró una reducción en pTau del hipocampo en ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1.

7.2.3. Efectos de la administración de anticuerpo anti-Tau en los epítomos de fosfo-Tau presentes en filamentos helicoidales emparejados (PHF)

30 La Enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza neuropatológicamente por ovillos neurofibrilares (NFT; Braak, Braak, y Bohl, 1993). Estructuralmente, los NFT consisten en filamentos helicoidales emparejados (PHF) compuestos por la proteína asociada a microtúbulos Tau, encontrada principalmente en un estado hiperfosforilado (Alonso et al., 1997). El objetivo de este estudio fue reducir estos epítomos pTau PHF en los cerebros de ratones transgénicos para Tau por cuatro administraciones del anticuerpo anti-pTau ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1.

35 Para medir los efectos de cuatro administraciones de ACI-36-2B6-Ab1 en la cantidad de fosfo epítomos Tau PHF bien documentados, se ensayaron fracciones solubles de corteza e hipocampo cerebral y SinT de ratones Tau Tg tratados con AD2 (epítomo PHF-1, pS396/pS404) y anticuerpo anti-pS396 (epítomo PHF-13, pS396) usando WB. Como marcadores de Tau PHF, la presencia de pS396/pS404 se ha documentado anteriormente (Greenberg et al., 1992; Reig et al., 1995), y más específicamente el sitio pS396 (Hoffmann et al., 1997). En los ratones Tau Tg, Tau se expresa como Tau murina endógena y como el transgén Tau humano, con una diferencia de peso molecular que puede identificarse claramente en WB cuando un anticuerpo de ensayo se une a Tau de ambas especies y Tau de los dos transcritos diferentes se expresa en cantidades suficientes. Por lo tanto, cuando fue posible, se identificaron las bandas de Tau de ratón endógena y transgénica humana para anticuerpo de ensayo y se cuantificaron separadamente. Para verificar los patrones de migración para estas bandas de Tau en nuestros ensayos de WB, se usó un anticuerpo anti-Tau que se une a Tau total, pero que es específico de humano (Tau13), y por lo tanto sólo muestra el transgén humano en cerebros Tau Tg para muestras control Tau Tg para verificar los patrones de migración para Tau humana y de ratón en el ratón transgénico para Tau. Además, todas las bandas cuantificadas se normalizaron para β -actina.

45 La presencia de epítomos PHF, ensayados en la fracción soluble de la corteza cerebral, se redujo en ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 y con ACI-36-3A8-Ab1. Esto fue significativo tanto para las bandas de ratón como humanas, usando el anticuerpo pS396 (PHF-13) para las WB (Figura 5A y B).

50 Cuando se usó el anticuerpo AD2 (PHF-1, pS396/pS404) para las WB de extractos de ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1, se observó una reducción significativa (Figura 5C).

Debe indicarse que aunque los dos anticuerpos específicos de PHF que se usaron para estas WB tenían epítomos

similares y una buena especificidad para su(s) diana(s) fosforilada(s), el anticuerpo pS396 (PHF-13) pareció tener una mejor relación señal a ruido y fue el mejor anticuerpo global para estas WB.

5 El efecto directo en la diana del anticuerpo de tratamiento se ensayó en la corteza usando ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-2B6-Ab1, respectivamente, como el anticuerpo de ensayo. Este anticuerpo anti-pTau se une al mismo epítipo de fosfo-Tau que el anticuerpo de tratamiento usado en este estudio. Las transferencias se habían ensayado previamente sólo con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón.

Las bandas se cuantificaron usando sistema de formación de imágenes por infrarrojo. Se determinan los valores para ratones individuales así como la media \pm SEM.

10 No se detectó señal por encima del fondo, verificando la ausencia de efectos de bloqueo o interferencia por el anticuerpo de tratamiento en estas muestras (datos no mostrados).

En los ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1, se observó una tendencia hacia una señal reducida hasta el nivel de ratones control tratados nTg, indicativo de un efecto directo en la diana (Figura 5G). En los ratones tratados con ACI-36-3A8-Ab1 no se observaron efectos significativos de tratamiento (Figura 5G).

15 Se observó el efecto significativo del tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 en Tau total en la corteza soluble de ratones Tau Tg, usando un anticuerpo Tau5 para el ensayo que se une tanto a Tau de ratón endógena como a Tau humana transgénica (Figura 5H y 5I). Se observó una reducción significativa en Tau total tanto para Tau de ratón endógena como Tau humana transgénica en la fracción soluble de la corteza cerebral.

Las bandas, que indican Tau de ratón A) y humana B) total (Tau5), se cuantificaron usando sistema de formación de imágenes por infrarrojo. Se determinan los valores para ratones individuales así como la media \pm SEM.

20 La presencia de epítipos PHF en la fracción Tau insoluble en detergente se hizo preparando fracciones de cerebro insolubles en sarcosil (SinT).

Las bandas se cuantificaron usando sistema de formación de imágenes por infrarrojo. Se determinan los valores para ratones individuales así como la media \pm SEM.

25 En esta fracción estaba presente mucha menos Tau cuando se compara con la fracción de Tau soluble, tanto en la corteza como en el hipocampo. Esto puede deberse a la edad de los ratones Tau Tg usados en este estudio, que a los 4 meses pueden no haber acumulado una cantidad significativa de Tau insoluble y agregada en el hipocampo y la corteza. Por lo tanto, cuando se ensaya para epítipos PHF en la fracción SinT, sólo el anticuerpo AD2 (PHF-1, pS396/pS404) proporcionó una señal que fue suficiente para la cuantificación fiable de las bandas.

30 Los ratones tratados con 1 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab1 y con 1 mg/kg de ACI-36-3A8-Ab1, respectivamente, tenían una reducción significativa en el epítipo PHF-1 en bandas que representan la Tau de ratón endógena (Figura 5C). Las señales observadas para la banda humana transgénica no fueron lo suficientemente intensas como para ser cuantificadas de manera fiable.

35 El hipocampo también se ensayó, usando los mismos anticuerpos y fracciones que para la corteza. Se detectaron señales menores para todos los anticuerpos de ensayo en fracciones del hipocampo comparado con las de la corteza.

Se determinaron los efectos del tratamiento con ACI-36-2B6-AB1 y ACI-36-3A8-AB1 en la inmunoreactividad de pS396 (PHF-13) en el hipocampo soluble de ratones Tau Tg. Las bandas, que indican los epítipos de ratón A) y humanos B) pTau pS396 (PHF-13), se cuantificaron usando un sistema de formación de imágenes por infrarrojo. Se determinan los valores para ratones individuales así como la media \pm SEM.

40 El tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 no alteró significativamente la presencia del epítipo pS396 (PHF-13) en la fracción de hipocampo soluble de Tau de ratón, con una pequeña tendencia para una reducción en la banda de transgén humano.

El tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 mostró una tendencia hacia una reducción en la presencia del epítipo pS396 (PHF-13) en la fracción de hipocampo soluble de Tau de ratón y la banda de transgén humano.

45 De manera similar a lo que se observó para las WB de pS396 (PHF-13), se detectó una tendencia para una señal reducida en ambos extractos de ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1 para Tau total en la fracción de hipocampo soluble de Tau humana.

50 Similar a las muestras de SinT de la corteza, la fracción SinT del hipocampo tuvo unos niveles muy bajos de pTau. Los ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1, respectivamente, no presentaron cambio en el epítipo PHF-1 (pS396/pS404) en bandas que representan Tau endógena de ratón. Las señales observadas para la banda humana transgénica no fueron lo suficientemente intensas para una cuantificación fiable.

7.2.4 Resumen

El estudio indica que la inmunización pasiva usando cuatro administraciones de un anticuerpo anti-pTau específico de fosfosito, anticuerpos ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1, mejora el aprendizaje espacial y reduce la patología cerebral pTau.

- 5 Cuatro administraciones periféricas del anticuerpo anti-pTau ACI-36-2B6-Ab1 a 1 y 3 mg/kg a ratones Tau Tg redujeron la presencia de epítomos pTau PHF en la corteza según se mide por transferencia Western. Se observó una tendencia para reducción en el hipocampo. De manera similar, también se observó una reducción en Tau total. Se observó una reducción significativa en la inmunoreactividad de pTau PHF-1 en la fracción de corteza insoluble, y también se observó una tendencia lo que indicó efectos directos en la diana del tratamiento con anticuerpo. Estos resultados proporcionan un apoyo adicional para anticuerpos anti-pTau ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1 en inmunoterapia pasiva frente a tauopatías tales como Enfermedad de Alzheimer.

EJEMPLO 8: Tratamiento de 3 meses de ratones que sobreexpresan Tau humana

8.1 Métodos

8.1.1 Ratones y tratamientos

- 15 Se usaron ratones transgénicos para Tau y se les administró los anticuerpos de tratamiento como se muestra en la Tabla en el Método 6.1. (estudio no. 3) y los ratones se asignaron a 4 grupos de tratamiento diferentes como se describe en la tabla siguiente.

| Grupo | Cepa de ratón | Genotipo | Edad al inicio | Sexo | n | Tratamiento | | |
|-------|---------------|----------|----------------------|-------|------|--------------------------|--------------------|--------------|
| A | TMHT | Tg | 3 meses (±2 semanas) | mixto | 15+1 | PBS (control) | i.p. 10 µl/ g p.c. | semanalmente |
| B | TMHT | Tg | 3 meses (±2 semanas) | mixto | 15+1 | ACI-36-2B6-Ab1 (1 mg/kg) | i.p. 10 µl/ g p.c. | semanalmente |
| C | TMHT | Tg | 3 meses (±2 semanas) | mixto | 15+1 | ACI-36-2B6-Ab1 (3 mg/kg) | i.p. 10 µl/g p.c. | semanalmente |
| F | TMHT | nTg | 3 meses (±2 semanas) | mixto | 15+1 | PBS (control) | i.p. 10 µl/ g p.c. | semanalmente |

- 20 En total se trataron 45 ratones Tg más 3 reservas asignadas a grupos de tratamiento A a C y 15 ratones nTg más 1 reserva (grupo F) en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, y 84 por inyección i.p. bien de PBS (control de vehículo) o anticuerpo anti-pTAU, ACI-36-2B6-Ab1 o ACI-36-3A8-Ab1. Los animales se englobaron aleatoriamente en 5 grupos de inicio diferentes (escalas) que comprenden animales de todos los grupos de tratamiento. El número de animales en una escala estaba limitado para asegurar la misma edad y manejo uniforme.
- 25 Después de la 12ª administración, se realizó una tarea de laberinto acuático (MWM) para ensayar el rendimiento de la memoria espacial. Después del MWM, se administró a los ratones el artículo de ensayo una vez adicional (13ª inyección) antes de sacrificarlos por eutanasia 24 horas después para determinar la patología Tau. La patología cerebral Tau se determinó en el hipocampo y amígdala por cuantificación inmunohistoquímica (IHC) usando el anticuerpo AT180 (anti-pTau, pT231/pS235). Además, los efectos del tratamiento en Tau y pTau soluble e insoluble en sarcosil en la corteza e hipocampo se midieron usando tecnología dúplex MesoScale Discovery (MSD), ensayando para pTAU (pT231 y pS396) y Tau total.

8.1.2. Ensayo de comportamiento - Tarea de laberinto acuático de Morris (MWM)

Este experimento se realizó según el protocolo descrito en el Ejemplo 7.1.2. En la semana 12, se ensayó la navegación espacial en el laberinto acuático de Morris (MWM) para evaluar el aprendizaje y la memoria.

8.1.3. Biología molecular

- 35 Se cuantificó TAU total y Tau fosforilada en Thr231 y en pS396 en homogenados de cerebro de animales Tg usando un ensayo inmunoabsorbente de MesoScale Discovery (MSD)

8.1.4. Determinación de la patología cerebral Tau por cuantificación inmunohistoquímica (IHC)

Este experimento se realizó según el protocolo descrito en el Ejemplo 7.1.3. La patología TAU se determinó por inmunoreactividad de AT180 en el hipocampo y amígdala de 8 animales por grupo.

5 8.1.5. Efectos de la administración de tres meses de anticuerpo anti-Tau en los epítomos de fosfo-Tau presentes en filamentos helicoidales emparejados (PHF)

10 Este experimento se realizó según los protocolos descritos en 7.1.4., 7.1.5. y 7.1.6. Para medir los efectos de cuatro administraciones de ACI-36-2B6-Ab1 y ACI-36-3A8-Ab1 en la cantidad de fosfo epítomos Tau PHF bien documentados, se ensayaron fracciones solubles y SinT de corteza e hipocampo cerebral de ratones Tau Tg tratados con AD2 (epítomo PHF-1, pS396/pS404), anticuerpo anti-pS396 (epítomo PHF-13, pS396) y AT180 (pT231/pS235) usando WB.

8.1.6. Efecto de administración de 3 meses de anticuerpo anti-Tau en los epítomos de fosfo-Tau usando ratones biGT bigénicos para Tau

15 El Estudio no. 4 se hizo usando ratones bigénicos para Tau como se muestra en el Método 6.1. Se prepararon muestras de corteza cerebral como se muestra en la Figura 4-2, usando el homogenado total (TH) o la fracción soluble (S1) para transferencia western. Las membranas se ensayaron usando los anticuerpos de ensayo siguientes para pTau o Tau total:

- HT-7 (26ng/ml), específico para Tau humana total
- PHF-13 (p8396) a una dilución 1/7.500
- AT180 (pT231) a 2,47ug/ml
- 20 • AT8 (pS202) a 3ug/ml
- pS404 a una dilución 1:5.000
- pS400 a una dilución 1:5.000

Todas las cuantificaciones se normalizaron para β -actina.

8.2 Resultados para el anticuerpo ACI-36-2B6-Ab1

25 Trece inyecciones i.p. de ACI-36-2B6-Ab1 administradas semanalmente a 1 ó 3 mg/kg durante un periodo de estudio de doce semanas no mostraron ningún efecto adverso importante.

8.2.1 Resultados de comportamiento - laberinto acuático de Morris

Los resultados del ensayo MWM demostraron tendencias fuertes hacia un aprendizaje espacial mejorado para los ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 (Figura 9).

30 Durante la última semana de tratamiento, se evaluaron el aprendizaje de navegación espacial y la memoria de los animales. Los animales tenían que cumplir 4 días de entrenamiento con 3 ensayos por día seguido de un ensayo de prueba y ensayo visual. Se evaluaron la latencia de escape (el tiempo [segundos] que el ratón necesita para encontrar la plataforma escondida y por lo tanto para escapar del agua), la ruta (la longitud de la trayectoria [metros] para alcanzar la diana), la velocidad de nado (calculada diariamente de ruta y latencia de escape), el número de los cruces de la zona diana y la permanencia en el cuadrante de la diana. Los animales control tratados con vehículo Tg (grupo A) y nTg (grupo F) mostraron las curvas de aprendizaje esperadas en términos de la latencia de escape y la longitud de la ruta de nado para alcanzar la plataforma durante los cuatro días de ensayo. Los animales Tg control (A) mostraron una alteración significativa de las capacidades de aprendizaje reflejado en curvas de aprendizaje más planas de latencias de escape y rutas de nado comparadas con los animales control nTg (grupo F). Las latencias de escape y rutas de nado fueron significativamente diferentes (ANOVA de Dos Vías) en los días 3 de entrenamiento ($p < 0,01$; latencia; $p < 0,001$, longitud; post ensayo de Bonferroni) y 4 ($p < 0,01$; post ensayo de Bonferroni). El tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1, dosis baja o alta (B y C) no mejoró significativamente las capacidades de aprendizaje espacial comparado con los animales control Tg (A). Cuando se ajustó el rendimiento de cada grupo a 100% en el día de entrenamiento 1 y todos los demás días como porcentaje del día 1, puede verse una ligera mejora para los ratones tratados con ACI-36-2B6-Ab1 (dosificación baja y alta) en longitud de ruta de nado, aunque sin significancia estadística. No se detectaron diferencias entre los grupos de tratamiento cuando se calculó la velocidad de nado en los cuatro días de entrenamiento. En el ensayo de prueba (PT), la permanencia en el cuadrante de la diana (cuadrante suroeste) así como los cruces en la zona de la diana se registraron, los controles nTg (grupo F) estuvieron más tiempo en el cuadrante de la diana y cruzaron la zona diana más frecuentemente respecto a los 50 controles Tg (grupo A) pero sin significancia estadística.

Ni el tratamiento con la dosis baja ni alta dio lugar a una mejora de las capacidades de aprendizaje espacial en comparación con los ratones control Tg según se evalúa en el PT.

8. 2.2 Biología molecular

8.2.2.1 TAU en fracción soluble de homogenados de corteza

5 Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en la fracción soluble de homogenados de corteza de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS), B (Tg, ACI-36-2B6-Ab1 1 mg/kg), y C (Tg, ACI-36-2B6-Ab1 3 mg/kg). Un tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de corteza solubles. Sin embargo, se observó un ligero incremento (sin significancia) de la media de TAU total, p231TAU, y p396TAU después de tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1. La fosforilación de TAU evaluada como las proporciones de pTAU a TAU total no se vio afectada.

8.2.2.2 TAU en fracción insoluble en sarcosil de homogenados de corteza

15 Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en la fracción insoluble en sarcosil de homogenados de corteza de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS), B (Tg, ACI-36-2B6-Ab1 1 mg/kg), y C (Tg, ACI-36-2B6-Ab1 3 mg/kg). Un tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de corteza insolubles en sarcosil. Se observó una ligera disminución (sin significancia) de la media de TAU total y p231TAU después de tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1. La fosforilación de TAU evaluada como las proporciones de pTAU a TAU total no se vio afectada.

8.2.2.3 TAU en fracción soluble de homogenados de hipocampo

20 Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en la fracción soluble de homogenados de hipocampo de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS), B (Tg, ACI-36-2B6-Ab1, 1 mg/kg), y C (Tg, ACI-36-2B6-Ab1, 3 mg/kg), el tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados solubles de hipocampo. Se observó una ligera disminución (sin significancia) de la fosforilación de TAU evaluada como las proporciones de pTAU a TAU total después de tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1.

25 8.2.2.4 TAU en fracción insoluble en sarcosil de homogenados de hipocampo

30 Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en las fracciones insolubles en sarcosil de homogenados de hipocampo de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS), B (Tg, ACI-36-2B6-Ab1 1 mg/kg), y C (Tg, ACI-36-2B6-Ab1 3 mg/kg). Un tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de hipocampo insolubles en sarcosil. El tratamiento con 3 mg/kg incrementó la media de TAU total, p231TAU así como p396TAU, aunque sin alcanzar significancia, mientras se observó una ligera reducción de la media de TAU total, p231TAU así como p396TAU después de tratamiento con 1 mg/kg. La fosforilación de TAU evaluada como las proporciones de pTAU a TAU total se incrementó ligeramente después de tratamiento con 3 mg/kg de ACI-36-2B6-Ab1.

8.2. 2.5. Transferencias Western para corteza soluble

35 El tratamiento con ACI-36-2B6-Ab1 redujo de manera dependiente de la dosis la presencia de los epítomos pTau pS396/pS404 (Figura 5D) y pT181 (Figura 5E y 5F) en la fracción soluble de la corteza cerebral, con un efecto significativo a la dosis de 3 mg/kg.

8.2.2.6 TAU en ratones biGT bigénicos para Tau

40 Ratones biGT tratados con ACI-36-2B6-Ab1 durante 3 meses tenían Tau total significativamente reducida en la fracción soluble de corteza cerebral (Figura 6A y 6B). Se observó una reducción significativa para los epítomos de pTau pT231/AT180 (Figura 6C y 6D), pS202/AT8 (Figura 6E), y pS396 (Figura 6F y 6G). También se observó una reducción significativa en homogenado total (TH) para epítomo de pTau pS400 (Figuras 6H y 6I) y pS404 (Figuras 6L y 6M). Además, también se observó una reducción significativa en fracción soluble para los epítomos de pTau pS400 (Figura 6J y 6K) y una tendencia para reducción del epítomo de pTau pS404 (Figura 6N y 6O).

45 8.2.3 Histología

8.2.3.1 Morfometría - determinación de áreas de región

50 Las áreas de región medidas del hipocampo y la amígdala no se diferenciaron significativamente en todos los cerebros investigados lo que excluye efectos negativos en el tejido durante la disección e IHC o tinción (por ejemplo, contracción inequívoca, seccionamiento diferente) y en cierto grado atrofia inducida por el tratamiento. Las secciones individuales pueden desviarse de la media individual y de grupo debido, por ejemplo, a plegamiento de tejido o pérdida de partes de la sección durante la ejecución del protocolo de marcaje. Por lo tanto, el área inmunoreactiva total [en μm^2] de cualquier marcaje se normalizó respecto al área de región individual de la sección [en mm^2] calculando el porcentaje de área marcada en el área de la región [área marcada / (área de la región *

10.000)].

8.2.3.2 Resultados de AT180 IH

El anticuerpo AT180 detecta pTAU endógena y humana (doblemente fosforilada en Thr231 y Ser235). La cantidad de pTAU intrasomal en controles nTg fue significativamente menor comparado con los grupos Tg ($p < 0,01$ así como $p < 0,001$). En la amígdala, la dosis más alta de ACI-36-2B6-Ab1 (3 mg/kg - grupo C) disminuyó significativamente la pTAU somal comparado con los animales tratados con vehículo (Figura 7, izquierda). La dosis más baja (1 mg/kg - grupo C) mostró la misma tendencia pero no alcanzó significancia. El mismo efecto fue detectable en el hipocampo donde ACI-36-2B6-Ab1 redujo pTAU de manera dependiente de la dosis, significativamente para la dosis más alta y con esta tendencia para la más baja (Figura 7, derecha). Esta disminución también fue cualitativamente visible como disminución del área de tinción y la intensidad de tinción en somas neuronales individuales. Los resultados de la suma de intensidades de tinción normalizada respecto al tamaño AOI de AT180 IR medida en las somas neuronales fueron comparables con el porcentaje de área de AT180 IR medido, incluyendo una dependencia de la dosis significativa del efecto mayor de la dosis más alta en la amígdala. En el hipocampo, las comparaciones post hoc no alcanzaron nivel de significancia.

8.2.4 Resumen

La patología cerebral Tau según se mide por MSD no mostró un cambio significativo, sin embargo, la inmunotinción de secciones de cerebro demostró dependencia de la dosis con una reducción de hasta 60% en la inmunotinción de AT180 (pT231/pS235) en somas neuronales.

El estudio muestra que la inmunización pasiva usando trece administraciones de un anticuerpo anti-pTau específico de fosfotio, ACI-36-2B6-Ab1 puede mejorar el aprendizaje espacial y reduce significativamente la patología cerebral pTau.

8.3 Resultados para el anticuerpo ACI-36-3A8-Ab1

Trece inyecciones i.p. de ACI-36-3A8-Ab1 administradas semanalmente a 1 ó 3 mg/kg durante un periodo de estudio de doce semanas no mostraron ningún efecto adverso importante.

8.3.1 Resultados de comportamiento - laberinto acuático de Morris

Los resultados del ensayo MWM demostraron un efecto significativo de aprendizaje espacial mejorado para ratones tratados con ACI-36-3A8-Ab1 a 3 mg/kg (Figura 10).

Los animales control tratados con vehículo Tg (grupo A) y nTg (grupo F) mostraron las curvas de aprendizaje esperadas en términos de la latencia de escape y la longitud de la ruta de nado para alcanzar la plataforma durante los cuatro días de ensayo. Los animales Tg control (A) mostraron una alteración significativa de las capacidades de aprendizaje reflejado en curvas de aprendizaje más planas de latencias de escape y rutas de nado comparadas con los animales control nTg (grupo F). Las latencias de escape y rutas de nado fueron significativamente diferentes (ANOVA de Dos Vías) en los días 3 de entrenamiento ($p < 0,01$, latencia; $p < 0,001$, longitud; post ensayo de Bonferroni) y 4 ($p < 0,01$; post ensayo de Bonferroni). El tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1, dosis baja o alta (D y E) no mejoró significativamente las capacidades de aprendizaje espacial comparado con los animales control Tg (A) cuando se analizan valores absolutos. Cuando se ajusta el rendimiento de cada grupo al 100% en el día de entrenamiento 1 y todos los demás días como porcentaje del día 1, puede haber una mejora de las capacidades de aprendizaje y memoria después de tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 (dosificación baja y alta). Los animales tratados con la dosis baja de ACI-36-3A8-Ab1 (grupo D) se comportaron sólo ligeramente mejor en el MWM comparado con los controles Tg (grupo A). El efecto de un tratamiento semanal con 3 mg/kg ACI-36-3A8-Ab1 (grupo E) fue mucho más pronunciado y casi restauró el comportamiento de los animales nTg. Comparado con los controles Tg (A) el efecto de 3 mg/kg ACI-36-3A8-Ab1 fue estadísticamente significativo para longitud de ruta de nado en el día 3 y día 4 ($p < 0,05$). No se detectaron diferencias entre los grupos de tratamiento cuando se calculó la velocidad de nado en los cuatro días de entrenamiento.

En el ensayo de prueba (PT), la permanencia en el cuadrante de la diana (cuadrante suroeste) así como los cruces en la zona de la diana se registraron, los controles nTg (grupo F) estuvieron más tiempo en el cuadrante de la diana y cruzaron la zona diana más frecuentemente respecto a los controles Tg (grupo A) pero sin significancia estadística. Ni el tratamiento con la dosis baja ni alta dio lugar a una mejora significativamente estadística en comparación con los ratones control Tg según se evalúa en el PT. Sin embargo, los animales tratados con ACI-36-3A8-Ab1 tenían - aunque estadísticamente insignificativo - más cruces de la zona diana comparado con el control Tg, lo que está de acuerdo con el resultado de la longitud de nado durante los 4 días de entrenamiento.

8.3.2 Biología molecular

8.3.2.1 TAU en fracción soluble de homogenados de corteza

Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en la fracción soluble de

homogenados de corteza de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS) y D (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 1 mg/kg) y de n=15 animales del grupo E (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 3 mg/kg). Un tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de corteza solubles. Sin embargo, se observó un ligero incremento (sin significancia) de la media de TAU total, p231TAU, y p396TAU después de tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1. La fosforilación de TAU en 231 evaluada como la proporción de p231TAU a TAU total disminuyó ligeramente después de tratamiento con 3 mg/kg ACI-36-3A8-AB1.

8.3.2.2 TAU en fracción insoluble en sarcosil de homogenados de corteza

Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en las fracciones insolubles en sarcosil de homogenados de corteza de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS) y D (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 1 mg/kg) y de n=15 animales del grupo E (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 3 mg/kg). Un tratamiento con ACI-36-3A8-AB1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de corteza insolubles en sarcosil.

Se observó una ligera disminución (sin significancia) de la media de TAU total, p231TAU, y p396TAU después de tratamiento con 1 mg/ ACI-36-3A8-Ab1. Además, las proporciones p231TAU a TAU total de los animales tratados con 1 mg/kg ACI-36-3A8-Ab1 mostraron una variabilidad ligeramente menor comparado con los animales tratados con vehículo (pero sin significancia en el Ensayo F: p=0,184) sin cambiar la media de las proporciones p231TAU a TAU total de los dos grupos. Para los grupos tratados con 1 mg/kg y 3 mg/kg ACI-36-3A8-Ab1 se observó un ligero incremento de la fosforilación de p396TAU.

8.3.2.3 TAU en fracción soluble de homogenados de hipocampo

Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en la fracción soluble de homogenados de hipocampo de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS) y D (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 1 mg/kg) y de n=15 animales del grupo E (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 3 mg/kg). Los niveles de TAU y pTAU en las fracciones solubles de hipocampo de IRN6301 (grupo D) fueron valores atípicos y se excluyeron. Un tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de hipocampo solubles. Se observó una ligera disminución (sin significancia) de la fosforilación de TAU en 231 evaluada como las proporciones de p231TAU a TAU total después de tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1.

8.3.2.4 TAU en fracción insoluble en sarcosil de homogenados de hipocampo

Se evaluaron TAU total, p231TAU, p396TAU, y las proporciones de pTAU a TAU total en las fracciones insolubles en sarcosil de homogenados de hipocampo de n=16 animales del grupo A (grupo vehículo Tg; PBS), B (Tg ACI-36-3A8-Ab1, 1 mg/kg), y C (Tg, ACI-36-3A8-Ab1, 3 mg/kg). Un tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1 no afectó significativamente TAU total y pTAU en los homogenados de hipocampo insolubles en sarcosil. Se observó un ligero incremento (sin significancia) de la media de TAU total, p231TAU así como p396TAU después de tratamiento con ACI-36-3A8-Ab1. La fosforilación de TAU evaluada como la proporción de p231TAU a TAU total no se afectó y el tratamiento con 1mg/kg ACI-36-3A8-Ab1 redujo ligeramente la proporción de p396TAU a TAU total.

8.3.2.5. Transferencias Western para corteza soluble

Una reducción significativa del epítipo pS396/pS404 pTau en la corteza cerebral soluble en ratones tratados con 1 ó 3 mg/kg de ACI-36-3A8-Ab1 (Figura 5D). La presencia del epítipo humano/transgénico pT181 pTau se redujo en la fracción soluble de corteza, con un efecto significativo en ratones tratados con 1 mg/kg y tendencia en ratones tratados con 3 mg/kg (Figura 5E). Se observó una tendencia para una reducción en la cantidad de pT181 pTau endógeno (Figura 5F).

8.3.2.6 TAU en ratones biGT bigénicos para Tau

Ratones biGT tratados con ACI-36-3A8-Ab1 durante 3 meses tenían Tau total significativamente reducida en la fracción soluble de corteza cerebral (Figura 6A y 6B). Se observó una reducción significativa para los epítipos de pTau pT231/AT180 (Figura 6C y 6D), pS202/AT8 (Figura 6E), y pS396 (Figura 6F y 6G). También se observó una reducción significativa en homogenado total (TH) para epítipo de pTau pS400 (Figuras 6H y 6I) y pS404 (Figuras 6L y 6M). Además, también se observó una reducción significativa en fracción soluble para los epítipos de pTau pS400 (Figura 6J y 6K) y una tendencia para reducción del epítipo de pTau pS404 (Figura 6N y 6O).

8.3.3 Histología

8.3.3.1 Morfometría - determinación de áreas de región

Véase el Ejemplo 8.2.3.1

8.3.3.2 Resultados de AT180 IH

El anticuerpo AT180 detecta pTAU endógena y humana (doblemente fosforilada en Thr231 y Ser235). La cantidad de pTAU intrasomal en controles nTg fue significativamente menor comparado con los grupos Tg (p<0,001). En la amígdala, las dos dosis de ACI-36-3A8-Ab1 [1 mg/kg (grupo D) y 3 mg/kg (grupo E)] disminuyeron significativamente

5 la pTAU somal comparado con los animales tratados con vehículo (Figura 8, izquierda). Un efecto similar fue detectable en el hipocampo donde la dosificación más baja de ACI-36-3A8-Ab1 redujo pTAU, sin embargo, en este caso la dosis más alta fue menos efectiva y sólo dio lugar a una tendencia de disminución (Figura 8, derecha). Esta disminución también fue cualitativamente visible como disminución del área de tinción y la intensidad de tinción en somas neuronales individuales. Los resultados de la suma normalizada de las intensidades de la AT180 IR medida en somas neuronales fueron comparables en la amígdala con porcentaje de área AT180 IR medida pero alcanzó significancia sólo para la dosis más alta. En el hipocampo, el resultado fue totalmente comparable al porcentaje de área IR.

8.3.4 Resumen

10 La patología cerebral Tau según se mide por MSD no mostró un cambio significativo, sin embargo, la inmunotinción de secciones de cerebro demostró dependencia de la dosis con una reducción de hasta 40% en la inmunotinción de AT180 (pT231/pS235) en somas neuronales.

El estudio muestra que la inmunización pasiva usando trece administraciones de un anticuerpo anti-pTau específico de fosfotio, ACI-36-3A8-Ab1 mejora el aprendizaje espacial y reduce significativamente la patología cerebral pTau.

15 **Depósitos:**

Las líneas celulares de hibridoma siguientes se depositaron en el nombre de AC Immune SA, PSE-EPFL Edificio B, 1015 Lausana, Suiza y Katholieke Universiteit Leuven, Minderbroedersstraat 8a - Box 5105, B-3000 Leuven con el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Inhoffenstrasse 7 B, 38124 Braunschweig, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest:

| Nombre del hibridoma | Número de depósito | Fecha del depósito |
|----------------------|--------------------|-----------------------|
| 6C10F9C12A11 | DSM ACC3079 | 25 de agosto, 2010 |
| 6C10E5E9C12 | DSM ACC3081 | 25 de agosto, 2010 |
| 6H1A11C11 | DSM ACC3080 | 25 de agosto, 2010 |
| 6H1G6E6 | DSM ACC3088 | 25 de agosto, 2010 |
| 2B6A10C11 | DSM ACC3084 | 25 de agosto, 2010 |
| 2B6G7A12 | DSM ACC3087 | 25 de agosto, 2010 |
| 3A8A12G7 | DSM ACC3086 | 25 de agosto, 2010 |
| 3A8E12H8 | DSM ACC3085 | 25 de agosto, 2010 |
| 7C2(1)F10C10D3 | DSM ACC3082 | 25 de agosto, 2010 |
| 7C2(2)B9F11D5 | DSM ACC3083 | 25 de agosto, 2010 |
| A4-4A6-48 | DSM ACC3136 | 30 de agosto, 2011 |
| A6-2G5-30 | DSM ACC3137 | 30 de agosto, 2011 |
| A6-2G5-41 | DSM ACC3138 | 30 de agosto, 2011 |
| A4-2A1-18 | DSM ACC3139 | 30 de agosto, 2011 |
| A4-2A1-40 | DSM ACC3140 | 30 de agosto, 2011 |
| A6-1 D2-12 | DSM ACC3141 | 6 de septiembre, 2011 |

Tabla 1. Descripción de secuencia Tau, vacuna y anticuerpo

| Descripción | Vacuna | Secuencia*, longitud (n), número ID de secuencia | Híbridos | Anticuerpos |
|--|--------|---|--|--|
| T1: Tau 5-20 [pY18] | ACI-33 | RQEFVMEHDHAGTY(p)GL (n = 16) (SEQ ID NO: 59) | 6C10F9C12A11 6C10E5E9C12 | ACI-33-6C10-Ab1 ACI-33-6C10-Ab2 |
| T8: Tau 206-221 [pT212, pS214] T9: Tau 196-211 [pS202, pT205] | ACI-41 | PGRSRRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 60) GYSSPGS(p)PGT(p)PGRSR (n = 16) (SEQ ID NO: 61) | 7C2(1)F10C10D3 7C2(2)B9F1105 | ACI-41-7C2..Ab1 ACI-41-7C2-Ab1 |
| T4: Tau 401-418 [pS404, pS409] | ACI-36 | GDTs(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n = 18) (SEQ ID NO: 63) | 6H1A11C11 6H1G6E6 2B6A10C11 2B6G7A12 3A8A12G7 3A8E12H8 | ACI-36-6H1-Ab1 ACI-36-H1-Ab2 ACI-36-2B6-4b1 ACI-36-2B6-4b2 ACI-36-3A8-Ab1 ACI-36-3A8-Ab2 |
| T3: Tau 393-408 [pS396, pS404] | ACI-35 | VYKS(p)PWSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO: 62) | A4-4A6-48 A6-2G5-30 A6-2G5-41 A4-2A1-18 A4-2A1-40 A6-1D2-12 | ACI-35-4A6-Ab2 ACI-35-2G5-Ab2 ACI-35-2G5-Ab3 ACI-35-2A1-Ab1 ACI-35-2A1-Ab2 ACI-35-1D2-Ab1 |

| Descripción | Vacuna | Secuencia*, longitud (n), número ID de secuencia | Híbridos | Anticuerpos |
|--|--------|--|----------|-------------|
| T5: Secuencia control: Tau 379-408 [pS396, pS404] | ACI-37 | RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PWSGDTS(p)PRHL (n = 30) (SEQ ID NO: 58) | | |
| T8: Tau 206-221 [pT212, pS214] | ACI-39 | PGRSRT(p)PS(p)LTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 60) | | |
| T9: Tau 196-211 [pS202, pT205] | ACI-40 | GYSSPGS(p)PGT(p)PGRSR (n = 16) (SEQ ID NO: 61) | | |
| T2: Tau 200-216 [pS202+ pT205 & pT212+pS214] | ACI-34 | PGS(p)PGT(p)PGRSRT(p)PS(p)LP (n = 17) (SEQ ID NO: 64) | | |
| T10: Tau 407-418 [pS409] | ACI-42 | HLS(p)NVSSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO: 65) | | |
| T11: Tau 399-408 [pS404] | ACI-43 | VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO: 66) | | |
| *Basado en la isoforma más larga de Tau humana (Tau441). p indica residuo fosforilado. | | | | |

Tabla 2. Resultados del cribado del hibridoma ACI-33

| <i>Cribado en placas de 24 pocillos</i> | | <i>Cribado en matraces T25</i> | | |
|---|-------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Positivo en ELISA | Positivo en TAUIR | Positivo en cribado de IgG | Positivo en ELISA | Positivo en TAUIR |
| 1A7 | | 1A7 | | |
| | 1A11 | | | |
| | 1C11 | 1C11 | | |
| 2C9 | | 2C9 | | |
| 3C3 | | 3C3 | 3C3 | |
| 3C5 | | 3C5 | | |
| 3E8 | | 3E8 | | |
| 3G10 | 3G10 | 3G10 | 3G10 | |
| 6C10 | 6C10 | 6C10 | 6C10 | 6C10 |
| 6F3 | | 6F3 | | |
| 6F8 | | 6F8 | | |

Tabla 3. Resultados del cribado del hibridoma ACI-36

| <i>Cribado en placas de 24 pocillos</i> | | <i>Cribado en matraces T25</i> | | |
|---|-------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Positivo en ELISA | Positivo en TAUIR | Positivo en cribado de IgG | Positivo en ELISA | Positivo en TAUIR |
| 2B6 | 2B6 | 2B6 | 2B6 | 2B6 |
| 2F9 | 2F9 | 2F9 | 2F9 | 2F9 |
| 2G1 | | 2G1 | 2G1 | 2G1 |
| 3A8 | 3A8 | 3A8 | 3A8 | 3A8 |
| 3B9 | | 3B9 | 3B9 | 3B9 |
| 3F11 | 3F11 | 3F11 | | 3F11 |
| | 4A3 | | | 4A3 |
| 4C1 | | 4C1 | 4C1 | 4C1 |
| 4C12 | | 4C12 | 4C12 | 4C12 |
| 4E12 | | 4E12 | 4E12 | 4E12 |
| 5E10 | | 5E10 | 5E10 | |
| 5F5 | | 5F5 | 5F5 | |
| 7D6 | 7D6 | 7D6 | 7D6 | 7D6 |
| 6H1 | | 6H1 | 6H1 | 6H1 |

Tabla 4. Clasificación para clones positivos en ELISA y TAUIR de ACI-36

| clasificación para ELISA | clasificación para TAUIR |
|--------------------------|--------------------------|
| 3A8 | 6H1 |
| 2B6 | 4C1 |
| 4C1 | 3A8 |
| 6H1 | 4C12 |
| 4C12 | 2B6 |
| 2G1 | 2F9 |
| 2F9 | 3B9 |
| 7D6 | 2G1 |
| 3B9 | 7D6 |
| 4E12 | 4E12 |

Tabla 5. Resultados del cribado del hibridoma ACI-41

| Cribado en placas de 24 pocillos | | Cribado en Matraces T25 | | |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Positivo en ELISA | Positivo en TAUIR | Positivo en cribado de IgG | Positivo en ELISA | Positivo en TAUIR |
| | 3D11 | 3D11 | | 3D11 |
| 4H6 | | 4H6 | | 4H6 |
| 5D10 | 5D10 | 5D10 | 5D10 | 5D10 |
| 5E6 | 5E6 | | | |
| 5F10 | | 5F10 | | |
| 6B7 | | 6B7 | 6B7 | |
| 7C2 | 7C2 | 7C2 | 7C2 | 7C2 |
| | 8G8 | | | 8G8 |
| | 8H8 | 8H8 | | 8H8 |

Tabla 6. Cribado de hibridomas para unión a diana

| Hibridomas | Anticuerpos | ELISA | | | | TAUIR | Transferencia Western |
|--------------|-----------------|---------------|-------------|------------------------|-----------------------|-------|-----------------------|
| | | p-péptido Tau | péptido Tau | pTau longitud completa | Tau longitud completa | | |
| 6C10F9C12A11 | ACI-33-6C10-Ab1 | + | - | +/- | - | + | - |
| 6C10E5E9C12 | ACI-33-6C10-Ab2 | + | - | +/- | - | + | - |
| 6H1A11C11 | ACI-36-6H1-Ab1 | + | - | + | - | + | + |
| 6H1G6E6 | ACI-36-6H1-Ab2 | + | - | + | - | + | + |
| 2B6A10C11 | ACI-36-2B6-Ab1 | + | - | + | - | + | + |
| 2B6G7A12 | ACI-36-2B6-Ab2 | + | - | + | - | + | + |
| 3A8A12G7 | ACI-36-3A8-Ab1 | + | - | + | - | + | + |
| 3A8E12H8 | ACI-36-3A8- | + | - | + | -/+ | + | + |

| Hibridomas | Anticuerpos | ELISA | | | | TAUPIR | Transferencia Western |
|-----------------|-----------------|---------------|-------------|------------------------|-----------------------|--------|-----------------------|
| | | p-péptido Tau | péptido Tau | pTau longitud completa | Tau longitud completa | | |
| | Ab2 | | | | | | |
| 7C2(1)F10C1 0D3 | ACI-41-7C2-Ab1 | + | - | + | - | + | - |
| 7C2(2)B9F11 D5 | ACI-41-7C2-Ab2 | + | - | + | - | + | |
| A4-2A1-18 | ACI-35-2A1-Ab1 | + | - | + | - | | |
| A4-2A1-40 | ACI-35-2A1-Ab2 | + | - | + | - | | |
| A4-4A6-18 | ACI-35-4A6-Ab1 | + | - | - | + | | |
| A4-4A6-48 | ACI-35-4A6-Ab2 | | | | | | |
| A6-1D2-12 | ACI-35-1 D2-Ab1 | + | - | + | - | | |
| A6-2G5-08 | ACI-35-2G5-Ab1 | + | - | - | - | | |
| A6-2G5-30 | ACI-35-2G5-Ab2 | + | - | + | - | | |
| A6-2G5-41 | ACI-35-2G5-Ab3 | + | - | + | - | | |

Tabla 7. Afinidad de unión de los anticuerpos anti-tau

| Hibridomas | Anticuerpos | Constante de velocidad de asociación (k_d) (1/Ms) | Constante de velocidad de disociación (k_a) (1/s) | Constante de disociación (K_D) (nM) |
|---------------|-----------------|---|---|---|
| 6C10F9C12A 11 | ACI-33-6C10-Ab1 | $9,46 \times 10^5$ | $3,27 \times 10^{-3}$ | 3,46 |
| 6H1A11C11 | ACI-36-6H1-Ab1 | $3,53 \times 10^4$ | $6,80 \times 10^{-5}$ | 1,93 |
| 6H1G6E6 | ACI-36-6H1-Ab2 | $9,99 \times 10^4$ | $9,58 \times 10^{-5}$ | 0,96 |
| 2B6A10C11 | ACI-36-2B6-Ab1 | $6,90 \times 10^5$ | $1,63 \times 10^{-4}$ | 0,24 |

ES 2 548 686 T3

| Hibridomas | Anticuerpos | Constante de velocidad de asociación (k_a) (1/Ms) | Constante de velocidad de disociación (k_d) (1/s) | Constante de disociación (K_D) (nM) |
|------------|----------------|---|---|---|
| 2B6G7A12 | ACI-36-2B6-Ab2 | $9,11 \times 10^5$ | $1,11 \times 10^{-4}$ | 0,12 |
| 3A8A12G7 | ACI-36-3A8-Ab1 | $1,01 \times 10^6$ | $1,09 \times 10^{-4}$ | 0,11 |
| 3A8E12H8 | ACI-36-3A8-Ab2 | $8,43 \times 10^5$ | $1,43 \times 10^{-4}$ | 0,17 |
| A4-4A6-18 | ACI-35-4A6-Ab1 | $2,00 \times 10^5$ | $3,10 \times 10^{-3}$ | 16 |
| A6-1D2-12 | ACI-35-1D2-Ab1 | $1,60 \times 10^3$ | $9,30 \times 10^{-6}$ | ≤ 6 |
| A6-2G5-08 | ACI-35-2G5-Ab1 | $4,80 \times 10^5$ | $5,30 \times 10^{-3}$ | 10 |

Tabla 8. Bibliotecas de péptidos u sadas para el mapeo de epítomos
Biblioteca de péptidos para T1

| Número de aminoácidos Tau(441) | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|------|----|----|
| Aminoácido | R | Q | E | F | E | V | M | E | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T1.18 | | | | | | | | | | | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.17 | | | | | | | | | | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.16 | | | | | | | | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.15 | | | | | E | | | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.14 | | | | | E | | M | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.13 | | | | | E | V | M | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.12 | | | | E | | V | M | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.11 | | | F | E | | V | M | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.10 | | | E | F | E | V | M | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.9 | | Q | E | F | E | V | M | | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| T1.7 | R | Q | E | F | E | V | M | E | D | H | A | G | T | Y(P) | G | L |
| No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aminoácido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T1.28 | | | | | | | | | | | A | G | T | Y | G | L |
| T1.27 | | | | | | | | | | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.26 | | | | | | | | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.25 | | | | | E | | | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.24 | | | | | E | | M | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.23 | | | | | E | V | M | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.22 | | | | E | | V | M | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.21 | | | F | E | | V | M | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.20 | | | E | F | E | V | M | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.19 | | Q | E | F | E | V | M | | D | H | A | G | T | Y | G | L |
| T1.8 | R | Q | E | F | E | V | M | E | D | H | A | G | T | Y | G | L |

Fosfo péptidos

No fosfo péptidos

Tabla 8. Continuación

Biblioteca de péptidos para T4

| Número de aminoácidos Tau(441) | | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | |
|--------------------------------|--|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Aminoácido | | G | D | T | S(p) | P | R | H | L | S(p) | N | V | S | S | T | G | S | I | D | |
| No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T3.17 | | G | D | T | S(p) | P | R | H | L | | | | | | | | | | | |
| T4.11 | | D | | T | S(p) | P | R | H | L | S(p) | | | | | | | | | | |
| T4.12 | | | | T | S(p) | P | R | H | L | S(p) | N | | | | | | | | | |
| T4.13 | | | | | S(p) | P | R | H | L | S(p) | N | V | | | | | | | | |
| T4.14 | | | | | P | P | R | H | L | S(p) | N | V | S | | | | | | | |
| T4.15 | | | | | | R | R | H | L | S(p) | N | V | S | S | | | | | | |
| T4.16 | | | | | | H | H | L | L | S(p) | N | V | S | S | T | | | | | |
| T4.17 | | | | | | L | | L | L | S(p) | N | V | S | S | T | G | | | | |
| T4.18 | | | | | | | | | | S(p) | N | V | S | S | T | G | S | | | |
| T4.19 | | | | | | | | | | | N | V | S | S | T | G | S | I | | |
| T4.20 | | | | | | | | | | | N | V | S | S | T | G | S | I | D | |

Fosfo péptidos

| Número de aminoácidos Tau(441) | | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | |
|--------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Aminoácido | | G | D | T | S | P | R | H | L | S | N | V | S | S | T | G | S | I | D | |
| No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T3.26 | | G | D | T | S | P | R | H | L | | | | | | | | | | | |
| T4.21 | | D | | T | S | P | R | H | L | S | | | | | | | | | | |
| T4.22 | | | | T | S | P | R | H | L | S | N | | | | | | | | | |
| T4.23 | | | | | S | P | R | H | L | S | N | V | | | | | | | | |
| T4.24 | | | | | | P | R | H | L | S | N | V | S | | | | | | | |
| T4.25 | | | | | | | R | H | L | S | N | V | S | S | | | | | | |
| T4.26 | | | | | | | | H | L | S | N | V | S | S | T | | | | | |
| T4.27 | | | | | | | | | L | S | N | V | S | S | T | G | | | | |
| T4.28 | | | | | | | | | | S | N | V | S | S | T | G | S | | | |
| T4.19 | | | | | | | | | | | N | V | S | S | T | G | S | I | | |
| T4.20 | | | | | | | | | | | N | V | S | S | T | G | S | I | D | |

No fosfo péptidos

Tabla 8. Continuación
Biblioteca de péptidos para T8

| Número de aminoácidos Tau(441) | | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | |
|--------------------------------|-------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Aminoácido | | P | G | S | R | S | R | T(p) | P | S(p) | L | P | T | P | P | T | R | |
| Fosfo péptidos | No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T8.7 | P | G | S | R | S | R | T(p) | P | | | | | | | | | |
| | T8.8 | | G | S | R | S | R | T(p) | P | S(p) | | | | | | | | |
| | T8.9 | | | S | R | S | R | T(p) | P | S(p) | L | | | | | | | |
| | T8.10 | | | | R | S | R | T(p) | P | S(p) | L | P | | | | | | |
| | T8.11 | | | | | S | R | T(p) | P | S(p) | L | P | T | | | | | |
| | T8.12 | | | | | | R | T(p) | P | S(p) | L | P | T | P | | | | |
| | T8.13 | | | | | | | T(p) | P | S(p) | L | P | T | P | P | | | |
| | T8.14 | | | | | | | | P | S(p) | L | P | T | P | P | T | | |
| | T8.15 | | | | | | | | | S(p) | L | P | T | P | P | T | R | |
| | No fosfo péptidos | No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | T8.16 | P | G | S | R | S | R | T | P | S | L | P | T | P | P | T | R |
| | | T8.17 | | G | S | R | S | R | T | P | S | | | | | | | |
| | | T8.18 | | | S | R | S | R | T | P | S | L | | | | | | |
| | | T8.19 | | | | R | S | R | T | P | S | L | P | T | | | | |
| T8.20 | | | | | | S | R | T | P | S | L | P | T | P | | | | |
| T8.21 | | | | | | | R | T | P | S | L | P | T | P | | | | |
| T8.22 | | | | | | | | T | P | S | L | P | T | P | P | | | |
| T8.23 | | | | | | | | | P | S | L | P | T | P | P | T | | |
| T8.24 | | | | | | | | | | S | L | P | T | P | P | T | R | |

Tabla 8. Continuación
Biblioteca de péptidos para T9

| Número de aminoácidos Tau(441) | | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | |
|--------------------------------|-------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| Aminoácido | | G | Y | S | S | P | G | S(p) | P | G | T(p) | P | G | S | R | S | R | |
| Fosfo péptidos | No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T9.7 | G | Y | S | S | P | G | S(p) | P | | | | | | | | | |
| | T9.8 | | Y | S | S | P | G | S(p) | P | G | | | | | | | | |
| | T9.9 | | | S | S | P | G | S(p) | P | G | T(p) | | | | | | | |
| | T9.10 | | | | S | P | G | S(p) | P | G | T(p) | P | | | | | | |
| | T9.11 | | | | | P | G | S(p) | P | G | T(p) | P | G | | | | | |
| | T9.12 | | | | | | G | S(p) | P | G | T(p) | P | G | S | | | | |
| | T9.13 | | | | | | | S(p) | P | G | T(p) | P | G | S | R | | | |
| | T9.14 | | | | | | | | P | G | T(p) | P | G | S | R | S | | |
| | T9.15 | | | | | | | | | G | T(p) | P | G | S | R | S | R | |
| | No fosfo péptidos | No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | T9.16 | G | Y | S | S | P | G | S | P | G | T | P | G | S | R | S | R |
| | | T9.17 | | Y | S | S | P | G | S | P | G | | | | | | | |
| | | T9.18 | | | S | S | P | G | S | P | G | T | | | | | | |
| | | T9.19 | | | | S | P | G | S | P | G | T | P | G | | | | |
| T9.20 | | | | | | P | G | S | P | G | T | P | G | S | | | | |
| T9.21 | | | | | | | G | S | P | G | T | P | G | S | | | | |
| T9.22 | | | | | | | | S | P | G | T | P | G | S | R | | | |
| T9.23 | | | | | | | | | P | G | T | P | G | S | R | S | | |
| T9.24 | | | | | | | | | | G | T | P | G | S | R | S | R | |

Tabla 8. Continuación
Biblioteca de péptidos para T3

| Número de aminoácidos Tau(441) | | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 |
|--------------------------------|-------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| Aminoácido | | V | Y | K | S(p) | P | V | V | S | G | D | T | S(p) | P | R | H | L |
| Fosfo péptidos | No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T3.9 | V | Y | K | S(p) | P | V | V | S | | | | | | | | |
| | T3.10 | | Y | K | S(p) | P | V | V | S | G | | | | | | | |
| | T3.11 | | | K | S(p) | P | V | V | S | G | D | | | | | | |
| | T3.12 | | | | S(p) | P | V | V | S | G | D | T | | | | | |
| | T3.13 | | | | | P | V | V | S | G | D | T | S(p) | | | | |
| | T3.14 | | | | | | V | V | S | G | D | T | S(p) | P | | | |
| | T3.15 | | | | | | V | V | S | G | D | T | S(p) | P | R | | |
| | T3.16 | | | | | | | S | S | G | D | T | S(p) | P | R | H | |
| | T3.17 | | | | | | | | G | G | D | T | S(p) | P | R | H | L |
| No fosfo péptidos | Aminoácido | V | Y | K | S | P | V | V | S | G | D | T | S | P | R | H | L |
| | No. péptido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | T3.18 | V | Y | K | S | P | V | V | S | | | | | | | | |
| | T3.19 | | Y | K | S | P | V | V | S | G | | | | | | | |
| | T3.20 | | | K | S | P | V | V | S | G | D | | | | | | |
| | T3.21 | | | | S | P | V | V | S | G | D | T | | | | | |
| | T3.22 | | | | | P | V | V | S | G | D | T | S | | | | |
| | T3.23 | | | | | | V | V | S | G | D | T | S | P | | | |
| | T3.24 | | | | | | V | V | S | G | D | T | S | P | R | | |
| | T3.25 | | | | | | | S | S | G | D | T | S | P | R | H | |
| T3.26 | | | | | | | | G | G | D | T | S | P | R | H | L | |

Tabla 9. Aminoácidos de Tau y fosfo-residuos requeridos para unión de anticuerpo.

| Vacuna | Hibridoma | Epítipo* |
|---|------------------|--|
| ACI-33 | 6C10F9C12A11 | Tau aa 15-20, con requerimiento para pY18 |
| ACI-33 | 6C10E5E9C12 | Tau aa 15-20, con requerimiento para pY18 |
| ACI-36 | 6H1A11C11 | Tau aa 405-412, con requerimiento para pS409 |
| ACI-36 | 6H1G6E6 | Tau aa 405-412, con requerimiento para pS409 |
| ACI-36 | 2B6A10C11 | Tau aa 405-411, con requerimiento para pS409 |
| ACI-36 | 2B6G7A12 | Tau aa 405-411, con requerimiento para pS409 |
| ACI-36 | 3A8A12G7 | Tau aa 405-411, con requerimiento para pS409 |
| ACI-36 | 3A8E12H8 | Tau aa 405-411, con requerimiento para pS409 |
| ACI-41 | 7C2(1)F10C10D3 | Tau aa 208-218, con requerimiento para pT212 y pS214 |
| ACI-35 | A4-2A1-18 | Tau aa 393-401, con requerimiento para pS396 |
| ACI-35 | A4-2A1-40 | Tau aa 393-401, con requerimiento para pS396 |
| ACI-35 | A4-4A6-18 | Tau aa 396-401, con requerimiento para pS396 |
| ACI-35 | A6-1D2-12 | Tau aa 394-400, con requerimiento para pS396 |
| ACI-35 | A6-2G5-08 | Tau aa 402-406, con requerimiento para pS404 |
| ACI-35 | A6-2G5-30 | Tau aa 393-400, con requerimiento para pS396 |
| ACI-35 | A6-2G5-41 | Tau aa 393-400, con requerimiento para pS396 |
| *Basado en la isoforma más larga de Tau humana (Tau441) | | |

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VK) y las CDR

| Vacuna | Híbrido | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VK CDR1 | VK CDR2 | VK CDR3 |
|--------|-----------|---------------------------------|--|---|--|----------------------------------|--|----------------------------|--|-----------------------------|----------------------------------|
| ACI-36 | 3A8A12G7* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_AD (SEQ ID NO: 48/49 and SEQ ID NO: 51) | EVQLQDSGPELVKPGA SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAS YYAVGYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 1) | DIVMTQSPSSLAMSVG QKVTMSCKSSQSVFNS GNQKNSLAWYQQKPG QSPKLLVFASTRESGV PDRFIGSGGTDFTSLTI SSVQAEDLADYFCQEH YTPPTFGTGKLELK (SEQ ID NO: 6) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | KSSQSVF NSGNQK NSLA (SEQ ID NO: 21) | FASTRE S (SEQ ID NO: 22) | QEHYTT PPT (SEQ ID NO: 23) |
| ACI-36 | 3A8A12G7* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_G (SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51) | EVQLQDSGPELVKPGA SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAS YYAVGYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 1) | DVVMQTPLSLPVSLG DQASISCRSSQRLVHS HGKTYLHWYLPKPGQS PKLLIYKVSNRFSGVDP RFGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFCSTAH FPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 7) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | RSSQRLV HSHGKT YLH (SEQ ID NO: 24) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 25) | SQTAHF PYT (SEQ ID NO: 26) |
| ACI-36 | 3A8E12H8* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_AD (SEQ ID NO: 48/49 and SEQ ID NO: 51) | EVQLQDSGPELVKPGA SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAS YYAVGYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 1) | DIVMTQSPSSLAMSVG QKVTMSCKSSQSVFNS GNQKNSLAWYQQKPG QSPKLLVFASTRESGV PDRFIGSGGTDFTSLTI SSVQAEDLADYFCQEH YTPPTFGTGKLELK (SEQ ID NO: 6) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | KSSQSVF NSGNQK NSLA (SEQ ID NO: 21) | FASTRE S (SEQ ID NO: 22) | QEHYTT PPT (SEQ ID NO: 23) |
| ACI-36 | 3A8E12H8* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_G (SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51) | EVQLQDSGPELVKPGA SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAS YYAVGYWGQGTTLTVS S (SEQ ID NO: 1) | DVVMQTPLSLPVSLG DQASISCRSSQRLVHS HGKTYLHWYLPKPGQS PKLLIYKVSNRFSGVDP RFGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYFCSTAH FPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 7) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | RSSQRLV HSHGKT YLH (SEQ ID NO: 24) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 25) | SQTAHF PYT (SEQ ID NO: 26) |

| Vacuna | Híbrido | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VK CDR1 | VK CDR2 | VK CDR3 |
|--------|-----------|---|---------------------------------|---|---|-------------------------------------|---|----------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|
| ACI-36 | 2B6A10C11 | SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 52 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | EVQLQQSGPELVKPGT SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAS YYAVGYWGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 2) | DVMTQTPLSLPVSLG DQASICRSSLVHSH GKTYLHWYLOKPGQSP KLLYKVSNRFSGVDPDR FSGSGGTDFTLKISR EAEDLGVYFCSTAHF PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 8) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | RSSQSLV HSHGKT YLH (SEQ ID NO: 27) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 25) | SQTAHF PYT (SEQ ID NO: 26) |
| ACI-36 | 2B6G7A12 | SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 52 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | EVQLQQSGPELVKPGT SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCAS YYAVGYWGQGTLLTVS S (SEQ ID NO: 2) | DVMTQTPLSLPVSLG DQASICRSSLVHSH GKTYLHWYLOKPGQSP KLLYKVSNRFSGVDPDR FSGSGGTDFTLKISR EAEDLGVYFCSTAHF PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 8) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | RSSQSLV HSHGKT YLH (SEQ ID NO: 27) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 25) | SQTAHF PYT (SEQ ID NO: 26) |
| ACI-36 | 6H1A11C11 | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDTSSSTAYME LRSLTSEDSAVYYCAS YAVGYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 3) | DVMTQTPLSLPVSLG DQASICRSSLVHSH GNTYLHWYLOKPGQSP KLLYKVSNRFSGVDPDR FSGSGGTDFTLKISR EAEDLGVYFCSTAHF PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | RSSQSLV HSHGNT YLH (SEQ ID NO: 28) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 25) | SQTAHF PYT (SEQ ID NO: 26)) |
| ACI-36 | 6H1G6E6 | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYFTDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNRGGTTYNQKFK GKATLTVDTSSSTAYME LRSLTSEDSAVYYCAS YAVGYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 3) | DVMTQTPLSLPVSLG DQASICRSSLVHSH GNTYLHWYLOKPGQSP KLLYKVSNRFSGVDPDR FSGSGGTDFTLKISR EAEDLGVYFCSTAHF PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9) | GYFTD YYMN (SEQ ID NO: 12) | DINPNR GGTTYN QKFKG (SEQ ID NO: 13) | YYAVG Y (SEQ ID NO: 14) | RSSQSLV HSHGNT YLH (SEQ ID NO: 28) | KVSNRF (SEQ ID NO: 25) | SQTAHF PYT (SEQ ID NO: 26) |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VK CDR1 | VK CDR2 | VK CDR3 |
|--------|----------------|--|--|---|---|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| ACI-33 | 6C10E5E9C12 | SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO:54 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 48/SEQ ID NO:49 and SEQ ID NO: 51 | EVQLVGGGLVQKPGGSLKSCAPSGFTFSDYGMHWVRQAPKLEWVAAYISSGSSTIYGDYVGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYCAR RGQLRLRFAYWGQGT LVTYSA (SEQ ID NO: 4) | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPRDFTGSGGDTFTTISVQAEDAGTKLELK (SEQ ID NO: 10) | GFTFSD YGMH (SEQ ID NO: 15) | YISSGSS TIYYGDT VKG (SEQ ID NO: 16) | RGQLR LRLFAY (SEQ ID NO: 17) | KASQDV STAVA (SEQ ID NO: 29) | SASYRY T (SEQ ID NO: 30) | QQHYTT PLT (SEQ ID NO: 31) |
| ACI-33 | 6C10F9C12A11 | SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO:54 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 54 and SEQ ID NO: 51 | EVQLVGGGLVQKPGGSLKSCAPSGFTFSDYGMHWVRQAPKLEWVAAYISSGSSTIYGDYVGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYCAR RGQLRLRFAYWGQGT LVTYSA (SEQ ID NO: 4) | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPRDFTGSGGDTFTTISVQAEDAGTKLELK (SEQ ID NO: 10) | GFTFSD YGMH (SEQ ID NO: 15) | YISSGSS TIYYGDT VKG (SEQ ID NO: 16) | RGQLR LRLFAY (SEQ ID NO: 17) | KASQDV STAVA (SEQ ID NO: 29) | SASYRY T (SEQ ID NO: 30) | QQHYTT PLT (SEQ ID NO: 31) |
| ACI-41 | 7C2(1)F10C10D3 | SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO:55 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 49/SEQ ID NO:56/SEQ ID NO: 57 and SEQ ID NO: 51 | EVKLMESGGGLVHPGASLRLYCAASGFTFDYYMSWVVRQPPGKAPPEWLALRNKANGYTTTEYTASVKGRFTISRDNLSQNILYLQMNTRAEADSATYYCVKALGRYFDVWVGTTT VTVSS (SEQ ID NO: 5) | DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGGDTFTLTIS SVKAEDLAVYYCQQYY SYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 11) | GFTFTD YYMS (SEQ ID NO: 18) | LIRNKAN GYTTEY TASVKG (SEQ ID NO: 19) | ALGRY FDV (SEQ ID NO: 20) | KSSQSL YSSNQK NYLA (SEQ ID NO: 32) | WASTRE S (SEQ ID NO: 33) | QQYYSY PFT (SEQ ID NO: 34) |
| ACI-41 | 7C2(2)B9F11D5 | SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO:55 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 57 and SEQ ID NO: 51 | EVKLMESGGGLVHPGASLRLYCAASGFTFDYYMSWVVRQPPGKAPPEWLALRNKANGYTTTEYTASVKGRFTISRDNLSQNILYLQMNTRAEADSATYYCVKALGRYFDVWVGTTT VTVSS (SEQ ID NO: 5) | DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGGDTFTLTIS SVKAEDLAVYYCQQYY SYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 11) | GFTFTD YYMS (SEQ ID NO: 18) | LIRNKAN GYTTEY TASVKG (SEQ ID NO: 19) | ALGRY FDV (SEQ ID NO: 20) | KSSQSL YSSNQK NYLA (SEQ ID NO: 32) | WASTRE S (SEQ ID NO: 33) | QQYYSY PFT (SEQ ID NO: 34) |

| Vacuna | Híbrido | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VK CDR1 | VK CDR2 | VK CDR3 |
|--------|-----------|---------------------|---------------------|---|---|--|---|-------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|
| ACI-35 | A4-4A6-18 | | | QVQLQPGAEALLKPGA SVKLSCKASGYTFTSY WMHWVKRPGRGLG WIGRIDPNSDRTKYNEK FKRKATLTVDKSSSTAY MQLSLTSEDSAVYYC ARDDYAWFAYWGQGT LVTYSA (SEQ ID NO: 68) | DVLMQTPLSLPVSLGD QASISCRSSQSIHNSG NTYLEWYLKQPGQSPK LLIYKLSNRFSGVPDFR SGSGSGDTFTLKISRVE AEDLGVYYCFQGSHPV PTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 69) | GYTFTS YWMH (SEQ ID NO: 70) | RIDPNS DRTKYN EKFKR (SEQ ID NO: 71) | DDYAW FAY (SEQ ID NO: 72) | RSSQSIV HSNGNT YLE (SEQ ID NO: 73) | KLSNRF S (SEQ ID NO: 74) | FQGS HV PPT (SEQ ID NO: 75) |
| ACI-35 | A6-1D2-12 | | | QVTLKESGPGILQSSQT LSLTCSFSGFSLSTSGM GVSWIRQPSGKGLLEWL AHIYWDKDRYNSLKL SRLTISKDTSRNQVFLKI TCVDTADTATYYCARLL RPYALDYWGQGTSTVY SS (SEQ ID NO: 76) | NILMTQSPSSLAVSAGE KVTMCKSSQSVLYSS NQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGGTDFTLTITIS SVQAEDLAVYYCLQYLS SLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 77) | GFSLST SGMGVS (SEQ ID NO: 78) | HIYWDD DKRYNA SLKS (SEQ ID NO: 79) | LLRPYA LDY (SEQ ID NO: 80) | KSSQSIV YSSNQK NYLA (SEQ ID NO: 81) | WASTRE S (SEQ ID NO: 82) | LQYLSSL T (SEQ ID NO: 83) |
| ACI-35 | A4-2A1-18 | | | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGHGTLTVTS A (SEQ ID NO: 88) | DIVMTQAAPSPVPTPGE SVSISCRSSKSLHNSG NTLYYWFLLRPGQSPQ LLIHRMSNLASGVPDFR SGSGSGTAFTLRISRVE AEDVGYYCMQHLKSP YTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 116) | GYTFTD YYMN (SEQ ID NO: 89) | DINPNN GGTSYN QKFKG (SEQ ID NO: 90) | EGRFA Y (SEQ ID NO: 91) | RSSKSL HSNGNT YLY (SEQ ID NO: 93) | RMSNLA S (SEQ ID NO: 94) | MQHLKS PYT (SEQ ID NO: 95) |
| ACI-35 | A4-2A1-40 | | | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGHGTLTVTS A (SEQ ID NO: 88) | DIX*MTQAAPSPVPTPG ESVSISCRSSKSLHNS GNTLYYWFLLRPGQSP QLLIHRMSNLASGVPDFR FSGSGGTAFTLRISRVE AEDVGYYCMQHLKSP PYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 92) *X = M o V | GYTFTD YYMN (SEQ ID NO: 89) | DINPNN GGTSYN QKFKG (SEQ ID NO: 90) | EGRFA Y (SEQ ID NO: 91) | RSSKSL HSNGNT YLY (SEQ ID NO: 93) | RMSNLA S (SEQ ID NO: 94) | MQHLKS PYT (SEQ ID NO: 95) |

| Vacuna | Híbrido | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VK CDR1 | VK CDR2 | VK CDR3 |
|--------|-----------|---------------------|---------------------|---|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| ACI-35 | A4-4A6-48 | | | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGFTFDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNNGGTSYHQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGGTGLTVTS A (SEQ ID NO: 88) | DIVMTQAAPSVPVTPGE SVSISCRSSKSLHNSG NTLYWFLQRPQSQ LLIYRMSNLSGVPDRF SGSGGTAFTRLRISRVE AEDVGYYCMQHLKSP YTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 118) | GYFTD YYMIN (SEQ ID NO: 89) | DINPNN GGTSYN QKFKG (SEQ ID NO: 90) | EGRFA Y (SEQ ID NO: 91) | RSSKSL HSNGNT YLY (SEQ ID NO: 93) | RMSNLA S (SEQ ID NO: 94) | MQHLKS PYT (SEQ ID NO: 95) |
| ACI-35 | A6-2G5-08 | | | QVQLKQSGAELVPRGA SVKLSCKASGFTFDYY INWVKQRPQGQLEWIA RIYPGRNIYYNEKFKG KATLTAEKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYFCARF WDVTTYWGQGLTVTSA (SEQ ID NO: 96) | DVLMTQTPLSLPVSIGD QASISCRSSQSIHNSG NTYLEWFLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRF SGSGGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCFQGSHPV YTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 97) | GYFTD YYIN (SEQ ID NO: 98) | RIYPGR GNIYYN EKFKG (SEQ ID NO: 99) | FWDVT Y (SEQ ID NO: 100) | RSSQSIV HSNGNT YLE (SEQ ID NO: 101) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 102) | FOGSHV PYT (SEQ ID NO: 103) |
| ACI-35 | A6-2G5-30 | | | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGFTFDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNNGGTSYHQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGGTGLTVTS A (SEQ ID NO: 104) | DIVMTQSQKFMSTSVG DRVSVTCASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALI YSASYRYSGVPDRFTG SGSGTDFTLTISNVQSE DLAEYFCQQYNSYPYT FGGGKLEIK (SEQ ID NO: 105) | GFTFD YYMIN (SEQ ID NO: 89) | DINPNN GGTSYH QKFKG (SEQ ID NO: 115) | EGRFA Y (SEQ ID NO: 91) | KASQNV GTNVA (SEQ ID NO: 106) | SASYRY S (SEQ ID NO: 107) | QQYNSY PYT (SEQ ID NO: 108) |
| ACI-35 | A6-2G5-41 | | | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGFTFDYY MNWVKQSHGKSLEWIG DINPNNGGTSYHQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGGTGLTVTS A (SEQ ID NO: 104) | DIVMTQSQKFMSTSVG DRVSVTCASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALI YSASYRYSGVPDRFTG SGSGTDFTLTISNVQSE DLAEYFCQQYNSYPYT FGGGKLEIK (SEQ ID NO: 105) | GFTFD YYMIN (SEQ ID NO: 89) | DINPNN GGTSYH QKFKG (SEQ ID NO: 115) | EGRFA Y (SEQ ID NO: 91) | KASQNV GTNVA (SEQ ID NO: 106) | SASYRY S (SEQ ID NO: 107) | QQYNSY PYT (SEQ ID NO: 108) |

*Dos secuencias V_k productivas (secuencias 6 y 7 en la Tabla 10; secuencias 40 y 41 en la Tabla 11) se aislaron de las líneas celulares 3A8A12G7 y 3A8E12H8; las secuencias "V_kG" se prepararon de clones hechos usando mezcla de cebadores "G" y secuencias "V_kAD" de clones hechos usando mezclas de cebadores "A" y "D". De acuerdo con esto, se producen dos anticuerpos con diferentes secuencias kappa por estos híbridos.

Tabla 11. Secuencia de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VK)

| Vacuna | Híbrido | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|-----------|---------------------------------|---|---|---|
| ACI-36 | 3A8A12G7* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_AD (SEQ ID NO: 48/ SEQ ID NO: 49/ and SEQ ID NO: 51) | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAACCTACTTACAA CCAGAAGTTCAGGGCAAGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCCCTCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTAATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGGCTACTGGGGCCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 35) | GACATTTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGT CAGTAGGACAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGTGTTTTAATAGTGGCAATCAAAAGAATCTTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCT GGTATACTTTGCATCCACTAGGAAATCTGGGGTCCCTGA TCAGTTCAATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTTT ACCATCAGCAGTGTGACAGGCTGAGGACCTGGCAGATTAC TTCTGTACGGAACATTAACCCTCTCCACCGTTCCGGTA CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 40) |
| ACI-36 | 3A8A12G7* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_G (SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51) | GAGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAACCTACTTACAA CCAGAAGTTCAGGGCAAGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCCCTCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTAATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGGCTACTGGGGCCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 35) | GATGTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCA GAGCCTGTACACAGTCAATGMAAACCTATTTACATTTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTTCAACCGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCAACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTTTTC TGTTCTCAACTGCACATTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAATAAAA (SEQ ID NO: 41) |
| ACI-36 | 3A8E12H8* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_AD (SEQ ID NO: 48/ SEQ ID NO: 49/ and SEQ ID NO: 51) | GAGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAACCTACTTACAA CCAGAAGTTCAGGGCAAGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCCCTCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTAATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGGCTACTGGGGCCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 35) | GACATTTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGT CAGTAGGACAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGTGTTTTAATAGTGGCAATCAAAAGAATCTTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCT GGTATACTTTGCATCCACTAGGAAATCTGGGGTCCCTGA TCAGTTCAATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTTT ACCATCAGCAGTGTGACAGGCTGAGGACCTGGCAGATTAC TTCTGTACGGAACATTAACCCTCTCCACCGTTCCGGTA CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 40) |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|-----------|---|--|--|---|
| ACI-36 | 3A8E12H8* | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | VK_G (SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51) | GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGGCC TTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACCGTGGTGAACACTACTTACAA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGGCCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 35) | GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTGTACACAGTATGGAATAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAAACCGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTTATTC TGTCTCAAAC TGACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 41) |
| ACI-36 | 2B6A10C11 | SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 52 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGTAAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGGCC TTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACCGTGGTGAACACTACTTACAA CCAGAAGTTTAAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGGCCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 36) | GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTGTACACAGTATGGAATAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAAACCGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTTATTC TGTCTCAAAC TGACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 42) |
| ACI-36 | 2B6G7A12 | SEQ ID NO: 46/SEQ ID NO: 52 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAACCTGGTG AAGCCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGTAAAGGCT TCTGGATATACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGGCC TTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACCGTGGTGAACACTACTTACAA CCAGAAGTTTAAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGGCCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 36) | GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTGTACACAGTATGGAATAACCTATTTACATTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAAGTTTCCAAACCGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTTATTC TGTCTCAAAC TGACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 42) |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|-------------|---|---|--|---|
| ACI-36 | 6H1A11C11 | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAAC TGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAAC TGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAAC TACTTACAA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CACGTCCTCCAGCACAGCCCTACATGGAGCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTAATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 37) | GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCA TCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTCTACACAGTCA TGGAAACACCTATTTACATTTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTT TGCTCTCAAAC TGCACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 43) |
| ACI-36 | 6H1G6E6 | SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 50 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAAC TGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAAC TGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACCGTGGTGAAC TACTTACAA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACGTTGACTGTAGA CACGTCCTCCAGCACAGCCCTACATGGAGCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTAATTACTGTGCA AGTTACTACGCCGTGGCTACTGGGCCAAGGCAC CACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 37) | GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCA TCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCCTTCTACACAGTCA TGGAAACACCTATTTACATTTGG TACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCCTGATC TACAAAGTTTCCAACCGGTTTTCTGGGGTCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAG ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTT TGCTCTCAAAC TGCACATTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG GGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 43) |
| ACI-33 | 6C10E5E9C12 | SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO: 54 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 48/SEQ ID NO: 49 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCACC CTCTGGATTCACTTTTCAGTGAAGTGGAAATGCACTGG GTTCGTCAAGCTCCAGAGAAGGACTGGAGTGGGT TGCATACATTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTAT GGAGACACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA GACAATGCCAAGAACACCCCTGTTCCCTGCAAAATGACC AGTCTGAGGTTCTGAGGACACGGCCATGTTACTGT GCAAGAAGGGGACAGCTCAGGCTACGCCCTGTTTGTCT TACTGGGGCCAAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 38) | GACATTTGTGATGACCCAGTCTCACAAA TTTCA TGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGGT CAGCATCACCTGCAAGGCCAGT CAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGACAA TCTCCTAACTACTGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTG GATCTGGGACGGATTTCACTTTCACTCAGCAGTGTGC AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAAGCAACATTA TACTACTCCGCTCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGA GCTGAAA (SEQ ID NO: 44) |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|--------------------|---|--|---|--|
| ACI-33 | 6C10F9C12 A11 | SEQ ID NO: 53/SEQ ID NO: 54 and SEQ ID NO: 51 | SEQ ID NO: 54 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGT GAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCACC CTCTGGATTACCTTTTCAGTGACTATGGAATGCACCTGG GTTCCAGCTAGGCTCCAGAGAAGGACTGGAGTGGGT TGCATACCTTAGTAGTGGCAGTAGTACCATCTACTAT GGAGACACAGTGAAGGGCCGATCACCATCTCCAGA GACAAATGCCAAGAACACCCCTGTTCCCTGCAAAATGACC AGTCTGAGGTCTGAGGACACCGCCATGTATTACTGT GCAAGAAGGGGACAGCTCAGGCTACGGCTGTTTGGT TACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 38) | GACATTTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGGTACAGCATCACCTGCAAGGCCAGT CAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTG GATCTGGAGCGGATTTCACTTTCACTTACAGCAGTGTGC AGGCTGAAGACCTGGCAGTTTACTGTGACGCAACATTA TACTACTCCGCTCAGGTTCCGGTGGTGGGACCAAGCTGGA GCTGAAA (SEQ ID NO: 44) |
| ACI-41 | 7C2(1)F10C 10D3 | SEQ ID NO: 53/ SEQ ID NO: 55 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 49/SEQ ID NO: 56/ and SEQ ID NO: 57 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTGAAGCTGATGGAATCTGGAGGAGGCTTGGTA CACCCCTGGGCTTCTCTGAGACTCTACTGTGCAGCT TCTGGATTCACCTTTACTGATTACTACATGAGCTGG TCCGCCAGCTCCAGGGAAGGCACCTGAGTGGTTG GCTTTGATTAGAACAAGCTAATGGTTACACAACAG AGTACTACTGCATCTGTTAAGGTCGGTTCACCATCTC CAGAGATAATCCCAAAACATCCTCTATCTTCAAATG AACACCCCTGAGGGCTGAGGACAGTGCCACTTATTAC TGTGTAAAAGCTCTGGGACGTTACTTCGATGCTGG GGCACAGGGACCCAGGTCACCCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 39) | GACATTTGTGATGTACAGTCTCCATCCCTCCCTAGCTGTGT CAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGACTACTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCT GATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGTCCCTGA TCGCTTACAGGCGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TACTGTGACGCAATATTAGCTATCCATTACGTTCCGGC TCGGGGACAAAAGTTGGAAAATAAAA (SEQ ID NO: 45) |
| ACI-41 | 7C2(2)B9F1 1D5 | SEQ ID NO: 53/ SEQ ID NO: 55 and SEQ ID NO: 47 | SEQ ID NO: 57 and SEQ ID NO: 51 | GAGGTGAAGCTGATGGAATCTGGAGGAGGCTTGGTA CACCCCTGGGCTTCTCTGAGACTCTACTGTGCAGCT TCTGGATTCACCTTTACTGATTACTACATGAGCTGG TCCGCCAGCTCCAGGGAAGGCACCTGAGTGGTTG GCTTTGATTAGAACAAGCTAATGGTTACACAACAG AGTACTACTGCATCTGTTAAGGTCGGTTCACCATCTC CAGAGATAATCCCAAAACATCCTCTATCTTCAAATG AACACCCCTGAGGGCTGAGGACAGTGCCACTTATTAC TGTGTAAAAGCTCTGGGACGTTACTTCGATGCTGG GGCACAGGGACCCAGGTCACCCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 39) | GACATTTGTGATGTACAGTCTCCATCCCTCCCTAGCTGTGT CAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTC AGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGACTACTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCT GATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGTCCCTGA TCGCTTACAGGCGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TACTGTGACGCAATATTAGCTATCCATTACGTTCCGGC TCGGGGACAAAAGTTGGAAAATAAAA (SEQ ID NO: 45) |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|-----------|---------------------|---------------------|---|--|
| ACI-35 | A4-4A6-18 | | | <p>CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTCT GAAGCCTGGGCTTCAGTGAACCTGCCTGCAAGGC TTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACCTG GGTGAAGCAGAGGCTTGACGAGGCTTGGAGTGA TTGGAAGGATTGATCCTAATAGTACTAAGTA CAATGAGAAGTTCAAGCGCAAGGCCACACTGACTGT AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGCTATTATTGT GCAAGGGATGATTACGCCTGGTTGCTTACTGGGGC CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 84)</p> | <p>GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCA GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAAATGG TACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAACTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGA TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTATTACT GCTTCAAGGTTACATGTTCTCCCTCCGACGTTCCGGTGGAG GCACCAAGCTGGAATCAAA (SEQ ID NO: 85)</p> |
| ACI-35 | A6-1D2-12 | | | <p>CAGGTTACTCTGAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTG CAGTCTCCAGACCCCTCAGCTCAGCTTGTCTTTCT CTGGTTTTCACTGAGCATTCTGGTATGGGTGTA GCTGGATTCTGAGCCTTCCAGAAAGGCTCTGGAGT GGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCT ATAAAGCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAACTCTCCA AGGATACCTCCAGAAACCAGGTTTCCCTCAAGATCA CCTGTGTGACACTGCAGATACTGCCACATACTACT GTGCTCGGTTACTGCGTCCCTTATGCTTTGGACTACTG GGGTCAAGGAACTCAGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 86)</p> | <p>AACATTTTGTGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTG CTGCAGGAGAAAGGTCACATAGAGCTGTAAGTCCAGTC AAAGTGTTTATACAGTTCAATCAGAAGAACTACTTGGC CTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCT GATCTACTGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGA TCGCTTACAGGCGAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTT ACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCTGGCAGTTTATT ACTGTCTCAATACCTCTCCTCGCTCACGTTCCGGTGTCTGG GACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 87)</p> |
| ACI-35 | A4-2A1-18 | | | <p>GAGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACAGCTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCGAG TCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTGTGTA AGAGAGGGCGGTTTGTCTTACTGGGGTCACTGGGAC TCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 109)</p> | <p>GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTGTACCTGTCA CTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGCTTAGTA AGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATTG GTTCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGAT ACATCGGATGTCCAACTTGCCTCAGGAGTCCAGACAG GTTCAGTGGCAGTGGGTCAAGGAACTGCTTTCACACTGAG AATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTA CTGTATGCAACATCTAAAATCTCCCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAATAAAAA (SEQ ID NO: 117)</p> |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador MH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|-----------|---------------------------|---------------------------|---|---|
| ACI-35 | A4-2A1-40 | | | <p>GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAA CCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAG TCTGACATCTGAGGACTCTGCAGICTATTATTGTGTA AGAGAGGGGCGGTTTGTCTTACTGGGTCATGGGAC TCTGGTCACTGTCTGTGCA (SEQ ID NO: 109)</p> | <p>GATATTR*TGATGACTCAGGCTGCACCCCTCTGTACCTGTC ACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCCTGCAGGCTAGT AAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATT GGTTCCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGA TATATCGGATGTCACACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACA GGTTCAAGTGGCAGTGGTCAGGAACCTGTTTTCACACTGA GAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATT ACTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAATAAAAA (SEQ ID NO: 110) R* = A or G</p> |
| ACI-35 | A4-4A6-48 | | | <p>GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAACTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCCTAACAATGGTGGTACTAGCTACAA CCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGA CAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAG TCTGACATCTGAGGACTCTGCAGICTATTATTGTGTA AGAGAGGGGCGGTTTGTCTTACTGGGTCATGGGAC TCTGGTCACTGTCTGTGCA (SEQ ID NO: 109)</p> | <p>GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCCTCTGTACCTGTC CTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCCTGCAGGCTAGTA AGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATTG GTTCCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGAT ATATCGGATGTCACACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAG GTTCAAGTGGCAGTGGTCAGGAACCTGTTTTCACACTGAG AATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTA CTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCGGAGG GGGGACCAAGCTGGAATAAAAA (SEQ ID NO: 119)</p> |
| ACI-35 | A6-2G5-08 | | | <p>CAGGTCAGCTGAAAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGT GAGGCTGGGCTTCAGTGAAGTCTCCTGCAAGG CTTCTGGCTACACTTCACTGACTACTATATAAACTG GGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGA TTGCAAGGATTTATCCTGGAAGAGGTAATTTACTA CAATGAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACACTGACTGC AGAAAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGT GCAAGATTCTGGGACGTGACTTACTGGGGCCAAAGG GACTCTGGTCACTGTCTGTGCA (SEQ ID NO: 111)</p> | <p>GATGTTTGTGATGACCCCAACTCCACTCTCCCCTGCTGTC GTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTTGCAGATCTAGTCA GAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGG TTCCCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATC TACAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGA TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACT GCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTACACGTTCCGGAGGGG GGACCAAGCTGGAATAAAAA (SEQ ID NO: 112)</p> |

| Vacuna | Hibridoma | Cebador VH (mezcla) | Cebador VK (mezcla) | VH | VK |
|--------|-----------|---------------------|---------------------|--|---|
| ACI-35 | A6-2G5-30 | | | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATTCACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACAAATGGTGACTAGCTACCA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGCCACATGACTGTAGA CAAGTCCCTCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGA AGAGAGGGAAGATTTGCTTACTGGGCCAAGGGACT CTGGTCACTGTCTGTGCA (SEQ ID NO: 113) | GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGT CAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGGCAATCTCTAAAGCAGCTGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG GTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCA GATCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTACAGCAATATAAC AGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGA AATAAAA (SEQ ID NO: 114) |
| ACI-35 | A6-2G5-41 | | | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCT TCTGGATTCACGTTCACTGACTACTACATGAACCTGGG TGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATAATTAATCCTAACAAATGGTGACTAGCTACCA CCAGAAGTTCAAGGGCAAGCCACATGACTGTAGA CAAGTCCCTCAGCACAGCTACATGGAGCTCCGCAG CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGA AGAGAGGGAAGATTTGCTTACTGGGCCAAGGGACT CTGGTCACTGTCTGTGCA (SEQ ID NO: 113) | GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACAT CAGTAGGAGACAGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGT CAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAA CCAGGGCAATCTCTAAAGCAGCTGATTTACTCGGCATCCT ACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTG GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCA GTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTACAGCAATATAAC AGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGA AATAAAA (SEQ ID NO: 114) |

*Dos secuencias V_k productivas (secuencias 6 y 7 en la Tabla 10; secuencias 40 y 41 en la Tabla 11) se aislaron de las líneas celulares 3A8A12G7 y 3A8E12H8; las secuencias "V_kG" se prepararon de clones hechos usando mezcla de cebadores "G" y secuencias "V_kAD" de clones hechos usando mezclas de cebadores "A" y "D". De acuerdo con esto, se producen dos anticuerpos con diferentes secuencias kappa por estos hibridomas.

Tabla 12. Cebadores usados para la secuenciación de CDR de regiones variables de anticuerpo

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | | SEQ ID NO |
|------------|---------------|-----------------------|-----|--|-----------|
| 3A8A 12G7 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT | 46 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | GGAATTCATG RAGWCACAKW CYCAGGTCTTT | 48 |
| | | | AD | ACTAGTCGACATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYYCWGG | 49 |
| | | | 5'G | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 3A8E 12H8 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT | 46 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | GGAATTCATGRAGWCACAKW CYCAGGTCTTT | 48 |
| | | | AD | ACTAGTCGACATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYYCWGG | 49 |
| | | | 5'G | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 2B6A 10C11 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT | 46 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT | 52 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 2B6G 7A12 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT | 46 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT | 52 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 6H1A11C11 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT | 46 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores | 5' | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | | SEQ ID NO |
|--------------------|---------------|-----------------------|----|--|-----------|
| | | | | | |
| | | VK | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 6H1G 6E6 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYCTCTT | 46 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 6C10F9 C12A11 | IgG3 | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT | 53 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT | 54 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT | 54 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 6C10E5E 9C12 | IgG3 | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT | 53 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT | 54 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | GGAATTCATGRAGWCACAKWYCAGGTCTTT | 48 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG | 49 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| 7C2(1)F10C 10D3 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT | 53 |
| | | | | ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT | 55 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACISCTGYTATGGGT | 56 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG | 49 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG | 57 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| | | | | | |
| 7C2(2)B9F 11D5 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRITTT | 53 |
| | | | | ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT | 55 |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | | SEQ ID NO | | |
|-----------|------------------------------------|-----------------------|-------|---------------------------------------|-----------|--|-----|
| | | | | | | | |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 47 | | |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG | 57 | | |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 | | |
| A6-2G5-08 | IgG2a | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTTCTCTT | 120 | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT | 121 | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCATTCTCTT | 122 | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTTCTCTT | 123 | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 124 | | |
| | | | | GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTCTTTTCTT | 125 | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTCCTCTT | 126 | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTTC | 127 | | |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAACGGGTGG | 128 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGATGG | 129 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGTGG | 130 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG | 131 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAGACGGGTGG | 132 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAGATGATGG | 133 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCAATGGATAAACGGGTGG | 134 | | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCAATGGATAAACGATGG | 135 | | |
| | | | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |
| | | | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| | | A4-2A1-18 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCATTCTCTT | 136 |
| | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTTCTCTT | | | | 120 | | |
| | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTTCTCTT | | | | 123 | | |
| | GGGAATTCATGGAATGCACCTGGGTTTTCTCTT | | | | 137 | | |
| | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTCCTCTT | | | | 138 | | |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | SEQ ID NO |
|-----------|---------------|-----------------------|--|-----------|
| | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCATCCTCTT | 139 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 124 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGATGAGCTTATCATCCTCTT | 140 |
| | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAACGGTGG | 141 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGGATAAACGGGTGG | 142 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAAACGGGTGG | 134 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAGACGGGTGG | 143 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAAACGGATGG | 144 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAAACGGATGG | 145 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG | 131 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGGGATAAACGGGTGG | 146 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAAACGGGTGG | 147 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAAACGGGTGG | 148 |
| | | Cebadores VK | 5' ACTAGTCGACATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTG | 149 |
| | | | 3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| A6-2G5-30 | IgG2b | Cebadores VH | 5' GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTCTTCCTCTT | 150 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTATTCTCTT | 151 |
| | | | GGGAATTTATGGAATGGAGCTGGGTCTTCCTCTT | 152 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTT | 127 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCATCCTCTT | 153 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 124 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTCTCTT | 154 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTTCTCTT | 155 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTT | 156 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATCTTCTT | 157 |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | SEQ ID NO |
|-----------|---------------|-----------------------|--|-----------|
| | | | ACTAGTCGACATGTAGATGTGGTTAAACTGGGT | 158 |
| | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGGGGATAAACGGATGG | 159 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAAGGGATAGACGGATGG | 160 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAGACGGGTGG | 161 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAGACGGATGG | 162 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGTGGATAAACGGATGG | 163 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAACGATGG | 164 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGTGGATAAACGATGG | 165 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGTGG | 130 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAAACGATGG | 166 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAACGATGG | 167 |
| | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCATGGATAAACGGGTGG | 168 |
| | | Cebadores VK | 5' ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACATACTCTGG | 169 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAGTCACATACTCTGG | 170 |
| | | | ACTAGTCGACTGGGCATCAGATGAGTCACATACTCTGG | 171 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACAGACCCAGG | 172 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATTCTCTGG | 173 |
| | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATATTCAGG | 174 |
| | | | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| | | | 3' CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| A4-2A1-40 | IgG2b | Cebadores VH | 5' GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCATCCTCTT | 139 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTCTCTT | 154 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTTCTCTT | 155 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTT | 127 |
| | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT | 121 |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | SEQ ID NO | |
|-----------|---------------|-----------------------|----|---|-----|
| | | | | ACTAGTCGACATGGATGGAGCTTATCATCCTCTT | 175 |
| | | 3' | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGTGG | 176 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAAACCGGTGG | 147 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGATGG | 129 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGTGGATAAACGGGTGG | 177 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGGTGG | 128 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGAGGTAAGTCCGGCTCAGTTCCTGGG | 178 |
| | | | | ACTAGTCGACATGAGGTCCCGGCTCAGTTCCTGGG | 179 |
| | | | | ACTAGTCGACATGAGGACGTCGATTCAGTTCCTGGG | 180 |
| | | 3' | | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| A6-2G5-41 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGGAATGGACCTGGGTCATCCTCTT | 181 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTCTCTT | 120 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTATCCTCTT | 182 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 124 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTCCTCTT | 126 |
| | | | | GGGAATTCATGAATGGATCTGGGTTATTCTCTT | 183 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGATAAACGGGTGG | 184 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGACGGGTGG | 185 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACAGATGG | 186 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG | 144 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGATAAACGGATGG | 145 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGGTGG | 187 |
| | | Cebadores VK | 5' | GGGAATTCATGGAGACACATTCCCAGGTCTTT | 188 |
| | | | | GGGAATTCATGGAGTCACAGTCTCAGGTCTTT | 189 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGGAGTCACATTTTCAGG | 190 |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | SEQ ID NO | |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------|---|-------------------------------------|-----|
| | | | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACATATTCAGG | 191 | |
| | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATTCTCAGG | 192 | |
| | | | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 | |
| | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 | |
| A4-4A6-48 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATGTTCTT | 193 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATGCTCTT | 194 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCACCTGGGTTTTCTCTT | 137 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGACCTGGGTTTTCTCTT | 195 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTT | 196 |
| | | | | GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTATTCTCTT | 197 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTATTCTCTT | 151 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT | 121 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGCCAATGGATAGACGATGG | 198 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGGATGG | 199 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGATGG | 200 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGCCAATGGATAACGGTGG | 141 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAAACGATGG | 166 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG | 131 |
| | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG | 144 | | | |
| | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGATGTACCCGGCTCAGTTTCTGGG | 201 | |
| | | | ACTAGTCGACATGAGGACTTCGATTCAGTTCTTGGG | 202 | |
| | | | ACTAGTCTACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 203 | |
| | | | ACTAGTCGACATGAAGTTGTCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 204 | |
| | | | ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 | |
| | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 | |

ES 2 548 686 T3

| Subclon | Isotipo de Ab | Secuencias de cebador | | | SEQ ID NO | | |
|-----------|---------------|-----------------------|-------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----|
| A4-4A6-18 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT | 205 | | |
| | | | | ATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT | 206 | | |
| | | | | ATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT | 207 | | |
| | | | 3' | CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 208 | | |
| | | Cebadores VK | 5' | ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT | 209 | | |
| | | | | ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT | 210 | | |
| | | | | ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 211 | | |
| | | | | ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT | 212 | | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG | 213 | | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG | 214 | | |
| | | | 3' | ACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 215 | | |
| | | A6-1 D2-12 | IgG2a | Cebadores VH | 5' | ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT | 216 |
| | | | | | | ATGGRCAGRCTTACWTTYTCATTCTT | 217 |
| | | | | | | ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT | 218 |
| | | | | 3' | CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 208 | |
| | | Cebadores VK | 5' | ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT | 219 | | |
| | | | | ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT | 209 | | |
| | | | | ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT | 210 | | |
| | | | | ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT | 220 | | |
| | | | | ATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG | 221 | | |
| | | | | ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 211 | | |
| | | | | ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT | 212 | | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG | 213 | | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG | 214 | | |
| | | | 3' | ACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 215 | | |

Codones Degenerados:

R = A o G S = C o G D = A o G o T B = C o G o T
 Y = C o T M = A o C H = A o C o T
 K = G o T W = A o T V = A o G o C

Tabla 13. Isoforma más larga de Tau humana (441aa), también denominada Tau40

| | |
|---|--|
| Isoforma más larga de Tau humana (441aa), también denominada Tau40 (SEQ ID NO:67) | |
| Isoforma 2 de proteína tau asociada a microtúbulos [Homo sapiens] | MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEGDSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIIÑK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV PGGGSVQIVY KPDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L (SEQ ID NO: 67) |
| Secuencia de Referencia NCBI: NP_005901.2 | |

LISTADO DE REFERENCIAS

- Alonso A.D., et al. (1997), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 94, 298-303
- Alving et al.,(1992) Infect. Immun. 60:2438-2444
- Asuni et al., (2007) J Neurosc. 27 (34), 9115-29
- 5 Braak H., et al. (1993), Eur.Neurol., 33, 403-408
- Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)
- Greenberg S.G., et al. (1992), J Biol.Chem., 267, 564-569.
- Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612
- Hodgson et al.,(1991) Bio/Technology, 9:421
- 10 Hoffmann R., et al (1997), Biochemistry, 36, 8114-8124.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991
- Kennedy, J. H., et al., 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31)
- Khaw, B. A. et al. (1982) J. Nucl. Med. 23:1011-1019
- 15 Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25 :402-405
- Masliah et al., (2005) Neuron, 46(6), 857-68
- Masliah et al., (2011) PLoS ONE, Volumen 6(4), e19338, p-1-17
- Muhs et al., (2007) Proc Natl Acad Sci USA, 104(23), 9810-5
- Muyllaert et al, (2006) Rev Neurol, 162(10), 903-907
- 20 Muyllaert et al, (2008) Genes Brain Behav., Supl. 1, 57-66
- Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 y 2, Plenum Press, N. Y. (1989))
- Nicolau et. al. (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337
- Nicoll et al., (2003) Nature Med, 9, 448-452
- Oddo et al., (2004) Neuron, 43, 321-332
- 25 Queen et al.,(1989) Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032
- Papanastassiou et al., Gene Therapy 9: 398-406 (2002)
- Reig S., et al. (1995), Acta Neuropathol., 90, 441-447
- Ribe et al., (2005) Neurobiol Dis, 20(3), 814-22
- Roberson et al, (2007) Science, 316 (5825), 750-4
- 30 Rosenmann et al., (2006) Arch Neurol, 63(10), 1459-67
- Rousseaux et al. Methods Enzymology, (1986), Academic Press 121:663-69
- Schurs, A. H. W. M., et al. 1977 {Clin. Chim Acta 57:1-40
- Terwel et al., (2006) J Biol Chem, 280, 3963-3973
- Terwel et al, (2008) Am J pathol., 172(3), 786-98
- 35 Urushitiani et al., (2007) Proc. Natl Acad Sci USA, 104(79), 2495-500
- Vandebroek et al., "Phosphorylation and Aggregation of Protein Tau in Humanized Yeast Cells and in Transgenic Mouse Brain"; 7th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease, Sorrento, Italia, 9-13 de marzo, 2005, p 15-19 Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), p 259 - 270

WO 2004/058258

WO 96/13590

WO 96/29605

Publicación de Patente U.S. No. 2002/0038086

5 Publicación de Patente U.S. No. 2003/0083299

Publicación de Patente U.S. No. 2002/0025313

Publicación de Patente U.S. No. 2004/0204354

Publicación de Patente U.S. No. 2004/0131692

Publicación de Patente U.S. No. 2002/0065259

10 Publicación de Patente U.S. No. 2003/0162695

Publicación de Patente U.S. No. 2005/0124533

Publicación de Patente U.S. No. 2005/0089473

Publicación de Patente U.S. No. 2003/0073713

Publicación de Patente U.S. No. 2003/0129186

15 Patente U.S. No. 5.112.596,

Patente U.S. No. 5.268.164,

Patente U.S. No. 5.506.206,

Patente U.S. No. 5.686.416

Patente U.S. No. 5.004.697

20

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> AC Immune S.A.
K.U. Leuven Research & Development

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

<130> P2654 PCT/A BS

10 <150> EP 10 18 6810.7
<151> 2010-10-07

15 <150> EP 11 17 4248.2
<151> 2011-07-15

<160> 221

<170> BiSSAP 1.0

20 <210> 1 <211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

25 <221> FUENTE

<222> 1..115

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 1

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

<210> 2

35 <211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

40 <221> FUENTE

<222> 1..115

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 2

45
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Tyr Tyr Ala Val Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 115
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 10 <222> 1..115
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 25 <222> 1..120
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Pro Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe

30

ES 2 548 686 T3

65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Arg Gly Gln Leu Arg Leu Arg Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

5 <210> 5
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..119
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 5

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

15 <210> 6
 <211> 113
 <212> PRT
20 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..113
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 6

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

30 **Lys**

<210> 7
<211> 112

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>

5 <221> FUENTE

<222> 1..112

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 7

10

```

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

<210> 8

<211> 112

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

20 <222> 1..112

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 8

25

```

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

<210> 9

<211> 112

30 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

35 <222> 1..112

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 9

ES 2 548 686 T3

```

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

```

5 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..107
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 10

```

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

```

15 <210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..113
 25 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 11

```

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1      5      10      15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

```

30

ES 2 548 686 T3

```

                20                25                30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
      35                40                45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
      50                55                60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      65                70                75                80
Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
      85                90                95
Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100                105                110
Lys

```

5 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 12
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
 1 5 10

20 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 13
 Asp Ile Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

30 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..6
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

40 <400> 14
 Tyr Tyr Ala Val Gly Tyr
 1 5

45 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> FUENTE

<222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

 <400> 15
 5 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
 1 5 10

 <210> 16
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> FUENTE
 15 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

 <400> 16

 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Gly Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 20 Gly

 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..11
 30 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

 <400> 17

 Arg Gly Gln Leu Arg Leu Arg Leu Phe Ala Tyr
 1 5 10
 35
 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 45
 <400> 18

 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10
 50
 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 19

Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

5 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..8
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

15 <400> 20

Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5

20 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

30 <400> 21

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Ser Leu
 1 5 10 15
 Ala

35 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 22

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

45 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 23

Gln Glu His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 24
<211> 16
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
10 <221> FUENTE
<222> 1..16
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 24

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

<210> 25
<211> 7
20 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
25 <221> FUENTE
<222> 1..7
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 25

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
40 <221> FUENTE
<222> 1..9
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 26

Ser Gln Thr Ala His Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 27
<211> 16
45 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
50 <221> FUENTE
<222> 1..16
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 27

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

<210> 28

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

10 <400> 28

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

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..11
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

20 <400> 29

25 **Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala**
1 5 10

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

35 <400> 30

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

40 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

50 <400> 31

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
1 5

55 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

60

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organisin="Mus musculus"
 5 <400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

10 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

20 <400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

25 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

35 <400> 34

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

40 <210> 35
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..345
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 35

gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tctgtaaagg cttctggata tacgttcaact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta accgtggtgg aactacttac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacgttg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggaactcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagttactac 300
 gccgtgggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

50

ES 2 548 686 T3

<210> 36
 <211> 345
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..345
 10 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

 <400> 36
 gagggtccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggata tacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catgaaaga gccttgagtg gattggagat attaataccta accgtggtgg aactacttac 180
 aaccagaagt ttaagggcaa ggccacgttg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggaactcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagttactac 300
 gccgtgggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

 15
 <210> 37
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..345
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"
 25
 <400> 37
 gagggtccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catgaaaga gccttgagtg gattggagat attaataccta accgtggtgg aactacttac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacgttg actgtagaca cgtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagttactac 300
 gccgtgggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

 30
 <210> 38
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..360
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"
 40
 <400> 38

ES 2 548 686 T3

gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcac cctctggatt cactttcagt gactatggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
 ccagagaagg gactggagtg ggttgcatac attagtagtg gcagtagtac catctactat 180
 ggagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaagggga 300
 cagctcaggc tacgcctggt tgcttactgg ggccaagggga ctctggtcac tgtctctgca 360

<210> 39
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..357
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

10

<400> 39

gaggtgaagc tgatggaatc tggaggaggc ttggtacacc ctggggcttc tctgagactc 60
 tactgtgcag cttctggatt cacctttact gattactaca tgagctgggt ccgccagcct 120
 ccaggaagg cacctgagtg gttggctttg attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180
 gagtatactg catctgttaa ggttogggtc accatctcca gagataattc ccaaaacatc 240
 ctctatcttc aaatgaacac cctgagggct gaggacagtg ccacttatta ctgtgtaaaa 300
 gctctgggac gttacttcga tgtctggggc acagggacca cggtcaccgt ctctca 357

15

<210> 40
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..339
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

25

<400> 40

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60
 atgagctgca agtccagtca gagggttttt aatagtgga atcaaaaagaa ctctttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcataggg agtggatctg ggacagattt cagtcttacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga ggacctggca gattacttct gtcaggaaca ttataccact 300
 cctcccacgt tcggtactgg gaccaagctg gagctgaaa 339

30

<210> 41
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

35

<220>
 <221> fuente

<222> 1..336
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 41

5
 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtcag gaaaaaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccggttt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctggt ctcaaactgc acattttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 42
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 42

15
 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtcag gaaaaaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccggttt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctggt ctcaaactgc acattttccg 300
 20 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 43
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 43

25
 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttcta cacagtcag gaaacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccggttt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactgc acattttccg 300
 30 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 44

35

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..321
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

10 <400> 44

| | |
|--|-----|
| gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc | 60 |
| atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acagaaacca | 120 |
| ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcacccctacc ggtacactgg agtccctgat | 180 |
| cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct | 240 |
| gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta ctccgctcac gttcgggtgct | 300 |
| gggaccaagc tggagctgaa a | 321 |

<210> 45
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..339
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

20 <400> 45

25

| | |
|---|-----|
| gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact | 60 |
| atgagctgca agtccagtca gaggctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttgccc | 120 |
| tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg | 180 |
| gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc | 240 |
| atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat | 300 |
| ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa | 339 |

<210> 46
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

35 <400> 46

40 gggaaatcat graatgsasc tggtywtyc tctt 34

<210> 47
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>

ES 2 548 686 T3

<221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5 <220>
 <221> variación
 <222> 30..30
 <223> /replace="n=i"

10 <400> 47
 cccaagcttc caggrccar kggataracn grtgg 35

15 <210> 48
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <400> 48
 gggaattcat gragwcacak wycaggtct tt 32

30 <210> 49
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..41
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40 <400> 49
 actagtcgac atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g 41

45 <210> 50
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 50
 actagtcgac atgaagttgc ctgtaggct gttgtgct 39

60 <210> 51
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 51

ES 2 548 686 T3

cccaagctta ctggatggtg ggaagatgga 30
 <210> 52
 5 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 52
 15 actagtcgac atgggatgga gctratcat sytctt 36

 <210> 53
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 25 <222> 1..33
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="artificial seuqence"

 <400> 53
 30 ggaattcat grastskgg ytmactkgr ttt 33

 <210> 54
 <211> 39
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 40 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 54
 45 actagtcgac atggactcca ggctcaattt agtttctt 39

 <210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 55
 <400> 55

 actagtcgac atgaagwtgt ggbtraactg grt 33
 60 <210> 56
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <221> fuente

<222> 1..39
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<220>
 5 <221> característica_misc
 <222> 27..27
 <223> /nota="n=i"

<400> 56
 10 actagtcgac atggagwcag acacacnsct gytatgggt 39

<210> 57
 <211> 37
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220> <221> fuente
 <222> 1..37
 20 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 57
 25 actagtcgac atggyctya tvtrctgct gctatgg 37

<210> 58
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..30
 35 <223> /tipo_mol="proteína" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-37" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 18..18
 <223> serina fosforilada

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26..26
 <223> serina fosforilada

<400> 58
 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 1 5 10 15
 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 20 25 30

<210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteína" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-33" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14..14
 <223> serina fosforilada

<400> 59

Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu
1 5 10 15

5

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

10

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-39" /organismo="secuencias artificiales"

15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7..7
 <223> treonina fosforilada

20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9..9
 <223> serina fosforilada

25

<400> 60

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
1 5 10 15

30

<210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

35

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-39" /organismo="Secuencia Artificial"

40

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7..7
 <223> serina fosforilada

45

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 10..10
 <223> treonina fosforilada

50

<400> 61

Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg
1 5 10 15

55

<210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

60

<220>
 <221> FUENTE

<222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-35" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> 4.4
 <223> serina fosforilada

<220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> 12..12
 <223> serina fosforilada

<400> 62
 15

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Tyr | Lys | Ser | Pro | Val | Val | Ser | Gly | Asp | Thr | Ser | Pro | Arg | His | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

<210> 63
 <211> 18
 20 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> FUENTE
 25 <222> 1..18
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-36" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> 4..4
 <223> serina fosforilada

<220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> 9..9
 <223> serina fosforilada

<400> 63

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asp | Thr | Ser | Pro | Arg | His | Leu | Ser | Asn | Val | Ser | Ser | Thr | Gly | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

40 Ile Asp

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 50 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-34" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3..3
 55 <223> serina fosforilada

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6..6
 60 <223> treonina fosforilada

<220>

<221> VARIANTE
 <222> 13..13
 <223> treonina fosforilada

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 15..15
 <223> serina fosforilada

10 <400> 64

Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu
1 5 10 15
Pro

<210> 65
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..12
 <223> /tipo_mol="proteína" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-42" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3..3
 <223> serina fosforilada

30 <400> 65

His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp
1 5 10

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> secuencias artificiales

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteína" /nota="Descripción de secuencia artificial: ACI-43" /organismo="secuencias artificiales"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6..6
 <223> serina fosforilada

50 <400> 66

Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
1 5 10

<210> 67
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..441
 <223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Homo sapiens"

60

<400> 67

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 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
 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 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

5

<210> 68

<211> 117

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..117

15 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 68

```

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

5

<210> 69
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

15

<400> 69

```

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

20

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

30

<400> 70

```

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1      5      10
    
```

35

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 5 <223> /tipo mol ="proteína" /organismo="Mus musculus"

 <400> 71

Arg Ile Asp Pro Asn Ser Asp Arg Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Arg
 10
 <210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..8
 <223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Mus musculus"
 20
 <400> 72

Asp Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5
 25
 <210> 73
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Mus musculus"
 35
 <400> 73

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
 40
 <210> 74
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteína" /organismo="Mus musculus"
 50
 <400> 74

Lys Leu Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
 55
 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 75

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 76

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..119

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 76

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Ala Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Cys Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Leu Leu Arg Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 77

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..112

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 77

Asn Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 5 <222> 1..12
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 78

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Ser
 1 5 10

10

<210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 20 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 79

His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

25

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

35

<900> 80

Leu Leu Arg Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5

40

<210> 81
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

50

<400> 81

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala

55

<210> 82
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 5
 <400> 82

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

 10 <210> 83
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..8
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

 20 <400> 83

Leu Gln Tyr Leu Ser Ser Leu Thr
1 5

 25 <210> 84
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..351
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

 35 <400> 84

caggccaac tgcagcagcc tggggctgag cttctgaagc ctggggcttc agtgaaactg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacgag gccttgagt gattggaagg attgatccta atagtgatcg tactaagtac 180
aatgagaagt tcaagcgcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagggatgat 300
tacgcctggg ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

 40 <210> 85
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

 <400> 85

ES 2 548 686 T3

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaactttc caaccgattt 180
tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttctc 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 86
<211> 357
5 <212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> fuente
10 <222> 1..357
<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 86

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagt cctcccagac cctcagtctg 60
15 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120
cagccttcag gaaagggctc ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180
tataacgcat ccctgaagag cggctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggtg 240
ttcctcaaga tcacctgtgt ggacactgca gatactgcca catactactg tgctcggtta 300
ctgcgtcctt atgctttgga ctactggggt caaggaacct cagtaccctg ctctca 357

<210> 87
<211> 336
20 <212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> fuente
25 <222> 1..336
<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 87

aacattttga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact 60
atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
gaatctggtg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcttcaata cctctcctcg 300
30 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 88
<211> 115
35 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> FUENTE

<222> 1..115

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 88

5

```

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

<210> 89

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

15 <222> 1..10

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 89

```

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
20 1          5          10
    
```

<210> 90

<211> 17

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

30 <222> 1..17

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 90

```

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1          5          10          15
Gly
    
```

35

<210> 91

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

40

<220>

<221> FUENTE

<222> 1...6

<223> /tipo mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

45

<400> 91

Glu Gly Arg Phe Ala Tyr
1 5

<210> 92
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
10 <221> SITE
<222> 3..3
<223> Xaa es Met o Val

<220>
15 <221> FUENTE
<222> 1..112
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 92

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

<210> 93
<211> 16
25 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
30 <221> FUENTE
<222> 1..16
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 93

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 94
<211> 7
40 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
45 <221> FUENTE
<222> 1..7
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 94

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

5 <210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

10 <400> 95

Met Gln His Leu Lys Ser Pro Tyr Thr
 1 5

15 <210> 96
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..115
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

25 <400> 96

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

30 <210> 97
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

40 <400> 97

ES 2 548 686 T3

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

<210> 98
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 10 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 98

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 99
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 25 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 99

Arg Ile Tyr Pro Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 100
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 35 <222> 1..6
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 100

Phe Trp Asp Val Thr Tyr
 1 5

<210> 101
 <211> 16
 45 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <220>
 <221> FUENTE
 5 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 101
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 10 **1 5 10 15**
 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> FUENTE
 20 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 102
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 25 **1 5**
 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> FUENTE
 35 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 103
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 40 **1 5**
 <210> 104
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..115
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 50 <400> 104

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

<210> 105
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 10 <222> 1..107
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 105

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

<210> 106
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 25 <222> 1..11
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 106

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 107
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 107

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..9

15 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 108

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

20

<210> 109

<211> 345

<212> ADN

<213> Mus musculus

25

<220>

<221> fuente

<222> 1..345

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

30

<400> 109

gagggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgtaagg cttctggata cacgttact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatgggtg tactagctac 180

aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagtctgac atctgaggac tctgcagtct attattgtgt aagagagggg 300

cggtttgctt actgggggtca tgggactctg gtcactgtct ctgca 345

35

<210> 110

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

40

<220>

<221> fuente

<222> 1..336

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

45

<400> 110

ES 2 548 686 T3

gatatttga tgactcaggc tgcacctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaaacactta cttgtattgg 120
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatat atoggatgtc caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatct aaaatctccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

5 <210> 111
<211> 345
<212> ADN
<213> Mus musculus

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..345
<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 111

15 caggtccagc tgaagcagtc tggggctgag ctggtgagc ctggggcttc agtgaaactg 60
tcctgcaagg cttctggcta cactttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gacttgagtg gattgcaagg atttattcctg gaagaggtaa tatttactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaaa aatcctccag cactgcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagattctgg 300
gacgtgactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

20 <210> 112
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..336
<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 112

30 gatgttttga tgaccxaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttga gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
ttcctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

35 <210> 113
<211> 345
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>

<221> fuente
 <222> 1..345
 <223> /tipo mol ="ADN" /organismo="Mus musculus"

5 <400> 113
 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggatt cacgttcaact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catgгааага gccttgagtg gattggagat attaatccta acaatggtgg tactagctac 180
 caccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgt aagagagggg 300
 agatttgctt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

10 <210> 114
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..321
 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

20 <400> 114
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctggatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca coacagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

25 <210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 115
 Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr His Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly

35 <210> 116
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 116

```

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

5

<210> 117

<211> 336

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> fuente

<222> 1..336

15 <223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 117

```

gatattgtga tgactcaggc tgcacctct gtacctgtca ctctctggaga gtcagtatec      60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg      120
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctcgatac atcggatgtc caaccttgcc      180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc      240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatct aaaatctccg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa                                336
    
```

20

<210> 118

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..112

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

30

<400> 118

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

<210> 119

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..336

<223> /tipo_mol="ADN" /organismo="Mus musculus"

<400> 119

gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctctggaga gtcagtatcc 60

atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120

ttctctcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180

tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240

agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatct aaaatctccg 300

15 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 120

<211> 34

<212> ADN

20 <213> secuencias artificiales

<220>

<221> fuente

<222> 1..34

25 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="secuencias artificiales"

<400> 120

ggaattcat ggaatgcagc tgggttttc tctt 34

30

<210> 121

<211> 34

<212> ADN

<213> secuencias artificiales

35

<220>

<221> fuente

<222> 1..34

<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="secuencias artificiales"

40

<400> 121

ggaattcat ggaatggagc tgggttttc tctt 34

45 <210> 122

<211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencias artificiales

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="secuencias artificiales"

10 <400> 122
 gggaattcat ggaatgcagc tgggtcattc tctt 34

15 <210> 123
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <400> 123
 gggaattcat ggaatggagc tgggttttc tctt 34

30 <210> 124
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40 <400> 124
 gggaattcat ggaatggagc tgggttattc tctt 34

45 <210> 125
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 125
 gggaattcat ggaatggagc tgggttattc tctt 34

60 <210> 126
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 126

5 gggaattcat ggaatgcagc tgggtcttcc tctt 34
 <210> 127
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 127
 15 gggaattcat ggaatggagc tgggttttcc tcttc 35
 <210> 128
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 128
 25 cccaagcttc cagggaccaa tggataacgg gtgg 34
 <210> 129
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 129
 35 cccaagcttc cagggaccaa tggataaacg atgg 34
 <210> 130
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 130
 45 cccaagcttc cagggaccaa tggataaacg atgg 34
 <210> 131
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 130
 55 cccaagcttc cagggaccaa tggataaacg atgg 34
 <210> 131
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 130
 65 cccaagcttc cagggaccaa tggataaacg atgg 34
 <210> 131
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 70 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 130

ES 2 548 686 T3

<222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5

<400> 131
 cccaagcttc cagggaccaa tggataaacg gatgg 35

<210> 132
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 15 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 132
 20 cccaagcttc cagggaccag tggatagacg ggtgg 35

<210> 133
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 30 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 133
 35 cccaagcttc cagggaccaa gggatagatg atgg 34

<210> 134
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 134
 45 cccaagcttc caggggcaa tggataaacg ggtgg 35

<210> 135
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 135
 60 cccaagcttc caggggcaa tggataaacg atgg 34

<210> 136
 <211> 34
 <212> ADN
 65

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 136

10 ggaattcat ggaatggagc tgggtcattc tctt 34

<210> 137
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 137

25 ggaattcat ggaatgcacc tgggtttcc tctt 34

<210> 138
 <211> 34
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 35 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 138

40 ggaattcat ggaatggagc tgggtcttcc tctt 34

<210> 139
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 139

ggaattcat ggaatggagc tgggtcatcc tctt 34

<210> 140
 55 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 140

65 actagtcgac atgggatgag cttatcatcc tctt 34

<210> 141
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 10 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 141

 15 cccaagcttc caggggcca tggataacgg tgg 33

 <210> 142
 <211> 36
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 25 <223> /tipo mol ="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 142

 30 cccaagcttc cagggaccag tgggataaac ggtgg 36

 <210> 143
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 40 <400> 143

 cccaagcttc cagggacca gggatagacg ggtgg 35

 45 <210> 144
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 144
 55 cccaagcttc cagggacca gggataaacg gatgg 35

 <210> 145
 <211> 35
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 145

5 cccaagcttc cagggaccag gggataaacg gatgg 35

 <210> 146
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 146

 cccaagcttc caggggccag ggataaacgg gtgg 34

20 <210> 147
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 147

 cccaagcttc caggggcca tggataaac ggtgg 35

35 <210> 148
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1...34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 148

 cccaagcttc cagggaccag tggataaacg gtgg 34

50 <210> 149
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 149

60 actagtcgac atggtgtcca cagctcagtt ccttg 35

65 <210> 150
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 548 686 T3

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 5 <400> 150
 gggaaatcat gaaatggagc tgggtcttcc tctt 34
 10 <210> 151
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 20 <400> 151
 gggaaatcat ggaatgcagc tgggttattc tctt 34
 25 <210> 152
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 35 <400> 152
 gggaaattat gaaatggagc tgggtcttcc tctt 34
 40 <210> 153
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 50 <400> 153
 gggaaatcat ggaatgcagc tgggtcatcc tctt 34
 55 <210> 154
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 65 <400> 154
 gggaaatcat ggaatgcagc tgggttttcc tctt 34
 <210> 155

ES 2 548 686 T3

<211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

10 <400> 155
 gggaattcat ggaatgcagc tgggtctttc tctt 34

15 <210> 156
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <400> 156
 actagtcgac atgggatgga gctatatcat cctctt 36

30 <210> 157
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40 <400> 157
 actagtcgac atgggatgga gcttatcatc ttctt 35

45 <210> 158
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 158
 actagtcgac atgtagatgt ggttaaactg ggt 33

60 <210> 159
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 159

ES 2 548 686 T3

5 cccaagcttc caggggccag gggataaacg gatgg 35
 <210> 160
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 160
 15 cccaagcttc caggggccaa gggatagacg gatgg 35
 <210> 161
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 25 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 161
 30 cccaagcttc cagggaccag gggatagacg ggtgg 35
 <210> 162
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 40 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 162
 45 cccaagcttc cagggaccag gggatagacg gatgg 35
 <210> 163
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 55 <400> 163
 cccaagcttc caggggccag tggataaacg gatgg 35
 60 <210> 164
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <221> fuente

ES 2 548 686 T3

<222> 1..33
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5

<400> 164
 cccaagcttc caggggcca tggataacga tgg 33

<210> 165
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

15

<400> 165
 cccaagcttc caggggccag tggataaacg atgg 34

20

<210> 166
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

30

<400> 166
 cccaagcttc cagggaccag tggataaacg atgg 34

35

<210> 167
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

45

<400> 167
 cccaagcttc cagggacca tggataacga tgg 33

50

<210> 168
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

60

<400> 168
 cccaagcttc cagggacat ggataaacgg gtgg 34

65

<210> 169
 <211> 41
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..41
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 169

10 actagtcgac atgggcatca agatgaagtc acatactctg g 41

<210> 170 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..40
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

20 <400> 170

actagtcgac atgggcatca agatgagtc catactctgg 40

25 <210> 171
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..38
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

35 <400> 171

actagtcgac tgggcatcag atgagtcaca tactctgg 38

40 <210> 172
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..41
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 172

actagtcgac atgggcatca agatgaagtc acagaccag g 41

<210> 173
 <211> 41
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 60 <222> 1..41
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 173

65 actagtcgac atgggcttca agatgaagtc acattctctg g 41

ES 2 548 686 T3

<210> 174
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5
<220>
<221> fuente
<222> 1..41
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

10
<400> 174

actagtcgac atgggcttca agatgaagtc acatattcag g 41

15
<210> 175
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20
<220>
<221> fuente
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25
<400> 175

actagtcgac atggatggag cttatcatcc tctt 34

30
<210> 176
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35
<220>
<221> fuente
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40
<400> 176

cccaagcttc cagggaccaa gggataaacg gtgg 34

45
<210> 177
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50
<220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55
<400> 177

cccaagcttc cagggccag tggataaacg ggtgg 35

60
<210> 178
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65
<220>
<221> fuente
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 178
actagtcgac atgaggtact cggctcagtt cctggg 36

5 <210> 179
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 179
actagtcgac atgaggtccc cggctcagtt cctggg 36

20 <210> 180
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 180
actagtcgac atgaggacgt cgattcagtt cttggg 36

35 <210> 181
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 181
gggaattcat ggaatggacc tgggtcatcc tctt 34

50 <210> 182
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 182
gggaattcat ggaatgcagc tgggttatcc tctt 34

65 <210> 183
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 548 686 T3

<221> fuente
<222> 1..33
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5 <400> 183
gggaattcat gaatgatct gggttattct ctt 33

10 <210> 184
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

20 <400> 184
cccaagcttc cagggaccag gggataaacg ggtgg 35

25 <210> 185
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> fuente
<222> 1..31
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

35 <400> 185
cccaagcttc cagggaccaa gggacgggtg g 31

40 <210> 186
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 186
cccaagcttc cagggaccaa tgataaaca gatgg 35

55 <210> 187
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<221> fuente
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

65 <400> 187
cccaagcttc cagggaccaa gggataaacg ggtgg 35

65 <210> 188
<211> 32

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..32 .
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 188
 10 ggaattcat ggagacacat tcccaggtct tt 32

 <210> 189
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..32
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 189
 25 ggaattcat ggagtcacag tctcaggtct tt 32

 <210> 190
 <211> 41
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..41
 35 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial",

 <400> 190
 40 actagtcgac atgggcttca agatggagtc acatttcag g 41

 <210> 191
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..41
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 50
 <400> 191

 actagtcgac atgggcatca agatgaagtc acatattcag g 41
 55
 <210> 192
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..41
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 65
 <400> 192

ES 2 548 686 T3

actagtcgac atgggctca agatgaagtc acattctcag g 41

<210> 193
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 193

15 actagtcgac atgggatgga gcttatcatg ttctt 35

<210> 194
 <211> 35
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..35
 25 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 194

30 actagtcgac atgggatgga gcttatcatg ctctt 35

<210> 195
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 40

<400> 195

gggaattcat ggaatggacc tgggtttcc tctt 34

45 <210> 196
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 196

gggaattcat ggaatggacc tgggtcttcc tctt 34

60 <210> 197
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34

ES 2 548 686 T3

<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 197

5 ggaattcat gaaatggagc tgggttattc tctt 34
 <210> 198
 <211> 34
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 15 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 198

20 cccaagcttc caggggcaa tggatagacg atgg 34
 <210> 199
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente'
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 199

35 cccaagcttc cagggaccaa gggatagacg gatgg 35
 <210> 200
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 200

50 cccaagcttc cagggaccaa gggatagacg atgg 34
 <210> 201
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 201

60 actagtcgac atgatgtacc cggctcagtt tctggg 36
 <210> 202
 <211> 36
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..36
 5 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 202
 actagtcgac atgaggactt cgattcagtt cttggg 36
 10 <210> 203
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 20 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 203
 actagtctac atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 39
 25 <210> 204
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..39
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 35 <400> 204
 actagtcgac atgaagttgt ctgtaggct gttggtgct 39
 40 <210> 205
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 50 <400> 205
 atgggatgga gctratcat sytcct 26
 55 <210> 206
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..23
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 206
 65 atgaagwtgt ggbtraactg grt 23

<210> 207
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 10
 <220>
 <221> variación
 <222> 15
 <223> /reemplazar="n=i"
 15
 <400> 207
 atggratgga sckknrtctt tmtct 25
 20
 <210> 208
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 30
 <220>
 <221> variación
 <222> 21
 <223> /reemplazar="n=i"
 35
 <400> 208
 ccaggrcca rkggatarac ngrtgg 26
 40
 <210> 209
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 50
 <400> 209
 atggagacag acacactct gctat 25
 55
 <210> 210
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 210
 65 atggagwcag acacactsct gytatgggt 29

<210> 211
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 10
 <400> 211
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 29
 15
 <210> 212
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 25
 <400> 212
 atggattwc argtcagat twtcagctt 29
 30
 <210> 213
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 40
 <400> 213
 atggyctya tvtccttgct gttctgg 27
 45
 <210> 214
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 214
 55
 atggyctya tvtrctgct gctatgg 27
 <210> 215
 <211> 21
 <212> ADN
 60
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 65
 <223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 215
actggatggt gggaagatgg a 21

5 <210> 216
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 216
atgaaatgca gctggrtyat sttctt 26

20 <210> 217
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 217
atggrcagrc ttacwtytc attcct 26

35 <210> 218
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

45 <400> 218
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

50 <210> 219
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..24
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

60 <400> 219
atgragwcac akwcycaggt cttt 24

65 <210> 220
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 548 686 T3

<221> fuente
<222> 1..32
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5 <220>
<221> variación
<222> 27
<223> /reemplazar="n=i"

10 <400> 220
atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwtc tt 32

15 <210> 221
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> fuente
<222> 1..31
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="Descripción de secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <400> 221
atgggcwtca agatragtc acakwyycwg g 31

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o parte funcional de éste que se une específicamente a un fosfo-epítipo en una proteína Tau de mamíferos, en el que dicho anticuerpo o parte funcional de éste tiene una alta afinidad de unión para proteína Tau soluble e insoluble, y modula los niveles de Tau soluble e insoluble, en el que el fosfo-epítipo es los aminoácidos 405-411 ó 405-412 que tienen una Ser fosforilada en la posición 409 (pS409), y en el que el anticuerpo o parte funcional de éste se une a la proteína Tau de mamíferos con una constante de disociación de menos de 10 nM según se mide por resonancia de plasmón superficial, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste no se une al epítipo no fosforilado correspondiente.
2. El anticuerpo o parte funcional de éste de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste se une al fosfo-epítipo en la proteína Tau de mamíferos con una constante de disociación de menos de 5 nM.
3. El anticuerpo o parte funcional de éste de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste se une al fosfo-epítipo en la proteína Tau de mamíferos con una constante de velocidad de asociación de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ o mayor.
4. El anticuerpo o parte funcional de éste de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste se une al fosfo-epítipo en la proteína Tau de mamíferos con una constante de velocidad de asociación de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ o mayor.
5. El anticuerpo o parte funcional de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la Tau de mamíferos es Tau humana.
6. El anticuerpo o parte funcional de éste de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o parte funcional de éste comprende:
- a) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o
- b) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con una secuencia de aminoácidos que es al menos 85% idéntica a SEQ ID NO: 27, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o
- c) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o
- d) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o
- e) un primer dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y/o un segundo dominio de unión que contiene en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; o
- f) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7, 8, ó 9, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, ó 3; o
- g) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o
- h) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; o
- i) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; o

j) un primer dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y/o un segundo dominio de unión que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

5 **7.** El anticuerpo o parte funcional de éste de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado; o un anticuerpo completamente humano.

8. El anticuerpo o parte funcional de éste de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es del isotipo IgG2a, IgG2b, o IgG3.

9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o parte funcional de éste de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **10.** El anticuerpo o parte funcional de éste o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en el tratamiento o alivio de los síntomas de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, en el que la enfermedad o trastorno neurodegenerativo está causado opcionalmente por o está asociado con la formación de lesiones neurofibrilares o una tauopatía.

15 **11.** El anticuerpo o parte funcional de éste o la composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en el que la administración del anticuerpo o parte funcional de éste resulta en el alivio de déficits cognitivos.

12. El anticuerpo o parte funcional de éste o la composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10 o reivindicación 11, en el que el alivio de déficits cognitivos comprende una parada de la progresión de los déficits cognitivos y/o una restauración de la capacidad de memoria cognitiva.

20 **13.** El anticuerpo o parte funcional de éste o la composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la enfermedad o trastorno neurodegenerativo se selecciona de Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, Síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis por cuerpos de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral por proteína de prión, daño cerebral traumático y enfermedades o trastornos adicionales que no muestran una patología amiloide clara incluyendo, pero no limitado a, complejo esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam,
25 enfermedad neuronal motora no Guamaniana con ovillos neurofibrilares, demencia con gránulos argirofílicos, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de múltiples sistemas, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia con ovillos predominantes, Parkinsonismo Postencefálico, Distrofia miotónica, y combinaciones de éstas.
30

14. Una línea celular que produce el anticuerpo o parte funcional de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

35 **15.** La línea celular de la reivindicación 14 que es una línea celular de hibridoma seleccionada de 3A8A12G7 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3086; 2B6A10C11 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3084; 3A8E12H8 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3085; 2B6G7A12 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3087; 6H1A11C11 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3080; y 6H1G6E6 depositada el 25 de agosto, 2010, como DSM ACC3088.

16. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o parte funcional de éste de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

40 **17.** El anticuerpo o parte funcional de éste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección asociado a la proteína tau, o en el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a la proteína tau, en un paciente que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo o parte funcional de éste a un epítipo de la proteína tau in situ que incluye las etapas de

45 a) poner en contacto la parte del cuerpo o área del cuerpo específica que se sospecha que contiene la proteína tau con un anticuerpo o parte funcional de éste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

b) permitir que el anticuerpo o parte funcional de éste se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;

c) detectar la formación del complejo inmunológico.; y

50 d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la parte o área específica del cuerpo;

en el que el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a una proteína tau incluye además la etapa de:

e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal, en el que un incremento en la cantidad de dicho complejo inmunológico comparado con un valor control normal indica que dicho paciente padece o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína tau.

5 **18.** Un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección asociada con la proteína tau, o para diagnosticar una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociada con la proteína tau, en un paciente que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo o parte funcional de éste a un epítipo de la proteína tau en una muestra que incluye las etapas de

a) poner en contacto la muestra que se sospecha que contiene la proteína tau con un anticuerpo o parte funcional de éste según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

10 b) permitir que el anticuerpo o parte funcional de éste se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;

c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de la proteína tau en la muestra;

15 en el que el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociado a una proteína tau incluye además la etapa de:

e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor control normal, en el que un incremento en la cantidad de dicho complejo inmunológico comparado con un valor control normal indica que dicho paciente padece o presenta riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína tau.

20

| Clon | Corteza | Hipocampo (CA1) | Clon | Corteza | Hipocampo (CA1) |
|---|---------|-----------------|-------------------------------------|---------|-----------------|
| 6C10F9 C12A11 | | | 6C10E5 E9C12 | | |
| 6H1A11 C11 | | | 6H1G6E 6 | | |
| 2B6A10 C11 | | | 2B6G7A 12 | | |
| 3A8A12 G7 | | | 3A8E12 H8 | | |
| 7C2(1) F10C10 D3 | | | 7C2(2) B9F11D 5 | | |
| Control anticuerpo AT100 | | | Control Anticuerpo PG5 | | |
| Control Sin anticuerpo primario | | | | | |

FIGURA 1-1


















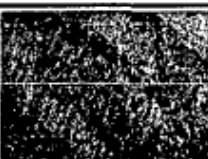


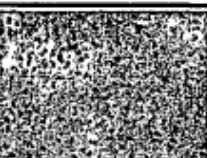

| Clon | Corteza | Hipocampo (CA1) | Clon | Corteza | Hipocampo (CA1) |
|---|---|---|----------------------------------|--|---|
| A4-2A1-18 |  |  | A6-2G5-08 |  |  |
| A4-4A6-48 |  |  | A6-2G5-30 |  |  |
| A4-2A1-40 |  |  | A6-2G5-41 |  |  |
| A6-1D2-12 |  |  | A4-4A6-18 |  |  |
| Control anticuerpo AT100 |  |  | Control Anticuerpo PG5 |  |  |
| Control Sin anticuerpo primario |  |  | | | |

FIGURA 1-2

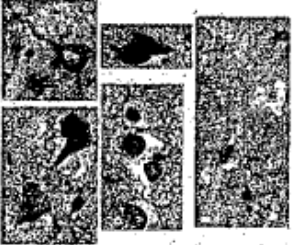


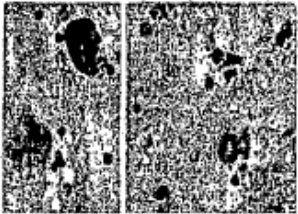
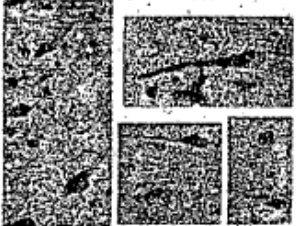
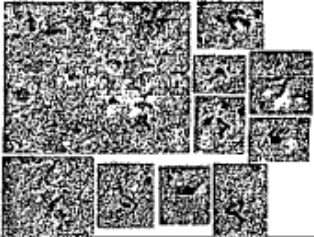

| Diagnóstico | Región | Tinción TAUIR ACI-3A8-Ab1 |
|---------------------|---------------------------|---|
| AD | Hipocampo |  |
| FAD | Hipocampo anterior |  |
| AGD | Hipocampo anterior |  |
| PSP | Pallidum |  |
| FTDP-17 | Corteza frontal |  |
| CBD | Corteza frontal |  |
| Control sano | Hipocampo |  |

FIGURA 2

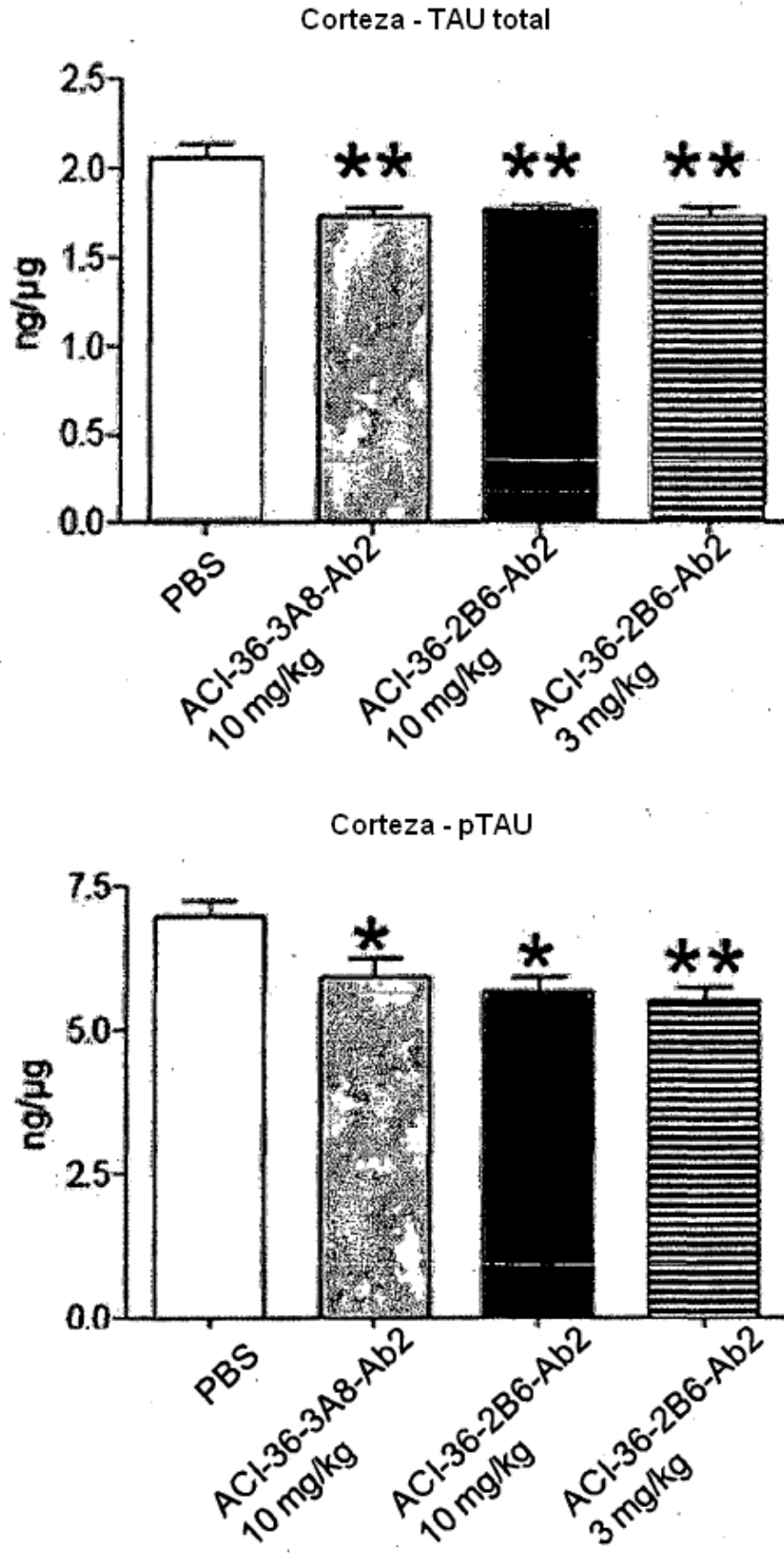


FIGURA 3

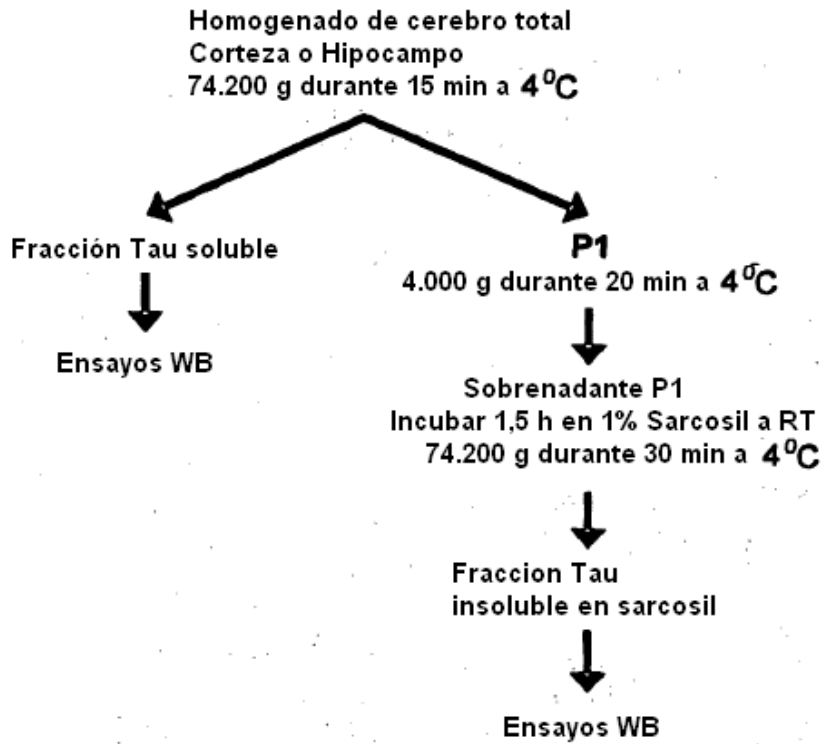


FIGURA 4-1

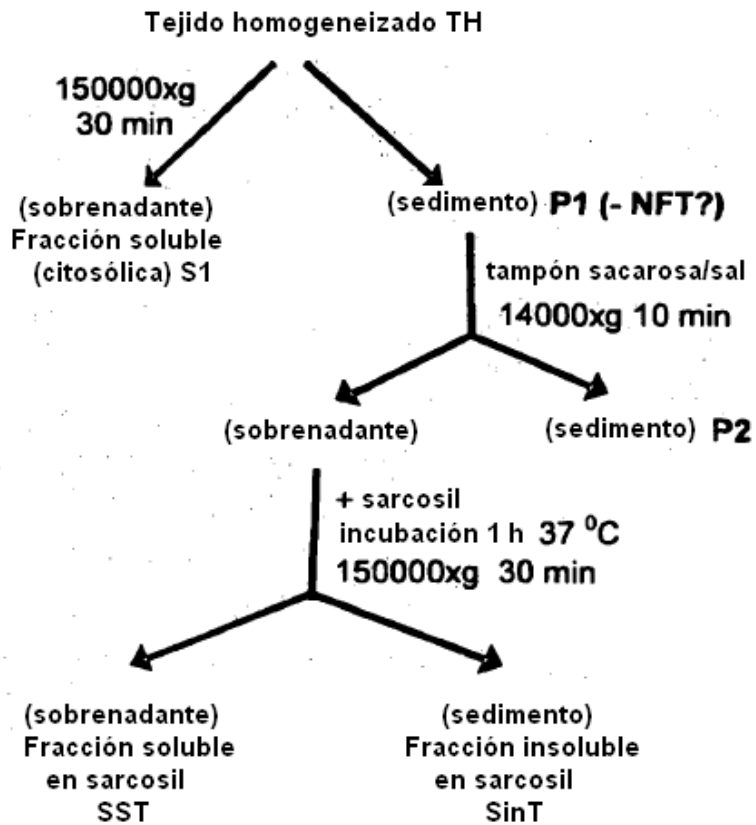


FIGURA 4-2

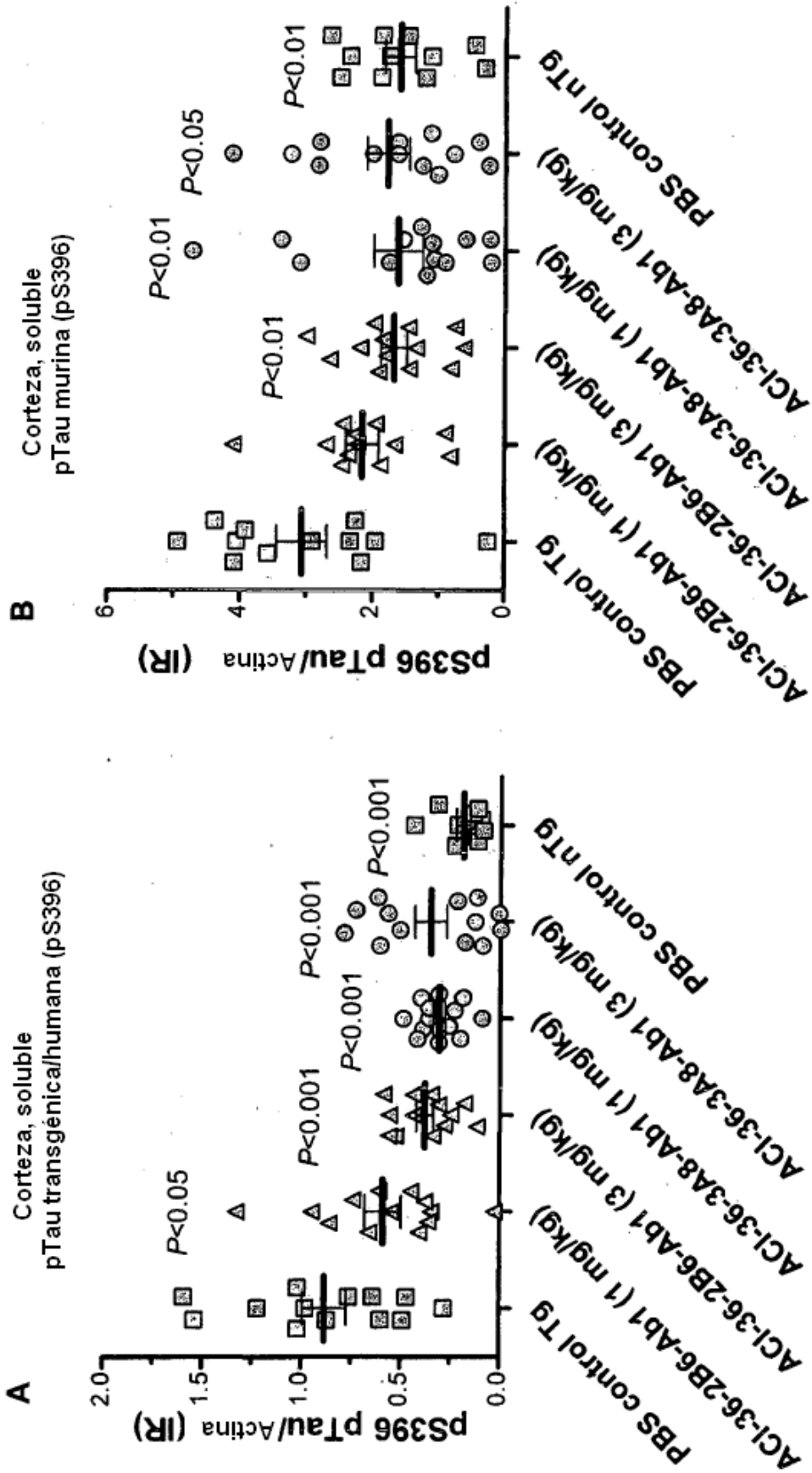


FIGURA 5-1

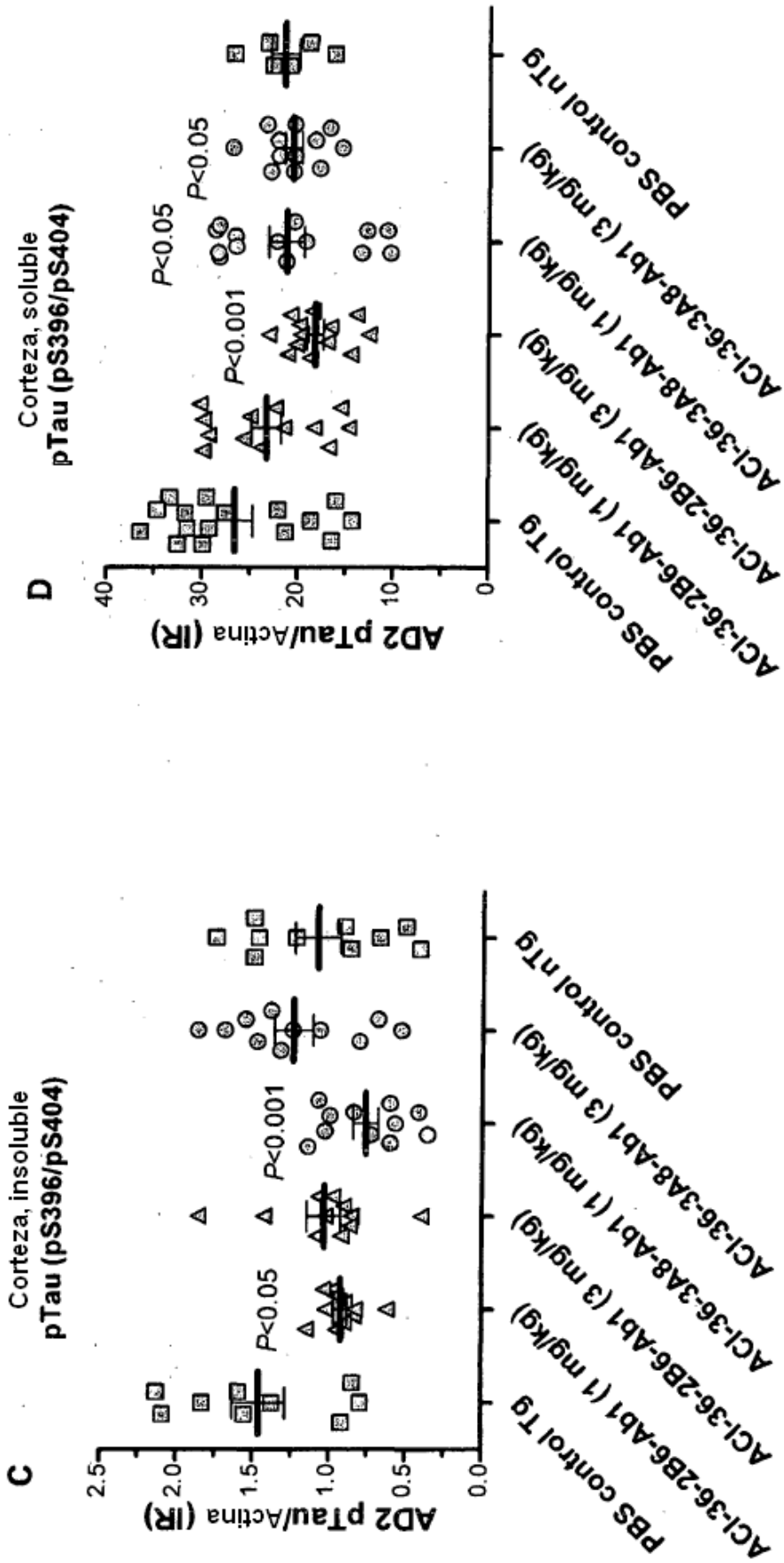


FIGURA 5-2

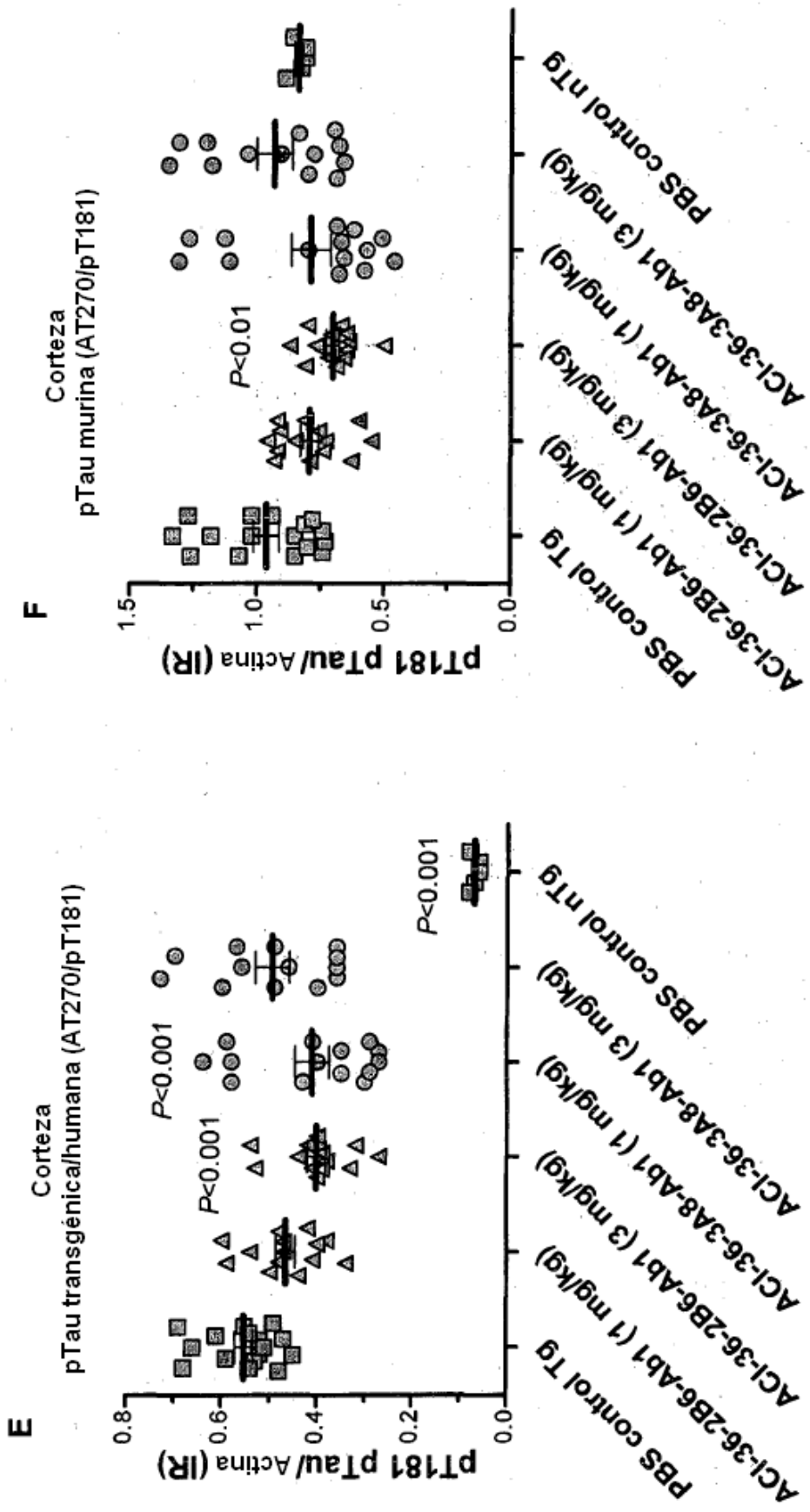


FIGURA 5-3

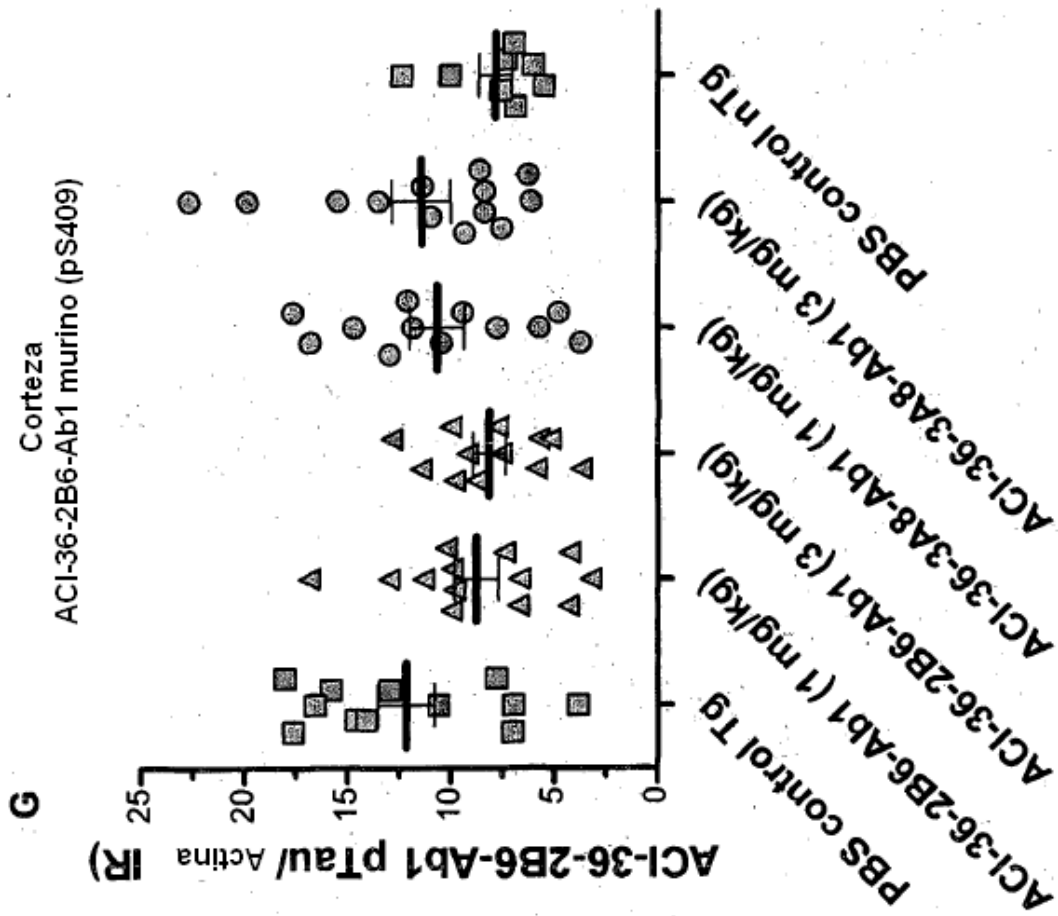


FIGURA 5-4

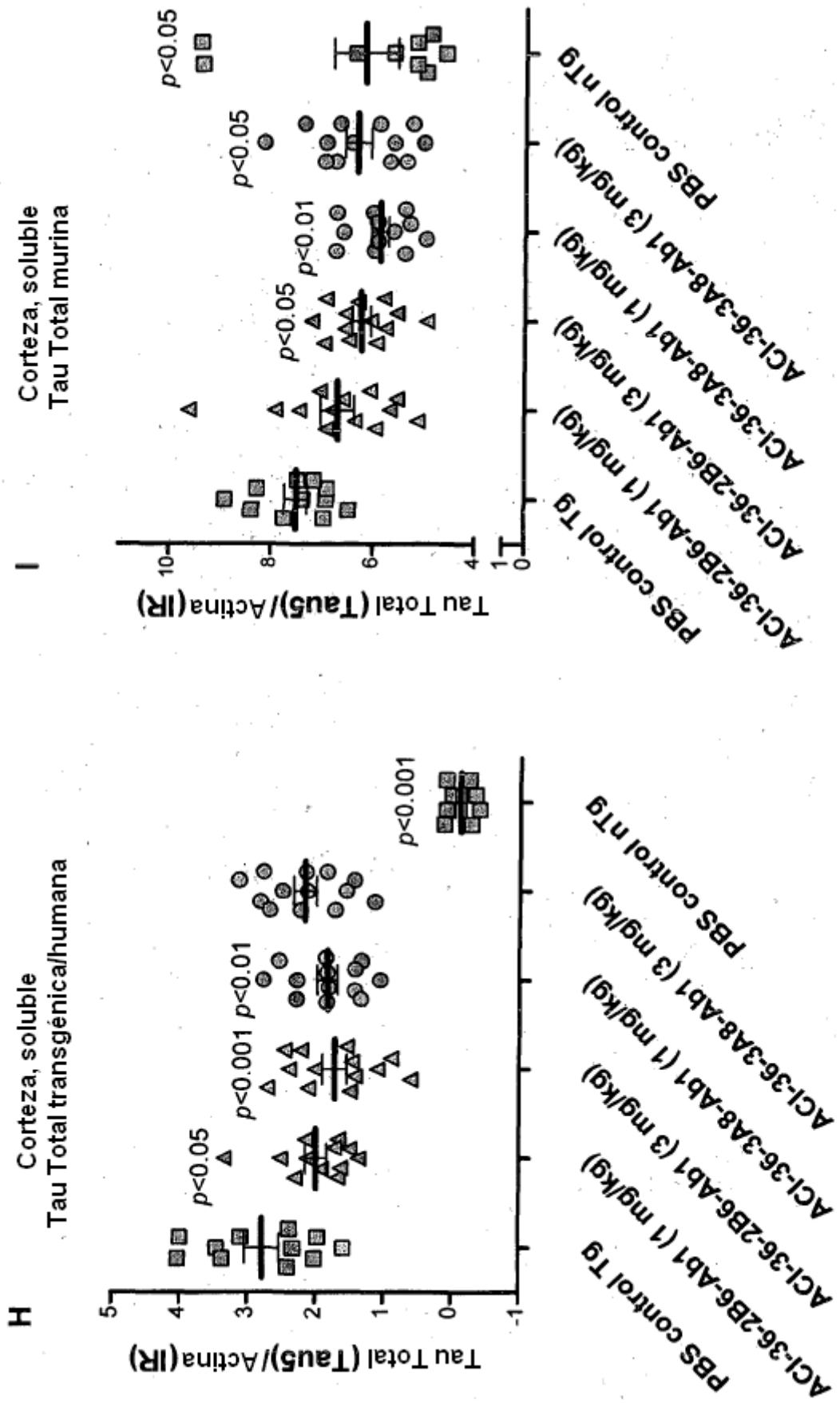


FIGURA 5-5

Corteza, fracción soluble (S1)
Tau total transgénica/humana (HT7)

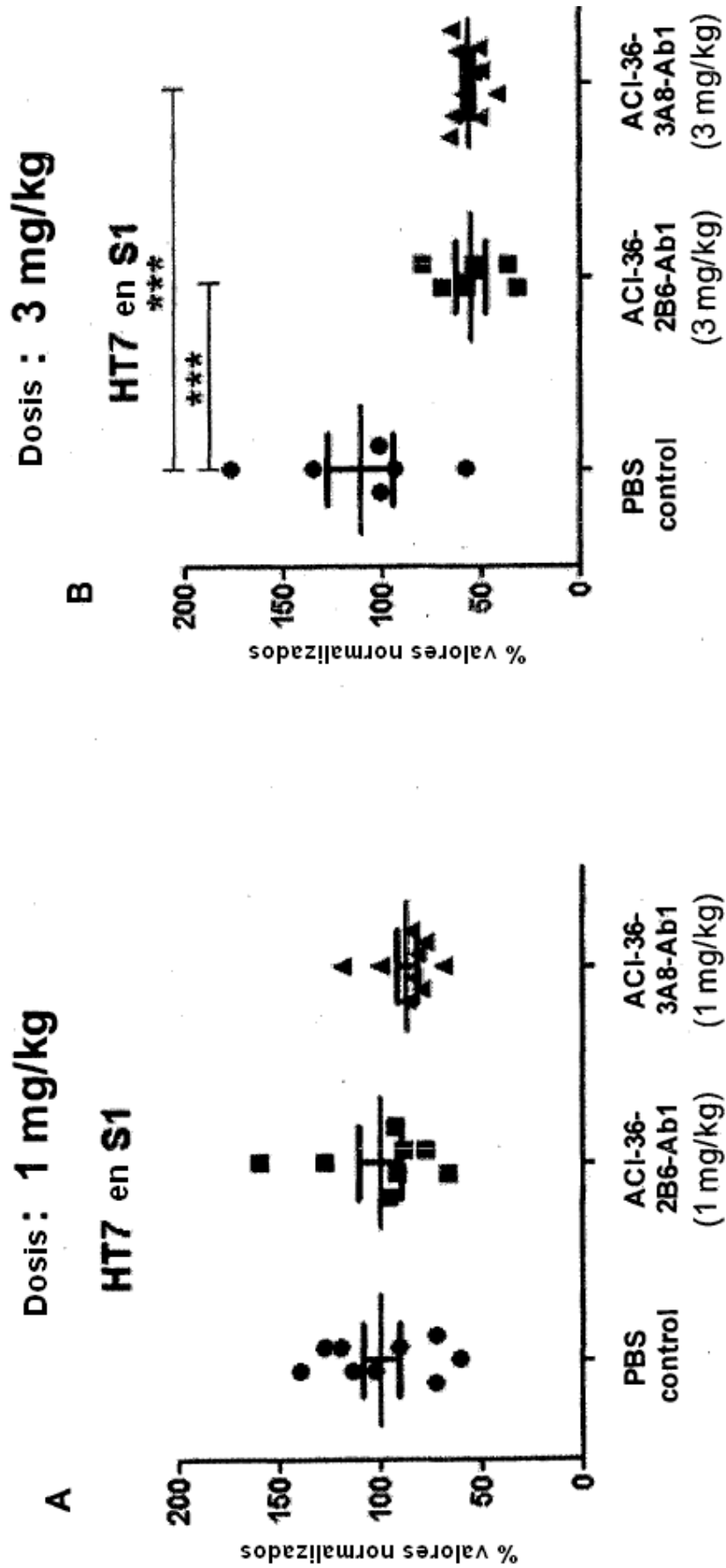


FIGURA 6-1

Corteza, fracción soluble (S1)
pTau transgénica/humana (pT231/AT180)

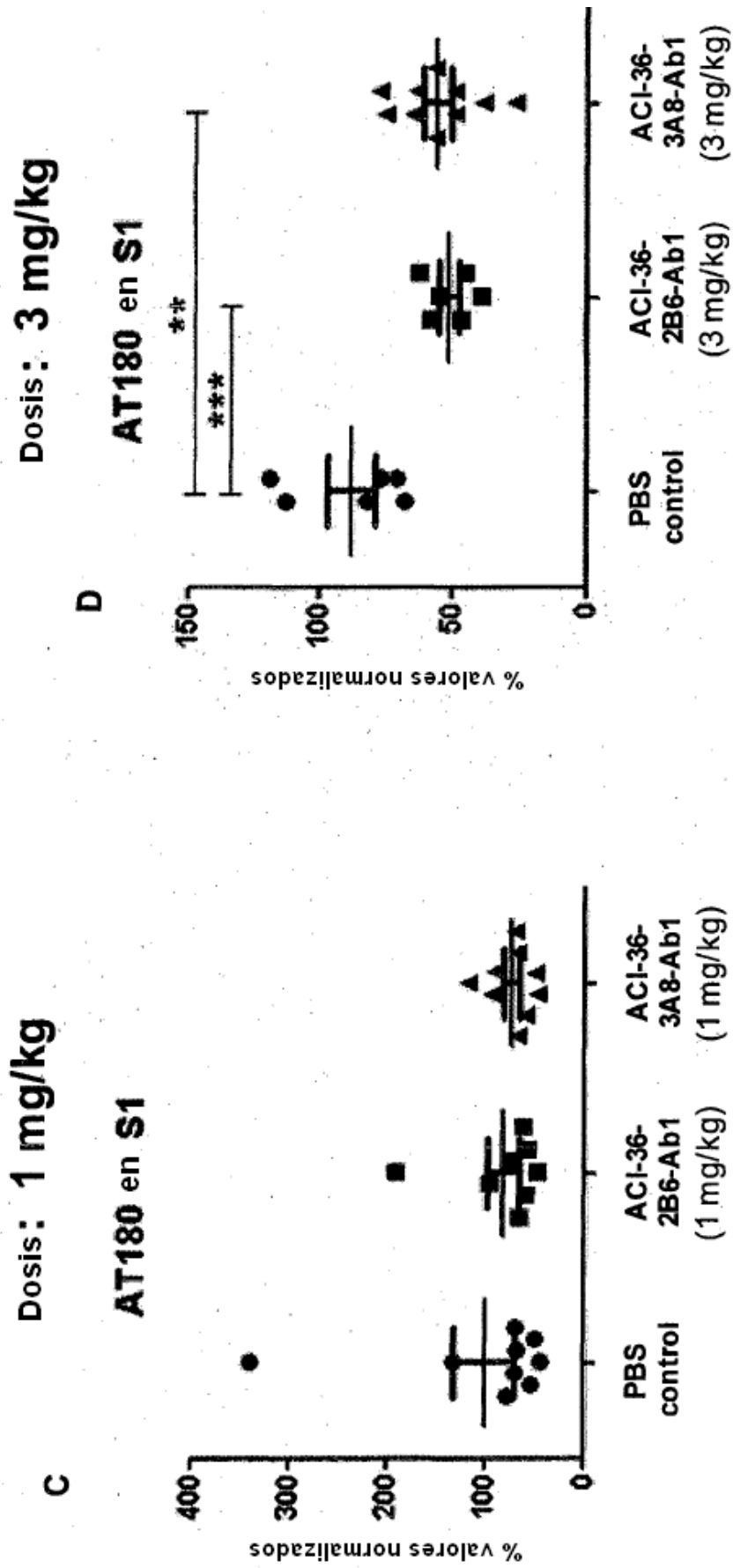


FIGURA 6-2

Corteza, fracción soluble (S1)
pTau transgénica/humana (pS202/AT8)

Dosis: 3 mg/kg

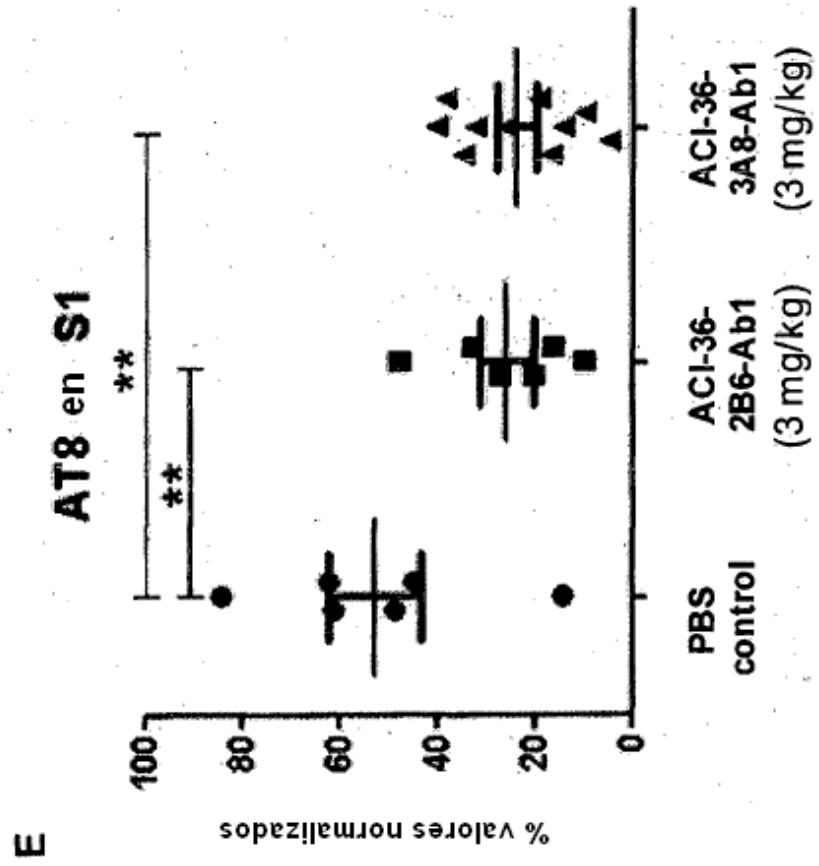


FIGURA 6-3

Corteza, fracción soluble (S1)
pTau transgénica/humana (pS396)

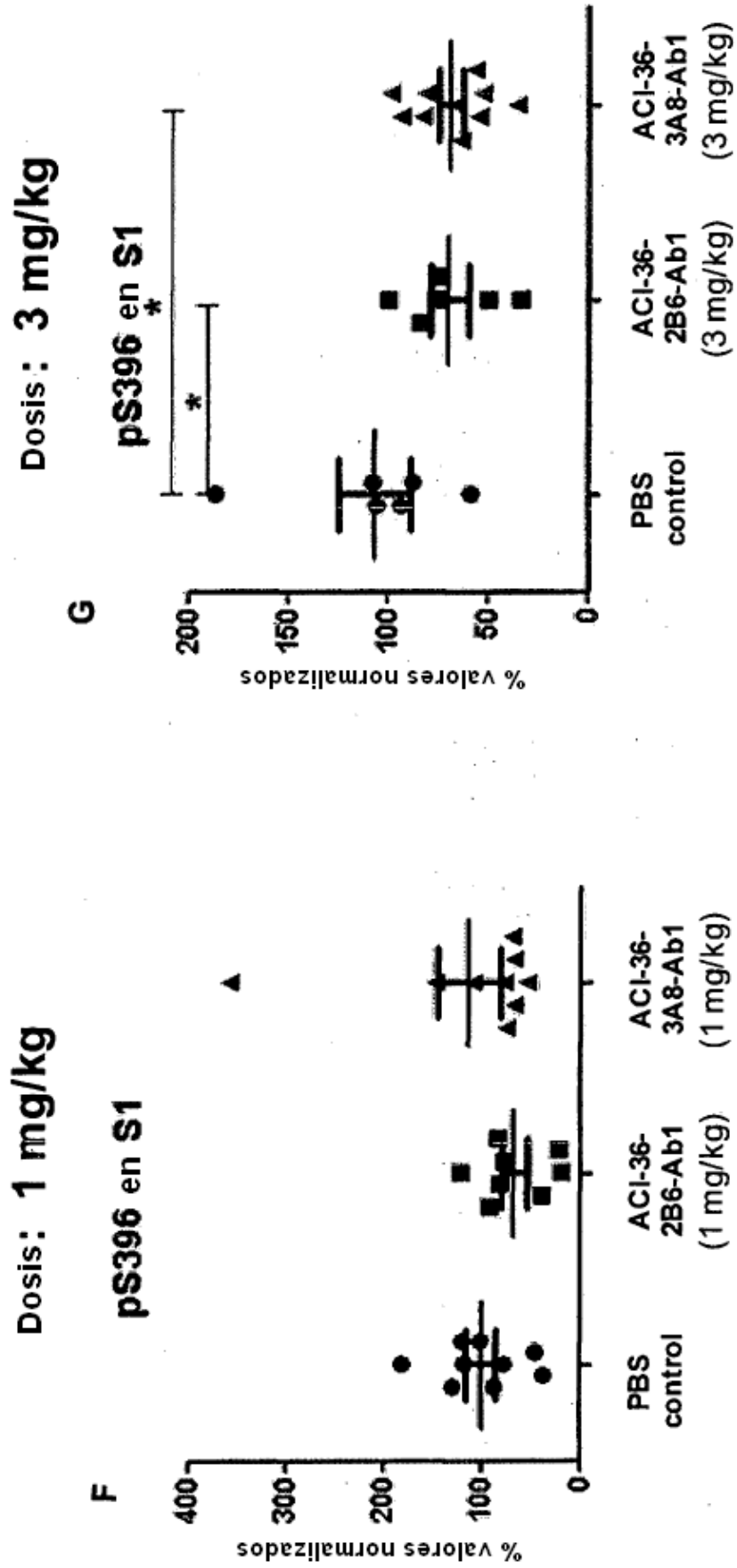


FIGURA 6-4

Corteza, homogenado total
pTau transgénica/humana (pS400)

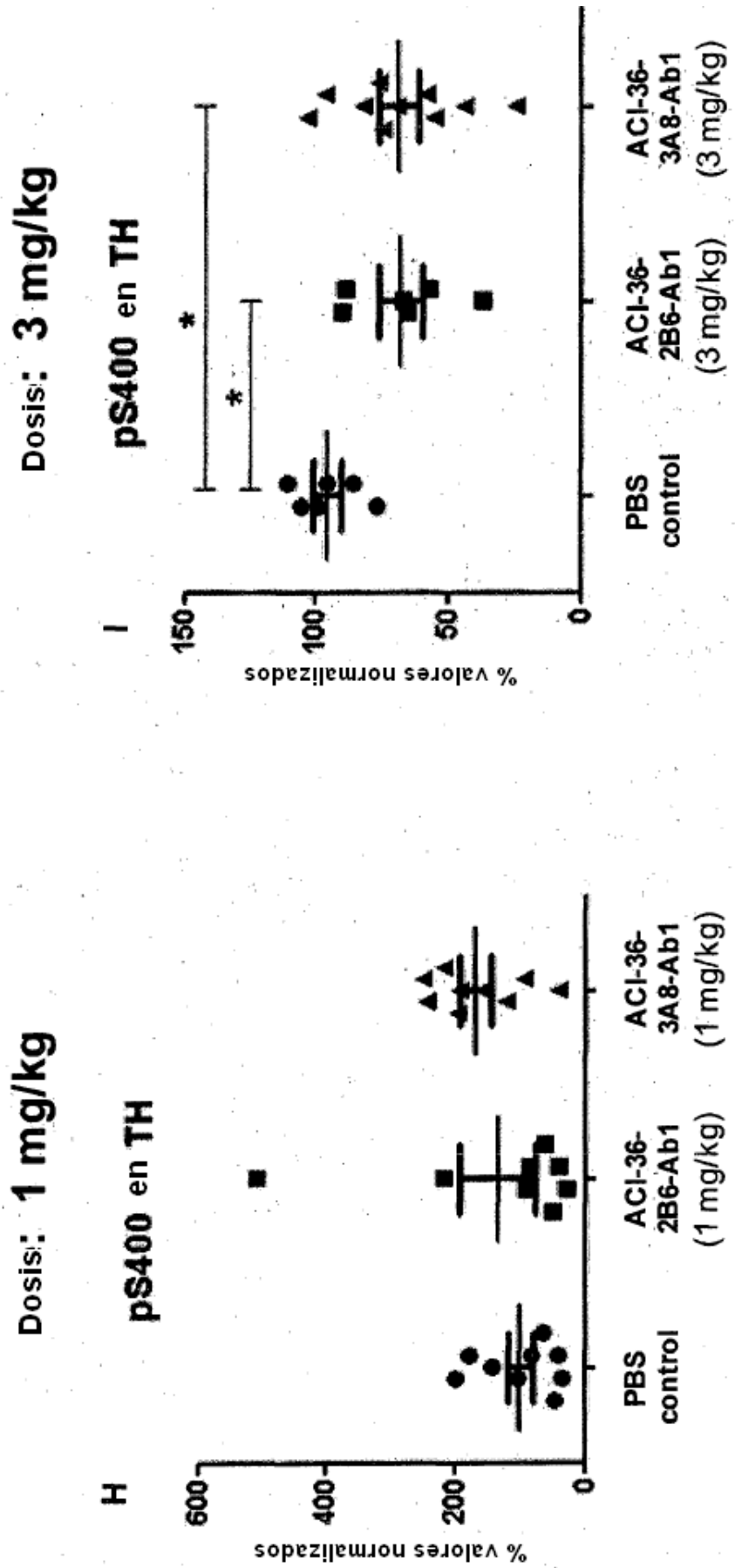
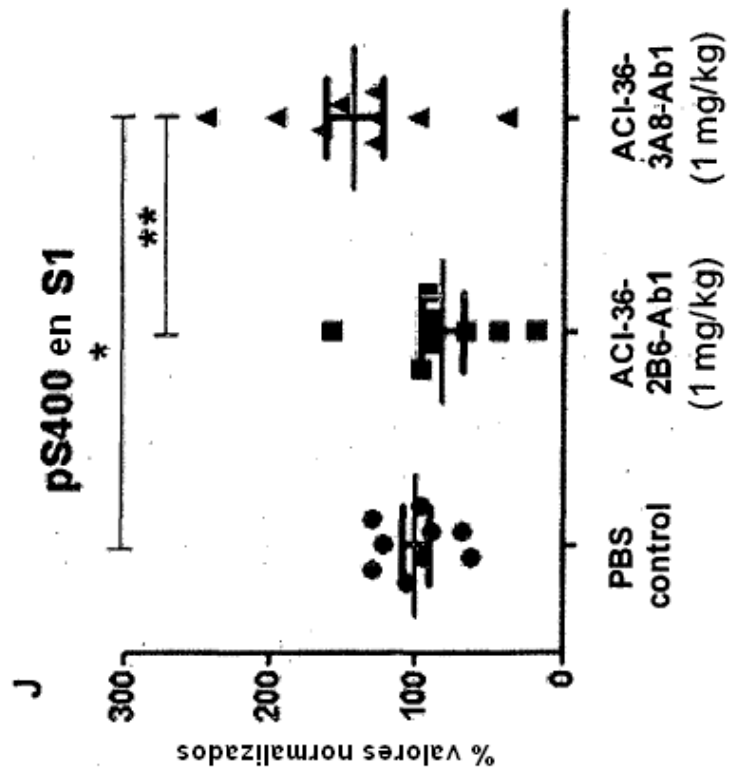


FIGURA 6-5

Corteza, fracción soluble (S1)
pTau transgénica/humana (pS400)

Dosis: 1 mg/kg



Dosis: 3 mg/kg

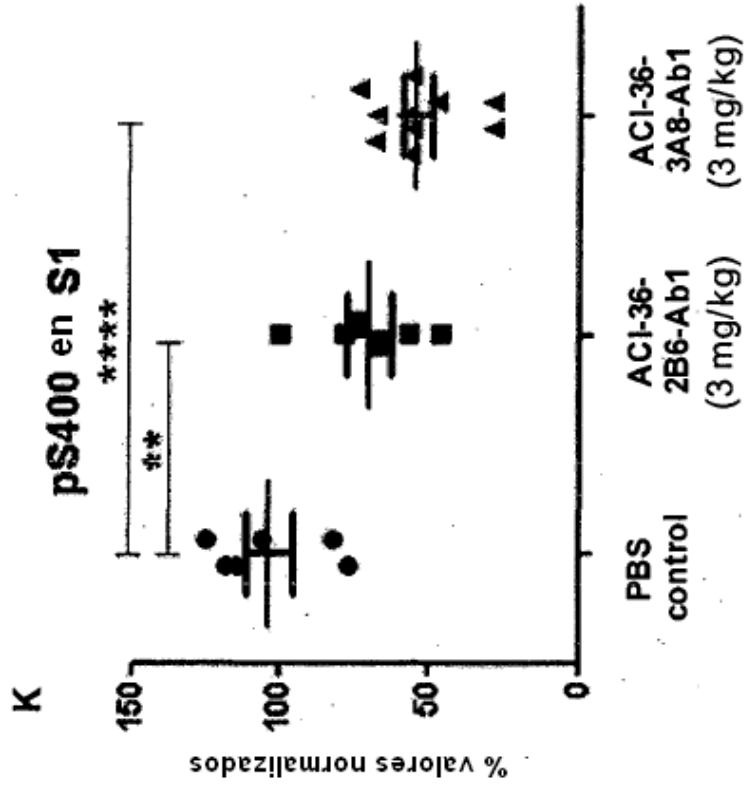


FIGURA 6-6

Corteza, homogenado total
pTau transgénica/humana (pS404)

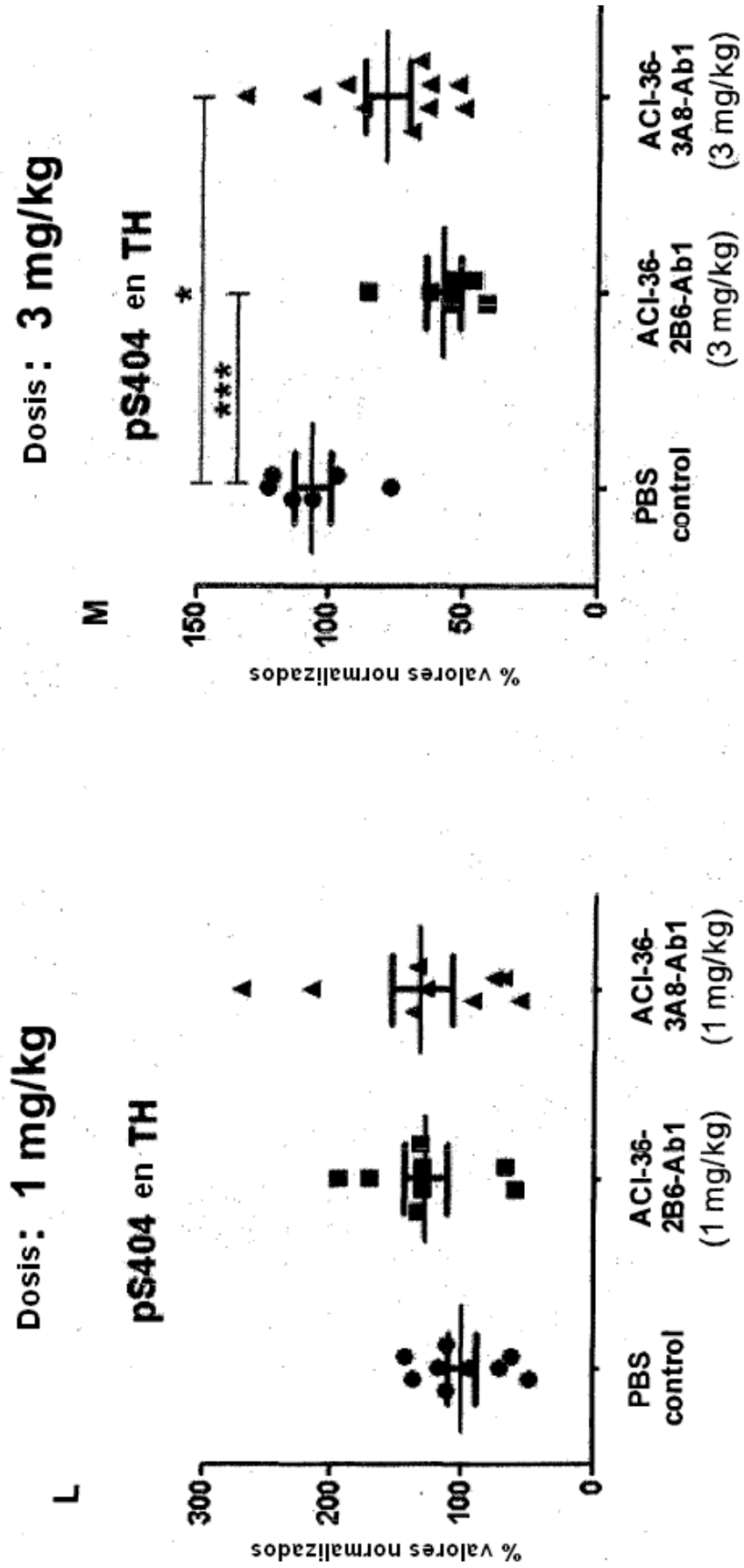


FIGURA 6-7

Corteza, fracción soluble (S1)
pTau transgénica/humana (pS404)

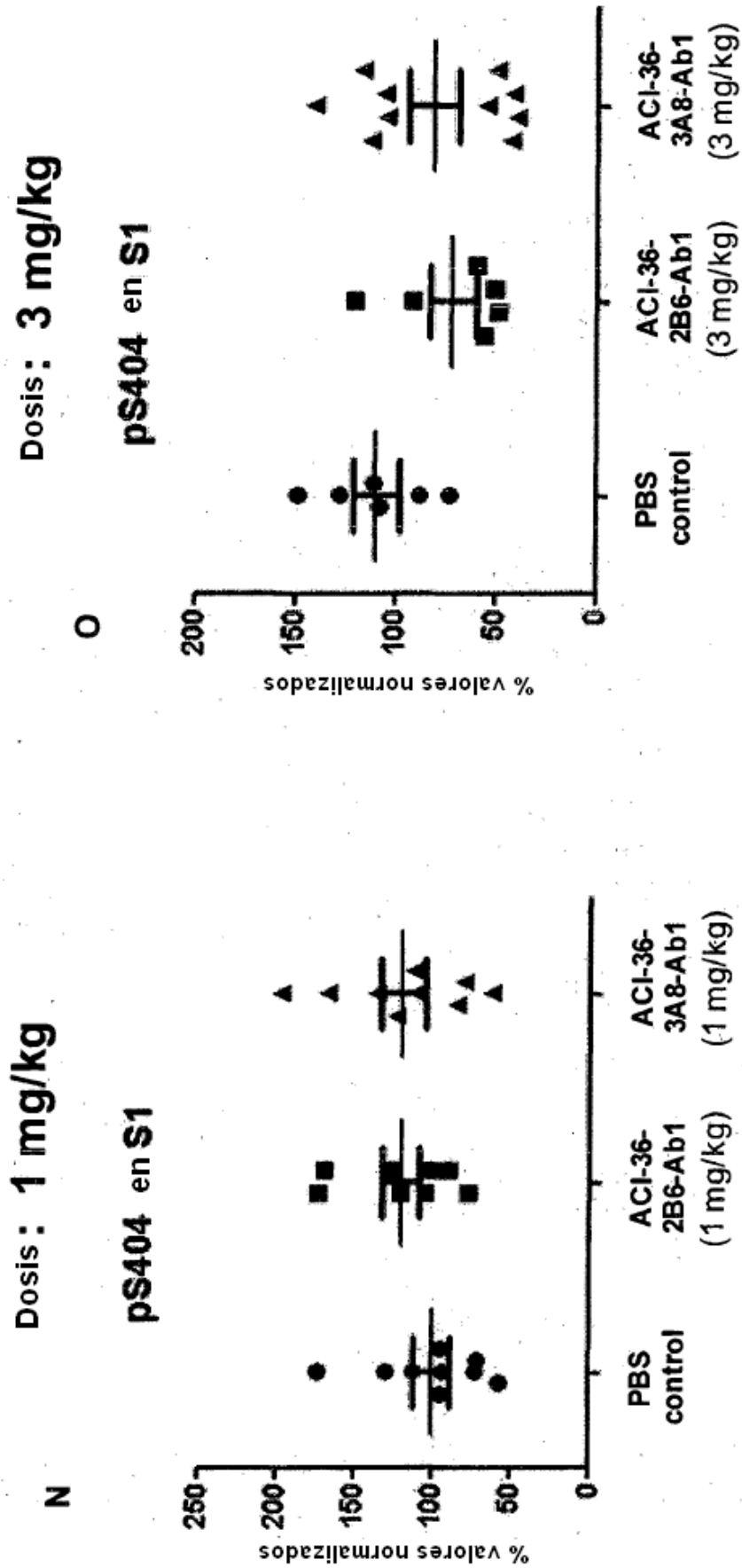


FIGURA 6-8

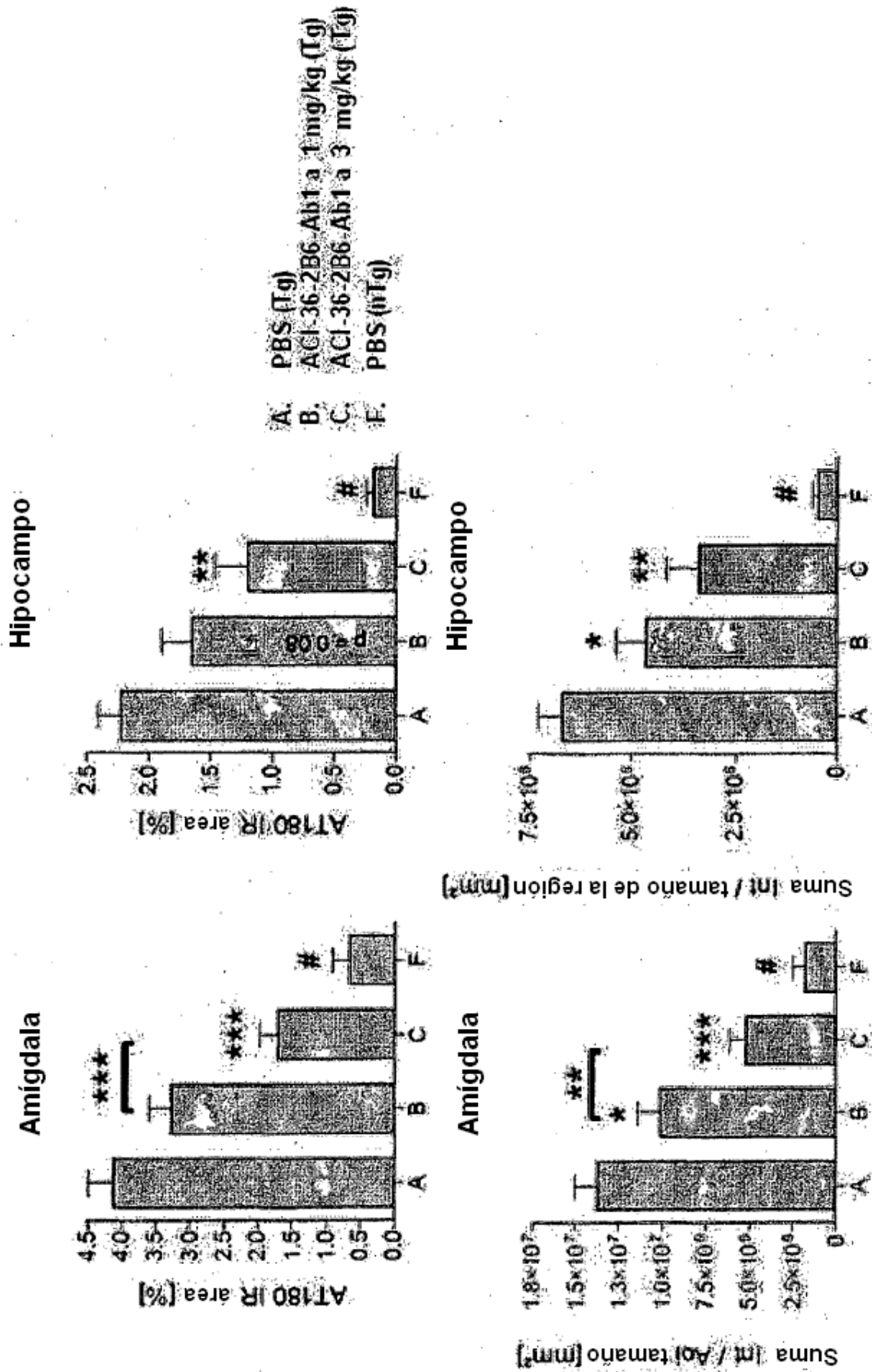


FIGURA 7

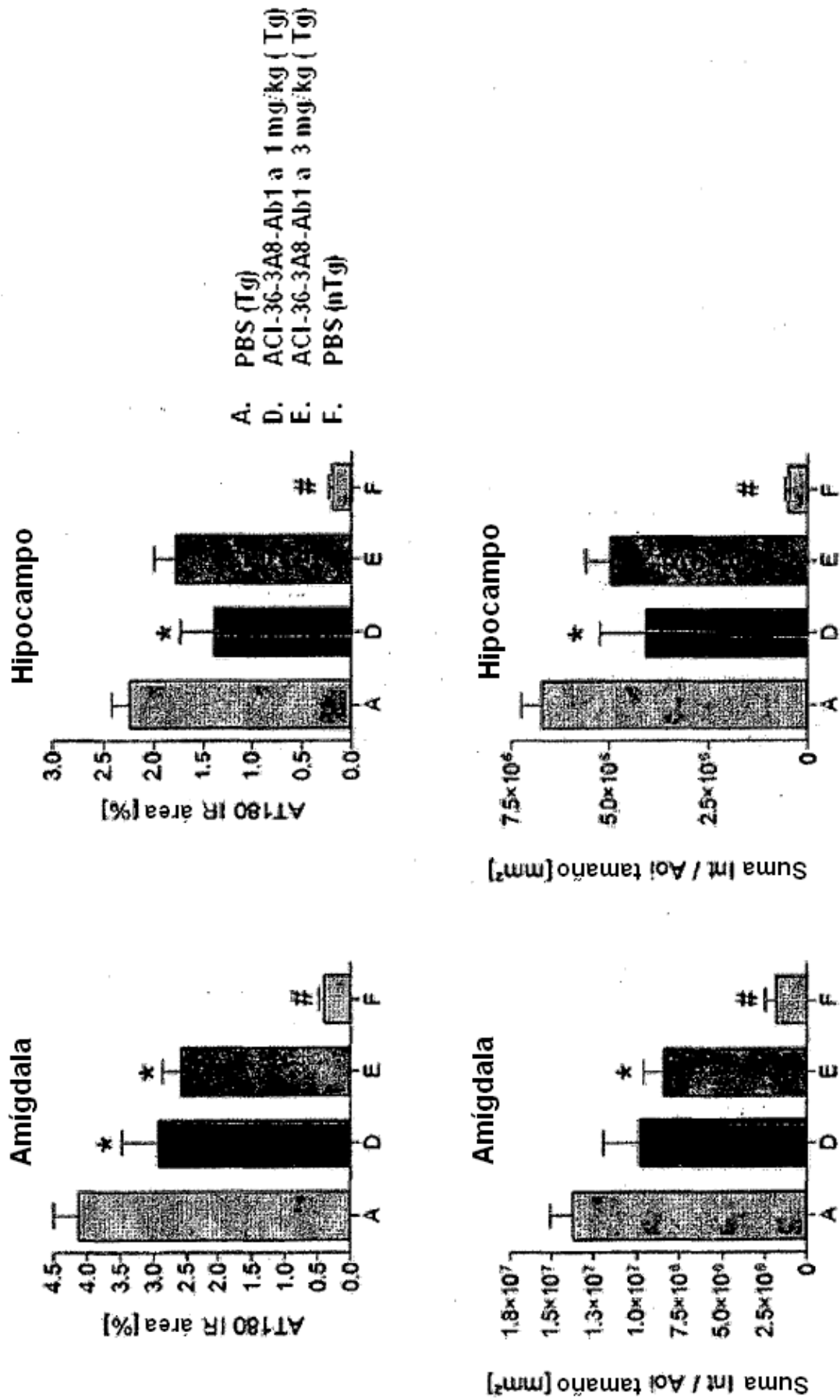
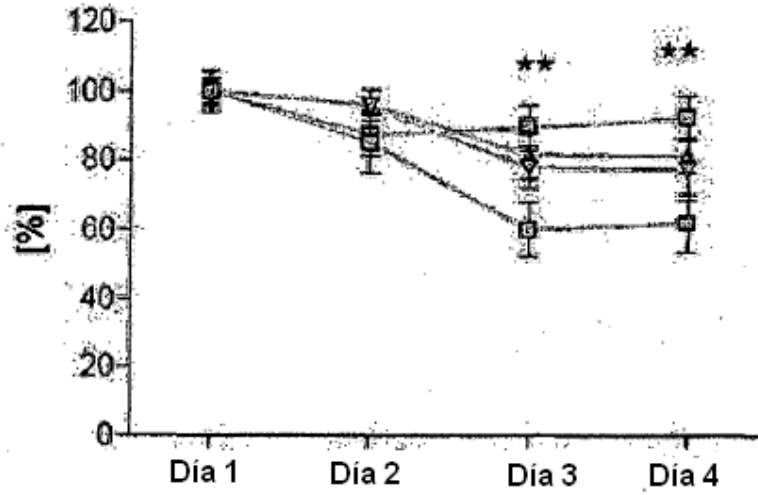


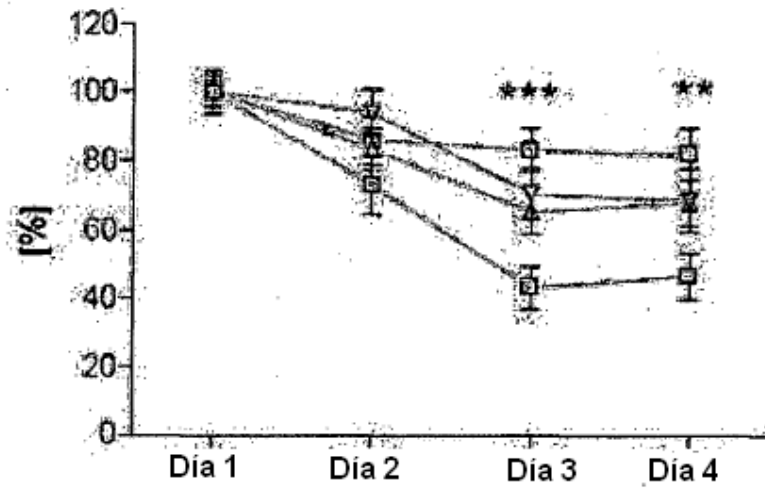
FIGURA 8

ACI-36-2B6-Ab1

Latencia de escape



Longitud de nado



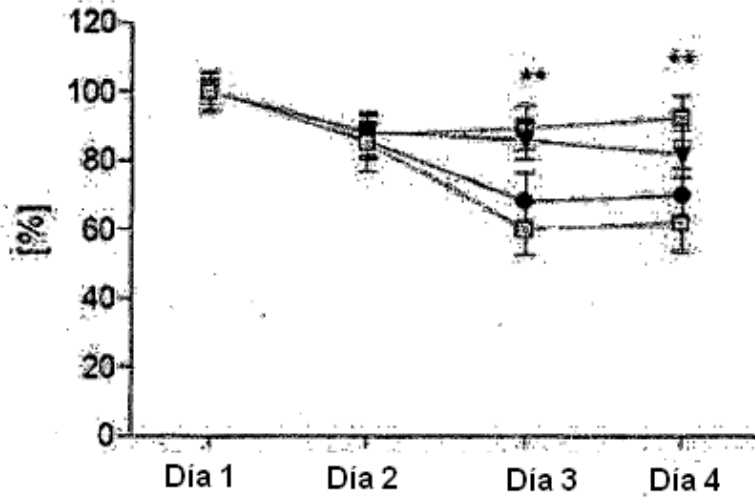
- PBS(Tg)
- ▲ ACI-36-2B6-Ab1 a 1 mg/kg(Tg)
- ▼ ACI-36-2B6-Ab1 a 3 mg/kg(Tg)
- PBS(nTg)

| | Latencia de escape | | | Longitud de nado | | |
|--------|--------------------|----------|----------|------------------|-----------|----------|
| | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 2 | Día 3 | Día 4 |
| A vs B | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 |
| A vs C | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 |
| A vs F | P > 0.05 | P < 0.01 | P < 0.01 | P > 0.05 | P < 0.001 | P < 0.01 |

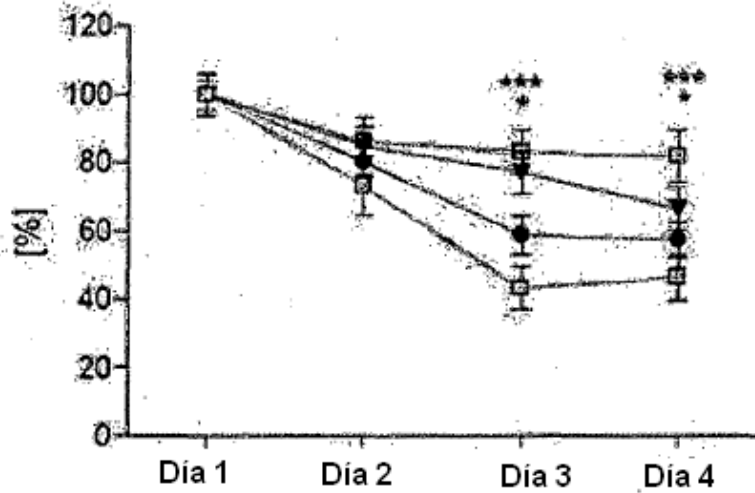
FIGURA 9

ACI-36-3A8-Ab1

Latencia de escape



Longitud de nado



- PBS(Tg)
- ▼— ACI-36-3A8-Ab1 a 1 mg/kg (Tg)
- ACI-36-3A8-Ab1 a 3 mg/kg (Tg)
- PBS(nTg)

| | Latencia de escape | | | Longitud de nado | | |
|--------|--------------------|----------|----------|------------------|-----------|-----------|
| | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 2 | Día 3 | Día 4 |
| A vs D | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 |
| A vs E | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P > 0.05 | P < 0.05 | P < 0.05 |
| A vs F | P > 0.05 | P < 0.01 | P < 0.01 | P > 0.05 | P < 0.001 | P < 0.001 |

FIGURA 10