

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 915**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2012 PCT/EP2012/069783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2012 E 12769656 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2764022**

54 Título: **Anticuerpos fosfoespecíficos que reconocen Tau**

30 Prioridad:

07.10.2011 WO PCT/EP2011/067604
05.04.2012 EP 12163319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

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;
PIHLGREN, MARIA;
ADOLFSSON, OSKAR y
VAN LEUVEN, FRED

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 600 915 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 fosfoespecíficos que reconocen Tau

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de enfermedades y trastornos provocados por o asociados con ovillos neurofibrilares. En particular, la invención se refiere a anticuerpos que reconocen y se unen específicamente a confórmers de la proteína Tau patológica fosforilada y a métodos y composiciones que involucran dichos anticuerpos para el uso terapéutico y diagnóstico en el tratamiento de Tauopatías que incluyen la enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés).

10 Los ovillos neurofibrilares y los hilos del neurópilo (NT, por sus siglas en inglés) son las características distintivas neuropatológicas principales de la enfermedad de Alzheimer (AD). Están compuestos por la proteína Tau asociada a microtúbulos que ha experimentado modificaciones postraduccionales, incluida la fosforilación, desamidación e isomerización de residuos de asparaginilo o aspartilo. Estos se originan mediante la agregación de proteína Tau hiperfosforilada y sus confórmers. La AD comparte esta patología con muchas Tauopatías neurodegenerativas, en particular, con tipos determinados de demencia frontotemporal (FTD, por sus siglas en inglés).

15 La proteína Tau es una proteína "naturalmente no plegada" libremente soluble que se une con avidéz a los microtúbulos (MT, por sus siglas en inglés) para fomentar su montaje y estabilidad. Los MT tienen una gran importancia para la integridad citoesquelética de las neuronas y, por lo tanto, para la formación y el funcionamiento adecuados de los circuitos neuronales, y, por lo tanto, para el aprendizaje y la memoria. La unión de Tau a MT es controlada por la fosforilación y desfosforilación dinámica, como se demuestra principalmente *in vitro* y en células no neuronales. Debido a la gran cantidad de sitios de fosforilación posibles (>80), la contribución exacta de cada uno y la identidad de las cinasas responsables permanece en gran medida no definida *in vivo*.

20 En el cerebro con AD, la patología de Tau se desarrolla luego de, y, por lo tanto, probablemente en respuesta a la patología amiloide, que constituye la esencia de la hipótesis de la cascada amiloide. Esto se basa en e indica mediante los estudios en pacientes con AD y síndrome de Down, y es corroborado por estudios en ratones transgénicos con patología amiloide y Tau combinadas (Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muyllaert et al, 2006; 2008; Terwel et al, 2008).

25 El momento exacto de ambas patologías en pacientes con AD humanos, así como mecanismos que relacionan la patología amiloide con Tau permanecen en gran medida desconocidos, pero se propone que estos implican la activación de vías de señalización neuronal que actúan en o mediante GSK3 y cdk5 como las "Tau-cinasas" principales (analizado por Muyllaert et al, 2006, 2008).

30 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 razonables que se corroboran entre sí en su totalidad:

- 35 • En casos de AD familiar de inicio temprano debido a mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) 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 la Tauopatía, no con la patología amiloide, lo que se ejemplificó más recientemente mediante varios estudios de fase clínica 1 y 2 que incluyen imagenología de PIB-PET para amiloide e identifican muchos "falsos positivos".
- 40 • individuos cognitivamente normales con carga amiloide cerebral alta;
- en FTD familiar, la Tauopatía es provocada por Tau mutante y provoca la neurodegeneración directamente, sin patología amiloide;
- en modelos de ratón experimentales, los defectos cognitivos provocados por la patología amiloide se alivian casi por completo con la ausencia de la proteína Tau (Roberson et al, 2007).

45 Los argumentos combinados sostienen la hipótesis de que la proteína Tau es un elemento principal en la muerte cognitiva en AD y las Tauopatías neurodegenerativas relacionadas.

Un tratamiento emergente prominente de la AD es mediante inmunoterapia pasiva con mAb específicos, para eliminar los péptidos amiloides y sus agregados que se supone que son neurotóxicos o sinaptotóxicos.

50 Se prevé que la inmunoterapia dirigida a la patología de Tau, como se propone en la presente, contrarresta los confórmers de la proteína Tau patológica que se sabe o se propone que provocan disfunción sináptica y neurodegeneración.

Otros enfoques terapéuticos que se dirigen a la proteína Tau son escasos y comprenden principalmente:

- inhibidores de las cinasas que se cree que aumentan la fosforilación de Tau hasta niveles patológicos
- compuestos que bloquean la agregación citoplásmica de proteína Tau hiperfosforilada.

Estos enfoques presentan varios obstáculos de especificidad y eficacia, un problema que comparten con los intentos de modificar el metabolismo de APP y amiloide, los cuales enfatizan la importancia de una búsqueda continua de opciones de tratamiento adicionales, incluida la inmunoterapia contra Tau. De hecho, la inmunoterapia dirigida a amiloide en un modelo de ratón preclínico con patología tipo AD combinada demostró también un efecto en la patología Tau, si bien persistieron los agregados de Tau (Oddo et al., 2004)

Se han sembrado algunas dudas con respecto a la viabilidad de alcanzar la proteína Tau intracelular mediante inmunoterapia. Estas se han contrarrestado con el estudio experimental más reciente en un modelo de ratón de Tauopatía (Asuni et al., 2007). Mostraron una reducción en la patología de los ovillos y mejoras funcionales mediante vacunación con un fosfopéptido derivado de proteína Tau.

US2008050383 describe anticuerpos monoclonales que reconocen el péptido Tau fosforilado 379-409 [P-Ser 396,404]. US2008050383 propone además el uso de los anticuerpos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Estos datos corroboran los informes anteriores de inmunoterapia dirigida a α -sinucleína en modelos de enfermedad de Parkinson (PD, por sus siglas en inglés) y enfermedad de cuerpos de Lewy (Masliah et al., 2005, 2011) y superóxido dismutasa en modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés) (Urushitani et al., 2007). Estas enfermedades son ejemplos en los que las proteínas intracelulares producen defectos sinápticos y neurodegeneración mediante mecanismos que aún no se comprenden en su totalidad.

Existe la necesidad aún no satisfecha de inmunoterapias pasivas y/o activas que funcionen para contrarrestar los conformeros de proteína patológica que se sabe, o supone, que provocan trastornos neurodegenerativos, como patología amiloide en AD provocada, por ejemplo, por agregados intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada que sean tan comunes para AD como para amiloide.

Esta necesidad no satisfecha es resuelta por la presente invención que proporciona proteínas de unión que reconocen y se unen a los principales fosfoepítomos patológicos de la proteína Tau. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos específicos contra fosfoepítomos lineales y conformacionales, simples y complejos, en la proteína Tau, particularmente en la proteína Tau agregada que se cree que son responsables de la sinapto y neurotoxicidad en Tauopatías, incluida la AD.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones representadas por las siguientes realizaciones. En particular, la invención se refiere en una primera realización a un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, o un fragmento funcional del mismo, que reconoce y se une específicamente a un fosfoepítomo en la proteína Tau de mamífero o a un fosfoepítomo en un fragmento de la proteína Tau de mamífero, donde dicho fosfoepítomo tiene o está comprendida en la secuencia de aminoácidos VYKSPVVSQDTSRHL (SEQ ID NO: 62) (Tau aa 393-408 de la SEQ ID NO: 67) que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396) y en la posición 404 (pS404), donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene una afinidad de unión a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble con una constante de disociación en un intervalo de entre 2 nM y 80 nM, y una constante de velocidad de asociación en un intervalo de entre $1,6 \times 10^2$ y 5×10^5 y puede detectar y/o modular los niveles de Tau fosforilada oligomérica soluble e insoluble *in vivo* y donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 106, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 107, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 108, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 115, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 91.

En una realización específica, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención y que se describió anteriormente tiene una constante de disociación inferior a 10 nM.

En varias realizaciones, la invención se refiere al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención como se define en la presente en cualquiera de las realizaciones precedentes, que es del isotipo IgG2b, IgG2a o IgG3.

En una realización, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención como se define en la presente en cualquiera de las realizaciones precedentes.

En varias realizaciones alternativas, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención como se define en la

presente en cualquiera de las realizaciones precedentes o una combinación de las mismas, en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención se refiere además al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, el polinucleótido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención como se define en la presente en cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, para su uso en terapia, particularmente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo como una Tauopatía en un mamífero, particularmente un humano que necesita dicho tratamiento.

10 En particular, la presente invención se refiere al anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, el polinucleótido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención como se define en la presente en cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, para su uso de acuerdo con la realización precedente para el tratamiento o alivio de déficits cognitivos en un mamífero, particularmente un humano que padece dicho déficit, y opcionalmente: (i) en donde el tratamiento o alivio de los déficits cognitivos en un mamífero, particularmente un humano, conlleva la interrupción del avance de los déficits cognitivos, o (ii) en donde el tratamiento o alivio de los déficits cognitivos en un mamífero, particularmente un humano, conlleva un aumento de la retención, particularmente una restitución completa de la capacidad de memoria cognitiva en el sujeto tratado.

15 En varias realizaciones, la presente invención se refiere al anticuerpo o fragmento funcional del mismo, el polinucleótido o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención como se define en la presente en cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, para su uso de acuerdo con la realización precedente para el tratamiento de enfermedades y trastornos provocados por o asociados con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la Tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran la presencia tanto de patologías Tau como amiloide que incluyen, pero no se limitan 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 de proteínas priónicas, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no muestran una patología amiloide característica que incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no de Guam con ovillos neurofibrilares, demencia argirofílica granulosa, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, demencia frontotemporal, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de ovillos neurofibrilares predominantes, parkinsonismo posencefálico y distrofia miotónica.

20 La invención se refiere además a un método in vitro para el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau o una predisposición a enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína Tau en una muestra, particularmente una muestra de fluido cerebroespinal o una muestra de cerebro, que comprende las etapas de:

25 a. hacer que la muestra que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con el anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención como se define en la presente memoria en cualquiera de las realizaciones precedentes, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína Tau;

b. permitir que el anticuerpo se una al antígeno 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 del antígeno Tau en la muestra,

30 donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau.

En una realización específica, el método de la invención como se define en la presente memoria en la realización precedente permite la detección de multímeros fosfoTau (pTau) en una muestra post mortem de un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad o trastorno asociado con Tau.

35 En varias realizaciones alternativas, la invención se refiere al anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención como se define en cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, para su uso en un método in vivo para el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau o una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína Tau en una parte o área corporal específica que comprende las etapas de:

40 a. hacer que la parte o área corporal que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con el

anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención como se define en la presente memoria en cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína Tau;

b. permitir que el anticuerpo se una al antígeno Tau para formar un complejo inmunológico;

5 c. detectar la formación del complejo inmunológico; y

d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno Tau en la parte o área corporal específica,

donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau.

10 En una realización, la invención se refiere a un kit de prueba para la detección y el diagnóstico de las enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau que comprende el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención como se define en cualquiera de las realizaciones precedentes.

En una realización, la invención se refiere a una línea celular que produce el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con la invención como se define en cualquiera de las realizaciones precedentes, particularmente 15 en donde dicha célula es la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3137; la línea celular de hibridoma A6-2G5-41 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3138.

La presente invención se define mediante las realizaciones precedentes y mediante las reivindicaciones. Cualquier materia identificada en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que supere el alcance de la invención según se representa en las reivindicaciones, no forma parte de la invención reivindicada sino que 20 solamente sirve como información antecedente para comprender mejor la invención.

Lo mismo se aplica a la materia identificada como la invención pero que está comprendida en los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y métodos de diagnóstico que se ponen en práctica en el cuerpo humano o animal.

Por consiguiente, la presente invención se refiere en una realización a un péptido o proteína de unión o una parte 25 funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un fosfoepítipo en la proteína Tau agregada, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a los epítipos no relacionados, en donde dicho 30 péptido o anticuerpo de unión tienen una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble in vivo, 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 35 menos 300 pM, particularmente de al menos 200 pM, particularmente de al menos 100 pM, particularmente de al menos 50 pM.

En particular, la constante de disociación se encuentra en un intervalo de entre 2 nM y 80 nM, particularmente entre 2 nM y 40 nM, particularmente entre 2 nM y 10 nM.

En un aspecto determinado, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a un fosfoepítipo que tiene, o está dentro de, 40 la secuencia de aminoácidos VYKSPWSGDTSPRHL (SEQ ID NO: 62) (Tau aa 393-408 de la SEQ ID NO: 67, por ejemplo, según se establece en la Tabla 1) que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396) y en la posición 404 (pS404).

En una segunda realización, la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional 45 de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica patológica pero, en una realización, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho 50 péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y tiene una constante de velocidad de asociación de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de entre $3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más; particularmente de $2 - 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más; particularmente de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $1 - 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más.

55 En particular, la constante de velocidad de asociación se encuentra en un intervalo de entre $1,6 \times 10^3$ y 5×10^5 ,

particularmente entre $2,4 \times 10^4$ y 5×10^5 , entre 3×10^3 y 5×10^5 .

En una tercera realización, la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un conformero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y tiene una afinidad de unión alta 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 más, 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 más, 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 más, 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 más, 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 más, 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 más.

En particular, la constante de disociación se encuentra en el intervalo de entre 2 nM y 80 nM y la constante de velocidad de asociación se encuentra en el intervalo de entre $1,6 \times 10^3$ y 5×10^5 , particularmente la constante de disociación se encuentra en el intervalo de entre 2 nM y 40 nM y la constante de velocidad de asociación se encuentra en el intervalo de entre $2,4 \times 10^4$ y 5×10^5 , particularmente la constante de disociación se encuentra en el intervalo de entre 2 nM y 10 nM y la constante de velocidad de asociación se encuentra en el intervalo de entre 3×10^3 y 5×10^5 .

Una realización (4) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un conformero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión se une a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que se selecciona del grupo que consiste en Tau aa 393-401, que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 396-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 394-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 402-406 que comprende un Ser fosforilado en la posición 404 (pS404) y Tau aa 393-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

Una realización (5) se refiere al péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido se une a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 393-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

Una realización (6) se refiere al péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido se une a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 396-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

Una realización (7) se refiere al péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido se une a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 394-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

Una realización (8) se refiere al péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido se une a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 402-406 que comprende un Ser fosforilado en la posición 404 (pS404).

Una realización (9) se refiere al péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido se une a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana, pero especialmente la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que comprende Tau aa 393-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

Una realización (10) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del

5 mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una
 10 realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende en
 15 secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 73, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 74, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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
 20 menos 94 %, particularmente al menos 95 %, particularmente al menos 96 %, particularmente al menos 97 %, particularmente al menos 98 %, particularmente al menos 99 % o 100 % idéntica a esta y/o un segundo dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 70, o una secuencia de aminoácidos al menos 95 %, particularmente 98 %, particularmente 99 % idéntica a esta, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 71, o una secuencia de aminoácidos al menos 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a esta, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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
 25 menos 94 %, particularmente al menos 95 %, particularmente al menos 96 %, particularmente al menos 97 %, particularmente al menos 98 %, particularmente al menos 99 % o 100 % idéntica a esta.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en una proteína Tau de mamífero o un fragmento de la misma, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

25 (a) un primer dominio de unión que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 73, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 74, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 75; y/o

30 (b) un segundo dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 70, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 71, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 72.

35 Una realización (11) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una
 40 realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 81, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 82, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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
 45 menos 94 %, particularmente al menos 95 %, particularmente al menos 96 %, particularmente al menos 97 %, particularmente al menos 98 %, particularmente al menos 99 % o 100 % idéntica a esta y/o un segundo dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 78, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 79, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a esta.

55 En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en una proteína Tau de mamífero o un fragmento de la misma, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

(a) un primer dominio de unión que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 81, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 82, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 83; y/o

60 (b) un segundo dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 78, una CDR2 que comprende la

secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 79, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 80.

Una realización (12) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 93, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 94, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a cualquiera de las CDR que anteceden y/o un segundo dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 90, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a cualquiera de las CDR que anteceden.

En un aspecto determinado, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo o una parte funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en una proteína Tau de mamífero o en un fragmento de la misma, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

(a) un primer dominio de unión que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 93, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 94, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 95; y/o

(b) un segundo dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 90, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 91.

Una realización (13) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 101, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 102, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a cualquiera de las CDR que anteceden y/o un segundo dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 98, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 99, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a cualquiera de las CDR que anteceden.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en una proteína Tau de mamífero o un fragmento de la misma, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

(a) un primer dominio de unión que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se

muestra en la SEQ ID NO: 101, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 102, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 103; y/o

- 5 (b) un segundo dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 98, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 99, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 100.

Una realización (14) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un conformero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 106, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 107, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a cualquiera de las CDR que anteceden y/o un segundo dominio de unión que comprende en secuencia una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 115, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a cualquiera de las CDR que anteceden.

30 En un aspecto particular, en la presente memoria se proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en una proteína Tau de mamífero o un fragmento de la misma, donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:

- (a) un primer dominio de unión que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 106, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 107, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 108; y/o
- 35 (b) un segundo dominio de unión que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 115, y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 91.

40 En una realización determinada, el primer dominio de unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en la presente memoria es una región variable de cadena ligera, y el segundo dominio de unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo descrito en la presente memoria es una región variable de cadena pesada.

En otra realización (15), la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un conformero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69, 77, 116/92, 118, 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 % o 100 % idéntica a esta y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la 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 % o 100 % idéntica a esta.

Una realización (16) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69, o una secuencia de aminoácidos al menos 98 % o 99 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 68, o una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 % o 93 % idéntica a esta.

Una realización (17) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos al menos 93 %, 94 % o 95 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 76, o una secuencia de aminoácidos al menos 88 %, 89 % o 90 % idéntica a esta.

Una realización (18) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 116, 92 o 118, o una secuencia de aminoácidos al menos 93 %, 94 % o 95 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 88, o una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 % o 93 % idéntica a esta.

Una realización (19) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 97, o una secuencia de aminoácidos al menos 99 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 96, o una secuencia de aminoácidos al menos 86%, 87%, 88% o 90% idéntica a esta.

Una realización (20) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 105, o una secuencia de aminoácidos al menos 98 % o 99 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 104, o una secuencia de aminoácidos al menos 88 %, 89 % o 90 % idéntica a esta.

Una realización (21) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69, o una secuencia de aminoácidos al menos 99 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 68, o una secuencia de aminoácidos al menos 93 % idéntica a esta.

Una realización (22) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 77, o una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a esta y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 76, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a esta.

Una realización (23) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 116, 92 o 118, o una secuencia de aminoácidos al menos 93 %, 95 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 88, o una secuencia de aminoácidos al menos 93 % idéntica a esta.

Una realización (24) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 97, o una secuencia de aminoácidos al menos 99 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 96, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a esta.

Una realización (25) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 105, o una secuencia de aminoácidos al menos 98 % o 99 % idéntica a esta; y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 104, o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a esta.

Una realización (26) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, de acuerdo con la realización (16), en donde dicho primer dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 73-75, y dicho segundo dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 70-72.

Una realización (27) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, de acuerdo con la realización (17), en donde dicho primer dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 81-83, y dicho segundo dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 78-80.

Una realización (28) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, de acuerdo con la realización (18), en donde dicho primer dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 93-95, y dicho segundo dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 89-91.

Una realización (29) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, de acuerdo con la realización (19), en donde dicho primer dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 101-103, y dicho segundo dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 98-100.

Una realización (30) de la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, de acuerdo con la realización (18), en donde dicho primer dominio de unión contiene las CDR que se

muestran en las SEQ ID NO: 89, 115 y 91, y dicho segundo dominio de unión contiene las CDR que se muestran en las SEQ ID NO: 106-108.

5 En aun otra realización (31), la presente invención se refiere a un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, particularmente un péptido o anticuerpo de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tiene una afinidad de unión alta a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble y puede detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho péptido o anticuerpo de unión comprende un

10 a. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 69, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 68; o un

15 b. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 77, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 76; o un

20 c. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 116, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 88; o un

d. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 92, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 88; o un

25 e. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 97, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 96; o un

f. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 105, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 104.

30 g. primer dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 118, y/o un segundo dominio de unión que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 88.

En una realización (32) de la invención, el péptido de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes es 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.

35 Una realización (33) de la invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes.

En una realización (34), dicho polinucleótido comprende una molécula de ácido nucleico que se selecciona del grupo que consiste en

40 a. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se ilustra en las SEQ ID NO: 84-87; SEQ ID NO: 109-114, 117 y 119;

b. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 84-87; SEQ ID NO: 109-114, 117 y 119;

c. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 84-87; SEQ ID NO: 109-114, 117 y 119;

45 d. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 84-87; SEQ ID NO: 109-114, 117 y 119;

e. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 84-87; SEQ ID NO: 109-114, 117 y 119;

50 f. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia que se muestra en las SEQ ID NO: 84-87; SEQ ID NO: 109-114, 117 y 119;

g. una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, cuya cadena complementaria se

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) mediante la degeneración del código genético,

5 en donde dicha molécula de ácido nucleico según se define en cualquiera de a) - h) reconoce y se une específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente en la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que se selecciona del grupo que consiste en Tau aa 393-401, que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 396-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 394-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 402-406 que comprende un Ser fosforilado en la posición 404 (pS404) y Tau aa 393-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), en donde, en una realización, dicho péptido de unión tiene una afinidad de unión alta 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 más, particularmente de entre $3 - 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $6 - 9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $1 - 4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, particularmente de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o más, pero, en una realización, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o a epítipos no relacionados.

20 En varias realizaciones (35) de la invención, se proporciona un péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido, de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, que puede reconocer y unirse específicamente a un fosfoepítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana, particularmente una proteína Tau asociada con microtúbulos, particularmente una proteína Tau hiperfosforilada y asociada con microtúbulos agregada como la que se encuentra presente en filamentos helicoidales emparejados (PHF, por sus siglas en inglés), que son las estructuras predominantes en ovillos neurofibrilares, no se une al epítipo no fosforilado correspondiente y/o epítipos no relacionados.

En una realización específica (36) de la invención, la proteína Tau humana es la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67.

30 Los péptidos y anticuerpos de unión según cualquiera de las realizaciones precedentes, por lo tanto, se pueden usar (37) para reducir los niveles de proteína Tau soluble total, particularmente de proteína Tau fosforilada soluble, en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un mamífero o un humano que contiene mayores niveles de proteína Tau soluble y/o proteína Tau fosforilada soluble.

35 Los péptidos y anticuerpos de unión según cualquiera de las realizaciones precedentes también se pueden usar (38) para reducir los niveles de filamentos helicoidales emparejados que contienen proteína Tau hiperfosforilada (PHF pTau) en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un mamífero o un humano que contiene mayores niveles de dichos filamentos helicoidales emparejados de pTau.

40 La reducción del nivel de proteína Tau soluble total y/o proteína Tau fosforilada soluble y/o filamentos helicoidales emparejados de pTau en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un mamífero o un humano que contiene mayores niveles de dichas variantes de proteína Tau, que contribuyen a las enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau en dicho mamífero o humano, puede conllevar una mejora y/o un alivio de los síntomas asociados con dichas enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau (39).

45 Los péptidos y anticuerpos de unión según cualquiera de las realizaciones precedentes, por lo tanto, se pueden usar (40) en terapia, particularmente en terapia en humanos, para enlentecer o detener el avance de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau.

50 Los péptidos y anticuerpos de unión según cualquiera de las realizaciones precedentes se pueden usar además (41) en terapia, particularmente en terapia en humanos, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau como, por ejemplo, deterioro o pérdida de funciones cognitivas que incluyen el razonamiento, criterio situacional, capacidad de memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

55 En una realización (42), la invención se refiere a los péptidos y anticuerpos de unión según cualquiera de las realizaciones precedentes para su uso en terapia, particularmente para su uso en el tratamiento de Tauopatías, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la proteína Tau, o para el alivio de los síntomas asociados con Tauopatías.

En una realización (43), la invención se refiere a los péptidos y anticuerpos de unión según cualquiera de las realizaciones precedentes para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que

padece una Tauopatía.

5 En otra realización específica (44) de la invención, los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas 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; ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; según se establece en las SEQ ID NO: 73-75, 81-83, 93-95, 101-103, 106-108 y/o al menos una o todas 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; ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; según se establece en las SEQ ID NO: 70-72, 78-80, 89-91, 98-100, (89, 115, 91) se usan en terapia, particularmente en terapia en humanos, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau como, por ejemplo, deterioro o pérdida de funciones cognitivas que incluyen el razonamiento, criterio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

15 En otra realización específica (45) de la invención, los péptidos y anticuerpos de unión que comprenden al menos una o todas las CDR de cadena ligera de los anticuerpos ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3 según se establece en las SEQ ID NO: 106-108 y/o al menos una o todas las CDR de cadena pesada de los anticuerpos ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3; según se establece en las SEQ ID NO: 89, 115 y 91 se usan en terapia, particularmente en terapia en humanos, para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau como, por ejemplo, deterioro o pérdida de funciones cognitivas que incluyen el razonamiento, criterio situacional, memoria, aprendizaje, navegación especial, etc.

20 La unión de los péptidos o anticuerpos según cualquiera de las realizaciones precedentes a ovillos Tau y pTau en cerebros se puede determinar mediante la aplicación de prueba de inmunorreactividad de proteína de secciones de cerebro y mediante tinción Western de homogenados de cerebro, respectivamente, como se describe en los Ejemplos.

25 En otra realización (46), la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

30 En una realización (47), el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, se usa en terapia, particularmente en terapia en humanos para el tratamiento o el alivio de los síntomas de enfermedades o trastornos asociados con la proteína Tau que incluyen trastornos neurodegenerativos como Tauopatías.

35 Los péptidos, anticuerpos de unión y/o composiciones farmacéuticas según cualquiera de las realizaciones precedentes, por lo tanto, se pueden usar (48) para enlentecer o detener el avance de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau, luego de la administración de dichos péptidos, anticuerpos de unión y/o composiciones farmacéuticas a un animal, particularmente un mamífero, particularmente un humano, que padece dicha enfermedad o afección.

40 Los péptidos, anticuerpos de unión y/o composiciones farmacéuticas según cualquiera de las realizaciones precedentes se pueden usar (49) para mejorar o aliviar los síntomas asociados con las enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau como, por ejemplo, el deterioro o la pérdida de funciones cognitivas que incluyen el razonamiento, criterio situacional, capacidad de memoria, aprendizaje, navegación especial, etc. luego de la administración de dichos péptidos, anticuerpos de unión y/o composiciones farmacéuticas a un animal, particularmente un mamífero, particularmente un humano, que padece dicha enfermedad o afección.

45 En una realización (50), el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, se usa en el tratamiento de enfermedades y trastornos provocados por o asociados con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la Tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran la presencia tanto de patologías Tau como amiloide que incluyen, pero no se limitan 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 de proteínas priónicas, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no muestran una patología amiloide característica que incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no de Guam con ovillos neurofibrilares, demencia argirofílica granulosa, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva. Panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de ovillos neurofibrilares predominantes, parkinsonismo

posencefálico y distrofia miotónica.

5 En una realización (51), el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas, se usa en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10 En una realización (52) de la invención, se proporciona un método para detectar y/o modular los niveles de proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica y/o insoluble, particularmente in vivo, particularmente en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que comprende administrarle a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o humano, el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

15 En un aspecto, la modulación se refiere a la reducción de los niveles de proteína Tau soluble, particularmente de proteína Tau fosforilada soluble, en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un humano que contiene mayores niveles de proteína Tau soluble y/o proteína Tau fosforilada soluble.

20 En una realización (53) de la invención, se proporciona un método para reducir los niveles de proteína Tau insoluble, particularmente de filamentos helicoidales emparejados que contienen proteína Tau hiperfosforilada (PHF pTau) en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que contiene mayores niveles de proteína Tau insoluble, particularmente de filamentos helicoidales emparejados de pTau (PHF de pTau) que comprenden administrarle a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o humano, el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

25 En una realización (54), la presente invención se refiere a un método para enlentecer o detener el avance de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un animal, particularmente un mamífero o humano, que comprende la administración a dicho animal, particularmente dicho mamífero o humano, que padece dicha enfermedad o afección, el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

30 En una realización (55), la presente invención se refiere a un método para mejorar o aliviar los síntomas asociados con enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau como, por ejemplo, el deterioro o la pérdida de las funciones cognitivas que incluyen el razonamiento, criterio situacional, capacidad de memoria, aprendizaje, navegación especial, etc. en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que comprende la administración a dicho animal, particularmente a dicho mamífero o humano, que padece dicha enfermedad o afección, el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

35 En una realización (56), la presente invención se refiere a un método para conservar o aumentar la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero que padece una Tauopatía.

40 En aun otra realización (57) de la invención, se proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociados con la proteína Tau que incluye una enfermedad o trastorno neurodegenerativo como una Tauopatía que comprende la administración a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un humano, que padece dicha enfermedad o trastorno, el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

45 En una realización (58) de la invención, se proporciona un método para el tratamiento de enfermedades y trastornos provocados por o asociados con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la Tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran tanto patologías Tau como amiloide que incluyen, pero no se limitan 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 de proteínas priónicas, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no muestran una patología amiloide característica que incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de
55 Guam, enfermedad neuronal motora no de Guam con ovillos neurofibrilares, demencia argirofílica granulosa, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical

progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de ovillos neurofibrilares predominantes, parkinsonismo posencefálico, distrofia miotónica, dicho método comprende la administración a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un humano, que padece dicha enfermedad o trastorno, el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

En otra realización (59) de la invención, se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria pasiva en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece un trastorno neurodegenerativo, como una Tauopatía, mediante la administración a dicho animal o humano el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación de las mismas.

En aun otra realización (60) de la invención, se proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un péptido de unión o un fragmento activo del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes, a un epítipo de la proteína Tau en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de

a. hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína Tau entre en contacto con un péptido de unión o un fragmento del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido o anticuerpo de unión o fragmento del mismo 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 del mismo, 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 corporal específica.

En aun otra realización (61) de la invención, se proporciona un método para el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un péptido de unión o un fragmento activo del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes, a un epítipo de la proteína Tau en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de

a. hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con un péptido de unión o un fragmento activo del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el péptido o fragmento del mismo 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 del mismo, se una al antígeno 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 del antígeno Tau en la muestra o parte o área corporal específica;

e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal;

en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau.

En una realización (62) de la invención, se proporciona un método para controlar la enfermedad residual mínima en un paciente luego del tratamiento con el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho método comprende:

a. hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el péptido o fragmento del mismo 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 del mismo, se una al antígeno 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 del antígeno Tau en la muestra o parte o área corporal específica;
- e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal;
- 5 en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece una enfermedad residual mínima.
- En una realización (63), se proporciona un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que se trata con el péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido, o una composición farmacéutica, según cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende
- 10 a. hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con un péptido de unión o un fragmento activo del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes, el péptido o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína Tau;
- 15 b. permitir que dicho péptido de unión, particularmente dicho anticuerpo, particularmente dicho anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, se una al antígeno 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 del antígeno Tau en la muestra o una parte o área corporal específica;
- 20 e. comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento;
- en donde una disminución de la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un potencial alto de poder responder al tratamiento.
- Los anticuerpos anti-Tau y fragmentos de los mismos se pueden usar en los métodos precedentes de la invención. En los métodos precedentes, la muestra que contiene el anticuerpo o un fragmento del mismo pueden ser inmunoenriquecida para aumentar la concentración de la proteína Tau en la muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-Tau o un fragmento del mismo unido a un soporte sólido.
- 25 Antes de la etapa (a), la muestra es inmunoenriquecida para aumentar la concentración de proteína Tau en la muestra poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-Tau o un fragmento del mismo unido a un soporte sólido.
- 30 En otra realización (64), la invención se refiere a un kit de prueba para la detección y el diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau, que comprende un péptido de unión o un fragmento activo del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes.
- En una realización (65), dicho kit de prueba comprende un recipiente que contiene uno o más péptidos de unión o fragmentos activos de los mismos, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes e instrucciones para usar los péptidos o anticuerpos de unión con el fin 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 correlacione con la presencia o ausencia del antígeno Tau.
- 35 En aun otra realización (66), la presente invención se refiere a un epítipo en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana como se muestra en la SEQ ID NO: 67, que se selecciona del grupo que consiste en Tau aa 393-401, que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 396-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 394-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396), Tau aa 402-406 que comprende un Ser fosforilado en la posición 404 (pS404) y Tau aa 393-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).
- 40 En una realización (67), dicho epítipo consiste en Tau aa 393-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).
- En una realización (68), dicho epítipo consiste en Tau aa 396-401 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).
- 45 En una realización (69), dicho epítipo consiste en Tau aa 394-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

En una realización (70), dicho epítipo consiste en Tau aa 402-406 que comprende un Ser fosforilado en la posición 404 (pS404).

En una realización (71), dicho epítipo consiste en Tau aa 393-400 que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396).

- 5 En otra realización (72), la invención se refiere a una línea celular que produce un péptido de unión o un fragmento activo del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes.

En una realización (73), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A4-4A6-48 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3136.

- 10 En una realización (74), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3137.

En una realización (75), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A6-2G5-41 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3138.

- 15 En una realización (76), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A4-2A1-18 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3139.

En una realización (77), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A4-2A1-40 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3140.

En una realización (78), la invención se refiere a una línea celular, que es la línea celular de hibridoma A6-1 D2-12 depositada el 6 de setiembre de 2011 como DSM ACC3141.

- 20 En una realización (79), la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que se codifica mediante un polinucleótido ubicado en un fragmento de nucleótido que se puede obtener mediante amplificación de PCR de ADN de línea celular de hibridoma A4-2A1-18 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3139 usando

- 25 a. un par de cebadores que comprende un cebador 5' de la SEQ ID NO: 149 y un cebador 3' de la 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' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 120, 123, 124, 136, 137, 138, 139 y 140; y un cebador 3' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 131, 134 y 141-148, para la amplificación de un segundo dominio de unión.

- 30 En una realización (80), la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que se codifica mediante un polinucleótido ubicado en un fragmento de nucleótido que se puede obtener mediante amplificación de PCR de ADN de línea celular de hibridoma A6-2G5-30 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3137 usando

a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 51 y 169-174 y un cebador 3' de la SEQ ID NO: 51, para la amplificación de un primer dominio de unión, y/o

- 35 b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 124, 127 y 150-158; y un cebador 3' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 130 y 159-168, para la amplificación de un segundo dominio de unión.

En una realización (81), la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que se codifica mediante un polinucleótido ubicado en un fragmento de nucleótido que se puede obtener mediante amplificación de PCR de ADN de línea celular de hibridoma A4-2A1-40 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3140 usando

- 40 a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 178, 179 y 180 y un cebador 3' de la SEQ ID NO: 51, para la amplificación de un primer dominio de unión, y/o

- 45 b. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 121, 127, 139, 154, 155 y 175; y un cebador 3' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 128, 129, 147, 176 y 177, para la amplificación de un segundo dominio de unión.

En una realización (82), la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que se codifica mediante un polinucleótido ubicado en un fragmento de nucleótido que se puede obtener mediante amplificación de PCR de ADN de línea celular de hibridoma A6-2G5-41 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3138 usando

- 50

- a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 51 y 188-192 y un cebador 3' de la 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' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 120, 124, 126, 181, 182 y 183; y un cebador 3' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 144, 145 y 184-187, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 5 En una realización (83), la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que se codifica mediante un polinucleótido ubicado en un fragmento de nucleótido que se puede obtener mediante amplificación de PCR de ADN de línea celular de hibridoma A4-4A6-48 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3136 usando
- 10 a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 50 y 201-204 y un cebador 3' de la 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' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 121, 137, 151 y 193-197; y un cebador 3' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 131, 141, 144, 166, 198, 199 y 200, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 15 En una realización (84), la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo que comprende un dominio de cadena ligera (VL) y/o cadena pesada (VH), que se codifica mediante un polinucleótido ubicado en un fragmento de nucleótido que se puede obtener mediante amplificación de PCR de ADN de línea celular de hibridoma A6-1D2-12 depositada el 6 de setiembre de 2011 como DSM ACC3141 usando
- 20 a. una mezcla de cebadores que comprende un cebador 5' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 209-214 y 219-221 y un cebador 3' de la 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' que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 216, 217 y 218 y un cebador 3' de la SEQ ID NO: 208, para la amplificación de un segundo dominio de unión.
- 25 En una realización (85), el anticuerpo según cualquiera de las realizaciones precedentes puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de camélido, un diacuerpo, o un anticuerpo manipulado o modificado genéticamente.
- En una realización (86), la invención proporciona un método para la producción de los péptidos o anticuerpos de unión de cualquiera de las realizaciones precedentes, que comprende la etapa de cultivar la línea celular de cualquiera de las realizaciones precedentes en un medio de cultivo adecuado y, opcionalmente, purificar los péptidos o anticuerpos de unión a partir de la línea celular o medio de cultivo.
- 30 En otra realización (87), la presente invención proporciona un método para detectar multímeros de fosfoTau (pTau) en una muestra de cerebro que comprende
- a. hacer que la muestra entre en contacto con un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína fosfoTau;
- 35 b. permitir que el anticuerpo se una a la proteína Tau para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente mediante la aplicación de un ensayo ELISA.
- En particular, la invención se refiere, en una realización específica (88), a un método de detección *post mortem* de multímeros de fosfoTau (pTau) en homogenados de cerebro de un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad o trastorno asociado con Tau y de un sujeto de control sano, que comprende
- 40 a. hacer que una muestra de homogenados de cerebro de ambos sujetos entre en contacto con un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína fosfoTau;
- b. permitir que el anticuerpo se una a la proteína Tau para formar un complejo inmunológico;
- 45 c. detectar la formación del complejo inmunológico, particularmente mediante la aplicación de un ensayo ELISA y
- d. comparar la cantidad o intensidad del complejo inmunológico en la muestra obtenida de un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad asociada con Tau o de la muestra de control,
- en donde un aumento en la cantidad o intensidad de dicho complejo inmunológico en comparación con el valor de control indica que dicho paciente padecía una enfermedad residual mínima.
- 50 En una realización (89), el aumento observado en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control

es de entre 30 % y 50 %, particularmente entre 35 % y 45 %.

En una realización (90), la invención proporciona un péptido o proteína de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, según cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho anticuerpo o fragmento muestra un perfil PK favorable. En particular, dicho anticuerpo o fragmento tiene una concentración en suero elevada hasta 10 días luego de la administración, lo que indica un perfil farmacocinético (PK) que avala favorablemente el uso de dichos anticuerpos como un anticuerpo terapéutico. (Deng et al., Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2012, 8(2) 141-60; Putman et al., Trends Biotech, 2010 (28) 509-516 ; Bai, S. Clin Pharmacokinet 2012; 51 (2): 119-135.

Breve descripción de las figuras y secuencias

Figuras

La Figura 1 muestra resultados de detección de multímeros de Tau fosforilada mediante ACI-35-2A1-Ab1 (panel izquierdo), ACI-35-2G5-Ab3 (panel medio) y un anticuerpo de control (HT7; panel derecho) en homogenados de cerebro humano de sujeto de control y con AD.

La Figura 2 (2A y 2B) muestra resultados de detección de total y p-Tau mediante anticuerpos comerciales en homogenados de cerebro humano.

La Figura 3 (3A, 3B, 3C) muestra la detección de fosfo-Tau mediante ACI-35-2A1-Ab1 (A), ACI-35-1D2-Ab1 (B) y ACI-35-2G5-Ab3 (C) en homogenados de cerebro humano.

La Figura 4 (4A, 4B, 4C) muestra resultados de detección de Tau-pS396 en cerebro humano con AD y de control (Ctrl) mediante anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1 (A), ACI-35-1D2-Ab1 (B) y ACI-35-2G5-Ab3 (C) usando AlphaLISA. ****p<0,0001, **p<0,01 mediante prueba de Mann-Whitney.

La Figura 5 (5A y 5B) muestra resultados de tinción con IHC de Tau-pT231 (AT180) en la amígdala (A) y el hipocampo (B), luego del tratamiento de ratones transgénicos Tau con ACI-35-2G5-Ab3.

La Figura 6 (6A y 6B) muestra resultados de tinción con IHC de Tau total (HT7) en la amígdala (A) y el hipocampo (B), luego del tratamiento de ratones transgénicos Tau con ACI-35-2G5-Ab3.

La Figura 7 muestra un SDS-PAGE para Tau-pS396 generado usando distintas condiciones de GSK3β, y se transfirió la membrana usando el anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3.

La Figura 8 muestra una configuración de ensayo AlphaLISA específico usando anticuerpos ACI-35-2G5-Ab3-BT y Tau-13.

La Figura 9 muestra la detección de Tau-pS396 en una fracción de cerebro S1 humano de un donante con AD; comparación de señal obtenida de muestras enriquecidas mediante muestras IP y no IP.

La Figura 10 muestra los resultados de detección de Tau-pS396 en CSF humano con AD y de control (Ctrl) mediante anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3 usando IP seguido de AlphaLISA. *** p=0,0003 mediante prueba de Mann-Whitney.

Secuencias

SEQ ID NO: 46 - 57 representa las secuencias de nucleótidos de cebadores directos e inversos VH/VK.

SEQ ID NO: 62 representa la secuencia de aminoácidos del antígeno Tau, péptido T3 (ver la Tabla 1).

SEQ ID NO: 67 representa la secuencia de aminoácidos de la isoforma más larga de Tau humana (441 aa), también denominada Tau40.

SEQ ID NO: 68 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A4-4A6-18.

SEQ ID NO: 69 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A4-4A6-18.

SEQ ID NO: 70 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) de 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) de 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) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1.

ES 2 600 915 T3

- SEQ ID NO: 73 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) de 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) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1.
- 5 SEQ ID NO: 75 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1.
- SEQ ID NO: 76 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A6-1D2-12.
- 10 SEQ ID NO: 77 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A6-1 D2-12.
- SEQ ID NO: 78 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1.
- SEQ ID NO: 79 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1.
- 15 SEQ ID NO: 80 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1.
- SEQ ID NO: 81 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1.
- 20 SEQ ID NO: 82 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1.
- SEQ ID NO: 83 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1.
- SEQ ID NO: 84 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A4-4A6-18.
- 25 SEQ ID NO: 85 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-4A6-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A4-4A6-18.
- SEQ ID NO: 86 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A6-1D2-12.
- 30 SEQ ID NO: 87 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-1D2-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A6-1 D2-12.
- SEQ ID NO: 88 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2 y ACI-35-4A6-Ab2, respectivamente, producidos mediante línea celular de hibridoma A4-2A1-18, A4-2A1-40 y A4-4A6-48, respectivamente.
- 35 SEQ ID NO: 89 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, ACI-35-4A6-Ab2, ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.
- SEQ ID NO: 90 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2 y ACI-35-4A6-Ab2, respectivamente.
- 40 SEQ ID NO: 91 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, ACI-35-4A6-Ab2, ACI-35-2G5-AB2 y ACI-35-2G5-AB3, respectivamente.
- SEQ ID NO: 92 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2 producido mediante línea celular de hibridoma A4-2A1-40.
- 45 SEQ ID NO: 93 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2.
- SEQ ID NO: 94 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena ligera (VK) de 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) de

anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab2.

SEQ ID NO: 96 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A6-2G5-08.

5 SEQ ID NO: 97 representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1 producido mediante 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) de 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) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2G5-Ab1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

45 SEQ ID NO: 115 representa la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la región variable de cadena pesada (VH) de 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) de anticuerpo monoclonal ACI-35-2A1-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A4-2A1-18.

SEQ ID NO: 117 representa la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera (VK) de anticuerpo

monoclonal ACI-35-2A1-Ab1 producido mediante línea celular de hibridoma A4-2A1-18.

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

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

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

Definición de términos

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", como se usan en la presente, son indistintos y se definen con el sentido de biomolécula compuesta por aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

10 Los términos "péptidos" o "péptido de unión" se usan en la presente memoria de manera indistinta y se refieren a cadenas de aminoácidos (comúnmente, L-aminoácidos) cuyos carbonos alfa se unen mediante enlaces peptídicos formados mediante 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 que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. De este modo, el término "extremo amino" (abreviado extremo N) se refiere al grupo alfa-amino libre en el aminoácido en el extremo amino del péptido, o al grupo alfa-amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra ubicación dentro del 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 ubicación dentro del péptido. Un péptido de unión puede constituir anticuerpos como anticuerpos policlonales o monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, diacuerpos, anticuerpos de camélidos, etc., o partes funcionales de los mismos, como se definen en la presente memoria.

15 Los términos "fragmento del mismo" o "fragmento", como se usan en la presente memoria en el contexto de un péptido, se refieren a un fragmento funcional del péptido que presenta básicamente la misma actividad (biológica) que un péptido intacto definido en la presente memoria. Los términos, cuando se usan en la presente memoria en el contexto de un anticuerpo, se refieren a un fragmento de anticuerpo que comprende una parte de un anticuerpo intacto que contiene una unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; moléculas de anticuerpo de cadena simple, que incluyen, moléculas Fv de cadena simple (scFv); y anticuerpos y/o fragmentos de anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos.

20 Comúnmente, los aminoácidos que conforman un péptido están numerados en orden, comenzando en el extremo amino y aumentando en el sentido hacia el extremo carboxi del péptido. Por lo tanto, cuando se dice que un aminoácido "sigue" a otro, dicho aminoácido está ubicado más cerca del extremo carboxi del péptido que el aminoácido precedente.

25 El término "residuo" se usa en la presente memoria para referirse a un aminoácido que se incorpora a un péptido mediante un enlace amida. De este modo, el aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural o, a menos que se limite de otro modo, puede comprender análogos conocidos de aminoácidos naturales que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural (es decir, miméticos de aminoácidos). Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones en la estructura principal del péptido conocidas por los expertos en la técnica.

30 La frase "que consiste básicamente en" se usa en la presente memoria para excluir cualquiera de los elementos que básicamente modificarían las propiedades esenciales de los péptidos a los que se refiere la frase. Por lo tanto, la descripción de un péptido "que consiste básicamente en" excluye cualquiera de las sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos que básicamente modificarían la actividad biológica de dicho péptido.

35 Además, un experto reconocerá que, como se mencionó anteriormente, las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que modifican, agregan o eliminan un aminoácido simple o un pequeño porcentaje de aminoácidos (comúnmente menor al 5 %, más comúnmente menor al 1 %) en una secuencia codificada son variaciones modificadas conservativamente donde las modificaciones generan la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. En la técnica se conocen las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservadoras 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).

5 Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que carece sustancial o esencialmente de los componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado natural. Por lo tanto, los péptidos descritos en la presente memoria no contienen materiales normalmente asociados con su entorno in situ. Comúnmente, los péptidos inmunogénicos aislados descritos en la presente memoria son al menos alrededor de 80 % puros, generalmente al menos alrededor de 90 %, y preferiblemente al menos alrededor de 95 %, según se mide mediante intensidad de banda en un gel teñido con plata.

10 La pureza u homogeneidad de la proteína puede indicarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, como electroforesis con gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización luego de la tinción. Con determinados fines, será necesaria la resolución alta y HPLC o un medio similar para la purificación utilizada.

Cuando los péptidos inmunogénicos tienen una longitud relativamente corta (es decir, inferior a alrededor de 50 aminoácidos), a menudo se sintetizan usando técnicas de síntesis de péptidos químicas estándar.

15 La síntesis en fase sólida, en la cual el aminoácido de extremo C 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 la síntesis en fase sólida son conocidas por los expertos en la técnica.

20 De manera alternativa, los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria se sintetizan usando metodología de ácido nucleico recombinante. En general, esto implica crear una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido, colocar el ácido nucleico en un casete de expresión controlado por un promotor particular, expresar el péptido en un hospedador, aislar el péptido o polipéptido expresado y, si fuera necesario, renaturalizar el péptido. Las técnicas suficientes para guiar a un experto en la técnica a través de dichos procedimientos pueden encontrarse en la bibliografía.

25 Una vez que se expresan, los péptidos recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar, incluida la precipitación de sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Se prefieren las composiciones básicamente puras de alrededor de 50 % a 95 % de homogeneidad, y se prefiere más la homogeneidad del 80 % al 95 % o más, para su uso como agentes terapéuticos.

30 Un experto en la técnica reconocerá que luego de la síntesis química, la purificación o la expresión biológica, los péptidos inmunogénicos pueden poseer una conformación básicamente distinta a las conformaciones naturales de los péptidos constitutivos. En este caso, a menudo es necesario desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y luego hacer que el péptido vuelva a plegarse en la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar las proteínas e inducir el replegamiento son conocidos por los expertos en la técnica.

35 La antigenicidad de la proteína purificada se puede confirmar, por ejemplo, mediante la demostración de la reacción con suero inmune, o con antisuero producido contra la propia proteína.

Los términos «un», «una» y «el/la», tal como se utilizan en la presente memoria, se definen en el sentido de «uno/a o más» e incluyen el plural, salvo que el contexto no lo permita.

40 Los términos "detectar" o "detectado", como se usan en la presente memoria, se refieren a usar técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas como métodos inmunoquímicos o histológicos y se refieren a determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia o concentración de la biomolécula investigada.

"Aislado" se refiere a una molécula biológica libre de al menos algunos de los componentes con los cuales se origina naturalmente.

45 Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" o "partes funcionales del mismo", como se usan en la presente memoria, son términos reconocidos en la técnica y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmuno-específicamente a un antígeno. La inmunoglobulina de acuerdo con 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.

50 "Anticuerpos", en el alcance de la presente invención, pretenden incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, quiméricos, de cadena simple, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados, anticuerpos de camélido, diacuerpos, así como partes funcionales o fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen fragmentos Fab y F(ab')₂, que incluyen los productos de una genoteca de expresión de inmunoglobulina Fab y fragmentos de unión al epítipo de

cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

Estos fragmentos activos se pueden obtener de un anticuerpo de la presente invención mediante diversas técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales purificados se pueden escindir con una enzima, como pepsina, y se pueden someter a filtración en gel de HPLC. La fracción apropiada que contiene fragmentos Fab luego se puede recoger y concentrar mediante filtración de membrana y similares. Para obtener una descripción adicional de las 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 genéticamente que tiene sus CDR derivadas de una inmunoglobulina de donante no humano, las partes derivadas de inmunoglobulina restantes de la molécula derivan de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s).

Un anticuerpo humanizado se puede referir 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 modificarse para conservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son conocidos por 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)).

Un "anticuerpo humanizado" también se puede obtener mediante un enfoque de ingeniería genética novedoso que permite la producción de anticuerpos policlonales similares a humanos madurados por afinidad en animales grandes como, por ejemplo, conejos (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

El término "anticuerpo completamente humano" o anticuerpo "humano" pretende referirse a un anticuerpo derivado de ratones transgénicos que contienen genes de anticuerpo humano o de células humanas. Sin embargo, para el sistema inmunológico humano, la diferencia entre los anticuerpos "completamente humanos", "humanos" y "humanizados" puede ser insignificante o inexistente y, de ese modo, los tres pueden presentar la misma eficacia y seguridad.

El término "anticuerpo monoclonal" también es 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 solamente un antígeno. Los anticuerpos monoclonales comúnmente se producen fusionando una célula B que produce anticuerpos, normalmente de corta duración, con una célula de crecimiento rápido, como una célula cancerosa (denominada a veces célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

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

Como se usa en la presente memoria, el término "soluble" se refiere a parcialmente o completamente disuelto en una solución acuosa.

Además, como se usa en la presente memoria, el término "inmunogénico" se refiere a sustancias que provocan o potencian la producción de anticuerpos, linfocitos T y otras células inmunitarias reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico y que contribuyen a una respuesta inmunitaria en humanos o animales.

Una respuesta inmunitaria tiene lugar cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, linfocitos T y otras células inmunitarias reactivas contra las composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno que deba tratarse.

El término "hibridoma" es reconocido en la técnica y los expertos en la técnica entienden que se refiere a una célula producida mediante la fusión de una célula que produce anticuerpos y una célula inmortal, por ejemplo, una célula de mieloma múltiple. Esta célula híbrida puede producir un suministro continuo de anticuerpo. Véase la definición de "anticuerpo monoclonal" que antecede y los Ejemplos que figuran más adelante para una descripción más detallada de los métodos de fusión.

El término "portador", como se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura en la que el péptido antigénico o una construcción supramolecular se pueden incorporar o con la que se pueden asociar, presentando o exponiendo así péptidos antigénicos o parte del péptido al sistema inmunitario de un humano o animal. Cualquier partícula que se pueda usar de manera adecuada en terapia en animales o humanos como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado, se puede usar como portador dentro del contexto de la presente invención.

El término "portador" comprende además métodos de suministro en donde las composiciones de construcciones antigénicas supramolecular que comprenden el péptido antigénico se pueden transportar a sitios deseados mediante mecanismos de suministro. Un ejemplo de dicho sistema de suministro utiliza metales coloidales como oro coloidal.

Las proteínas portadoras que se pueden usar en las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, péptido de unión a maltosa "MBP"; albúmina de suero bovino "BSA"; hemocianina de lapa californiana "KLH"; ovalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina de suero de cualquier especie; gamma globulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas que tienen antígenos Ia; y polímeros de D- y/o L- aminoácidos.

Además, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de péptido de unión que, cuando se administra a un humano o animal, es suficiente para generar un efecto terapéutico en dicho humano o animal. La cantidad eficaz la determina fácilmente un experto en la técnica siguiendo los procedimientos de rutina.

"pTau PHF", "PHF" y "filamentos helicoidales emparejados" se usan en la presente memoria como sinónimos y se refieren a pares de filamentos de aproximadamente 10 nm enrollados formando hélices con una periodicidad de 160 nm visibles en microscopio electrónico. El ancho varía entre 10 y 22 nm. PHF son las estructuras predominantes en los ovillos neurofibrilares de la enfermedad de Alzheimer (AD) e hilos del neurópilo. PHF se puede observar en algunos pero no en todas las neuritas distróficas asociadas con las placas neuríticas. El componente principal de PHF es una forma hiperfosforilada de la proteína Tau asociada a microtúbulos. PHF están compuestos por proteínas Tau hiperfosforiladas antiparalelas unidas a disulfuro. PHF Tau puede estar truncada de sus 20 residuos de aminoácidos de extremo C. Los mecanismos subyacentes a la formación de PHF son inciertos, pero la hiperfosforilación de Tau puede separarla de los microtúbulos, aumentando el conjunto soluble de Tau.

Dentro del alcance de la presente invención, se demostró que la respuesta inducida por anticuerpo a la composición antigénica de acuerdo con la invención, en gran medida, es independiente de linfocitos T. Se usó un modelo de ratón lampiño en este sentido y se vacunaron ratones lampiños y se midieron las respuestas del anticuerpo para evaluar la respuesta de anticuerpo específico de A β inducida por la composición antigénica de acuerdo con la invención en los ratones lampiños inmunizados. Los ratones lampiños contienen la mutación Foxn1nu y, como consecuencia, presentan una menor función de linfocitos T debido a la ausencia de un timo adecuado.

Una "cantidad farmacéuticamente eficaz", 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 detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que deba tratarse o cualquier complicación asociada con estos.

La presente invención proporciona péptidos de unión que reconocen y se unen a los fosfoepítos patológicos principales de la proteína Tau. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos específicos contra fosfoepítos lineales y conformacionales, simples y complejos, en la proteína Tau, que se cree que son responsables de la sinapto y neurotoxicidad en Tauopatías, incluida la AD.

Por consiguiente, la presente invención se refiere en una realización a un péptido de unión o una parte funcional de los mismos, particularmente a un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, los cuales reconocen y se unen específicamente a un fosfoepítoto en un mamífero, particularmente en la proteína Tau humana o en un fragmento de la misma, particularmente a un confórmero de la proteína Tau patológica pero, en una realización, no se unen al epítoto no fosforilado correspondiente y/o a los epítotos no relacionados, en donde dicho péptido o anticuerpo de unión tienen una afinidad de unión alta 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.

Proteína "Tau soluble", como se usa en la presente memoria, se refiere a proteínas que consisten en monómeros de péptido/proteína Tau completamente solubilizados o de péptidos/proteínas similares a Tau, o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de monómeros de péptidos/proteínas Tau y de oligómeros de proteína Tau. "Tau soluble" excluye particularmente los ovillos neurofibrilares (NFT).

"Tau insoluble", como se usa en la presente memoria, se refiere a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau, o de péptidos/proteínas similares a Tau, o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son insolubles *in vitro* en un medio acuoso e *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 de derivados de los mismos, que son insolubles en el cuerpo de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, respectivamente. "Tau insoluble" incluye particularmente los ovillos neurofibrilares (NFT).

"Tau monomérico" o "monómero de Tau", como se usan en la presente memoria, se refieren a proteínas Tau completamente solubilizadas sin complejos agregados en un medio acuoso.

"Tau agregado", "Tau oligomérico" y "oligómero de Tau" se refieren a múltiples monómeros agregados de péptidos o proteínas Tau, o de péptidos/proteínas similares a Tau, o de péptidos/proteínas Tau modificados o truncados o de otros derivados de péptidos/proteínas Tau que forman estructuras oligoméricas o poliméricas que son insolubles *in vitro* en un medio acuoso e *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 de derivados de los mismos, que son insolubles o solubles en el cuerpo de mamífero o humano más particularmente en el cerebro, respectivamente.

5 Un "anticuerpo de modulación" se refiere a un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo como se describe en la presente memoria en las diversas realizaciones, que pueden regular por aumento (por ejemplo, activar o estimular), regular por disminución (por ejemplo, inhibir o suprimir) o cambiar de otro modo una propiedad funcional, actividad biológica o nivel de proteína Tau soluble, insoluble y/u oligomérica, particularmente de proteína Tau fosforilada soluble, *in vivo*, particularmente en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un humano que contiene niveles superiores de proteína Tau soluble y/o

10 proteína Tau fosforilada soluble. Un anticuerpo de modulación o fragmento funcional del mismo puede actuar para modular una proteína Tau o un polipéptido que codifica dicha proteína Tau directa o indirectamente. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de modulación o fragmento funcional del mismo reduce los niveles de proteína Tau soluble, insoluble y/u oligomérica, particularmente proteína Tau soluble e insoluble, particularmente proteína Tau soluble, insoluble y oligomérica. En un aspecto, la proteína Tau soluble, insoluble y/u oligomérica es

15 proteína Tau fosforilada, particularmente proteína Tau fosforilada soluble, en el cerebro, particularmente en la corteza cerebral y/o el hipocampo, de un animal, particularmente un mamífero o un humano que contiene mayores niveles de proteína Tau y/o proteína Tau fosforilada, particularmente de proteína Tau soluble y/o proteína Tau fosforilada soluble.

20 En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de unión o una parte funcional del mismo, particularmente un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, o un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica dicho péptido o anticuerpo de unión, según cualquiera de las realizaciones descritas y reivindicadas en la presente memoria, o una combinación de las mismas, en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

25 Los portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones como emulsiones de agua/aceite, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

30 Los péptidos de unión de acuerdo con la invención que incluyen anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, se pueden preparar en una formulación fisiológicamente aceptable y pueden comprender un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable usando las técnicas conocidas. Por ejemplo, los péptidos de unión de acuerdo con la invención y que se describen en la presente memoria que incluyen cualquier péptido de unión funcionalmente equivalente o parte funcional del mismo, en particular, los anticuerpos monoclonales de la invención que incluyen cualquier anticuerpo funcionalmente

35 equivalente o parte funcional del mismo, se combinan con un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición terapéutica. Los portadores, diluyentes y/o excipientes farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones como emulsiones de agua/aceite, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede lograr de acuerdo con la metodología estándar conocida por los expertos en la técnica.

40 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en forma de un sólido, líquido o aerosol en una dosis farmacéuticamente eficaz adecuada. Los ejemplos de composiciones sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación implantables. Las píldoras pueden administrarse por vía oral. Las cremas terapéuticas pueden administrarse por vía tópica. Las unidades de dosificación implantables pueden administrarse por vía local, por ejemplo, en un sitio de tumor, o pueden implantarse para la liberación sistemática de la

45 composición terapéutica, por ejemplo, por vía subcutánea. Los ejemplos de composiciones líquidas incluyen formulaciones adaptadas para inyección por vía intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraarterial y formulaciones para administración tópica e intraocular. Los ejemplos de formulaciones de aerosol incluyen formulaciones de inhalación para la administración a los pulmones.

50 Las composiciones pueden administrarse mediante vías de administración estándar. En general, la composición puede administrarse por vía tópica, oral, rectal, nasal, intradérmica, intraperitoneal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular).

Además, la composición se puede incorporar en matrices de liberación sostenida como polímeros biodegradables, donde los polímeros se implantan en la cercanía del lugar donde se desee el suministro, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una única dosis, la administración de dosis repetidas en intervalos

55 de tiempo predeterminados, y la administración sostenida durante un período de tiempo predeterminado.

Una matriz de liberación sostenida, como se usa en la presente memoria, es una matriz compuesta por materiales, normalmente polímeros degradables mediante hidrólisis enzimática o con ácido/base o mediante disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz actúa mediante enzimas y fluidos corporales. La matriz de liberación sostenida

se selecciona de forma deseable mediante materiales biocompatibles como liposomas, poliláctidos (ácido poliláctido), poliglicólido (polímero de ácido glicólico), poliláctido co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, ácidos de poliamino, aminoácidos como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos, polivinil propileno, polivinilpirrolidona y silicona. Una matriz biodegradable preferida es una matriz de un poliláctido, poliglicólido o poliláctido co-glicólido (copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico).

Los expertos en la técnica saben que la dosificación de la composición dependerá de varios factores como, por ejemplo, la afección que se esté tratando, la composición particular utilizada y otros factores clínicos como peso, tamaño, sexo y condición de salud general del paciente, área de superficie corporal, el compuesto o la composición particular que se administre, otros fármacos que se administren simultáneamente, y la vía de administración.

La composición de acuerdo con la invención se puede administrar junto con otras composiciones que comprenden una sustancia o compuesto biológicamente activo como, por ejemplo, un compuesto conocido utilizado en la medicación de Tauopatías y/o amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados con la proteína amiloide o tipo amiloide como la proteína β amiloide implicada en la enfermedad de Alzheimer.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede producir su efecto biológico mediante el mismo mecanismo o un mecanismo similar al de la vacuna terapéutica de acuerdo con la invención o mediante un mecanismo de acción no relacionado o mediante una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

En general, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolinesterasa, bloqueadores del canal de calcio, aminas biogénicas, tranquilizadores de benzodiazepina, síntesis de acetilcolina, potenciadores de almacenamiento o liberación, agonistas del receptor postsináptico de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa A o B, antagonistas del receptor de glutamato de N-metil-D-aspartato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes y antagonistas del receptor serotoninérgico.

En particular, el agente o compuesto biológicamente activo puede comprender al menos un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en compuestos contra tensión oxidativa, compuestos anti-apoptóticos, quelantes metálicos, inhibidores de reparación de ADN 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, agentes de ruptura lámina β , moléculas antiinflamatorias, "antipsicóticos atípicos" como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina o inhibidores de colinesterasa (ChEI) como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina y otros fármacos y complementos nutritivos como, por ejemplo, vitamina B 12, cisteína, un precursor de acetilcolina, lecitina, colina, Ginkgo biloba, acetil-L-carnitina, idebenona, propentofilina, o un derivado de xantina, junto con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, y, opcionalmente, un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable e instrucciones para el tratamiento de enfermedades.

En una realización adicional, la composición de acuerdo con la invención puede comprender niacina o memantina junto con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, y, opcionalmente, un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En aun otra realización de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden "antipsicóticos atípicos" como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por incoherencia notoria, descarrilamiento, tangencialidad) y comportamiento raro o desorganizado, así como anhedonia, afecto aplanado, apatía y aislamiento social, junto con el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, y, opcionalmente, un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otros compuestos que se pueden usar de manera adecuada en las composiciones además del péptido de unión de acuerdo con la invención son los que se describen, por ejemplo, en WO 2004/058258 (ver especialmente las páginas 16 y 17) incluidas las dianas de fármacos terapéuticos (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanosulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas del receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes que disminuyen el colesterol (páginas 68-75); inhibidores amiloides (páginas 75-77), inhibidores de la formación amiloide (páginas 77-78), quelantes metálicos (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), complementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (ver páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94).

Puede haber materia farmacéuticamente activa proteínica en cantidades de entre 1 ng y 10 mg por dosis. En general, el régimen de administración debería encontrarse en el intervalo de entre 0,1 µg y 10 mg del anticuerpo de acuerdo con la invención, particularmente en un intervalo de 1,0 µg y 1,0 mg, y más particularmente en un intervalo de entre 1,0 µg y 100 µg, en el que todas las cifras individuales que se encuentran dentro de estos intervalos forman parte de la invención si la administración tiene lugar mediante infusión continua, una dosificación más apropiada puede encontrarse en el intervalo de entre 0,01 µg y 10 mg de unidades por kilogramo de peso corporal por hora en donde todas las cifras individuales que se encuentran dentro de estos intervalos también forman parte de la invención.

La administración, en general, será por vía parenteral, por ejemplo, intravenosa o subcutánea. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los solventes no acuosos incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los solventes acuosos se pueden seleccionar del grupo que consiste en agua, soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas/alcohol que incluyen solución salina y medio amortiguado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluido y nutrientes, regeneradores de electrolitos (como los que se basan en la dextrosa de Ringer) y otros. También puede haber conservantes presentes, tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, gases inertes, etc.

La composición farmacéutica puede comprender además portadores proteínicos como, por ejemplo, albúmina de suero o inmunoglobulina, particularmente de origen humano. Puede haber otros agentes biológicamente activos presentes en la composición farmacéutica de la invención según su uso pretendido.

Cuando la diana de unión se encuentra ubicada en el cerebro, determinadas realizaciones de la invención proporcionan el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, para atravesar la barrera hematoencefálica. Determinadas enfermedades neurodegenerativas se asocian con un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de modo que el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales o fragmento activo de los mismos se pueda introducir fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de esta, que incluyen, pero no se limitan a, métodos físicos, métodos basados en lípidos y métodos basados en receptores y canales.

Los métodos físicos para transportar el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales o fragmento activo de los mismos a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, evadir la barrera hematoencefálica completamente o mediante la creación de aberturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de evasión incluyen, pero no se limitan a, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou et ál., *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 aberturas en la barrera incluyen, pero no se limitan a, ultrasonido (véase, por ejemplo, publicación de patente de EE.UU. N.º 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, mediante administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989)), permeabilización mediante, por ejemplo, bradiquina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. N.º 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206 y 5,686,416), y transfección de neuronas que se extienden a través de la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el péptido de unión o fragmento de unión al antígeno (véase, por ejemplo, publicación de patente de EE.UU. N.º 2003/0083299).

Los métodos basados en lípidos para transportar el péptido de unión de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de los mismos a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, encapsular el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o fragmento activo de los mismos en liposomas que se acoplan a fragmentos activos de los mismos que se unen a receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20020025313), y recubrir el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o fragmento activo de los mismos en partículas de lipoproteína de baja densidad (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20040131692).

Los métodos basados en receptores y canales para transportar el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o fragmento activo de los mismos, a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero no se limitan a, el uso de bloqueadores glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); la activación de canales de potasio (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2005/0089473), la inhibición de transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/0073713); el revestimiento de

anticuerpos con una transferrina y modulación de la actividad de uno o más receptores de transferrina (véase, por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/0129186) y cationización de los anticuerpos (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º 5,004,697).

5 Un sujeto puede recibir administraciones únicas o repetidas del péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento activo de los mismos, o de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, durante un período de tiempo prolongado. La duración de la administración puede ser de entre 1 semana y hasta 12 meses o más. Durante este período, el péptido de unión, anticuerpo o composición farmacéutica se pueden administrar una vez por semana, una vez cada dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, etc., o con menor o mayor frecuencia según las necesidades del sujeto que deba tratarse.

10 En una realización adicional, la presente invención proporciona métodos y kits para la detección y el diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau que incluyen enfermedades o trastornos neurodegenerativos como Tauopatías que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran tanto patologías Tau como amiloide que incluyen, pero no se limitan 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 de proteínas priónicas, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no muestran una patología amiloide característica que incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no de Guam con ovillos neurofibrilares, demencia argirofílica granulosa, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-pontonigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de ovillos neurofibrilares predominantes, parkinsonismo posencefálico, distrofia miotónica. Las anomalías patológicas pueden ser provocadas por o estar asociadas con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la Tauopatía.

15 Además, la presente invención proporciona métodos y kits para el diagnóstico de una predisposición a enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau, que incluyen enfermedades o trastornos neurodegenerativos como Tauopatías que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran de forma conjunta tanto patologías Tau como amiloide, o para controlar una enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, o una composición de acuerdo con 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*.

20 El diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau o de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau en un sujeto que lo necesita, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, que incluye enfermedades o trastornos neurodegenerativos como Tauopatías que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que manifiestan tanto patologías Tau como amiloide, se puede lograr mediante la detección de la unión inmunoespecífica de un péptido de unión de la invención, particularmente de un anticuerpo, particularmente de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo de los mismos, a un epítipo de la proteína Tau en una muestra o *in situ*, que incluye hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína Tau entre en contacto 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 de control normal, en donde un aumento en la cantidad del complejo inmunológico en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau.

25 El control de una enfermedad residual mínima en un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, luego del tratamiento con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, o una composición de acuerdo con la invención se puede lograr mediante la detección de la unión inmunoespecífica de un péptido de unión de la invención, particularmente de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo de los mismos, a un epítipo de la proteína Tau en una muestra o *in situ*, que incluye hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína Tau entre en contacto con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, que se une a un epítipo de la proteína Tau, permitir que el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, se una a la proteína Tau para formar un complejo inmunológico, detectar la formación del complejo inmunológico y

5 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 de control normal, en donde un aumento en la cantidad de dicho complejo inmunológico en comparación con un valor de control normal indica que el sujeto aún puede padecer una enfermedad residual mínima.

10 La predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto, particularmente un mamífero, más particularmente un humano, a un tratamiento con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, o una composición de acuerdo con la invención se puede lograr mediante la detección de la unión inmuno-específica de un péptido de unión, particularmente de un anticuerpo monoclonal o un fragmento activo de los mismos, a un epítipo de la proteína Tau en una muestra o *in situ*, que incluye hacer que la muestra o una parte o área corporal específica que se sospecha que contiene la proteína Tau entre en contacto con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, que se une a un epítipo de la proteína Tau, permitir que el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, 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 de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento, en donde una disminución en la cantidad de dicho complejo inmunológico indica que dicho paciente tiene un alto potencial de responder al tratamiento.

15 Las muestras biológicas que se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau, para el diagnóstico de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau, que incluye enfermedades o trastornos neurodegenerativos como Tauopatías que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran patologías tanto Tau como amiloide, o para controlar la enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, o una composición de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria son, por ejemplo, fluidos como suero, plasma, saliva, secreciones gástricas, moco, fluido cerebroespinal, fluido linfático y similares 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, cualquier inmunoensayo conocido por los expertos en la técnica se puede usar como, por ejemplo, ensayos que utilizan métodos de detección indirectos usando reactivos secundarios para la detección, ensayos de ELISA e inmunoprecipitación y aglutinación. Se proporciona una descripción detallada de estos ensayos, por ejemplo, en Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York 1988 555-612, WO96/13590 a Maertens y Stuyver, Zrein et al. (1998) y WO96/29605.

25 Para el diagnóstico *in situ*, el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, de la invención o cualquier parte activa o funcional de los mismos se puede administrar al organismo que se diagnosticará mediante los métodos conocidos en la técnica como, por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intranasal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, de manera que pueda ocurrir una unión específica entre un anticuerpo de acuerdo con la invención con una región epitópica en la proteína amiloide. El complejo de antígeno/péptido de unión se puede detectar convenientemente a través de una etiqueta unida al péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, o un fragmento funcional de los mismos, o cualquier otro método de detección conocido en la técnica.

30 Los inmunoensayos usados en aplicaciones de diagnóstico o en aplicaciones de diagnóstico de una predisposición a una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau, que incluye enfermedades o trastornos neurodegenerativos como Tauopatías que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran tanto patologías Tau como amiloide, o para controlar una enfermedad residual mínima en un paciente o para predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, o una composición de acuerdo con la invención y como se describe en la presente memoria comúnmente dependen de los reactivos etiquetados, péptidos de unión o reactivos secundarios para detección. Estas proteínas o reactivos se pueden etiquetar con compuestos generalmente conocidos por los expertos en la técnica que incluyen enzimas, radioisótopos y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas que incluyen, pero no se limitan a, partículas coloreadas, tales como oro coloidal y perlas de látex. De estas, el etiquetado radioactivo se puede usar para casi todos los tipos de ensayos y con la mayoría de las variantes. Las etiquetas conjugadas con enzimas son particularmente útiles cuando deba evitarse la radioactividad o cuando se necesiten resultados rápidos. Los fluorocromos, si bien requieren equipos costosos para su uso, proporcionan un método de detección muy sensible. Los péptidos de unión útiles en estos ensayos son los que se describen y reivindican en la presente memoria que incluyen anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

De manera alternativa, el péptido de unión de acuerdo con la invención, que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, se puede etiquetar indirectamente mediante reacción con sustancias etiquetadas que tienen una afinidad con la inmunoglobulina, tal como la proteína A o G o segundos anticuerpos. El péptido de unión de acuerdo con la invención, que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, se puede conjugar con una segunda sustancia y se puede detectar con una tercera sustancia etiquetada que tiene afinidad con la segunda sustancia conjugada con el anticuerpo. Por ejemplo, el péptido de unión de acuerdo con la invención que incluye anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales y fragmentos activos de los mismos, se puede conjugar con biotina y el conjugado de biotina/péptido de unión detectado usando avidina o estreptavidina etiquetada. De manera similar, el péptido de unión se puede conjugar con un hapteno y el conjugado de hapteno/péptido de unión se puede detectar usando péptido de unión anti-hapteno etiquetado.

Los expertos en la técnica conocerán estas y otras etiquetas adecuadas que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención. La unión de estas etiquetas a los péptidos de unión o fragmentos de los mismos se puede lograr utilizando técnicas estándar comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas típicas son descritas 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 es el método de glutaraldehído, el método de periodato, el método de dimaleimida, y otras.

Los inmunoensayos actuales utilizan un método de anticuerpo doble para detectar la presencia de un analito, en donde el anticuerpo se etiqueta indirectamente mediante reactividad con un segundo anticuerpo que se ha etiquetado con una etiqueta 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 etiquetado es un anticuerpo anti-ratón. Para el anticuerpo que se usará en el ensayo descrito en la presente memoria, esta etiqueta es preferiblemente una perla recubierta con anticuerpo, particularmente una perla magnética. Para el anticuerpo que se empleará en el inmunoensayo descrito en la presente memoria, la etiqueta es preferiblemente una molécula detectable, tal como una sustancia radioactiva, fluorescente o electroquimioluminiscente.

Un sistema de anticuerpo doble alternativo, a menudo denominados sistemas de formato rápido dado que se adaptan a determinaciones rápidas de la presencia de un analito, también se puede emplear dentro del alcance de la presente invención. El sistema requiere afinidad alta entre el anticuerpo y el analito. De acuerdo con una realización de la presente invención, la presencia de la proteína amiloide se determina usando un par de anticuerpos, cada uno específico para la proteína amiloide. Uno de dichos pares de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo detector" y el otro de dichos pares de anticuerpos se denomina en la presente memoria "anticuerpo de captura". El anticuerpo monoclonal de la presente invención se puede usar como un anticuerpo de captura o un anticuerpo detector. El anticuerpo monoclonal de la presente invención también se puede usar como un anticuerpo de captura y un anticuerpo detector, juntos en un único ensayo. Una realización de la presente invención, por lo tanto, usa el método de sándwich de anticuerpo doble para detectar la proteína amiloide en una muestra de fluido biológico. En este método, el analito (proteína amiloide) está intercalado entre el anticuerpo detector y el anticuerpo de captura, el anticuerpo de captura se encuentra irreversiblemente inmovilizado en un soporte sólido. El anticuerpo detector contendría una etiqueta detectable para identificar la presencia del sándwich de anticuerpo y analito y, por lo tanto, la presencia del analito.

Los ejemplos de sustancias de fase sólida incluyen, pero no se limitan a, placas de microtitulación, tubos de prueba de poliestireno, perlas y portaobjetos magnéticos, plásticos o de vidrio conocidos en el campo del radioinmunoensayo e inmunoensayo de enzimas. Los métodos para acoplar anticuerpos a fases sólidas también son conocidos por los expertos en la técnica. Más recientemente, se ha empleado una cantidad de material poroso como nylon, nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio y otros polímeros porosos como soportes sólidos.

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 definió anteriormente. Además, la presente invención se refiere al kit de diagnóstico mencionado en última instancia que, además de una composición como se definió anteriormente, también comprende un reactivo de detección como se definió 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).

Es aun otro objeto de la presente invención proporcionar inmunosondas novedosas y kits de prueba para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas con la proteína Tau, que comprenden péptidos de unión de acuerdo con la presente invención. Para inmunosondas, los péptidos de unión se unen directa o indirectamente a una molécula indicadora adecuada, por ejemplo, una enzima o un radionúclido. El kit de prueba incluye un recipiente que contiene uno o más péptidos de unión de acuerdo con la presente invención e instrucciones para usar los péptidos de unión con el fin 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 correlacione con la presencia o ausencia de la proteína Tau.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y análisis de hibridomas y anticuerpos

El objetivo de este estudio fue generar y analizar mAb (anticuerpos monoclonales) anti-Tau. Se generaron hibridomas mediante fusión de células de bazo de ratón inmunizadas con vacuna Tau con una línea celular de mieloma. Se evaluaron los hibridomas para determinar la reactividad contra proteína Tau de longitud completa fosforilada y no fosforilada, así como los péptidos antigénicos Tau fosforilados y no fosforilados usados en la preparación de vacunas. También se realizó análisis de hibridoma para determinar la reactividad de hibridomas sobrenadantes para ovillos de Tau usando inmunohistoquímica en cortes de cerebro de ratón transgénico Tau.

1.1 Métodos

1.1.1 Fusión

Se usó un ratón C57BL/6 tipo silvestre vacunado con ACI-35 (Tau 393-408 [pS396, pS404]) para la producción de hibridomas. El ratón se estimuló con vacuna ACI-35 el día 0 y luego nuevamente el día 4 y la fusión se realizó el día 7.

Se fusionaron 6×10^7 (ACI-35) esplenocitos del ratón inmunizado con 2×10^7 células de mieloma SP2-O-Ag14 en una relación de 3 esplenocitos /1 célula de mieloma.

Las fusiones generaron 8x96 placas de pocillos y los clones se nombraron de acuerdo con la placa (1-8) luego la fila (A-G) y finalmente la columna (1-12).

1.1.2 Método de análisis para seleccionar los clones

Las 8x96 placas de pocillos se analizaron dos veces en primer lugar para determinar la expresión de IgG. Los clones con expresión positiva luego se transfirieron en placas de 24 pocillos y los sobrenadantes celulares (=clones) de células crecientes se analizaron en un análisis ELISA Tau y un análisis de inmunohistoquímica TAUIR. Se transfirieron sobrenadantes positivos en ELISA y/o TAUIR a matraces T25 y se analizaron los clones nuevamente para determinar la expresión de IgG en un análisis ELISA Tau y análisis TAUIR.

1.1.3 Análisis de IgG

Se recubrieron placas de ELISA (Costar; Sigma) con 50 μ l/pocillo de anticuerpo IgG anti-ratón (AbD Serotec, Düsseldorf, Alemania) en amortiguador de recubrimiento durante 16 h a 4 °C. Después de lavar las placas con PBS/Tween, los pocillos se bloquearon con 100 μ l/pocillo de solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubaron sobrenadantes de hibridoma no diluidos (50 μ l por pocillo) durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado, se aplicó una mezcla de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgM (AbD Serotec) anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un lavado final, se realizó la detección con sustrato de HRP (TMB; 3-3',5,5'-tetrametilbencidina), y las placas se leyeron a 405 nm usando un lector de microplacas. Los resultados se expresan como densidad óptica (O.D.).

1.1.4 Análisis ELISA de hibridomas Tau

Se realizó el análisis ELISA de hibridomas en péptido pTau (ACI-35, T3.5: Tau393-408[pS396/pS404; PolyPeptide Laboratories, Hillerød, Dinamarca), el péptido Tau no fosforilado correspondiente (T3.6: Tau393-408, PolyPeptide Laboratories), proteína Tau de longitud completa fosforilada (441aa) (pTau protein, Vandebroek et al., 2005) y proteína Tau de longitud completa (441aa) (Tau protein, SignalChem, Richmond, Canadá). Finalmente, se usó albúmina de suero bovino (BSA) como control negativo.

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

1.1.5 Análisis de IHC de hibridomas: Unión de anticuerpos anti-Tau a ovillos en secciones de cerebro de ratones transgénicos (TAUIR)

Se realizaron experimentos TAUIR de acuerdo con el protocolo del EJEMPLO 3.1.2.

1.1.6 Análisis de IgG en matraces T25

Se recubrieron placas ELISA con 5 μ g/ml de anticuerpo específico de fragmento F(ab')₂ IgG anti-ratón (Jackson

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

1.2 Resultados

Los sobrenadantes celulares de 8x96 placas de pocillos generados de la fusión se analizaron para la producción de IgG. De 768 pocillos (8x96 pocillos) analizados, se seleccionaron 48 pocillos positivos para la producción de IgG en función de la mejor unión al fosfo-péptido de vacuna, y al fosfo-Tau de longitud completa. La selección se basó en la unión al péptido y proteína fosfo-Tau de longitud completa mediante ELISA y también a selectividad al compararla con el péptido no fosfo y proteína Tau de longitud completa no fosfo. Se subclonaron 24 hibridomas seleccionados al sembrar 2 placas por hibridoma en 1 célula/pocillo y 1 placa a 0,5 célula/pocillo. Los sobrenadantes se analizaron nuevamente para determinar la unión a fosfo-péptido y fosfo-proteína para verificar el perfil de unión, luego de lo cual se evaluó la estabilidad en un cultivo de 6 semanas. Luego se seleccionaron ocho clones estables y se analizaron para la producción de isotipos y la unión usando ELISA y TAUPIR como se describe en los Métodos.

1.3. Conclusión

Los anticuerpos generados han demostrado alta especificidad a péptidos pTau solamente con unión marginal a péptidos no fosforilados.

Se seleccionaron un total de 8 clones para la subclonación adicional y se secuenciaron (véase la Tabla 6 y la Tabla 7) y se depositaron 6 clones en DSMZ (véase la Tabla 10).

Los clones madre positivos mencionados anteriormente se cultivaron adicionalmente en placas de 96 pocillos, luego placas de 24 pocillos y finalmente matraces T25. En cada etapa, los sobrenadantes de los clones de hibridoma se analizaron mediante ELISA, Taupir y transferencia Western.

Ejemplo 2: Clonación de regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo

Se clonan los genes de región variable pesada y ligera de anticuerpo de las células de hibridoma y se determinan las secuencias de ADN y la ubicación de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), así como las características de unión al anticuerpo.

Se preparó ARN total de 3×10^6 células de hibridoma (1 vial) usando el mini kit Qiagen RNeasy (N.º Cat: 74104). Se eluyó ARN en 50 uL de agua y se comprobó en un gel de agarosa al 1,2 %.

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

EJEMPLO 3: Estudios de unión I

El objetivo fue medir la unión de fosfo-Tau (pTau) de los anticuerpos generados a partir de los hibridomas subclonados derivados de ratones inmunizados con las vacunas liposómicas de Tau. Para evaluar esto, se usó un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) para medir la unión de los anticuerpos purificados a proteína Tau de longitud completa fosforilada y no fosforilada, así como los péptidos antigénicos Tau fosforilados y no fosforilados usados para la preparación de vacunas liposómicas.

Se completó el análisis mediante otros dos métodos. Se realizó inmunohistoquímica (IHC) en secciones de cerebro de un animal transgénico Tau (TAUPIR) usando un anticuerpo anti-Tau como el anticuerpo primario. De manera adicional, se realizó transferencia western (WB) en homogenados de proteína en el cerebro de ratones transgénicos Tau, usando un anticuerpo anti-Tau como el anticuerpo de transferencia.

3.1 Métodos

3.1.1. ELISA: Ensayo de unión a fosfo-Tau

Para evaluar la unión de los anticuerpos purificados a Tau y pTau, se usó un ensayo ELISA. En resumen, se recubrieron placas Nunc MaxiSorp de 96 pocillos (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). De manera adicional, se recubrieron placas con 10 µg/mL del péptido de vacuna derivada de Tau, Tau393-408 (fosforilada o no en S396 y S404). Para analizar la reactividad cruzada con las secuencias de Tau y pTau de distintos epítomos de pTau que no se usaron en la preparación de vacunas, las placas se recubrieron con 10 µg/mL de los siguientes péptidos: Tau393-408 (fosforilada o no en S396 y S404), los recubrimientos se realizaron durante la noche en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) a 4 °C. Las placas se lavaron completamente con 0,05 % de Tween 20/PBS y luego se bloquearon con 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) en 0,05 % de Tween 20/PBS durante 1 h a 37 °C. El anticuerpo analizado luego se agregó en 8 o 16 series de diluciones dobles de entre 20 y 0 µg/mL, y se permitió incubar durante 2 h a 37 °C. Las placas luego se lavaron como se describió anteriormente, y se agregó anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con AP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, Inglaterra) a una dilución 1/6000 en 0,05 % de Tween 20/PBS durante 2 horas a 37 °C. Después del lavado, se incubaron las placas con p-nitrofenil fosfato disódico hexahidrato (pNPP; Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) solución de sustrato de fosfatasa, y se leyeron a 405 nm luego de períodos de incubación de 30 min, 1, 2 o 16 h usando un lector de placas ELISA.

3.1.2. TAUIR y transferencia Western: Unión de anticuerpo anti-Tau a ovillos Tau en secciones de cerebro de un animal transgénico Tau (TAPIR)

Para la tinción de TAUIR, las secciones de cerebro fueron de ratones TPLH (ratones transgénicos que expresan la isoforma más larga (441 aa) de hTau^{P301L}), ratones biGT transgénicos dobles (ratones transgénicos GSK-3β cruzados con TPLH) >18 meses de edad, y ratones biAT transgénicos dobles (ratones transgénicos hAPP^{V717I} cruzados con TPLH). Como control negativo, se usaron secciones de ratones inactivados Tau (TKO; 6 meses de edad). Se lavaron secciones de cerebro durante 5 min en PBS y luego se incubaron durante 15 min a RT en 1,5 % de H₂O₂ en PBS:MeOH (1:1) para bloquear la actividad de peroxidasa endógena. Después de lavar las secciones 3 veces en PBST ((PBS/0,1 % TritonX100) se incubaron durante 30 min a RT en PBST+10 % de solución de bloqueo de FCS (suero fetal bovino). La incubación con el anticuerpo anti-Tau que se analiza se realizó durante la noche a 4 °C usando las siguientes concentraciones de anticuerpo: ACI-35-2A1-Ab1 a 0,0053 µg/mL, ACI-35-2A1-Ab2 a 0,0048 µg/mL, ACI-35-4A6-Ab1 a 0,015 µg/mL, ACI-35-1D2-Ab1 a 0,0047 µg/mL, ACI-35-2G5-Ab1 a 0,0055 µg/mL y ACI-35-2G5-Ab2 y ACI-35-2G5-Ab3 a 0,01 µg/mL en PBST/10 % de FCS. A continuación, las secciones se lavaron 3 veces en PBST antes de la incubación con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP (adquirido de Dako, Glostrup, Dinamarca) en PBST/10 % de FCS durante 1 h a RT. Antes de la detección, se lavaron las secciones 3 veces con PBST y se incubaron en 50 mM de Tris/HCl pH 7,6 durante 5 min. La detección se realizó mediante la incubación de las secciones durante 3 min en diaminobencidina (DAB: 1 comprimido en 10 ml de 50 mM de Tris.HCl + 3 µl de H₂O₂ 30 %; MP Biomedicals, Solon, OH, EUA). La reacción se detuvo lavando las secciones 3 veces en PBST. Luego, las secciones se transfirieron a placas de vidrio silanizado y se secaron al aire en una placa caliente a 50 °C durante 2 horas. La contratinción se realizó usando incubación con hematoxilina de Mayers (Fluka Chemie, Buchs, Suiza) durante 1 min, seguido de una etapa de lavado durante 4 min en agua corriente. Las secciones se deshidrataron pasándolas en un baño de etanol al 50 %, 70 %, 90 % y dos veces en 100 % y luego en Xylol 2 veces durante 1 min. Finalmente, las secciones se montaron con DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra) en cubreobjetos de vidrio para imagenología.

Se realizó tinción adicional (transferencia Western) en proteínas de homogenados de cerebro separados en SDS-PAGE (10 %) de ratones de tipo silvestre (FVB), ratones transgénicos Tau (TPLH y biGT) o ratones inactivados Tau (TKO). Para la transferencia Western, se usaron los anticuerpos en las siguientes concentraciones: ACI-35-2A1-Ab1 a 0,53 µg/mL, ACI-35-2A1-Ab2 a 0,48 µg/mL, ACI-35-4A6-Ab1 a 0,5 µg/mL, ACI-35-1D2-Ab1 a 0,47 µg/mL, ACI-35-2G5-Ab1 a 0,55 µg/mL, ACI-35-2G5-Ab2 a 0,33 µg/mL y ACI-35-2G5-Ab3 a 0,5 µg/mL.

3.2 Resultados

El anticuerpo ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-2A1-Ab2, ACI-35-1D2-Ab1, ACI-35-2G5-Ab2 y ACI-35-2G5-Ab3 demostró actividad de unión y especificidad elevadas a la proteína Tau humana fosforilada (Tabla 2), más específicamente al péptido fosfo-Tau antigénico usado en la vacuna correspondiente. No se observó reactividad cruzada con Tau no fosforilada, o con otros péptidos derivados de Tau fosforilada o no fosforilada analizados. El anticuerpo ACI-35-4A6-Ab1, según su selección, demostró actividad de unión elevada solamente con el péptido fosfo-Tau antigénico usado en la preparación de la vacuna. Se descubrió baja reactividad cruzada con la contraparte no fosfo del péptido antigénico usado en la preparación de la vacuna con respecto a lo que se esperaba en función de la selección de clones. El anticuerpo ACI-35-2G5-Ab1 demostró actividad de unión elevada solamente con el péptido fosfo-Tau antigénico usado en la preparación de la vacuna. Se observó poca reactividad cruzada con el fosfo-péptido T4.5 que comprende parte de la secuencia de péptidos antigénicos usados en la vacuna.

Se usaron TAUIR y WB para observar la unión a ovillos de Tau en el cerebro de ratones con Tauopatía avanzada (biGT > 18 meses), y a Tau de longitud completa en homogenados desnaturalizados derivados de estos ratones. Se analizaron diferentes regiones del cerebro: corteza y la parte CA1, CA3 y giro dentado (DG) del hipocampo. Los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1 y ACI-35-2A1-Ab2 mostraron los mejores resultados de TAUIR con una tinción citoplásmica densa e hilos del neurópilo evidentes, especialmente en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. El anticuerpo ACI-35-4A6-Ab1 fue negativo en TAUIR solamente con estructuras tipo ovillo esporádicas apenas visibles levemente teñidas. El anticuerpo ACI-35-1D2-Ab1 demostró una correcta tinción de TAUIR citoplásmica

con hilos del neurópilo en la región CA1. El anticuerpo ACI-35-2G5-Ab1 fue negativo en TAUPIR con tinción nuclear y solamente un poco de tinción de ovillos. Finalmente, los anticuerpos ACI-35-2G5-Ab2 y ACI-35-2G5-Ab3 demostraron tinción de TAUPIR citoplásmica correcta similar con hilos del neurópilo observados en CA1 y CA3 del hipocampo. La valoración de calidad de tinción usando signos de + o - se muestra en la Tabla 2. Se transfirieron homogenizados de cerebro de ratones transgénicos Tau, lo que muestra que todos los anticuerpos se unieron bien a las bandas de Tau esperadas (Tabla 2, clasificada como +) con ACI-35-1 D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab1, que también muestra unión no específica adicional (-/+).

Ejemplo 4: Estudios de unión II

4.1 Métodos

4.1.1 Ensayo de unión de SPR

Todos los experimentos de SPR se llevaron a cabo en un instrumento Biacore X (GE Healthcare). El chip sensor SA (dextrano de carboximetilo derivado de estreptavidina) se adquirió de GE Healthcare. El amortiguador de ejecución fue PBS (PBS de Dulbecco, Sigma D8537). La estreptavidina unida no covalentemente se retiró en primer lugar de la superficie del sensor mediante la inyección de 8 pulsos (cada uno ~1 µL) de 16 mM de NaOH (ac). Luego se solubilizó péptido fosfo-Tau en PBS para proporcionar una concentración de péptido final de 1 µM y luego se inyectó (35 µL) en celda de flujo (fc) 2 del chip sensor a 5 µl/min. Después del acoplamiento, se obtuvo un nivel de inmovilización final de 130 RU. Para estudiar la unión de los anticuerpos a la superficie del chip, se prepararon varias concentraciones de anticuerpos mediante diluciones dobles en serie con amortiguador de ejecución. La inyecciones se realizaron en fc 1 y 2 a una velocidad de flujo de 50 µL/min durante 120 s. La celda de flujo 1 no generó derivaciones y las respuestas de fc 1 se restaron de fc 2 para corregir el ruido del instrumento y los cambios refractarios masivos. Después de cada inyección, se lavaron las superficies inmediatamente con amortiguador de ejecución durante 100 s. Para retirar cualquier anticuerpo unido restante del chip, se realizó regeneración de la superficie mediante la inyección de 1 µL de 10 mM de Glicina-HCl pH 1,7. Los análisis cinéticos se realizaron usando algoritmos para integración numérica y análisis global usando BIAevaluation 3.0. Los sensogramas obtenidos para inyecciones de anticuerpo a distintas concentraciones se superpusieron y las líneas de referencia se ajustaron a cero. Para el ajuste de la curva, todos los datos se ajustaron simultáneamente a un modelo homogéneo 1:1 (Langmuir).

Péptidos usados

| | | |
|-------|---|-------------------------------|
| T3.30 | Enlazador LC-Biotina-GVYKS[PO3H2]PWSGDTS[PO3H2]PRHL-NH2 | lote MI89P9-P12-2 (64 % puro) |
| | | lote MI89P9-P12-3 (87 % puro) |

4.2 Resultados

La unión de los anticuerpos anti-Tau al péptido Tau fosforilado se controló en tiempo real usando SPR. Los análisis de las fases de asociación y disociación de unión del anticuerpo se podrían usar para determinar la constante de velocidad de asociación (k_a), constante de velocidad de disociación (k_d), así como la constante de disociación K_D .

Se descubrió que todos los anticuerpos se unieron específicamente al péptido T3.30 en la superficie de dextrano de carboximetilo no derivada en el intervalo de 46 → 734 nM del anticuerpo analizado (o 11,5 → 184 nM para ACI-35-4A6-Ab1). Los análisis cinéticos de los sensogramas revelaron la constante de disociación K_D para que la interacción de unión entre los distintos anticuerpos y T3.30 sea de entre 2 y 82 nM. Por lo tanto, esto demuestra que los anticuerpos reconocen el fosfopéptido T3.30 con afinidad muy alta (Tabla 3).

Ejemplo 5: Estudios de unión III ELISA en muestras de cerebro humano (ELISA para detección de multímeros de Tau fosforilada)

5.1 Métodos

5.1.1. Muestras humanas: Preparación de muestras de cerebro humano usadas para los ensayos descritos en la presente memoria

La corteza post-mortem temporal para diez muestras con enfermedad de Alzheimer (AD) y diez controles con coincidencia de edad se obtuvieron del Brain Endowment Bank de la Universidad de Miami. La edad promedio al fallecimiento para los pacientes con AD (siete mujeres, tres hombres) fue 81,1 ± 7,3 años y para los controles (sin síntomas neurológicos; nueve mujeres, un hombre) fue 87,0 ± 5,8 (no difiere significativamente de los pacientes con AD según prueba t de Student). Todas las muestras fueron de origen caucásico. Las muestras de AD fueron caracterizadas para la etapa de enfermedad de Braak (Braak y Braak (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82:239-259) como se muestra en la Tabla 4.

La corteza post-mortem temporal para diez muestras de AD y diez controles con coincidencia de edad se homogeneizaron de acuerdo con el siguiente protocolo. Los fragmentos de cerebro se pesaron y homogeneizaron en 9 volúmenes de 25 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de inhibidores de fosfatasa que contienen EGTA (30 mM de NaF, 0,2 mM de Na₃VO₄, 1 nM de ácido okadaico, 1 mM de PMSF, 5 mM de Na₄P₂O₇) e inhibidores de proteasa (Complete Mini; Roche, Suiza). La homogeneización se realizó en hielo usando un recipiente de vidrio. Esto constituye la fracción de homogenado total (TH). Se midieron las concentraciones de proteína usando reactivo Bradford (Sigma).

5.1.2. Configuración de ELISA 1: Ensayo de configuración de ELISA 1 para detectar la presencia de multímeros de Tau fosforilada en homogenados de cerebro cortical post-mortem humanos de individuos afectados con AD y controles con coincidencia de edad

Se recubrieron placas de 96 pocillos de microtitulación con anticuerpos durante la noche a 4 °C a 5 µg/ml en amortiguador de carbonato/bicarbonato. Después de 4 lavados en PBS-Tween, las placas se saturaron con PBS-Tween 10 % BSA durante 1 h a 37 °C. Luego se agregaron homogenados de cerebro a los pocillos a una concentración de 100 ng/µL en 50 µL de PBS, y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Después de lavar las placas, el mismo anticuerpo usado para el recubrimiento, pero biotinilado, se incubó durante 1 h a 37 °C a una concentración final de 5 µg/mL. Las placas se lavaron y luego de la adición de avidina-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) y su sustrato (ABTS, Roche 10881420), se leyeron las placas en distintos momentos. Los valores se expresan como promedio OD ±SD para 10 sujetos con AD y 10 sujetos de control.

5.2 Resultados

Los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 se analizaron para determinar su capacidad de detectar multímeros de fosfoTau (pTau) en homogenados de cerebro de sujetos con AD y de control, usando una configuración de ELISA 1 específica de fosfo y multímero. Observamos una diferencia muy significativa (p<0,001) entre AD y los controles con coincidencia de edad (n=10) en este ensayo para ambos anticuerpos (Figura 1). Usando homogenados corticales post-mortem humanos de cerebro con AD y de control con coincidencia de edad, demostramos la capacidad de los anticuerpos anti-pTau ACI-35-2A1-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 de detectar multímeros de Tau-pS396 en muestras de cerebro humano post-mortem.

Ejemplo 6: Estudios de unión IV - Transferencias Western en muestras de cerebro humano.

6.1 Métodos

6.1.1. Muestras humanas: El mismo método para la preparación de muestras humanas que se describe en el Método 5.1.1.

6.1.2. Transferencias Western: Ensayo de transferencia Western para detectar la presencia de Tau fosforilada en homogenados de cerebro cortical post-mortem humanos de individuos afectados con AD y controles con coincidencia de edad

Los anticuerpos Tau anti-humanos usados en este estudio fueron ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 de ratón, todos dirigidos contra Tau-pS396. El anticuerpo TAU-13 monoclonal de ratón (Abcam ab24636) dirigido contra Tau humana total, y el anticuerpo monoclonal de conejo E178 dirigido contra Tau-pS396 (Abcam ab32057) se usaron como controles. 20 µg de cada homogenado total se cargaron por carril en 10 % de gel prefabricado de poliacrilamida Bis-TRIS (Nupage Novex 10 % Bis-TRIS Midi Gel, Invitrogen). Las proteínas se resolvieron según la recomendación del fabricante en amortiguador de ejecución NuPAGE MOPS SDS (Invitrogen NP0001). La transferencia de proteína se realizó durante 3 h en 25 mM de TRIS pH 8,6, 190 mM de amortiguador de glicina, 20 % de metanol, en hielo en membranas de PVDF (Immobilon-FL, Millipore IPFL00010). Las membranas se bloquearon durante 1 h en amortiguador de bloqueo Licor (Odyssey) diluido 1/3 en PBS. Las membranas se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios en las siguientes concentraciones: TAU-13 a 0,6 µg/mL, E178 diluido 1/5000, ACI-35-2A1-Ab1 a 0,53 µg/mL, ACI-35-1D2-Ab1 a 0,47 µg/mL y ACI-35-2G5-Ab3 a 0,5 µg/mL, diluidos 1/3 en amortiguador Licor y 2/3 PBS con 0,1 % de Tween-20 (PBS-T). Después de 4 lavados en PBS-T, las membranas se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado con el tinte LICOR 800 (IRDye de cabra anti-ratón 800 CW, Odyssey) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente 4 veces con PBS-T, y se escanearon para la reproducción de imágenes usando el sistema LICOR.

6.2 Resultados

Los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 se analizaron para determinar su capacidad de detectar fosfoTau (pTau) en homogenados de cerebro de sujetos con AD y de control, usando transferencias Western específicas de fosfo. Todas las muestras de corteza humana post-mortem se caracterizaron en primer lugar usando anticuerpos comerciales contra Tau humana: anticuerpos Tau anti-total (TAU-13) y Tau anti-pS396 (E178). Como se muestra en la Figura 2A, usando el anticuerpo TAU-13, detectamos en todas las muestras el marcador de Tau característico correspondiente a distintas isoformas de Tau en el intervalo de 50-70 kDa. De manera interesante, en homogenados de cerebro con AD también observamos un cambio relativo en el patrón de migración de Tau esperado para la presencia de Tau hiperfosforilada en cerebros con AD. Confirmando esta hipótesis, el

anticuerpo Tau anti-pS396 comercial distinguió muy bien los controles y AD (Figura 2B). De hecho, el anticuerpo Tau anti-pS396 reveló tres bandas inmunorreactivas principales correspondientes a isoformas hiperfosforiladas de Tau en todos los homogenados de cerebro con AD y con una intensidad muy baja, o ausentes en los controles sanos. Además, las muestras de AD mostraron pruebas inmunorreactivas de TAU-13 de peso molecular alto que probablemente refleja la presencia de Tau agregada (Figura 2A).

La transferencia Western con ACI-35-2A1-Ab1 reveló la presencia de dos bandas de proteína inmunorreactiva del tamaño esperado para fosfo Tau en los homogenados de cerebro con AD pero no en los controles (Figura 3A). Las inmunorreacciones débiles mediante transferencia Western usando ACI-35-2A1-Ab1 puede explicarse mediante la presencia de dos bandas no específicas principales a ~35 y ~40 kDa. La transferencia Western con ACI-35-1 D2-Ab1 reveló la presencia de dos bandas de proteína inmunorreactiva del tamaño esperado para fosfo Tau en los homogenados de cerebro con AD pero no en los controles (Figura 3B). Las inmunorreacciones débiles mediante transferencia western usando ACI-35-1D2-Ab1 se pueden explicar mediante la presencia de bandas no específicas a ~40 y ~50 kDa, así como 4 bandas no específicas entre 80 kDa y 150 kDa. La transferencia western con ACI-2G5-Ab3 reveló la presencia de tres bandas inmunorreactivas principales que corresponden a isoformas (hiper)fosforiladas de Tau en todos los homogenados de cerebro con AD y ausentes en los controles sanos, salvo por un sujeto de control (C22), que tiene historial familiar de AD (Figura 3C). Este informe demostró que ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 pueden distinguir entre AD y los controles con coincidencia de edad con respecto a la presencia de Tau pS396 en corteza post-mortem humana y, por lo tanto, estos anticuerpos monoclonales reconocen isoformas Tau patológicas asociadas con AD.

Ejemplo 7: Estudios de unión V - Configuración 1 (ELISA en muestras de cerebro humano)

7.1 Métodos

7.1.1. Muestras humanas. El mismo método para la preparación de muestras humanas que el que se describe en el Método 5.1.1., salvo por la última parte, preparación de la fracción S1.

7.1.2. Fracción de proteína Tau S1: Subdivisión de fracciones de homogenados totales para obtener proteínas Tau soluble y fosfo-Tau.

Para preparar la fracción de Tau soluble (S1) usada para el ensayo de AlphaLISA, se dividió la mitad del volumen de fracción de TH y se almacenó a -80 °C. El resto de la fracción de TH se procesó adicionalmente mediante la adición de Triton X-100 hasta una concentración final de 0,4 %. Las muestras se mezclaron y se agitaron en vórtex varias veces antes de centrifugarse a 5'000 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante constituye la fracción S1. Las muestras se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C. Las concentraciones de proteína se midieron usando reactivo Bradford.

7.1.3. AlphaLISA: Ensayo AlphaLISA para detectar la presencia de Tau fosforilada en homogenados de cerebro cortical post-mortem humanos de individuos afectados con AD y controles con coincidencia de edad.

Los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3, todos dirigidos contra Tau-pS396, se biotinilaron usando el kit de biotinilación EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC (Thermo Scientific), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó un exceso molar de veinticinco veces de Biotina en anticuerpo en la reacción de etiquetado. Después de la biotinilación, se retiró el exceso de biotina libre mediante diálisis contra PBS usando los dispositivos de diálisis Slide-A-Lyzer MINI, 10K MWCO (Thermo Scientific). Los anticuerpos biotinilados se designan ACI-35-2A1-Ab1-BT, ACI-35-1D2-Ab1-BT y ACI-35-2G5-Ab3-BT. Se conjugó anticuerpo Tau-13 con perlasceptoras alfa activadas (Perkin Elmer) usando el siguiente protocolo: Se mezclaron 0,1 mg de solución de anticuerpo Tau-13 (purificado en columna de proteína A) con 1 mg de sedimentos de perlasceptoras AlphaLISA y complementada con amortiguador de fosfato 0,13 M (pH 8,0) hasta un volumen de reacción final de 200 µL. A continuación, se agregó 1,25 µL de 10 % de Tween-20 y 10 µL de una solución de 25 mg/mL de NaBH₃CN y el tubo se incubó durante 48 h a 37 °C con leve rotación (7 rpm). Después de la reacción de conjugación, se bloquearon los sitios activos en las perlas mediante la adición de 10 µL de una solución de carboxi-metoxilamina y se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 1 h. Finalmente, las perlas se lavaron dos veces con 200 µL de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 y se almacenaron 4 °C en 200 µL de amortiguador de almacenamiento (PBS con 0,05 % de Proclin-300) que dio como resultado una concentración de perlasceptoras AlphaLISA final de 5 mg/ml.

AlphaLISA es un ensayo homogéneo basado en quimioluminiscencia de proximidad de perlas. Si las perlas donantes y receptoras alfa se encuentran próximas entre sí, luego de la excitación láser, una cascada de reacciones químicas produce una señal amplificada. Después de la excitación a 680 nm, el fotosensibilizador contenido en las perlas donantes convierte el oxígeno ambiente en especies de oxígeno singlete más reactivas. Estos singletes difusos (hasta 200 nm, en 4 µseg de una semivida) y produce una reacción quimioluminiscente en las perlas receptoras, lo que produce emisión de luz. La configuración del ensayo fue el siguiente:

Se diluyeron previamente muestras de S1 en amortiguador de ensayo alfa (PerkinElmer AL000C) para obtener una concentración madre de 20 µg/mL. Los siguientes reactivos se agregaron a una placa de 384 pocillos blanca

OptiPlate (PerkinElmer) hasta un volumen final de 50 μ L: Homogenado de cerebro S1 (5 μ L), 10 μ L de ACI-35-2A1-Ab1-BT, ACI-35-1D2-Ab1-BT o ACI-35-2G5-Ab3-BT para una concentración de anticuerpo final de 0,2 nM, 0,5 nM o 0,5 nM, respectivamente, y 10 μ L de conjugado de perlasceptoras Tau13 para una concentración de perlas final de 2,5 μ g/mL. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, y se agregaron 25 μ L de perlas donantes de estreptavidina y se incubaron adicionalmente durante 2 h a temperatura ambiente en la oscuridad. La lectura se realizó usando el instrumento EnSpire Alpha y el análisis se realizó con EnSpire Workstation versión 3.00. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el software GraphPad Prism. Los resultados se presentan como unidades alfa \pm SD.

7.2 Resultados

Se usó un ensayo AlphaLISA para analizar los anticuerpos ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 para determinar la capacidad de detectar Tau-pS396 en homogenados de cerebro humano post-mortem, y para distinguir AD de los controles con coincidencia de edad. Todos los anticuerpos detectaron Tau-pS396 (Figura 4A, 4B, 4C). La diferencia en la detección de señales entre AD y los controles (n=10) también fue muy significativa para todos los anticuerpos, lo que demuestra un aumento de señal en los cerebros de los sujetos con AD; ACI-35-2A1-Ab1 ($p < 0,0001$), ACI-35-1D2-Ab1 ($p < 0,0001$) y ACI-35-2G5-Ab3 ($p = 0,002$). En conclusión, se usó la tecnología AlphaLISA para demostrar la capacidad de ACI-35-2A1-Ab1, ACI-35-1D2-Ab1 y ACI-35-2G5-Ab3 de detectar pS396-Tau en los cerebros de sujetos con AD, y para diferenciar entre los donantes con AD y de control.

Ejemplo 8: Eficacia *in vivo* del anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3

8.1 Métodos

8.1.1. Configuración del estudio: Efectos de tratamiento *in vivo* de 2 administraciones de anticuerpo anti-pTau ACI-35-2G5-Ab3 en ratones transgénicos Tau

A ratones transgénicos Tau hembras y machos (TMHT) con C57BL/6xDBA como trasfondo, de 6-7 meses de edad, se les administraron mediante inyección i.p 3 o 10 mg/kg de ACI-35-2G5-Ab3 o vehículo de control (PBS) dos veces, con una semana de separación. El día 14, los animales se sometieron a eutanasia, los cerebros se cosecharon y procesaron para inmunohistoquímica (IHC). Para determinar la patología Tau en el hipocampo y la amígdala, se etiquetaron 5 cortes (1 de cada nivel) por cerebro usando anticuerpos AT180 (para Tau-pT231) y HT7 (para Tau humana total) y, posteriormente, se evaluó el área inmunorreactiva usando software Image Pro Plus (v6.2). Se midieron los objetos inmunorreactivos por encima de una restricción de tamaño (30 μ m² en la amígdala, 7 μ m² en el hipocampo) y por encima de un umbral de intensidad dinámico. El área total y la intensidad de los objetos y el umbral individual se presentaron automáticamente. Si se usa, se definió un umbral dinámico como intensidad promedio dentro de un área de intensidad (AOI) más un factor por la desviación estándar de intensidades de pixeles dentro del AOI. El tamaño de la región se midió mediante delineación manual del hipocampo y la amígdala. Los datos del área AT180 y HT7 IR se normalizaron con la región (en el hipocampo) o tamaño de AOI (en amígdala).

8.2 Resultados

El anticuerpo pTau AT180 detecta pTau endógena y humana (doblemente fosforilada en Thr231 y Ser235). Para los ratones transgénicos Tau usados en este estudio, las mediciones histológicas AT180 se concentraron en las neuronas del hipocampo y de la amígdala. Los ratones tratados con ACI-35-2G5-Ab3 presentaron una reducción significativa para intensidad promedio y normalizada total de AT180 de etiquetado somal, tanto en amígdala e hipocampo (Figura 5A y 5B), que muestra la reducción de pTau positiva para AT180 somal total en ratones tratados.

Para Tau humana total (transgénica), se usó el anticuerpo HT7. HT7 reconoce Tau humana normal entre el residuo 159 y 163. Las mediciones histológicas se concentraron en somas inmunorreactivas de neuronas del hipocampo y de la amígdala. Los ratones tratados con ACI-35-2G5-Ab3 presentaron un área inmunorreactiva de HT7 reducida, así como la intensidad de HT7 total y promedio de la inmunorreactividad en la amígdala (Figura 6A). En el hipocampo, lo mismo se observó para intensidad promedio (Figura 6B). Sin embargo, se observó un aumento en el etiquetado de HT7 para el área inmunorreactiva, y la intensidad total en el hipocampo en los ratones tratados a 10 mg/kg. Este aumento observado en el hipocampo se debió principalmente a tres ratones del total de ocho ratones analizados.

El tratamiento con ACI-35-2G5-Ab3 disminuyó significativamente los niveles de pTau inmunorreactivos AT180 en ambas regiones analizadas, por lo tanto, en somas de neuronas del hipocampo y de la amígdala. En la amígdala, la intensidad total de etiquetado disminuyó tanto para pTau inmunorreactiva AT180 como Tau humana total inmunorreactiva HT7. El tratamiento con una dosis de 3 mg/kg también disminuyó significativamente la intensidad de HT7 promedio en ambas regiones. Sin embargo, en 10 mg/kg, el área inmunorreactiva de HT7 promedio y la intensidad total en el hipocampo aumentaron con respecto a la de los ratones tratados con control, lo que sugiere que un tratamiento con ACI-35-2G5-Ab3 conlleva un cambio con respecto a pTau patológica.

55

Ejemplo 9: Mapeo de epítomos de anticuerpos anti pTau**9.1 Métodos**

El mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales de ratón Tau anti-fosfo se realizó mediante ELISA usando distintas genotecas de péptido fosfo y no fosfo. Las secuencias de aminoácidos de la genoteca de péptidos T3 usadas se muestran en la Tabla 11A. Cada genoteca consistió en péptidos biotinilados cortos que abarcan las secuencias fosfo y no fosfo presentes en la vacuna de péptidos. De manera adicional, se generó una genoteca de péptidos que sustituye cada residuo de una secuencia de péptidos que se une al anticuerpo con Alanina (Ala), como se muestra en las Tablas 11B y 11C. Cada genoteca consistió en péptidos biotinilados cortos que abarcan las secuencias fosfo y no fosfo presentes en la vacuna de péptidos. Las genotecas de péptidos se adquirieron de ANAWA Trading SA. Las genotecas de péptidos se adquirieron de ANAWA Trading SA. El mapeo de epítomos se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mimotopes). En resumen, las placas recubiertas con estreptavidina (NUNC) se bloquearon con 0,1 % de BSA en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante la noche a 4 °C. Después del lavado con PBS-0,05 % de Tween 20, las placas se recubrieron durante 1 h a RT con los distintos péptidos de cada genoteca, se diluyeron con 0,1 % de BSA, 0,1 % azida de sodio en PBS hasta una concentración final de 10 µM. Después del lavado, las placas se incubaron durante 1 h a RT con el anticuerpo que se analizará diluido hasta 40 ng/ml en 2 % de BSA, y 0,1 % de azida de sodio en PBS. Las placas se lavaron nuevamente y se incubaron con anticuerpo secundario de IgG anti-ratón conjugado con AP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, Inglaterra) a una dilución de 1/6000 durante 1 h a RT. Después de un lavado final, las placas se incubaron con solución de sustrato de fosfatasa de hexahidrato disódico de fosfato p-nitrofenilo (pNPP; Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) y se leyeron a 405 nm luego de 2 h de incubación usando un lector de placas ELISA. La unión se consideró positiva si la densidad óptica (O.D.) fue al menos 2 veces más que la O.D. de fondo.

9.2 Resultados

Como resultado de los experimentos de mapeo de epítomos, se pudieron identificar los epítomos que incluyen el residuo de aminoácido fosforilado requerido (ver la Tabla 5) al cual se unen de manera específica los anticuerpos descritos en la presente memoria.

- Tau aa 393-401, con requisito para pS396 (ACI-35-2A1-Ab1; ACI-35-2A1-Ab2)
- Tau aa 396-401, con requisito para pS396 (ACI-35-4A6-Ab1)
- Tau aa 394-400, con requisito para pS396 (ACI-35-1D2-Ab1)
- Tau aa 402-406, con requisito para pS404 (ACI-35-2G5-Ab1)
- Tau aa 393-400, con requisito para p396 (ACI-35-2G5-Ab2; ACI-35-2G5-Ab3)

Ejemplo 10: Fosforilación de Tau en serina 396 (pS396) usando cinasa GSK3β y análisis de transferencia Western / SDS-PAGE**10.1 Métodos**

Se incubó la isoforma más larga de Tau de longitud completa humana (TAU441; SignalChem) a una concentración final de 16 µM (20 µg de Tau/25 µL de reacción) con 0,018 U de GSK3β/pmol de Tau en amortiguador de fosforilación que contenía HEPES pH 7,64 (40 mM), EGTA (5 mM), MgCl₂ (3 mM) y ATP (2 mM) durante 1, 6, o 20 h a 4, 30 o 37 °C. Una unidad de GSK3β es descrita por el fabricante (New England BioLabs) como la cantidad de enzima que transferirá 1 pmol de fosfato de ATP a fosfopéptido CREB (KRREILSRPPSYR) en 1 minuto a 30 °C. Tau fosforilada con GSK3β (pTau-GSK3β) se analizó con anticuerpos dirigidos contra Tau fosforilada en serina 202, 396, 404, 409, treonina 181, 205, y 231, y Tau total, ejecutados en ELISA directos y transferencias Western (WB), para optimizar y verificar la actividad de cinasa y la especificidad (no se muestra). De manera adicional, las sondas se analizaron para determinar la presencia de GSK3β usando un anticuerpo anti-GSK3α/β (BioSource Invitrogen). Para todas las WB, se diluyó pTau-GSK3β mediante la adición de un volumen igual de amortiguador de muestra A (125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 4 % [p/v] de sulfato de dodecil sódico [SDS], 20 % de glicerol, 0,01 % de bromofenol azul, 5 % de β-mercaptoetanol), y las muestras se calentaron hasta 95 °C durante 10 min. 30 µg de la muestra se cargaron a un gel Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen) y se ejecutaron en amortiguador MOPS SDS (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,45 µm en amortiguador de transferencia (25 mM de Tris pH 8,6, 190 mM de glicina, 20 % de metanol). Para verificar la transferencia de proteína, las membranas se tiñeron con Ponceau S durante 5 min. Luego, las membranas se lavaron y luego se bloquearon durante 1 hora en amortiguador de bloqueo (5 % de BSA en TBS [50 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM de NaCl]). Las membranas se transfirieron durante la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios en amortiguador de bloqueo y 0,1 % de Tween. La transferencia con el ACI-35-2G5-Ab3 se realizó en dilución de anticuerpo 0,5 µg/mL.

10.2 Resultados

Tau tratada con GSK3β dio como resultado presencia elevada de fosforilación en Tau serina 396 (Tau-pS396), como

se verifica usando los anticuerpos específicos a distintos residuos de Tau fosfo-serina y -treonina (no se muestran). La Figura 7 muestra un SDS-PAGE para Tau-pS396 generado usando distintas condiciones de GSK3 β , y se transfirió la membrana usando el anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3. El anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3, específico para Tau-pS396, demostró una buena señal para Tau-pS396, con bandas también observadas que sugieren que se une a dímeros de Tau-pS396 (Figura 7, carriles 11 y 13). No se observaron bandas en ausencia de tratamiento con GSK3 β (carriles 6-8 y 14-15).

Ejemplo 11: Detección de fosforilación de Tau (pSer396) en muestras de fluido cerebroespinal (CSF) humano

11.1 Métodos

11.1.1 Muestras humanas - muestras de cerebro post-mortem

La corteza post-mortem temporal de un donante con enfermedad de Alzheimer (AD) AD19 se obtuvo del Brain Endowment Bank de la Universidad de Miami. Agradecemos la generosidad del Brain Endowment Bank de la Universidad de Miami por proporcionar las muestras para este estudio. La información demográfica acerca del donante se muestra en la Tabla 12 a continuación, donde también se indica la etapa Braak de la enfermedad (Braak y Braak (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82:239-259).

Tabla 12. Descripción de la muestra de cerebro AD19 usada en este estudio.

| ID de la muestra | Sexo | Edad al fallecimiento | Edad al diagnóstico | Duración de la enfermedad | Etapa de la enfermedad |
|------------------|------|-----------------------|---------------------|---------------------------|------------------------|
| AD 19 | F | 81 | 77 | 4 | Braak V |

11.1.2. Preparación de fracción de homogenado S1 de cerebro post-mortem

La corteza post-mortem temporal del donante AD19 se homogeneizó de acuerdo con el siguiente protocolo. El fragmento de cerebro se pesó y homogeneizó en 9 volúmenes de 25 mM de Tris-HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de inhibidores de fosfatasa que contienen EGTA (30 mM de NaF, 0,2 mM de Na3VO4, 1 nM de ácido okadaico, 1 mM de PMSF, 5 mM de Na4P2O7 e inhibidores de proteasa (Complete Mini; Roche 04 693 124 001). La homogeneización se realizó en hielo usando un recipiente de vidrio. Esto constituye la fracción de homogenado total (TH). Se dividió la mitad del volumen de fracción de TH y se almacenó a -80 °C. El resto de la fracción de TH se procesó adicionalmente mediante la adición de Triton X-100 hasta una concentración final de 0,4 %. La muestra se mezcló y se agitó en vórtex varias veces antes de centrifugarse a 5'000 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante constituye la fracción S1. La muestra se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. La concentración de proteína se midió usando reactivo Bradford (Sigma B6916-500).

11.1.3 Muestras de CSF humano

Las muestras de fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) leve a moderada clínicamente confirmada y donantes de control voluntarios sanos (Ctrls) fueron proporcionadas por Charité School of Medicine Berlin. Agradecemos la generosidad de Charité School of Medicine Berlin por proporcionar las muestras para este estudio. Las muestras se dividieron en alícuotas, se almacenaron a -80 °C y se usaron sin procesamiento adicional. La información demográfica y clínica sobre donantes de muestras de CSF se muestra en la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13. Información demográfica y clínica sobre donantes de muestra de CSF

| Diagnóstico | n | Edad promedio (StDev) | Intervalo de edad | % mujeres | Valor MMSE (StDev) | Intervalo MMSE |
|-------------|----|-----------------------|-------------------|-----------|--------------------|----------------|
| AD | 17 | 72,5 (8) | 57-85 | 35 | 21,2 (4) | 13-27 |
| Control | 16 | 65 (7) | 53-77 | 69 | 29(1) | 27-30 |

11.1.4 Inmunoenriquecimiento de Tau CSF

11.1.4.1 Acoplamiento de anticuerpo

Para el inmunoenriquecimiento de Tau CSF, se usó un anticuerpo Tau humano comercial (clon HT7, Thermo

Scientific MN 1000). Para acoplar HT7 a Dynabeads de proteína G (Life Technologies 10004D), para cada muestra, se resuspendieron 1,5 mg (50 µL) de Dynabeads de proteína G mediante mezcla en vórtex y se transfirieron a un tubo de recuperación máxima de 1,7 mL (Axygen MCT-175-L-C). Los tubos se colocaron en un soporte magnético (DynaMag, Life Technologies 123.21 D) para concentrar las perlas en el costado del tubo y para retirar el amortiguador. La unión de 1 µg de HT7 en 200 µL de PBS a Dynabeads de proteína G se realizó usando un Hula Mixer (Life Technologies) a 10/20 rpm, 25 °/inclinación 10, 5 °12 vibro durante 10 min, luego de lo cual los tubos se colocaron en el imán, se retiró el amortiguador y los tubos se lavaron una vez mediante pipeteo leve con 200 µL de PBS/0,02 % de Tween 20 y dos veces con 200 µL de amortiguador de conjugación (20 mM de fosfato de Na, 150 mM de NaCl, preparado en el momento). Los amortiguadores de lavado siempre se retiraron usando el imán. Para reticular HT7 a las Dynabeads de proteína G, se resuspendieron las perlas de HT7 en 250 µL de solución de BS3 5 mM (Sigma-Aldrich S5799) disuelta en amortiguador de conjugación y se incubó con rotación (la misma configuración que anteriormente) durante 30 min a temperatura ambiente (RT), la reacción finalizó mediante la adición de 12,5 µL de amortiguador de inactivación (Tris-HCl 1M pH 7,5) durante 15 min seguido de tres lavados con 200 µL de PBS/0,02 % de Tween 20.

11.1.4.2 Inmunoenriquecimiento de Tau CSF

Se usó CSF sin diluir y se transfirieron 1 mL de CSF para cada donante al tubo que contenía las perlas reticuladas de HT7 y se incubó durante 1 h a 4 °C en rotación continua (10 rpm). Después de retirar el material no unido en el imán, las perlas se lavaron con 200 µL de PBS/0,02 % de Tween 20 y se eluyó Tau en 20 µL de sulfato de dodecilo sódico (SDS) al 1 % en PBS a 70 °C durante 10 min. Para evitar la sedimentación de las perlas, los tubos se mezclaron brevemente (300 rpm en el mezclador horizontal calentado, durante 5 segundos, cada minuto). Después de esta incubación, las muestras eluidas se recogieron colocando los tubos en el imán.

Como control positivo, Tau también se enriqueció a partir de homogenados de cerebro humano. Para esto, se prepararon diluciones en serie de fracción S1 de cerebro humano de donante AD19 en PBS (0,5 µg/mL, 0,17 µg/mL, 0,056 µg/mL, 0,019 µg/mL, 0,006 µg/mL, 0,002 µg/mL, 0,0007 µg/mL). Cada muestra (1 mL) luego se trató como se describió anteriormente y se eluyó en 25 µL de SDS al 1 %.

11.1.5 AlphaLISA.

11.1.5.1 Descripción de ensayo AlphaLISA

AlphaLISA es un ensayo homogéneo que utiliza la tecnología Alpha basada en perlas. AlphaLISA se seleccionó como plataforma de tecnología basada en sensibilidad y cantidad mínima de etapas. En resumen, el ensayo se basa en la proximidad de las perlas. Luego de la excitación a 680 nm, el fotosensibilizador que contenía perlas donantes convierte el oxígeno ambiente en especies de oxígeno singlete, estas se dispersan (hasta 200 nm, en 4 µseg de una semivida) y producen una reacción quimioluminiscente en las perlas aceptoras, lo que genera la emisión de luz.

La configuración del ensayo usada en estos experimentos fue la siguiente (véase también la Figura 8):

- El Anticuerpo Pan-Tau Tau-13 (Abcam ab24636), acoplado a perlas aceptoras Alpha, se une a Tau humana presente en la muestra y forma el complejo "proteína Tau-perlas aceptoras de anticuerpo Tau-13".
- El anticuerpo de detección ACI-35-2G5-Ab3-BT se une al pS396 de Tau humana y permite la unión de las perlas donantes Alpha recubiertas con estreptavidina (SAv) con el complejo.

Luego de llevar todos los reactivos a la reacción, se lee la señal quimioluminiscente usando el lector EnSpire Alpha 2390.

11.1.5.2 Biotinilación de anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3

Para usarlo en el ensayo AlphaLISA, el anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3 se biotiniló usando el kit de biotinilación EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC (Thermo Scientific 21935), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó un exceso molar de veinticinco veces de Biotina en el anticuerpo en la reacción de etiquetado. Después de la biotinilación, se retiró el exceso de biotina libre mediante lavado del anticuerpo cuatro veces en PBS usando 50'000 MWCO Spin-X UF 500 Concentrator (Corning 431480). El anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3 biotinilado se indica como ACI-35-2G5-Ab3-BT.

11.1.5.3 Acoplamiento del anticuerpo Tau-13 a perlas aceptoras AlphaLISA.

Para usarlos en el ensayo AlphaLISA, se conjugó el anticuerpo Tau-13 con las perlas aceptoras Alpha activadas (Perkin Elmer 6772001). Se utilizó el siguiente protocolo de conjugación: Se mezclaron 0,1 mg de solución de anticuerpo Tau-13 (purificado en columna de proteína A) con 1 mg de sedimentos de perlas aceptoras AlphaLISA y complementada con amortiguador de fosfato 0,13 M (pH 8,0) hasta un volumen de reacción final de 200 µL. A continuación, se agregaron 1,25 µL de 10 % de Tween-20 y 10 µL de una solución de 25 mg/mL de NaBH₃CN y el tubo se incubó durante 48 h a 37 °C con leve rotación (7 rpm). Después de la reacción de conjugación, se bloquearon los sitios activos en las perlas mediante la adición de 10 µL de una solución de carboxi-metoxilamina y

se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 1 h. Finalmente, las perlas se lavaron dos veces con 200 µL de 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 y se almacenaron 4 °C en 200 µL de amortiguador de almacenamiento (PBS con 0,05 % de Proclin-300) que dio como resultado una concentración de perlasceptoras AlphaLISA final de 5 mg/ml.

11.1.5.4 Límite de determinación de detección usando pS396-Tau de cerebro

- 5 Se usaron muestras de cerebro Tau inmunoenriquecidas, muestras de fracción de cerebro S1 y de amortiguador en blanco para este experimento. Cada muestra se analizó en 50 µL de volumen final usando una placa blanca de 384 pocillos OptiPlate (PerkinElmer 6007291). Las diluciones de todos los reactivos se realizaron con amortiguador de ensayo Alpha (PerkinElmer AL000C).
- 10
- 5 µL de muestra (1/10 del volumen final, por lo tanto, la concentración de proteína final en el ensayo corresponde a 1/10 de la concentración de la muestra).
 - Se agregaron 10 µL de SDS al 0,5 % para muestras de fracción de cerebro S1 o 10 µL de amortiguador puro para las muestras de cerebro Tau inmunoenriquecidas.
 - Se mezclaron 15 µL de anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3-BT (concentración final: 5 nM) con conjugado de perlasceptoras y Tau13 (concentración final de perlas: 2,5 µg/ml)
- 15
- Incubación a temperatura ambiente durante 1 hora.
 - 20 µL de perlas donantes de estreptavidina (concentración final de perlas: 25 µg/mL)
 - Incubación a temperatura ambiente durante 30 min (protegida de la luz).
 - Lectura usando el instrumento EnSpire Alpha y el análisis con EnSpire Workstation versión 3.00.

11.1.5.5 Determinación de pS396-Tau inmunoenriquecida en CSF

- 20 Cada muestra se analizó en 50 µL de volumen final usando una placa blanca de 384 pocillos OptiPlate (PerkinElmer 6007291). Las diluciones de todos los reactivos se realizaron con amortiguador de ensayo Alpha (PerkinElmer AL000C).
- 25
- 5 µL de eluato inmunoprecipitado de cada donante.
 - Se mezclaron 20 µL de anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3-BT (concentración final: 5 nM) con conjugado de perlasceptoras y Tau13 (concentración final de perlas: 2,5 µg/mL)
- 30
- Incubación a RT durante 1 h.
 - 25 µL de perlas donantes de estreptavidina (concentración final de perlas: 25 µg/ml)
 - Incubación a RT durante 30 min (protegida de la luz).
 - Lectura usando el instrumento EnSpire Alpha y el análisis con EnSpire Workstation versión 3.00.

11.1.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el software GraphPad Prism.

11.2 Resultados

- 35 Los experimentos preliminares indicaron que la cantidad de pS396 presente en CSF humano era demasiado baja para la detección. Por este motivo, se desarrolló un protocolo de inmunoenriquecimiento acoplado a inmunodetección de sensibilidad alta. El protocolo de inmunoenriquecimiento se validó en primer lugar usando material de cerebro post-mortem AD humano. La comparación paralela de las muestras de homogenados de cerebro no tratado con muestras inmunoenriquecidas Tau reveló que en las concentraciones correspondientes el límite de detección del ensayo AlphaLISA Tau13/ACI-35-2G5-Ab3 se alcanzó a 0,5 µg/mL para las muestras no tratadas y entre 0,002-0,006 µg/mL para las muestras inmunoenriquecidas, lo que indica un enriquecimiento de 100 veces (Figura 9).
- 40

- 45 A continuación, se aplicó el protocolo de inmunoenriquecimiento en las muestras de CSF de donantes vivos (n=17 para pacientes con AD leve a moderada y n=16 para voluntarios sanos con coincidencia de edad). Los datos obtenidos (Figura 10) demuestran que: a) luego del protocolo de inmunoenriquecimiento, AlphaLISA Tau13/ACI-35-2G5-Ab3 detectó pS396-Tau en todas las muestras de CSF humano; y b) de manera más importante, se observó un aumento significativo en la cantidad de pS396-Tau en CSF de AD en comparación con el control (p=0,0003, prueba de Mann-Whitney).

5 En conclusión, se desarrolló un protocolo de inmunoenriquecimiento/inmunodetección, lo que permite la detección de pS396-Tau en CSF humano. El aumento de pS396-Tau en CSF de AD leve a moderada sugiere que este método se podría usar satisfactoriamente en estudios de biomarcadores clínicos para evaluar el avance de la enfermedad, estratificación de los pacientes y eficacia de la terapia. El anticuerpo ACI-35-2G5-Ab3 detectó pS396-Tau en todas las muestras de CSF humano y, de manera más importante, el anticuerpo pudo distinguir el CSF AD en comparación con el control.

Tabla 1. Secuencia de Tau, descripción de vacuna y anticuerpo

| Descripción | Vacuna | Secuencia*, longitud (n), número de secuencia ID | Hibridoma | Anticuerpos |
|--------------------------------|--------|--|------------|----------------|
| | | | A4-4A6-48 | ACI-35-4A6-Ab2 |
| | | | A6-2G5-30 | ACI-35-2G5-Ab2 |
| | | | A6-2G5-41 | ACI-35-2G5-Ab3 |
| T3: Tau 393-408 [pS396, pS404] | ACI-35 | VYKS(p)PWSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO: 62) | A4-2A1-18 | ACI-35-2A1-Ab1 |
| | | | A4-2A1-40 | ACI-35-2A1-Ab2 |
| | | | A6-1 D2-12 | ACI-35-1D2-Ab1 |
| | | | A4-4A6-18 | ACI-35-4A6-Ab1 |
| | | | A6-2G5-08 | ACI-35-2G5-Ab1 |

*En función de la isoforma más larga de Tau humana (Tau441). p indica residuo fosforilado.

Tabla 2. Análisis de hibridomas para la unión a la diana

| Hibridoma | Anticuerpos | ELISA | | | | TAUPIR | Análisis de transferencia Western |
|------------|----------------|---------------|-------------|------------------------|-----------------------|--------|-----------------------------------|
| | | p Tau péptido | péptido Tau | pTau longitud completa | Tau longitud completa | | |
| A4-2A1-18 | ACI-35-2A1-Ab1 | + | - | + | - | +++ | + |
| A4-2A1-40 | ACI-35-2A1-Ab2 | + | - | + | - | +++ | + |
| A4-4A6-18 | ACI-35-4A6-Ab1 | + | - | - | + | - | + |
| A6-1 D2-12 | ACI-35-1D2-Ab1 | + | - | + | - | ++ | -/+ |

| Hibridoma | Anticuerpos | ELISA | | | | TAUPIR | Análisis de transferencia Western |
|-----------|----------------|---------------|-------------|------------------------|-----------------------|--------|-----------------------------------|
| | | p Tau péptido | péptido Tau | pTau longitud completa | Tau longitud completa | | |
| A6-2G5-08 | ACI-35-2G5-Ab1 | + | - | - | - | - | -/+ |
| A6-2G5-30 | ACI-35-2G5-Ab2 | + | - | + | - | ++ | + |
| A6-2G5-41 | ACI-35-2G5-Ab3 | + | - | + | - | ++ | + |

La intensidad de unión se puede comparar solamente dentro de la misma columna, dentro del mismo ensayo (ELISA, TAUIR o WB).

- No muy buena unión o ausente; + Buena unión; ++ Muy buena unión; +++ Excelente unión (mejor que muy buena unión)

Tabla 3. Afinidad de unión de los anticuerpos anti-Tau

| Hibridoma | 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) |
|------------|----------------|---|---|---|
| A4-4A6-18 | ACI-35-4A6-Ab1 | $2,00 \times 10^5$ | $3,10 \times 10^{-3}$ | 16^a |
| | | $1,10 \times 10^5$ | $1,70 \times 10^{-3}$ | 15^b |
| A6-1 D2-12 | ACI-35-1D2-Ab1 | $1,60 \times 10^3$ | $9,30 \times 10^{-6}$ | $\leq 6^a$ |
| | | $2,20 \times 10^4$ | $1,80 \times 10^{-3}$ | 82^b |
| A6-2G5-08 | ACI-35-2G5-Ab1 | $4,80 \times 10^5$ | $5,30 \times 10^{-3}$ | 10^a |
| | | $3,20 \times 10^4$ | $2,20 \times 10^{-3}$ | 70^b |
| A6-2G5-30 | ACI-35-2G5-Ab2 | $2,40 \times 10^4$ | $2,30 \times 10^{-4}$ | 10^b |
| A6-2G5-41 | ACI-35-2G5-Ab3 | $1,70 \times 10^4$ | $3,80 \times 10^{-5}$ | 2^b |
| A4-2A1-18 | ACI-35-2A1-Ab1 | $2,70 \times 10^4$ | $1,00 \times 10^{-3}$ | 38^b |
| A4-2A1-40 | ACI-35-2A1-Ab2 | $3,00 \times 10^4$ | $9,00 \times 10^{-4}$ | 30^b |

^a Análisis realizados con una pureza de fosfo péptido de 64 % mediante HPLC.

^b Análisis realizados con una pureza de fosfo péptido de 87 % mediante HPLC.

Tabla 4. Descripción de los sujetos con AD usados para este estudio

| ID del sujeto con AD | Sexo | Edad fallecimiento | Edad al diagnóstico | Duración de la enfermedad | Etapas Braak de AD |
|----------------------|------|--------------------|---------------------|---------------------------|--------------------|
| AD 18 | F | 82 | 66 | 16 | Braak V |
| AD 19 | F | 81 | 77 | 4 | Braak V |
| AD 20 | M | 88 | 82 | 6 | Braak V |
| AD 21 | F | 82 | 77 | 5 | Braak VI |
| AD 22 | M | 62 | 49 | 13 | Braak V |
| AD 23 | F | 76 | 65 | 11 | Braak VI |
| AD 24 | F | 86 | 84 | 2 | Braak V |
| AD 25 | M | 81 | 78 | 3 | Braak V |
| AD 26 | F | 88 | 83 | 5 | Braak V |
| AD 27 | F | 85 | 82 | 3 | Braak V |

Tabla 5. Aminoácidos Tau y fosforesiduos requeridos para la unión al anticuerpo.

| Hibridoma | Anticuerpo | Epítipo* |
|-----------|----------------|--|
| A4-2A1-18 | ACI-35-2A1-Ab1 | Tau aa 393-401, con requisito para pS396 |
| A4-2A1-40 | ACI-35-2A1-Ab2 | Tau aa 393-401, con requisito para pS396 |
| A4-4A6-18 | ACI-35-4A6-Ab1 | Tau aa 396-401, con requisito para pS396 |
| A6-1D2-12 | ACI-35-1D2-Ab1 | Tau aa 394-400, con requisito para pS396 |
| A6-2G5-08 | ACI-35-2G5-Ab1 | Tau aa 402-406, con requisito para pS404 |
| A6-2G5-30 | ACI-35-2G5-Ab2 | Tau aa 393-400, con requisito para pS396 |
| A6-2G5-41 | ACI-35-2G5-Ab3 | Tau aa 393-400, con requisito para pS396 |

*En función de la isoforma más larga de Tau humana (Tau441)

5

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VK) y las CDR

ES 2 600 915 T3

| Anticuerpo | Hibridoma | VH | VK | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VK CDR1 | VK CDR2 | VK CDR3 |
|----------------|-----------|---|---|--|--|-------------------------------------|---|------------------------------------|---------------------------------------|
| ACI-35-4A6-Ab1 | A4-4A6-18 | QVQLQDQPGAEELKPGA SVKLSCKASGYTFTSY WMHWVKQRPRGRLG WIGRIDPNSDRTKYNEK FKRKATLTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYC ARDDYAWFAYWGGGT LVTVSA (SEQ ID NO: 68) | DVLMQTPLSLPLVSLGD QASISCRSSQSIHNSNG NTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKLSNRFSQVPRDF SGSGSGTDFTLKISRVE 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-35-1D2-Ab1 | A6-1D2-12 | QVTLKESGPGILQSSQT LSLTCFSFGFSLSTSGM GVSWIROPQSGKLEWL AHYWDKRYNASLK SRITISKDTSRNGVFLK TCVDTADTATYYCARLL RPYALDYWGQGSVTV SS (SEQ ID NO: 76) | NILMTQSPSSLAWSAGE KVTMSCKSSQSVLYSS NQKNYLAWYQQKPGQ SPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFLTLS SVQAEDLAVYYCLOLYS SLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 77) | GFSLST SGMGVS (SEQ ID NO: 78) | HIYWDD DKRYNA SLKS (SEQ ID NO: 79) | LLRPYA LDY (SEQ ID NO: 80) | KSSQSVL YSSNQK NYLA (SEQ ID NO: 81) | WASTRE S (SEQ ID NO: 82) | LOYLSSL T (SEQ ID NO: 83) |
| ACI-35-2A1-Ab1 | A4-2A1-18 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGHGTLVTVS A (SEQ ID NO: 88) | DIVMTQAAPSVPVTPGE SVSISCRSSKLLHSNG NTLYWFLQRPQSQSP LLIHRMSNLASGVPDRF SGSGSGTAFTLRISRVE AEDVGVYYCMQHLKSP YTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 116) | GYFTFD 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-35-2A1-Ab2 | A4-2A1-40 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGHGTLVTVS A (SEQ ID NO: 88) | DIX*MTQAAPSVPVTPG ESVSISCRSSKLLHSNG GNTLYWFLQRPQSQSP QLLIYRMSNLASGVPDR FSGSGSGTAFTLRISRVE EAEDVGVYYCMQHLKS PYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 92) *X = M or V | GYFTFD 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-A46-Ab2 | A4-4A6-48 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYNQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGHGTLVTVS A (SEQ ID NO: 88) | DIVMTQAAPSVPVTPGE SVSISCRSSKLLHSNG NTLYWFLQRPQSQSP LLIYRMSNLASGVPDRF SGSGSGTAFTLRISRVE AEDVGVYYCMQHLKSP YTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 118) | GYFTFD 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-35-2G5-Ab1 | A6-2G5-08 | QVQLKQSGAELVIRPGA SVKLSCKASGYTFTDYY INWVKQRPGQGLEWIA RIYPGRGNIYYNEKFKG KATLTAEKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYFCARF WDVTYWGGGT LVTVSA (SEQ ID NO: 96) | DVLMQTPLSLPLVSLGD QASISCRSSQSIHNSNG NTYLEWFLQKPGQSPK LLIYKLSNRFSQVPRDF SGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCFQGSHPV YTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 97) | GYFTFD YYIN (SEQ ID NO: 98) | RIYPGR GNIYYN EKFKG (SEQ ID NO: 99) | FWDVY Y (SEQ ID NO: 100) | RSSQSIV HSNGNT YLE (SEQ ID NO: 101) | KVSNRF S (SEQ ID NO: 102) | FQGS HV PYT (SEQ ID NO: 103) |
| ACI-35-2G5-Ab2 | A6-2G5-30 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYHQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGGGT LVTVSA (SEQ ID NO: 104) | DIVMTQSQKFMSTSVG DRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALI YSASYRYSGVPRDFG SGSGTDFLTISNVQSE DLAEYFCQQYNSYPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 105) | GFTFD YYMN (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-35-2G5-Ab3 | A6-2G5-41 | EVQLQQSGPELVKPGA SVKISCKASGYTFTDYY MNWVKQSHGKSLWIG DINPNNGGTSYHQKFK GKATLTVDKSSSTAYM ELRSLTSEDSAVYYCVR EGRFAYWGGGT LVTVSA (SEQ ID NO: 104) | DIVMTQSQKFMSTSVG DRVSVTCKASQNVGTN VAWYQQKPGQSPKALI YSASYRYSGVPRDFG SGSGTDFLTISNVQSE DLAEYFCQQYNSYPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 105) | GFTFD YYMN (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) |

Tabla 7. Secuencia de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VK)

| Anticuerpo | Hibridoma | VH | VK |
|----------------|-----------|---|--|
| ACI-35-4A6-Ab1 | A4-4A6-18 | CAGGTCCAACAGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTCT GAAGCCTGGGCTTCAGTGAACCTGCTCTGCAAGG CTTCTGGCTACACCTTCACCAAGCTACTGGATGCACT GGTGAAGCAGAGCCCTGGACGAGCCCTGGAGTG GATTGGAAGGATTGATCCTAATAGTGATCGTACTAA GTACAATGAGAAGTCAAGCGCAAGGCCACACTGA CTGTAGACAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGC TCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGCTATT ATTGTGCAAGGGATGATTACGCCCTGGTTGCTTACT GGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGCTCTGCA (SEQ ID NO: 84) | GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGCTTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAA GGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTG ATCTACAACTTTCCAACCAGTATTTCTGGGGTCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACT CAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTT ATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCTCCCGACGTTCCG GTGGAGGCCAACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 85) |
| ACI-35-1D2-Ab1 | A6-1D2-12 | CAGGTTACTTGAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTG CAGTCTCCAGACCCCTCAGTCTGACTGTTCTTTC TCTGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTG AGCTGGATTCTGTCAGCCTTCAGGAAAGGCTGGA GTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGC GCTATAACGCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAACT CCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTTTCTCAAGA TCACCTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACT ACTGTGCTCGTTACTGCGTCCCTTATGCTTTGGACT ACTGGGTCAAAGGAACCTCAGTCAACCCGCTCTCTCA (SEQ ID NO: 86) | AACATTTTGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTG TCTGCAGGAGAAAGGTCACATATGAGCTGTAAGTCCAGT CAAAGTGTATACAGTCAAATCAGAAGAACTACTTGG CCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCTAAACTG CTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCT GATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTACT CTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCTGGCAGTT TATTACTGCTTCAATACCTCTCCTCGCTCACGTTCCGGTG CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 87) |
| ACI-35-2A1-Ab1 | A4-2A1-18 | GAGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGG CTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAAC GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGGAGTGG ATTGGAGATATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATGACT GTAGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT CCGCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTA TTGTGTAAGAGAGGGGGTTGCTTACTGGGGTCT ATGGGACTCTGGTCACTGCTCTGCA (SEQ ID NO: 109) | GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCCTGTC ACTCCTGGAGAGTCAAGTATCCATCTCCTGCAGGCTAGT AAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATT GGTCTCCTGCAGAGGCCAGCCAGTCTCCTCAGCTCCTG ATACATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCAGGAACTGCTTTCACACT GAGAACTCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTT ATTACTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCG AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 117) |

| Anticuerpo | Hibridoma | VH | VK |
|----------------|-----------|--|--|
| ACI-35-2A1-Ab2 | A4-2A1-40 | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGG CTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAAC GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAGATATTAATCCTAACAAATGGTACTAGC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATGACT GTAGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT CCGCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTA TTGTGTAAGAGAGGGGGCTTGGCTTACTGGGGTC ATGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 109) | GATATTR*TGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGT CACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGCTAG TAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTAT TGGTCTCCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCT GATATATCGGATGTCCAACTTGCCTCAGGAGTCCCAGA CAGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCAGGAACCTGCTTTCACAC TGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGT TATTACTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCC GAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA (SEQ ID NO: 110) R* = A or G |
| ACI-35-4A6-Ab2 | A4-4A6-48 | GAGGTCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGG CTTCTGGATACACGTTCACTGACTACTACATGAAC GGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAGATATTAATCCTAACAAATGGTACTAGC TACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATGACT GTAGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT CCGCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTA TTGTGTAAGAGAGGGGGCTTGGCTTACTGGGGTC ATGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 109) | GATATTTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTTC ACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGCTAGT AAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATT GGTCTCCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTG ATATATCGGATGTCCAACTTGCCTCAGGAGTCCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGTTCAGGAACCTGCTTTCACACT GAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGT ATTACTGTATGCAACATCTAAAATCTCCGTACACGTTCCG AGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA (SEQ ID NO: 119) |
| ACI-35-2G5-Ab1 | A6-2G5-08 | CAGGTCAGCTGAAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGT GAGGCTGGGGCTTCAGTGAACCTGTCTGCAAGG CTTCTGGCTACACTTTCAGTCACTACTATATAAAGT GGTGAAGCAGAGGGCTGGACAGGGACTTGAGTGG TTGCAAGGATTTATCCTGGAAGAGGTAATATTTACTA CAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTG CAGAAAAATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAAGCTCA GCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGCTATTTCT GTGCAAGATTTCTGGGACGTGACTTACTGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 111) | GATGTTTTGATGACCCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGT CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAAT GGTCTCCTGCAGAAACCCAGGCCAGTCTCCAAAGTCTCCTG ATCTACAAAAGTTTCCAAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGAC AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCCACACT CAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTT ATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTACACGTTCCG GAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAA (SEQ ID NO: 112) |

| Anticuerpo | Hibridoma | VH | VK |
|----------------|-----------|--|---|
| ACI-35-2G5-Ab2 | A6-2G5-30 | <p>GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAAG CTTCTGGATTACGTTTCACTGACTACTACATGAAC GGGTGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAGATAATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGC TACCACAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACT GTAGACAAGTCCCTCAGCACAGCCTACATGGAGCT CCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTA CTGTGTAAGAGAGGGGAAGATTGGCTTACTGGGGCC AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 113)</p> | <p>GACATTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAAATTCATGTCCACA TCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGGCCAG TCAGAAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAA ACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATC CTACCCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATG TGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAAGCAAT ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAG CTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 114)</p> |
| ACI-35-2G5-Ab3 | A6-2G5-41 | <p>GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGT GAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAAG CTTCTGGATTACGTTTCACTGACTACTACATGAAC GGGTGAAGCAGAGCCATGAAAGAGCCTTGAGTGG ATTGGAGATAATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTAGC TACCACCAAGATTCAAGGGCAAGGCCACATTGACT GTAGACAAGTCCCTCAGCACAGCCTACATGGAGCT CCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTA CTGTGTAAGAGAGGGGAAGATTGGCTTACTGGGGCC AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 113)</p> | <p>GACATTTGTGATGACCCAGTCTCAAAAAATTCATGTCCACA TCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGGCCAG TCAGAAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAA ACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATC CTACCCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATG TGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAAGCAAT ATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAG CTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 114)</p> |

Tabla 8. Cebadores usados para secuenciamiento de CDR de regiones variables de anticuerpo

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | | SEQ NO | ID | | |
|-----------|------------|----------------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-----|--|
| A4-4A6-48 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATGTTCTT | 193 | | | |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATGCTCTT | 194 | | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCACCTGGGTTTTCTCTT | 137 | | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGACCTGGGTTTTCTCTT | 195 | | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTT | 196 | | | |
| | | | | GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 197 | | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTATTCTCTT | 151 | | | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT | 121 | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAGACGATGG | 198 | | |
| | | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGGATGG | 199 | | |
| | | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAGACGATGG | 200 | | |
| | | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAACGGTGG | 141 | | |
| | | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAAACGATGG | 166 | | |
| | | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG | 131 | | |
| | | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG | 144 | | |
| | | | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGATGTACCCGGCTCAGTTTCTGGG | 201 | |
| | | | | | | ACTAGTCGACATGAGGACTTCGATTCAGTTCTTGGG | 202 | |
| | | | | | | ACTAGTCTACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 203 | |
| | | | ACTAGTCGACATGAAGTTGTCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | | 204 | | | |
| | | | ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | | 50 | | | |
| | | | 3' | | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 | | |
| | | | | | | | | |
| A4-4A6-18 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT | 205 | | | |
| | | | | ATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT | 206 | | | |
| | | | | ATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT | 207 | | | |

ES 2 600 915 T3

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | | SEQ NO | ID |
|-----------|------------|----------------------|----|------------------------------------|--------|----|
| | | | 3' | CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 208 | |
| | | Cebadores VK | 5' | ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT | 209 | |
| | | | | ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT | 210 | |
| | | | | ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 211 | |
| | | | | ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT | 212 | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG | 213 | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG | 214 | |
| | | | 3' | ACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 215 | |
| A6-1D2-12 | IgG2a | Cebadores VH | 5' | ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT | 216 | |
| | | | | ATGGRCAGRCTTACWTYTTCATTCTT | 217 | |
| | | | | ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT | 218 | |
| | | | 3' | CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG | 208 | |
| | | Cebadores VK | 5' | ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT | 219 | |
| | | | | ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT | 209 | |
| | | | | ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT | 210 | |
| | | | | ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIVTCTT | 220 | |
| | | | | ATGGGCVVTCAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG | 221 | |
| | | | | ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 211 | |
| | | | | ATGGATTTVVCARGTGCAGATTVTCAGCTT | 212 | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG | 213 | |
| | | | | ATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG | 214 | |
| | | | 3' | ACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 215 | |
| A4-2A1-18 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCATTCTCTT | 136 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTTCTCTT | 120 | |

ES 2 600 915 T3

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | SEQ NO | ID |
|-----------|------------|----------------------|----|-------------------------------------|-----|
| | | | | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTT | 123 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGCACCTGGGTTTTCTCTT | 137 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTCCTCTT | 138 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCATCCTCTT | 139 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 124 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGAGCTTATCATCCTCTT | 140 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGGCAATGGATAACGGTGG | 141 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGGATAAACGGTGG | 142 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCAATGGATAAACGGTGG | 134 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAGACGGTGG | 143 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAAACGGATGG | 144 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAAACGGATGG | 145 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG | 131 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGGGATAAACGGTGG | 146 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCAATGGATAAACGGTGG | 147 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAAACGGTGG | 148 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTG | 149 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| A4-2A1-40 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCATCCTCTT | 139 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTCTCTT | 154 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTTCTCTT | 155 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTT | 127 |
| | | | | GGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT | 121 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGATGGAGCTTATCATCCTCTT | 175 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAAACGGTGG | 176 |

ES 2 600 915 T3

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | SEQ NO | ID |
|-----------|------------|----------------------|----|---|-----|
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAAACCGGTGG | 147 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGATGG | 129 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGTGGATAAACGGGTGG | 177 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGGTGG | 128 |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGAGGTACTIONCGGCTCAGTTCCTGGG | 178 |
| | | | | ACTAGTCGACATGAGGTCCCCGGCTCAGTTCCTGGG | 179 |
| | | | | ACTAGTCGACATGAGGACGTCGATTCAGTTCCTGGG | 180 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| A6-2G5-08 | IgG2a | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTCTCTT | 120 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTT | 121 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCATTCTCTT | 122 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTT | 123 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTATTCTCTT | 124 |
| | | | | GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTCTTTCTT | 125 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTCCTCTT | 126 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTTC | 127 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGGTGG | 128 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGATGG | 129 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGTGG | 130 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGATGG | 131 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAGACGGGTGG | 132 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGATAGATGATGG | 133 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAAACGGGTGG | 134 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAAACGATGG | 135 |
| | | Cebadores | 5' | ACTAGTCGACATGAAGTTCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT | 50 |

ES 2 600 915 T3

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | | SEQ NO | ID |
|-----------|------------|----------------------|----|---|--------|----|
| | | VK | | | | |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 | |
| A6-2G5-30 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGAAATGGAGCTGGGTCTTCCTCTT | 150 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTATTCTCTT | 151 | |
| | | | | GGGAATTTATGGAATGGAGCTGGGTCTTCCTCTT | 152 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTTTCTCTT | 127 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCATCCTCTT | 153 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTATTCTCTT | 124 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTCTCTT | 154 | |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTTCTCTT | 155 | |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTATATCATCCTCTT | 156 | |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTTATCATCTTCTT | 157 | |
| | | | | ACTAGTCGACATGTAGATGTGGTTAAACTGGGT | 158 | |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGGGGATAAACGGATGG | 159 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAAGGGATAGACGGATGG | 160 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAGACGGGTGG | 161 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAGACGGATGG | 162 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGTGGATAAACGGATGG | 163 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAATGGATAACGATGG | 164 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGGCCAGTGGATAAACGATGG | 165 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGGTGG | 130 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGTGGATAAACGATGG | 166 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACGATGG | 167 | |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCATGGATAAACGGGTGG | 168 | |
| | | Cebadores VK | 5' | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACATACTCTGG | 169 | |

ES 2 600 915 T3

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | SEQ NO | ID |
|-----------|------------|----------------------|----|---|-----|
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAGTCACATACTCTGG | 170 |
| | | | | ACTAGTCGACTGGGCATCAGATGAGTCACATACTCTGG | 171 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACAGACCCAGG | 172 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATTCTCTGG | 173 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATATTCAGG | 174 |
| | | | | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |
| A6-2G5-41 | IgG2b | Cebadores VH | 5' | GGGAATTCATGGAATGGACCTGGGTCATCCTCTT | 181 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTTTTCTCTT | 120 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTTATCCTCTT | 182 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGGAGCTGGGTTATTCTCTT | 124 |
| | | | | GGGAATTCATGGAATGCAGCTGGGTCTTCCTCTT | 126 |
| | | | | GGGAATTCATGAATGGATCTGGGTTATTCTCTT | 183 |
| | | | 3' | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAAACGGGTGG | 184 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGACGGGTGG | 185 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAATGGATAAACAGATGG | 186 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGATGG | 144 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAGGGGATAAACGGATGG | 145 |
| | | | | CCCAAGCTTCCAGGGACCAAGGGATAAACGGGTGG | 187 |
| | | Cebadores VK | 5' | GGGAATTCATGGAGACACATTCCCAGGTCTTT | 188 |
| | | | | GGGAATTCATGGAGTCACAGTCTCAGGTCTTT | 189 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGGAGTCACATTTTCAGG | 190 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCATCAAGATGAAGTCACATATTCAGG | 191 |
| | | | | ACTAGTCGACATGGGCTTCAAGATGAAGTCACATTCTCAGG | 192 |
| | | | | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | 51 |

| Subclon | Isotipo Ab | Secuencias cebadoras | | | | | | | SEQ ID NO | | |
|-----------------------------|------------|----------------------|---------|--------------------------------|---------|---|-------------|---|-------------|--|----|
| | | | 3' | CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA | | | | | | | 51 |
| 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 9. Isoforma más larga de Tau humana (441aa), también denominada Tau40

| | |
|---|---|
| Isoforma más larga de Tau humana (441 aa), también denominada Tau40 (SEQ ID NO: 67) | MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKQANATR IPAKTTPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR RTPSLTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV PGGGSVQIVY KPVDSLK VTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L (SEQ ID NO: 67) |
| Isoforma 2 de proteína Tau asociada a microtúbulos [Homo sapiens] | |
| Secuencia de referencia de NCBI: NP_005901.2 | |

Depósitos:

- 5 **Tabla 10.** Las siguientes líneas celulares de hibridoma se depositaron a nombre de AC Immune SA, PSE-EPFL Edificio B, 1015 Lausana/Suiza y Katholieke Universiteit Leuven, Waaistraat 6 - Casilla 5105, 3000 Leuven/Bélgica en "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) en Braunschweig, Inhoffenstrasse 7 B, 38124 Braunschweig, según las disposiciones del Tratado de Budapest:

| Nombre de hibridoma | Número de depósito | Fecha de depósito |
|---------------------|--------------------|----------------------|
| A4-4A6-48 | DSM ACC3136 | 30 de agosto de 2011 |
| A6-2G5-30 | DSM ACC3137 | 30 de agosto de 2011 |
| A6-2G5-41 | DSM ACC3138 | 30 de agosto de 2011 |
| A4-2A1-18 | DSM ACC3139 | 30 de agosto de 2011 |
| A4-2A1-40 | DSM ACC3140 | 30 de agosto de 2011 |

ES 2 600 915 T3

| Nombre de hibridoma | Número de depósito | Fecha de depósito |
|---------------------|--------------------|-------------------------|
| A6-1 D2-12 | DSM ACC3141 | 6 de septiembre de 2011 |

Tabla 11A. Genoteca de péptidos para mapeo de epítopos
Genoteca de péptidos para T3
Cantidad de aminoácidos Tau(441)

| Aminoácido | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | |
|--------------------------|-------------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|---|
| | V | Y | K | S(p) | P | V | V | S | G | D | T | S(p) | P | R | H | L | |
| Fosfo péptidos | N.º 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 | S | G | D | T | S(p) | P | R | | |
| | T3.16 | | | | | | | | S | G | D | T | S(p) | P | R | H | |
| | T3.17 | | | | | | | | | G | D | T | S(p) | P | R | H | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | L | |
| | Aminoácido | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | V | Y | K | S | P | V | V | S | G | D | T | S | P | R | H | L |
| No fosfo péptidos | N.º 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 | S | G | D | T | S | P | R | | |
| | T3.25 | | | | | | | | S | G | D | T | S | P | R | H | |
| | T3.26 | | | | | | | | | G | D | T | S | P | R | H | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | L | |

Tabla 11 B. Genoteca de péptido de sustitución de alanina (Ala) usada para mapeo de epítipo de anticuerpos específicos de pS396

| N.º de péptido | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 |
|----------------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| T3-Ala.A1 | V | Y | K | S | P | V | V | S |
| T3-Ala.A2 | V | Y | K | S(p) | P | V | V | S |
| T3-Ala.A3 | A | Y | K | S(p) | P | V | V | S |
| T3-Ala.A4 | V | A | K | S(p) | P | V | V | S |
| T3-Ala.A5 | V | Y | A | S(p) | P | V | V | S |
| T3-Ala.A6 | V | Y | K | A | P | V | V | S |
| T3-Ala.A7 | V | Y | K | S(p) | A | V | V | S |
| T3-Ala.A8 | V | Y | K | S(p) | P | A | V | S |
| T3-Ala.A9 | V | Y | K | S(p) | P | V | A | S |
| T3-Ala.A10 | V | Y | K | S(p) | P | V | V | A |

Tabla 11C. Genoteca de péptido de sustitución de alanina (Ala) usada para mapeo de epítipo de anticuerpos específicos de pS404

| N.º de péptido | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| T3-Ala.B1 | S | G | D | T | S | P | R | H |
| T3-Ala.B2 | S | G | D | T | S(p) | P | R | H |
| T3-Ala.B3 | A | G | D | T | S(p) | P | R | H |
| T3-Ala.B4 | S | A | D | T | S(p) | P | R | H |
| T3-Ala.B5 | S | G | A | T | S(p) | P | R | H |
| T3-Ala.B6 | S | G | D | A | S(p) | P | R | H |
| T3-Ala.B7 | S | G | D | T | A | P | R | H |
| T3-Ala.B8 | S | G | D | T | S(p) | A | R | H |
| T3-Ala.B9 | S | G | D | T | S(p) | P | A | H |
| T3-Ala.B10 | S | G | D | T | S(p) | P | R | A |

Lista de referencia

5 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
 Braak and Braak (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 82:239-259)
 Braak H., et al. (1993), Eur.Neurol., 33, 403-408

10 Gill et al., Nature Med. 9: 589-595 (2003)
 Greenberg S.G., et al. (1992), J Biol.Chem., 267, 564-569.
 Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612
 Hodgson et al.,(1991) Bio/Technology, 9:421
 Hoffmann R., et al (1997), Biochemistry, 36, 8114-8124.

15 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
 Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25 :402-405

20 Masliah et al., (2005) Neuron, 46(6), 857-68
 Masliah et al., (2011) PLoS ONE, Volume 6(4), e19338, pp- 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

- Muyllaert et al, (2008) *Genes Brain Behav.*, Suppl. 1, 57-66
- Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 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
- 5 Oddo et al., (2004) *Neuron*, 43, 321-332
- 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
- 10 Roberson et al, (2007) *Science*, 316 (5825), 750-4
- 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
- 15 Terwel et al, (2008) *Am J pathol.*, 172(3), 786-98
- 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, marzo 9-13, 2005, pp 15-19
- 20 Wagner et al (2002) *Journal of Liposome Research* Vol 12(3), pp 259 - 270
- WO 2004/058258
- WO 96/13590
- WO 96/29605
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2002/0038086
- 25 Publicación de patente de EE.UU. N.º 2003/0083299
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2002/0025313
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0204354
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0131692
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2002/0065259
- 30 Publicación de patente de EE.UU. N.º 2003/0162695
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0124533
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0089473
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2003/0073713
- Publicación de patente de EE.UU. N.º 2003/0129186
- 35 Patente de EE.UU. N.º 5,112,596,
- Patente de EE.UU. N.º 5,268,164,
- Patente de EE.UU. N.º 5,506,206,

Patente de EE.UU. N.º 5,686,416

Patente de EE.UU. N.º 5,004,697

Lista de secuencias

- 5 <110> AC Immune S.A. Katholieke Universiteit Leuven
 <120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA
 <130> 103112PC
 10 <140>
 <141> 2012-10-05
 <150> EP 12 16 3319.2
 15 <151> 2012-04-05
 <150> PCT/EP2011/067604
 <151> 2011-10-07
 20 <160> 221
 <170> BiSSAP 1.0
 <210> 1
 25 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 30 <221> FUENTE
 <222> 1..115
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 1
 35
 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
 <211> 115
 40 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> FUENTE
 45 <222> 1..115
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 2

ES 2 600 915 T3

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
 20 <212> PRT
 <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

ES 2 600 915 T3

```

          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
   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
 20 <210> 6
 <211> 113
 <212> PRT
 <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
Lys

```

30

ES 2 600 915 T3

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 10 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

 <400> 7

 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
 15
 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 25
 <400> 8

 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
 30
 <210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 40
 <400> 9

ES 2 600 915 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

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

<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

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

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..113
 <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
 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

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

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

 <400> 12

 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
 1 5 10
 15
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 25
 <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"
 55 <400> 15

 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met His
 1 5 10
 60 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 600 915 T3

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 5 <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
 Gly
 10 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..11
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 20 <400> 17

 Arg Gly Gln Leu Arg Leu Arg Leu Phe Ala Tyr
 1 5 10
 25 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 35 <400> 18

 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser
 1 5 10
 40 <210> 19
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 45 <221> FUENTE
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

 <400> 19
 50 Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Thr Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly

 <210> 20
 <211> 8
 55 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> FUENTE
 60 <222> 1..8
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 20

Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Val
 1 5

5 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

15 <400> 21

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

20 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

30 <400> 22

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

35 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

45 <400> 23

Gln Glu His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

50 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

55 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

60 <400> 24

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

ES 2 600 915 T3

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

5 <400> 29

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

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

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

15 <400> 30

20 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

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

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

25 <400> 31

30 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Leu Thr
 1 5

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

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

35 <400> 32

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

45 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

55 <400> 33

60

ES 2 600 915 T3

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> FUENTE
 10 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 34
Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr
 15 1 5
 <210> 35
 <211> 345
 <212> DNA
 20 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..345
 25 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"
 <400> 35
 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggata tacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta accgtggtgg aactacttac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa gggcacgttg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggaactcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagttactac 300
 gccgtgggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345
 30
 <210> 36
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..345
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"
 40
 <400> 36
 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggata tacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta accgtggtgg aactacttac 180
 aaccagaagt ttaagggcaa gggcacgttg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 atggaactcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagttactac 300
 gccgtgggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345
 45
 <210> 37
 <211> 345

ES 2 600 915 T3

<212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 5 <221> FUENTE
 <222> 1..345
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 37
 10 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggata cacgttcaact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta accgtggtgg aactacttac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacgttg actgtagaca cgtcctccag cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagtactac 300
 gccgtgggct actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

<210> 38
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 20 <221> FUENTE
 <222> 1..360
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 38
 25 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcac cctctggatt cactttcagt gactatggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120
 ccagagaagg gactggagtg ggttgcatat attagtagtg gcagtagtac catctactat 180
 ggagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaaatga ccagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagaagggga 300
 cagctcaggc tacgcctgtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360

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

<220>
 35 <221> FUENTE
 <222> 1..357
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 39
 40

ES 2 600 915 T3

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

5 <210> 40
<211> 339
<212> DNA
<213> Mus musculus

10 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..339
<223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 40

15 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctatgt cagtaggaca gaaggtcact 60
atgagctgca agtccagtc gagtgttttt aatagtggca atcaaaagaa ctctttggcc 120
tggtagcagc agaaaccagg acagtctcct aaacttctgg tatactttgc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcataggc agtggatctg ggacagattt cagtcttacc 240
atcagcagtg tgcaggctga ggacctggca gattacttct gtcaggaaca ttataccact 300
cctcccacgt tcggtactgg gaccaagctg gagctgaaa 339

20 <210> 41
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

25 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..336
<223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 41

30 gatgtgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaggettgta cacagtcatg gaaaaaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccggttt 180
tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggetgagga tctgggagtt tatttctggt ctcaaactgc acattttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

35 <210> 42
<211> 336
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..336

ES 2 600 915 T3

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

<400> 42

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtcacg gaaaaaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccggttt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240

5

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctggt ctcaaactgc acattttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 43

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

10

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..336

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

15

<400> 43

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttcta cacagtcacg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtffc caaccggttt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactgc acattttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

20

<210> 44

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

25

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..321

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

30

<400> 44

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtc ggatgtgagt actgctgtag cctggatca acagaaacca 120
 ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatoctacc ggtacactgg agtccctgat 180
 cgcttactg cagtgatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta ctccgctcac gttcgggtgct 300

35

gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 45

<211> 339

<212> DNA

<213> Mus musculus

40

ES 2 600 915 T3

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..339
 5 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

 <400> 45
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtc gagccttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
 ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaataaaaa 339
 10
 <210> 46
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 20 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 46
 gggaattcat graatgsasc tggtywtyc tctt 34
 25
 <210> 47
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..35
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 35
 <220>
 <221> variation
 <222> 30..30
 <223> /sustitución="n=i"
 40
 <400> 47
 cccaagcttc caggrccar kggataracn grtgg 35
 45
 <210> 48
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..32
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 55
 <400> 48
 gggaattcat gragwcacac wycaggtct tt 32

ES 2 600 915 T3

<210> 49
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..41
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

10

<400> 49

actagtcgac atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g 41

15

<210> 50
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..39
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25

<400> 50

actagtcgac atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 39

30

<210> 51
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

35

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..30
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40

<400> 51

cccaagctta ctggatggtg ggaagatga 30

45

<210> 52
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 52

55

actagtcgac atgggatgga gctratcat sytctt 36

60

<210> 53
<211> 33
<212> DNA
<213> secuencia artificial

65

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..33
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="secuencia artificial"

ES 2 600 915 T3

<400> 53
gggaattcat grasttskkg ytmactkgr ttt 33

5 <210> 54
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..39
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

15 <400> 54
actagtcgac atggactcca ggctcaattt agttttcct 39

20 <210> 55
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..33
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

30 <400> 55
actagtcgac atgaagwtgt ggbtraactg grt 33

35 <210> 56
<211> 39
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

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

45 <220>
<221> característica_misc
<222> 27..27
<223> /nota="n=i"

50 <400> 56
actagtcgac atggagwcag acacacnsct gytatgggt 39

55 <210> 57
<211> 37
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..37
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

65 <400> 57
actagtcgac atggyctya tvtrctgct gctatgg 37
<210> 58

ES 2 600 915 T3

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-37" /organismo="Secuencia Artificial"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 18..18
 <223> serina fosforilada

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 26..26
 <223> serina fosforilada

20 <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> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-33" /organismo="Secuencia Artificial"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 14..14
 <223> serina fosforilada

40 <400> 59

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

<210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-39" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7..7
 <223> treonina fosforilada

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9..9
 <223> serina fosforilada

ES 2 600 915 T3

<400> 60

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

5 <210> 61
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..16
<223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-39" /organismo="Secuencia Artificial"

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 7..7
<223> serina fosforilada

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 10..10
<223> treonina fosforilada

25 <400> 61

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

30 <210> 62
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..16
<223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-35" /organismo="Secuencia Artificial"

40 <220>
<221> VARIANTE
<222> 4..4
<223> serina fosforilada

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> 12..12
<223> serina fosforilada

50 <400> 62

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

55 <210> 63
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..18
<223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-36" /organismo="Secuencia Artificial"

<220>

ES 2 600 915 T3

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

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 9..9
 <223> serina fosforilada

10 <400> 63

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

<210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-34" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3..3
 <223> serina fosforilada

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6..6
 <223> treonina fosforilada

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 13..13
 <223> treonina fosforilada

40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 15..15
 <223> serina fosforilada

45 <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> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..12
 <223> /tipo_mol="proteina" /nota="Descripción de la secuencia artificial: ACI-42" /organismo="Secuencia Artificial"

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

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 3..3
 <223> serina fosforilada

ES 2 600 915 T3

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440

5 <210> 68
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..117
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

15 <400> 68

ES 2 600 915 T3

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 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

<210> 69
 <211> 112
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 10 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

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

<210> 70
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 25 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 70

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

<210> 71
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 40 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

ES 2 600 915 T3

<400> 71
Arg Ile Asp Pro Asn Ser Asp Arg Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Arg
5
<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
10
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..8
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
15
<400> 72
Asp Asp Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5
20
<210> 73
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
25
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..16
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
30
<400> 73
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
35
<210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
40
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..7
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
45
<400> 74
Lys Leu Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
50
<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
55
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..9
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
60
<400> 75
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
1 5

ES 2 600 915 T3

<210> 76
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..119
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 10
 <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 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
 15
 <210> 77
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 25
 <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
 30
 <210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..12
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 40
 <400> 78

ES 2 600 915 T3

<213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 5 <222> 1..8
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 83

Leu Gln Tyr Leu Ser Ser Leu Thr
 10 1 5

<210> 84
 <211> 351
 <212> DNA
 15 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..351
 20 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 84

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttctgaagc ctggggcttc agtgaaactg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacgag gccttgagtg gattggaagg atgtatccta atagtgatcg tactaagtac 180
 aatgagaagt tcaagcgcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtct attattgtgc aagggatgat 300
 tacgcctgggt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

25 <210> 85
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

35 <400> 85

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaactttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcct 300
 ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaaa 336

40 <210> 86
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..357

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

<400> 86

```
caggttactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagt cctcccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctgggtt ttacttgagc acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt      120
cagccttcag gaaagggctc ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc      180
tataacgcat ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctccag aaaccaggta      240
ttcctcaaga tcacctgtgt ggacactgca gatactgccca catactactg tgctcggtta      300
5 ctgcgtcctt atgctttgga ctactggggg caaggaacct cagtcaccgt ctctca      357
```

<210> 87

<211> 336

<212> DNA

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..336

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

<400> 87

```
aacattttga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact      60
atgagctgta agtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc      120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg      180
gaatctgggtg tcctgatcgc cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc      240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcttcaata cctctcctcg      300
20 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa      336
```

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>

<221> FUENTE

<222> 1..115

30 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 88

```
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
```

35

<210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..10
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 10
 <400> 89

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5 10
 15
 <210> 90
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 25
 <400> 90

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
 30
 <210> 91
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..6
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 40
 <400> 91

Glu Gly Arg Phe Ala Tyr
1 5
 45
 <210> 92
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50
 <220>
 <221> SITE
 <222> 3..3
 <223> Xaa is Met or Val
 55
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 92

ES 2 600 915 T3

Asp Ile Xaa 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> 93
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <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
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<400> 94

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<400> 95

Met Gln His Leu Lys Ser Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 96
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE

<222> 1..115
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

<400> 96

5
 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

<210> 97
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<400> 97

15
 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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 98
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

<400> 98

35
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn
 1 5 10

<210> 99
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40

ES 2 600 915 T3

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 5
 <400> 99

Arg Ile Tyr Pro Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly
 10 <210> 100
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..6
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 20 <400> 100

Phe Trp Asp Val Thr Tyr
1 5
 25 <210> 101
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..16
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 35 <400> 101

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15
 40 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..7
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
 <400> 102

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5
 55 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..9
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

ES 2 600 915 T3

<400> 103

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
1 5

5 <210> 104
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

15 <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 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

20 <210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..107
<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

30 <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 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

35 <210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

40 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..11

ES 2 600 915 T3

```

<223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
<400> 106
  Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
5   1           5           10
  <210> 107
  <211> 7
  <212> PRT
10  <213> Mus musculus
  <220>
  <221> FUENTE
  <222> 1..7
15  <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
  <400> 107
  Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
20  1           5
  <210> 108
  <211> 9
  <212> PRT
  <213> Mus musculus
25  <220>
  <221> FUENTE
  <222> 1..9
  <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"
30  <400> 108
  Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
  1           5
35  <210> 109
  <211> 345
  <212> DNA
  <213> Mus musculus
40  <220>
  <221> FUENTE
  <222> 1..345
  <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"
45  <400> 109
  gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata      60
  tcctgtaagg cttctggata cacgttcact 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
  <210> 110
50  <211> 336
  <212> DNA
  <213> Mus musculus
  <220>

```

ES 2 600 915 T3

<221> FUENTE
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

5 <400> 110
 gatattttrtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctctggaga gtcagtatcc 60
 atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120
 ttctctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180
 tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240
 agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct aaaatctccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

10 <210> 111
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..345
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

20 <400> 111
 caggtccagc tgaagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaaactg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cactttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gacttgagtg gattgcaagg atttatcctg gaagaggtaa tatttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaaa aatcctccag cactgcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagattctgg 300
 gacgtgactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca 345

25 <210> 112
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

35 <400> 112
 gatgttttga tgaccctaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgcga gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 ttctctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctctgatct acaaagtctc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

40 <210> 113
 <211> 345

ES 2 600 915 T3

<212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 5 <221> FUENTE
 <222> 1..345
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 113

10 gaggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggatt cacgttact gactactaca tgaactgggt gaagcagagc 120
 catggaaga 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

<210> 114
 <211> 321
 15 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 20 <222> 1..321
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

<400> 114

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120
 gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacacctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300

25 gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 115
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..17
 35 <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

40 <210> 116
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <220>

ES 2 600 915 T3

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

5 <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
  
```

10 <210> 117
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..336
 <223> /tipo_mol="DNA" /organismo="Mus musculus"

20 <400> 117

```

gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctctggaga gtcagtatcc      60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg      120
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatac atcggatgtc caaccttgcc      180
tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc      240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatct aaaatctccg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa      336
  
```

25 <210> 118
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..112
 <223> /tipo_mol="proteina" /organismo="Mus musculus"

35 <400> 118

ES 2 600 915 T3

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
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

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

<400> 119
 gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctctggaga gtcagtatcc 60
 atctctctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120
 ttctctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 180
 tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240
 agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatct aaaatctccg 300
 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 120
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 120
 gggaattcat ggaatgcagc tgggttttc tctt 34

<210> 121
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 121
 gggaattcat ggaatggagc tgggtcttcc tctt 34

<210> 122

ES 2 600 915 T3

<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

10 <400> 122

gggaattcat ggaatgcagc tgggtcattc tctt 34

15 <210> 123
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <400> 123

gggaattcat ggaatggagc tgggttttct tctt 34

30 <210> 124
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40 <400> 124

gggaattcat ggaatggagc tgggttattc tctt 34

45 <210> 125
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 125

gggaattcat ggaatggagc tgggttattc tctt 34

60 <210> 126
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 126

ES 2 600 915 T3

ggaattcat ggaatgcagc tgggtcttcc tctt 34

5 <210> 127
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 127
15 ggaattcat ggaatggagc tgggttttcc tcttc 35

<210> 128
<211> 34
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 128
30 cccaagcttc caggaccaa tggataacgg gtgg 34

<210> 129
<211> 34
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 129
45 cccaagcttc caggaccaa tggataaacg atgg 34

<210> 130
<211> 34
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 130
60 cccaagcttc caggaccaa tggataaacg gtgg 34

<210> 131
<211> 35
65 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE

ES 2 600 915 T3

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

5 <400> 131
cccaagcttc cagggaccaa tggataaacg gatgg 35

10 <210> 132
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

20 <400> 132
cccaagcttc cagggaccag tggatagacg ggtgg 35

25 <210> 133
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

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

35 <400> 133
cccaagcttc cagggaccaa gggatagatg atgg 34

40 <210> 134
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 134
cccaagcttc caggggcaa tggataaacg ggtgg 35

55 <210> 135
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

65 <400> 135
cccaagcttc caggggcaa tggataaacg atgg 34

<210> 136
<211> 34
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> FUENTE
 5 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 136
 10 gggaattcat ggaatggagc tgggtcattc tctt 34
 <210> 137
 <211> 34
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> FUENTE
 20 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 137
 25 gggaattcat ggaatgcacc tgggtttcc tctt 34
 <210> 138
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 35 <400> 138
 gggaattcat ggaatggagc tgggtcttcc tctt 34
 40 <210> 139
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 50 <400> 139
 gggaattcat ggaatggagc tgggtcatcc tctt 34
 <210> 140
 55 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <221> FUENTE
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 140
 65 actagtcgac atgggatgag cttatcatcc tctt 34

ES 2 600 915 T3

<210> 141
<211> 33
<212> DNA
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..33
10 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 141
cccaagcttc caggggcca tggataacgg tgg 33
15

<210> 142
<211> 36
<212> DNA
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..36
25 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 142
cccaagcttc cagggaccag tgggataaac ggtgg 36
30

<210> 143
<211> 35
<212> DNA
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
40 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 143
cccaagcttc cagggacca gggatagacg ggtgg 35
45

<210> 144
<211> 35
<212> DNA
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
55 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 144
cccaagcttc cagggacca gggataaacg gatgg 35
60

<210> 145
<211> 35
<212> DNA
65 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

ES 2 600 915 T3

<400> 145
5 cccaagcttc caggaccag gggataaacg gatgg 35
<210> 146
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
15 <400> 146
cccaagcttc caggggccag ggataaacgg gtgg 34
20 <210> 147
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
30 <400> 147
cccaagcttc caggggcaa tggataaacg ggtgg 35
35 <210> 148
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
40 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
45 <400> 148
cccaagcttc caggaccag tggataaacg gtgg 34
50 <210> 149
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
55 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
60 <400> 149
actagtcgac atggtgtcca cagctcagtt ccttg 35
65 <210> 150
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 600 915 T3

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
5 <400> 150
gggaattcat gaaatggagc tgggtcttcc tctt 34
10 <210> 151
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
20 <400> 151
gggaattcat ggaatgcagc tgggttattc tctt 34
25 <210> 152
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
35 <400> 152
gggaatttat gaaatggagc tgggtcttcc tctt 34
40 <210> 153
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
45 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
50 <400> 153
gggaattcat ggaatgcagc tgggtcatcc tctt 34
55 <210> 154
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
65 <400> 154
gggaattcat ggaatgcagc tgggttttcc tctt 34
<210> 155

ES 2 600 915 T3

<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

10 <400> 155

gggaattcat ggaatgcagc tgggtctttc tctt 34

15 <210> 156
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

25 <400> 156

actagtcgac atgggatgga gctatatcat cctctt 36

30 <210> 157
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

40 <400> 157

actagtcgac atgggatgga gcttatcatc ttctt 35

45 <210> 158
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..33
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 158

actagtcgac atgtagatgt ggttaaactg ggt 33

60 <210> 159
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 159

ES 2 600 915 T3

cccaagcttc caggggccag gggataaacg gatgg 35

5 <210> 160
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 160
15 cccaagcttc caggggccaa gggatagacg gatgg 35

<210> 161
<211> 35
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 161
30 cccaagcttc cagggaccag gggatagacg ggtgg 35

<210> 162
<211> 35
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 162
45 cccaagcttc cagggaccag gggatagacg gatgg 35

<210> 163
<211> 35
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 163
60 cccaagcttc caggggccag tggataaacg gatgg 35

<210> 164
<211> 33
65 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE

ES 2 600 915 T3

<222> 1..33
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5
<400> 164
cccaagcttc caggggcca tggataacga tgg 33

10
<210> 165
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

20
<400> 165
cccaagcttc caggggccag tggataaacg atgg 34

25
<210> 166
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

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

35
<400> 166
cccaagcttc cagggaccag tggataaacg atgg 34

40
<210> 167
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

45
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..33
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

50
<400> 167
cccaagcttc cagggacca tggataacga tgg 33

55
<210> 168
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

60
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

65
<400> 168
cccaagcttc cagggaccat ggataaacgg gtgg 34

70
<210> 169
<211> 41
<212> DNA

ES 2 600 915 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
5 <222> 1..41
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 169

10 actagtcgac atgggcatca agatgaagtc acatactctg g 41

<210> 170
<211> 40
<212> DNA
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
20 <222> 1..40
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 170

25 actagtcgac atgggcatca agatgagtca catactctgg 40

<210> 171
<211> 38
<212> DNA
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
35 <222> 1..38
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 171

actagtcgac tgggcatcag atgagtcaca tactctgg 38

40 <210> 172
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> FUENTE
50 <222> 1..41
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 172

actagtcgac atgggcatca agatgaagtc acagaccag g 41

<210> 173
55 <211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <221> FUENTE
<222> 1..41
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 173

65 actagtcgac atgggctca agatgaagtc acattctctg g 41

ES 2 600 915 T3

5 <210> 174
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..41
10 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 174
actagtcgac atgggcttca agatgaagtc acatattcag g 41

15 <210> 175
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
25 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 175
actagtcgac atggatggag cttatcatcc tctt 34

30 <210> 176
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
40 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 176
cccaagcttc cagggaccaa gggataaacg gtgg 34

45 <210> 177
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <221> FUENTE
<222> 1..35
55 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 177
cccaagcttc caggggccag tggataaacg ggtgg 35

60 <210> 178
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <221> FUENTE
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

ES 2 600 915 T3

<400> 178
actagtcgac atgaggtact cggctcagtt cctggg 36
5
<210> 179
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
10
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
15
<400> 179
actagtcgac atgaggtccc cggctcagtt cctggg 36
20
<210> 180
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
25
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
30
<400> 180
actagtcgac atgaggacgt cgattcagtt cttggg 36
35
<210> 181
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
40
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
45
<400> 181
gggaattcat ggaatggacc tgggtcatcc tctt 34
50
<210> 182
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
55
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
60
<400> 182
gggaattcat ggaatgcagc tgggttatcc tctt 34
65
<210> 183
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 600 915 T3

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..33
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
5 <400> 183
gggaattcat gaatgatct gggttattct ctt 33
10 <210> 184
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
20 <400> 184
cccaagcttc caggaccag gggataaacg ggtgg 35
25 <210> 185
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..31
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
35 <400> 185
cccaagcttc caggaccaa gggacgggtg g 31
40 <210> 186
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
45 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
<400> 186
50 cccaagcttc caggaccaa tggataaaca gatgg 35
<210> 187
<211> 35
<212> DNA
55 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
60 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
<400> 187
cccaagcttc caggaccaa gggataaacg ggtgg 35
65 <210> 188

ES 2 600 915 T3

<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..32
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

10 <400> 188

gggaattcat ggagacacat tcccaggctt tt 32

15 <210> 189
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

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

25 <400> 189

gggaattcat ggagtcacag tctcaggctt tt 32

30 <210> 190
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

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

40 <400> 190

actagtcgac atgggcttca agatggagtc acatttcag g 41

45 <210> 191
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..41
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

55 <400> 191

actagtcgac atgggcatca agatgaagtc acatattcag g 41

60 <210> 192
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..41
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 192

ES 2 600 915 T3

actagtcgac atgggctca agatgaagtc acattctcag g 41

5 <210> 193
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 193
15 actagtcgac atgggatgga gcttatcatg ttctt 35

<210> 194
<211> 35
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 194
30 actagtcgac atgggatgga gcttatcatg ctctt 35

<210> 195
<211> 34
35 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
40 <221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 195
45 gggaattcat ggaatggacc tgggtttcc tctt 34

<210> 196
<211> 34
50 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 196
60 gggaattcat ggaatggacc tgggtcttc tctt 34

<210> 197
<211> 34
65 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE

ES 2 600 915 T3

<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

5 <400> 197
gggaattcat gaaatggagc tgggttattc tctt 34

10 <210> 198
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

20 <400> 198
cccaagcttc caggggcca tggatagacg atgg 34

25 <210> 199
<211> 35
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..35
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

35 <400> 199
cccaagcttc cagggacca gggatagacg gatgg 35

40 <210> 200
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..34
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

50 <400> 200
cccaagcttc cagggacca gggatagacg atgg 34

55 <210> 201
<211> 36
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

65 <400> 201
actagtcgac atgatgtacc cggctcagtt tctggg 36

<210> 202
<211> 36
<212> DNA

ES 2 600 915 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
5 <222> 1..36
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 202

10 actagtcgac atgaggactt cgattcagtt cttggg 36

<210> 203
<211> 39
<212> DNA
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
20 <222> 1..39
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 203

25 actagtctac atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 39

<210> 204
<211> 39
<212> DNA
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
35 <222> 1..39
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 204

40 actagtcgac atgaagttgt ctgtaggct gttggtgct 39

<210> 205
<211> 26
<212> DNA
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
50 <222> 1..26
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 205

atgggatgga gctratcat sytcct 26

<210> 206
55 <211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <221> FUENTE
<222> 1..23
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 206

65 atgaagwtgt ggbtraactg grt 23

ES 2 600 915 T3

<210> 207
 <211> 25
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..25
 10 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <220>
 <221> variation
 <222> 15
 15 <223> /sustitución="n=i"

 <400> 207

 atggratgga sckknrtctt tmtct 25
 20
 <210> 208
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..26
 30 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <220>
 <221> variation
 <222> 21
 <223> /sustitución="n=i"
 35
 <400> 208

 ccagggrrcca rkggatarac ngrtgg 26
 40
 <210> 209
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..25
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
 50
 <400> 209

 atggagacag acacactcct gctat 25

 <210> 210
 55 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <221> FUENTE
 <222> 1..29
 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

 <400> 210
 65
 atggagwcag acacactsct gytatgggt 29

ES 2 600 915 T3

5 <210> 211
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..29
10 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 211
atgaagttgc ctgtaggct gttggtct 29

15 <210> 212
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..29
25 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 212
atggattwc argtgcagat twtcagctt 29

30 <210> 213
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..27
40 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 213
atggyctya tvtcctgct gttctgg 27

45 <210> 214
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <221> FUENTE
<222> 1..27
55 <223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 214
atggyctya tvtrctgct gctatgg 27

60 <210> 215
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <221> FUENTE
<222> 1..21
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"

ES 2 600 915 T3

<400> 215
actggatggt gggaagatgg a 21
5
<210> 216
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
10
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..26
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
15
<400> 216
atgaaatgca gctgrtyat sttctt 26
20
<210> 217
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
25
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..26
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
30
<400> 217
atggrcagrc ttacwtytc attcct 26
35
<210> 218
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
40
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..26
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
45
<400> 218
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26
50
<210> 219
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
55
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..24
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
60
<400> 219
atgragwcac akwycaggt cttt 24
65
<210> 220
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

ES 2 600 915 T3

<220>
<221> FUENTE
<222> 1..32
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
5
<220>
<221> variation
<222> 27
<223> /sustitución="n=i"
10
<400> 220

atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwtc tt 32
15
<210> 221
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
20
<220>
<221> FUENTE
<222> 1..31
<223> /tipo_mol="DNA" /nota="Descripción de la secuencia artificial: cebador" /organismo="Secuencia Artificial"
25
<400> 221

atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g 31

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento funcional del mismo, que reconoce y se une específicamente a un fosfoepítipo en la proteína Tau de mamífero o a un fosfoepítipo en un fragmento de la proteína Tau de mamífero, en donde dicho fosfoepítipo tiene o está comprendida en la secuencia de aminoácidos VYKSPVSGDTSPRHL (SEQ ID NO: 62) (Tau aa 393-408 de la SEQ ID NO: 67) que comprende un Ser fosforilado en la posición 396 (pS396) y en la posición 404 (pS404), en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene una afinidad de unión a la proteína Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble con una constante de disociación en un intervalo de entre 2 nM y 80 nM, y una constante de velocidad de asociación en un intervalo de entre $1,6 \times 10^2$ y 5×10^5 y puede detectar y/o modular los niveles de Tau fosforilada soluble, oligomérica e insoluble *in vivo* y en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende:
- una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 106, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 107, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 108, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 89, una CDR2 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 115, y una CDR3 con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 91.
2. El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene una constante de disociación inferior a 10 nM.
3. El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
4. El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es del isotipo IgG2b, IgG2a o IgG3.
5. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento funcional del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una combinación de las mismas, en una cantidad terapéuticamente eficaz junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
7. El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, un polinucleótido o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una combinación de las mismas, para su uso en terapia, particularmente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, tal como una Tauopatía en un mamífero, particularmente un humano que necesita dicho tratamiento.
8. El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, polinucleótido, o composición farmacéutica, o una combinación de los mismos, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para el tratamiento o alivio de déficits cognitivos en un mamífero, particularmente un humano que padece dicho déficit, y opcionalmente: (i) donde el tratamiento o alivio de los déficits cognitivos en un mamífero, particularmente un humano, conlleva la interrupción del avance de los déficits cognitivos, o (ii) donde el tratamiento o alivio de los déficits cognitivos en un mamífero, particularmente un humano, conlleva un aumento de la retención, particularmente una restitución completa de la capacidad de memoria cognitiva en el sujeto tratado.
9. El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, polinucleótido, o composición farmacéutica, o una combinación de los mismos, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 para el tratamiento de enfermedades y trastornos provocados por o asociados con la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en la Tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran la presencia tanto de patologías Tau como amiloide que incluyen, pero no se limitan 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 de proteínas priónicas, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no muestran una patología amiloide característica que incluyen, pero no se limitan a, esclerosis lateral amiotrófica/complejo parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad neuronal motora no de Guam con ovillos neurofibrilares, demencia argirofílica granulosa, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, demencia frontotemporal, enfermedad de Hallervorden-Spatz, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración Pallido-ponto-nigral, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, demencia de ovillos neurofibrilares predominantes, parkinsonismo posencefálico y distrofia miotónica.
10. Un método *in vitro* para el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau o una predisposición a enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína Tau en una muestra, que comprende las etapas de:

- a. hacer que la muestra que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con el anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína Tau;
- b. permitir que el anticuerpo se una al antígeno Tau para formar un complejo inmunológico;
- 5 c. detectar la formación del complejo inmunológico; y
- d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia del antígeno Tau en la muestra,
- donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau.
- 10 **11.** El método de la reivindicación 10, en donde los multímeros fosfoTau (pTau) se detectan en una muestra post-mortem de un sujeto que se sospecha que padece una enfermedad o trastorno asociado con Tau.
- 12.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en donde la muestra es una muestra de fluido cerebroespinal o una muestra de cerebro.
- 15 **13.** El anticuerpo o un fragmento funcional del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una combinación de las mismas, para su uso en un método *in vivo* para el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau o una predisposición a una enfermedad, trastorno o afección asociados con la proteína Tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno-específica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un epítipo de la proteína Tau en una parte o área corporal específica que comprende las etapas de:
- 20 a. hacer que la parte o área corporal que se sospecha que contiene el antígeno Tau entre en contacto con el anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de la proteína Tau;
- b. permitir que el anticuerpo se una al antígeno 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 del antígeno Tau en la parte o área corporal específica,
- en donde un aumento en la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o afección asociada con la proteína Tau.
- 30 **14.** Los kits de prueba para la detección y el diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociados con la proteína Tau que comprenden el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15.** Una línea celular que produce el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 16.** La línea celular de la reivindicación 15, que es la línea celular de hibridoma A6-2G5-30 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3137; línea celular de hibridoma A6-2G5-41 depositada el 30 de agosto de 2011 como DSM ACC3138.

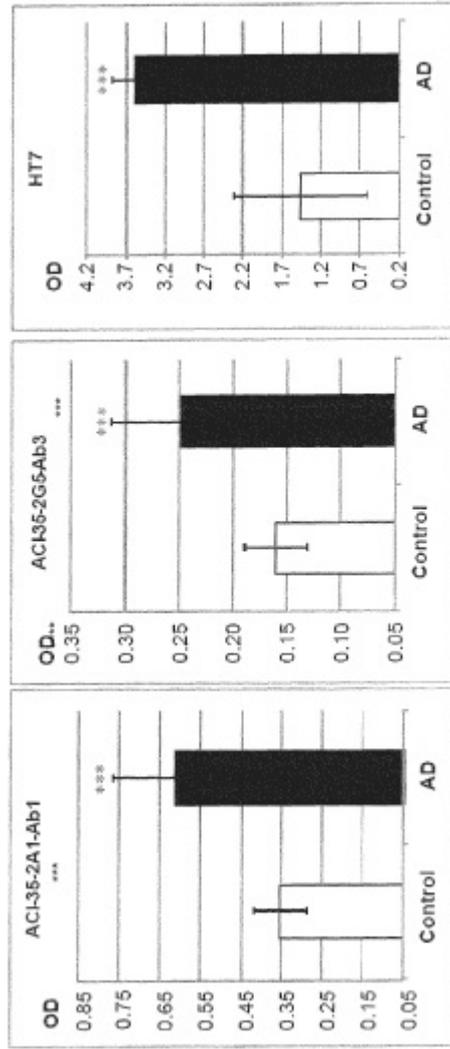


Figure 1.

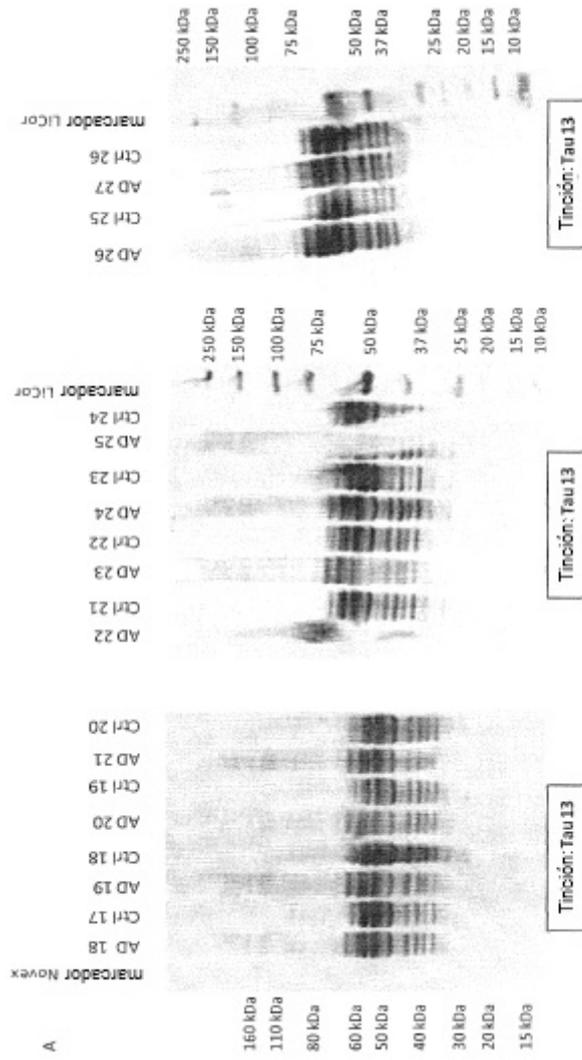


Figure 2A

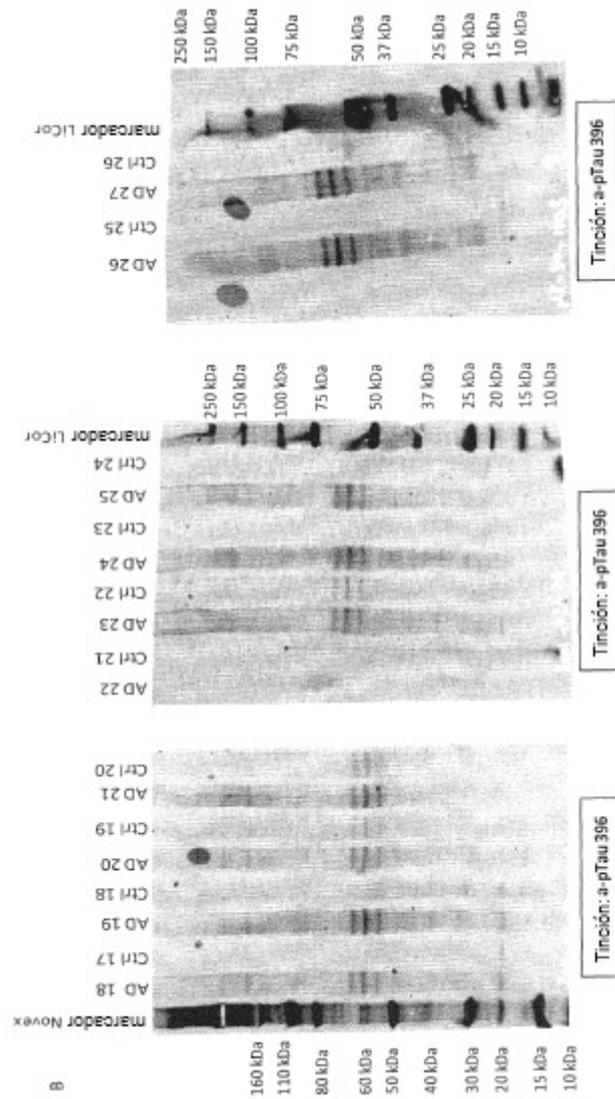


Figura 2B

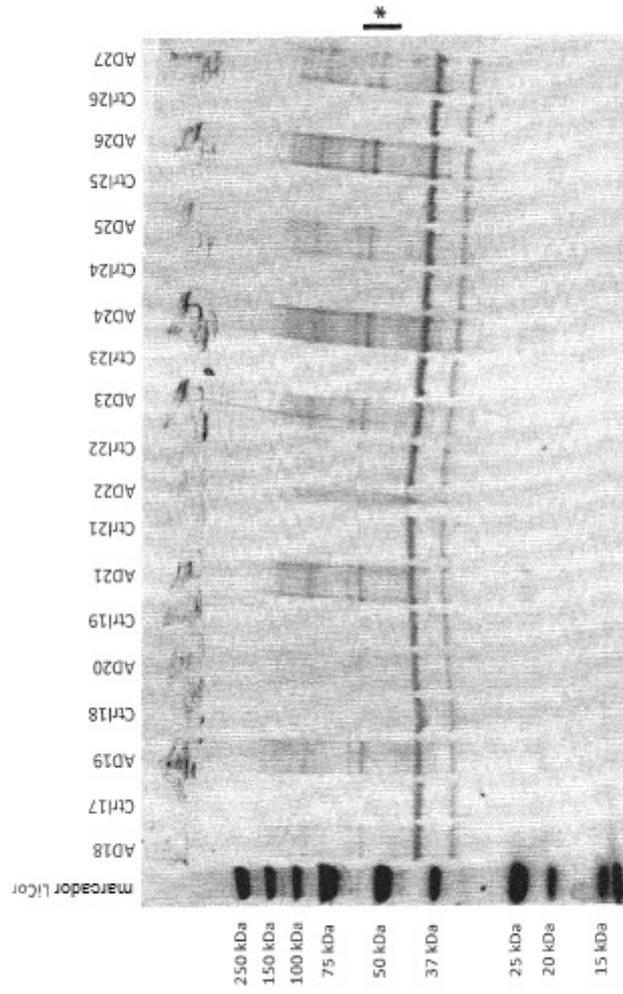


Figure 3A

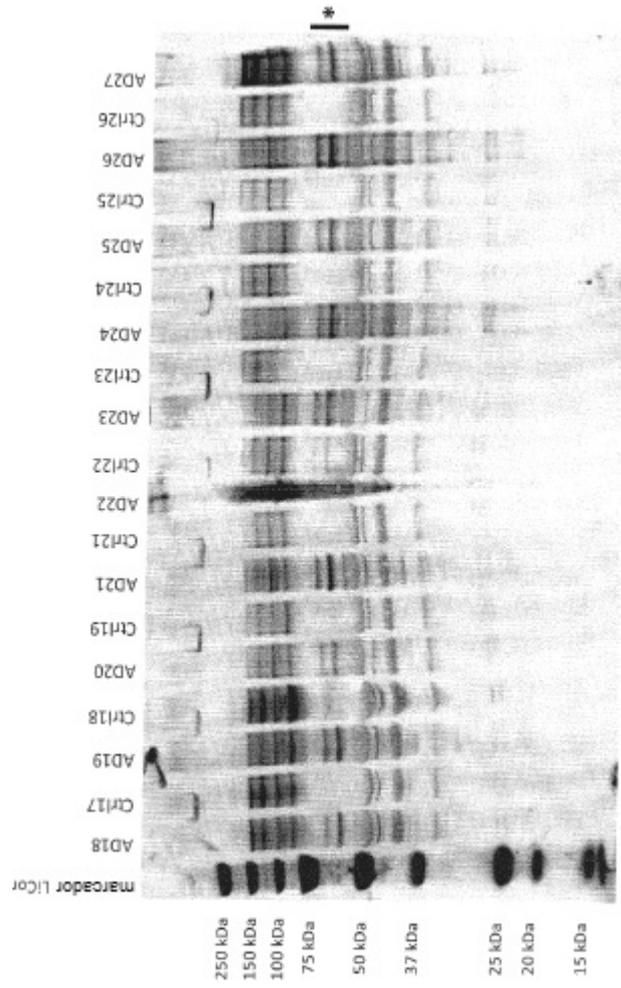


Figure 3B

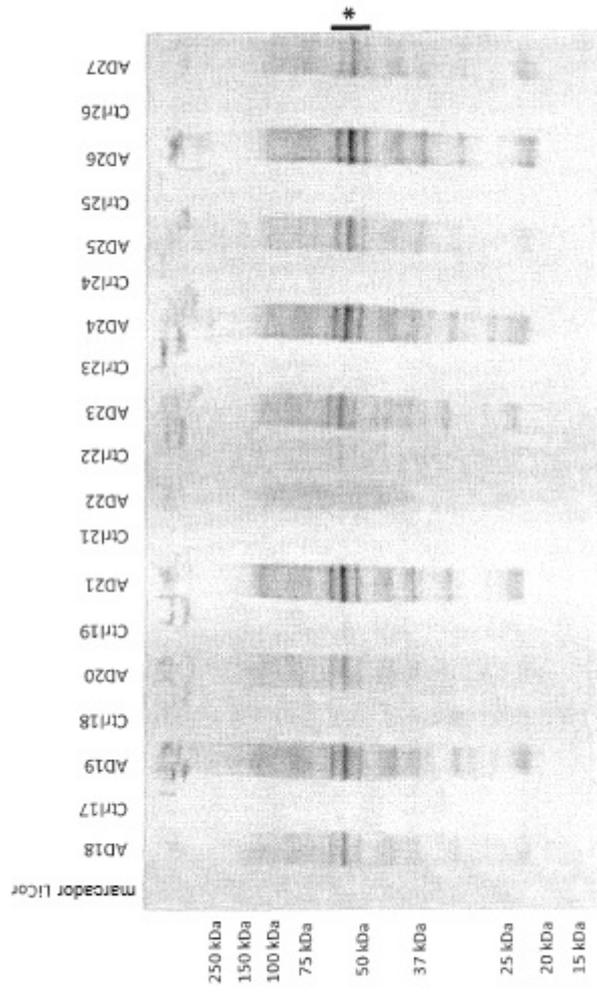


Figura 3C

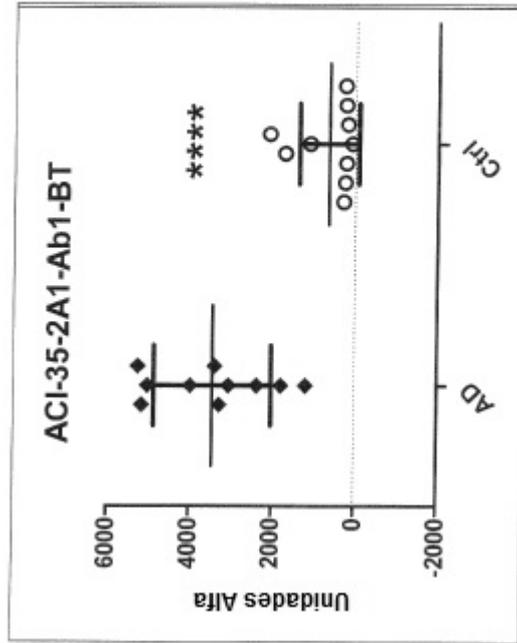


Figura 4A

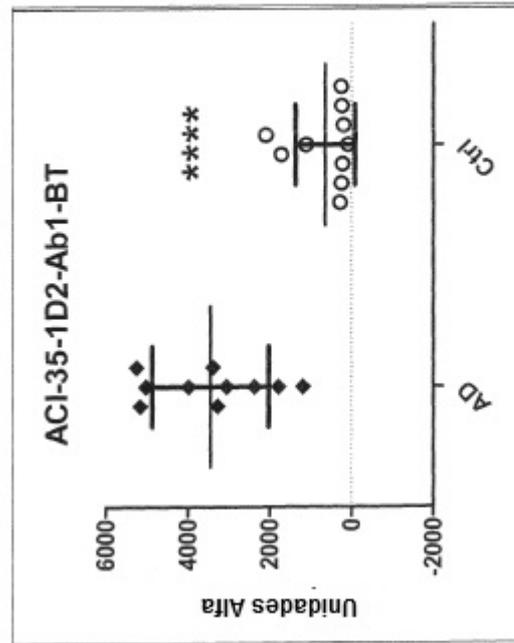


Figura 4B

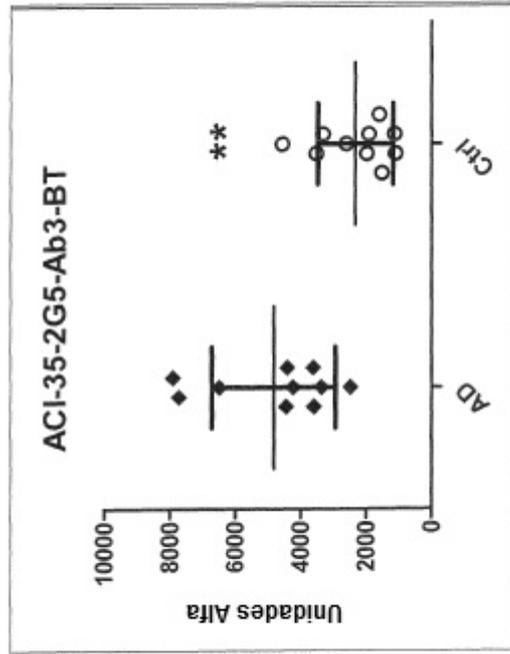


Figura 4C

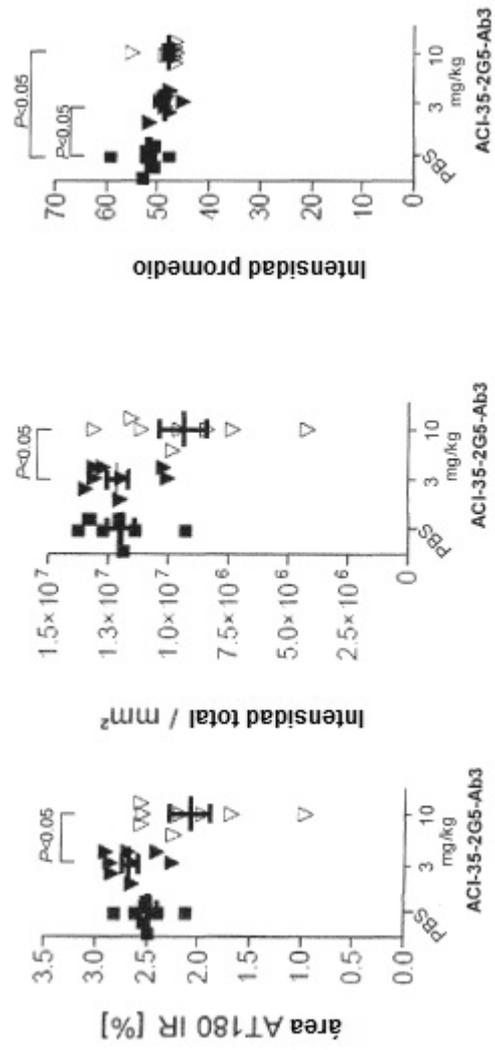


Figura 5A

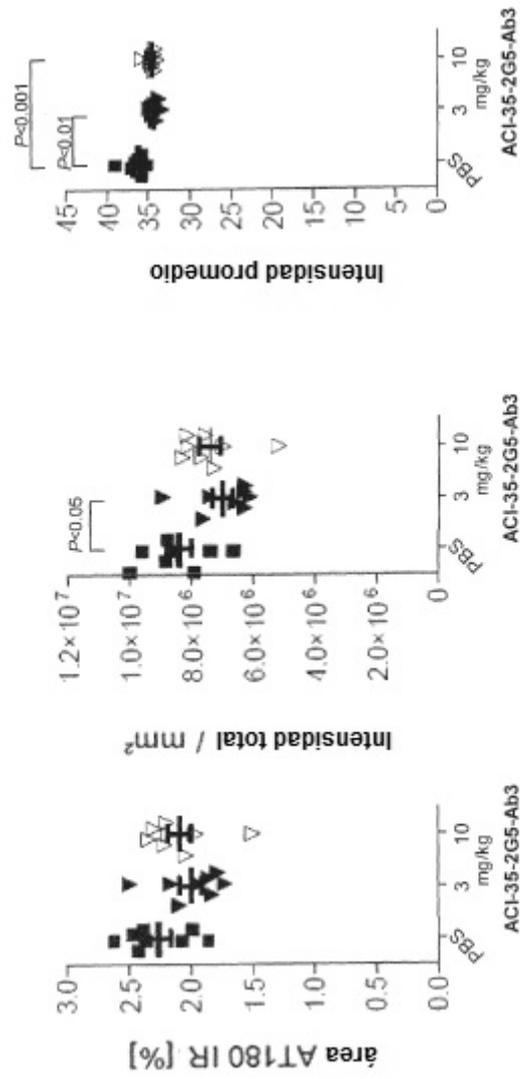


Figura 5B

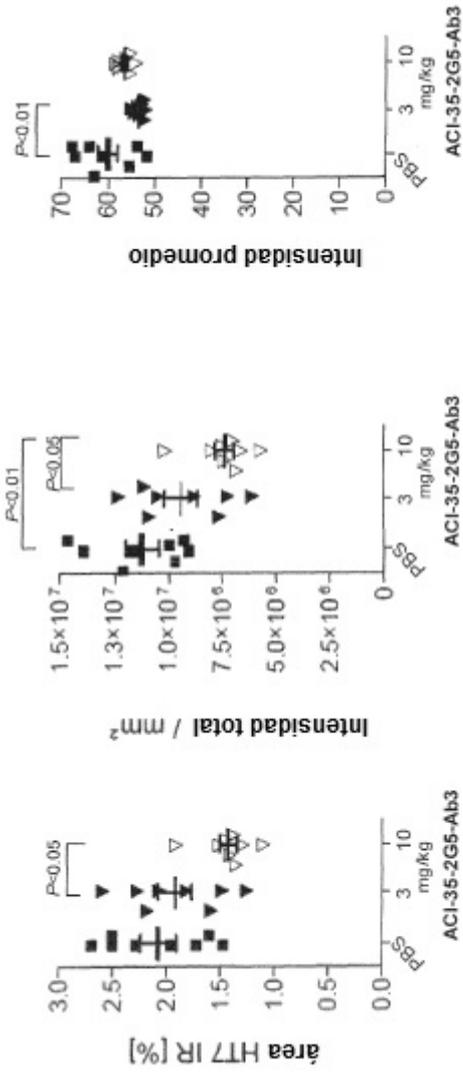


Figura 6A

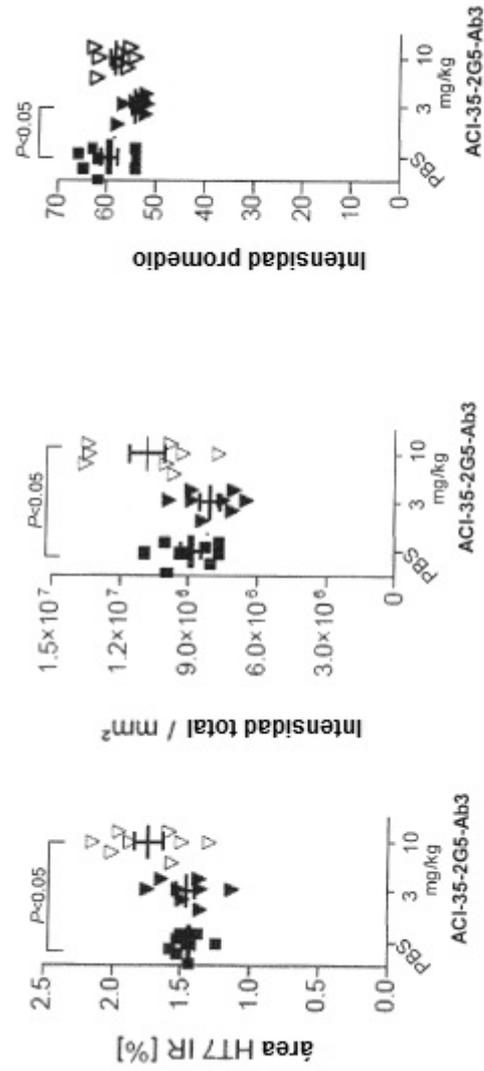


Figura 6B

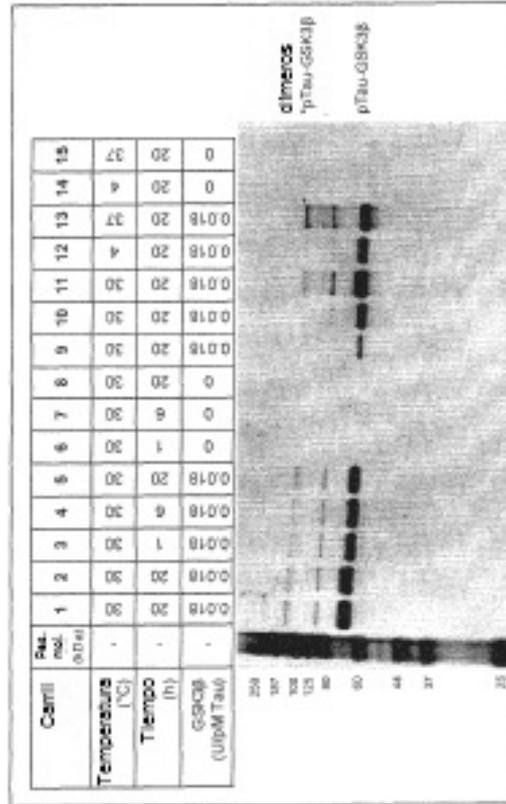


Figura 7



FIGURA 8

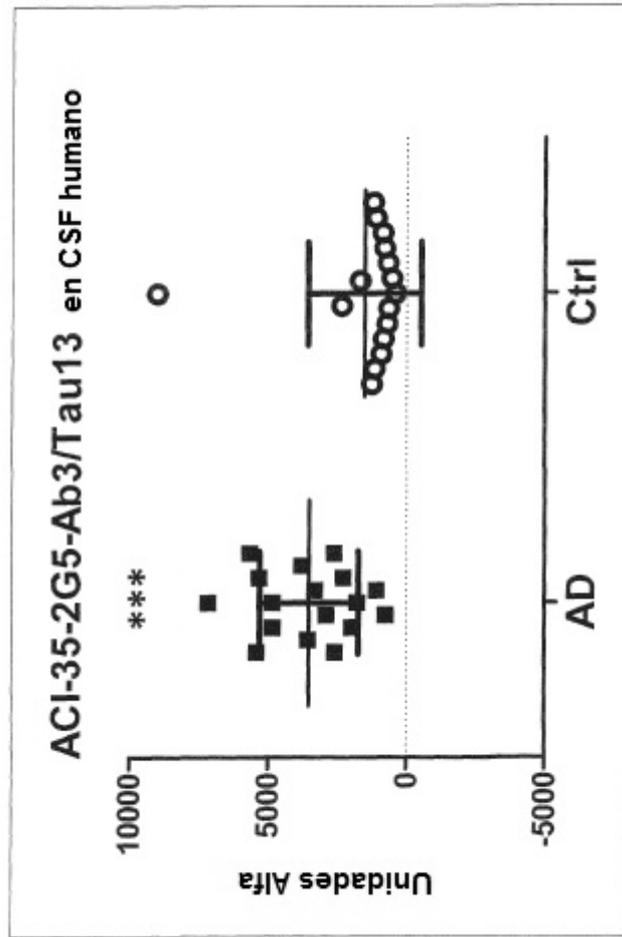


FIGURA 9

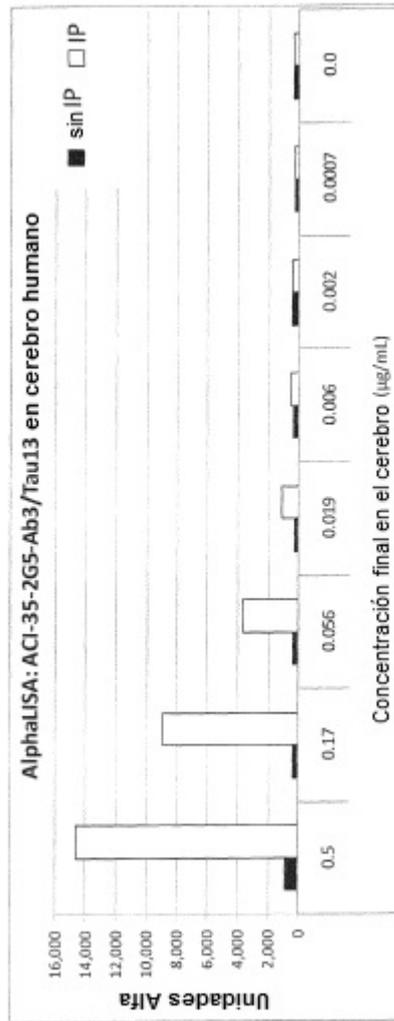


FIGURA 10