



No. 11-147439- -00000-0000

Fecha: 2011-10-31 17:19:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 147



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO: **“USO DE UN ANTICUERPO ANTI-TAU PS422 PARA
EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBRALES”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/28**

71. SOLICITANTE: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**

DOMICILIO: **BASILEA, SUIZA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

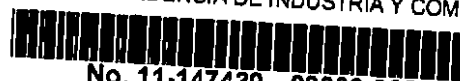
22. BOGOTÁ, D.C. **21 OCT 2011**

(FORMA P 10).

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-147439- -00000-0000

Fecha: 2011-10-31 17:19:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evs: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 147

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

Dirección: Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basilea, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BOHRMANN, Bernd; GOEPFERT, Ulrich; GRUENINGER, Fiona; HUBEER, Walter; KARELL, Hans-Willi; LIFKE, Valeria; MUNDIGL, Olaf; OFFNER, Sonja; OZMEN, Laurence y SCHRAEML, Michael.

Dirección: Mohrhaldenstrasse 166b, CH-4125 Riehen; Waxensteinstrasse 30, D-82377, Penzberg; Bodenweg 49, CH-4144 Arlesheim; Ziegelhofweg 62, CH-4303 Kaiseraugst.; Zugspitzstrasse 14a, D-82377 Penzberg; An der Freiheit 26, D-82377 Penzberg; Tassiloring 16, D-82362 Weilheim; Waxensteinstrasse 27, D-82377 Penzberg; 2d rue des champs, F-68300 Saint Louis y Hochfeldstrasse 46, D-82377 Penzberg.

Nacionalidad o Domicilio: Suiza, Alemania y Francia.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/003437

Fecha: 08/06/10

Publicación Internacional No. WO 2010/142423 A3

Fecha: 16/12/10

⑥

Título (54)

"USO DE UN ANTICUERPO ANTI-TAU PS422 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBRALES"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/18

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP
EP

10/06/09
30/06/09

09007656-3
09008487.2

⑨

Comprobante de Pago No. 11-101797

Fecha: 18 de Octubre de 2011

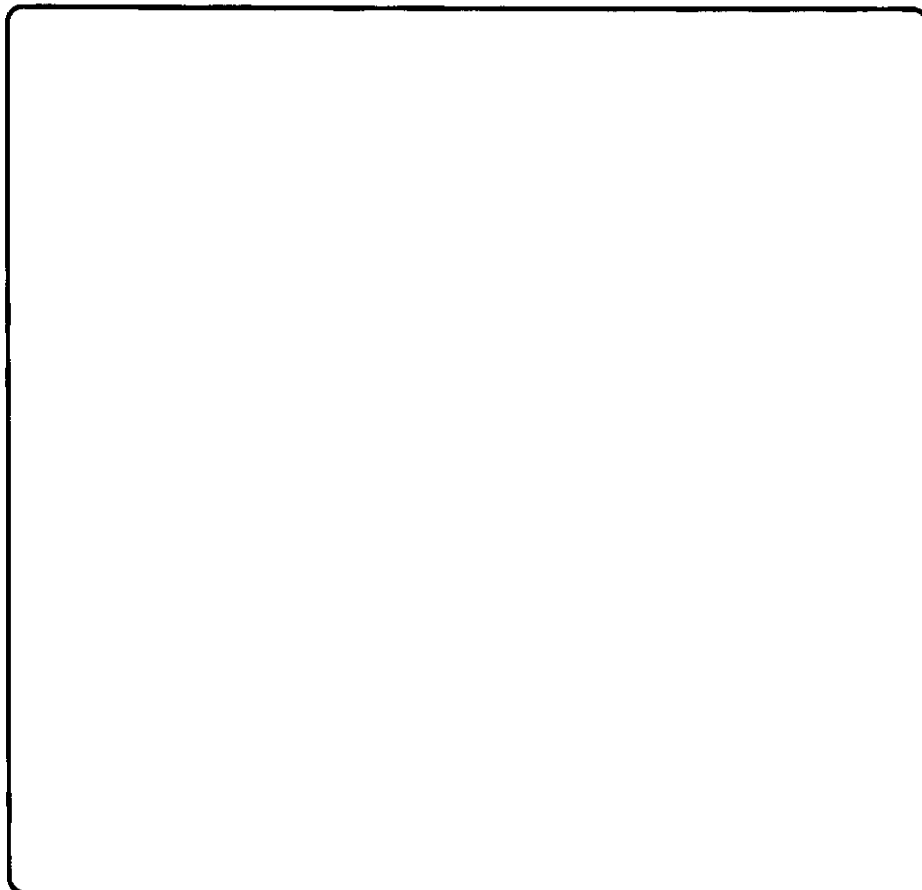
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación, Opinión Escrita y Listado de Secuencias

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 101797
		Bogotá D.C., Octubre 18 de 2011 - 16:46:27

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.	NI 830.022.145
-----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414999583	18/10/2011	38.215.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00 571.000.00
			\$571.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****_
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-147439- -00000-0000
Fecha: 2011-10-31 17:19:22 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 147

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Uricoechea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258651

2004 SET - 3 P 12:12

Mano Uncocheza

UCS

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Esta copia concuerda con el original
que tuve a la vista

31 OCT. 2011

ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)

Los abajo firmados, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

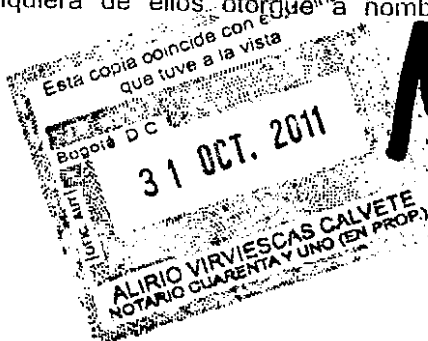
con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 17th day of August 2008.
F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Holder of procuration

Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strehle a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es el titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 JUNIO 1997 y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland

Basel

{ss

On this 17th day of August 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Strehle came both Swiss citizens and Swiss resident to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basilea, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

D. P. Kuster
Notary

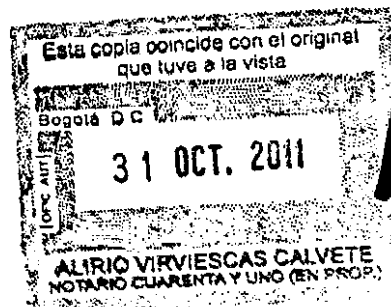
17.08.2004

2 Fr.

Dr. PETER KUSTER

Allg. Prot. - No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by P. Kuch

3. in his/her function as Att. Noter

4. and certified by the seal of the Gemeinde

Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

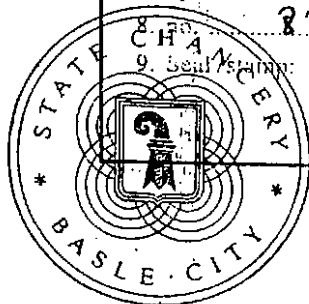
6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. 8835 / 10 326

9. Seal/Stamp:

10. Signature: [Signature]



Esta copia coincide con el original
que tuve a la vista

31 OCT. 2011

ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (EN PROP.)



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/18	
(22) Fecha de solicitud: 31-10-11		(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	09007656.3	10-06-09	EP
	09008487.2	30-06-09	EP
		(72) Inventor(es): BOHRMANN, Bernd; GOEPFERT, Ulrich; GRUENINGER, Fiona; HUBEER, Walter; KARELL, Hans-Willi; LIFKE, Valeria; MUNDIGL, Olaf; OFFNER, Sonja; OZMEN, Laurence y SCHRAEML, Michael.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 10-01-12		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 16-12-10
	Fecha de presentación de la solicitud: 08-06-10		No. publicación: WO 2010/142423 A3
	No. de solicitud: PCT/EP2010/003437		
(54) Título: "USO DE UN ANTICUERPO ANTI-TAU PS422 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBRALES"			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Un anticuerpo, que se une a la tau fosforilada en la serina 422 (pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la tau pS422, pero no se une a la tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, es útil para el tratamiento de una tauopatía.

Sector: Industria farmacéutica, en particular inmunoglobulinas como son anticuerpos monoclonales contra material de humanos, y preparaciones farmacéuticas que los contienen las cuales son útiles en el tratamiento de enfermedades neurológicas relacionadas con la proteína asociada al microtúbulo tau humana.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ X ____ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 31-10-11	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18			
(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.			
(72) Inventor(es): BOHRMANN, Bernd; GOEPFERT, Ulrich; GRUENINGER, Fiona; HUBEER, Walter; KARELL, Hans-Willi; LIFKE, Valeria; MUNDIGL, Olaf; OFFNER, Sonja; OZMEN, Laurence y SCHRAEML, Michael.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
	09007656.3	10-06-09	EP
	09008487.2	30-06-09	EP
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 10-01-12		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 16-12-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 08-06-10		No. publicación: WO 2010/142423 A3	
No. de solicitud: PCT/EP2010/003437			
(54) Título: "USO DE UN ANTICUERPO ANTI-TAU PS422 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBRALES"			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 31-10-11		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/18			
(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.			
(72) Inventor(es): BOHRMANN, Bernd; GOEPFERT, Ulrich; GRUENINGER, Fiona; HUBEER, Walter; KARELL, Hans-Willi; LIFKE, Valeria; MUNDIGL, Olaf; OFFNER, Sonja; OZMEN, Laurence y SCHRAEML, Michael.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País			
09007656.3 10-06-09 EP			
09008487.2 30-06-09 EP			
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 10-01-12		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 16-12-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 08-06-10		No. Publicación : WO 2010/142423 A3	
No. de solicitud: PCT/EP2010/003437			
(54) Título: "USO DE UN ANTICUERPO ANTI-TAU PS422 PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBRALES"			
(57) Resumen - Reivindicación(es):			
Resumen.-			
Un anticuerpo, que se une a la tau fosforilada en la serina 422 (pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la tau pS422, pero no se une a la tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, es útil para el tratamiento de una tauopatía.			
Sector: Industria farmacéutica, en particular Inmunoglobulinas como son anticuerpos monoclonales contra material de humanos, y preparaciones farmacéuticas que los contienen las cuales son útiles en el tratamiento de enfermedades neurológicas relacionadas con la proteína asociada al microtúbulo tau humana.			

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 26157 WO-SR	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/003437	International filing date (day/month/year) 08/06/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/06/2009
Applicant F. Hoffmann-La Roche AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☐

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒

With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☒

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the title,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2010/003437

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. (means)

☒

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☒

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/003437

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 23

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/003437

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98/22120 A1 (WISTAR INST [US]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; OTVOS LASZLO [US]; HOFFMANN) 28 May 1998 (1998-05-28) cited in the application claims 1-3 claim 20 claims 26,28 ----- -/--	1-23
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 November 2010		Date of mailing of the international search report 05/04/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schwachtgen, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/003437

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONG CHENG-XIN ET AL: "Dysregulation of protein phosphorylation/dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target." JOURNAL OF BIOMEDICINE & BIOTECHNOLOGY, vol. 2006, no. 3, 31825, 2006, pages 1-11, XP002608929 ISSN: 1110-7243 page 3, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 page 6, column 1, paragraph 2 -----	1-23
Y	EP 1 876 185 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 9 January 2008 (2008-01-09) cited in the application claims 1-5 -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/003437

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9822120	A1	28-05-1998 AU 5508798 A	10-06-1998
EP 1876185	A1	09-01-2008 NONE	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4, 23

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized in specifically binding to phosphorylated Tau fragment of SEQ ID NO:9 and to Tau pS422, but not binding to Tau and to phosphorylated MCAK fragment of SEQ ID NO:17, for use in the treatment of a Tauopathy.

2. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:6, CDR2H of SEQ ID NO:7, and CDR3H of SEQ ID NO:8; subject-matter related thereto

3. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:23, CDR2H of SEQ ID NO:24, and CDR3H of SEQ ID NO:25; subject-matter related thereto

4. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:31, CDR2H of SEQ ID NO:32, and CDR3H of SEQ ID NO:33; subject-matter related thereto

5. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:39, CDR2H of SEQ ID NO:40, and CDR3H of SEQ ID NO:41; subject-matter related thereto

6. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:47, CDR2H of SEQ ID NO:48, and CDR3H of SEQ ID NO:49; subject-matter related thereto

7. claims: 5-22(partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:55, CDR2H of SEQ ID NO:56, and CDR3H of SEQ ID NO:57; subject-matter related thereto

8. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:63, CDR2H of SEQ ID NO:64, and CDR3H of SEQ ID NO:65; subject-matter related thereto

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 December 2010 (16.12.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/142423 A3

PCT

(51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/003437

(22) International Filing Date:
8 June 2010 (08.06.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09007656.3 10 June 2009 (10.06.2009) EP
09008487.2 30 June 2009 (30.06.2009) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacher Strasse 124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BOHRMANN, Bernd [DE/CH]; Mohrhaldenstrasse 166B, CH-4125 Riehen (CH). GOEPFERT, Ulrich [DE/DE]; Waxensteinstrasse 30, 82377 Penzberg (DE). GRUENINGER, Fiona [CH/CH]; Bodenweg 49, CH-4144 Arlesheim (CH). HUBER, Walter [CH/CH]; Ziegelhofweg 62, CH-4303 Kaiseraugst (CH). KRELL, Hans-Willi [AT/DE]; Zugspitzstrasse 14a, 82377 Penzber (DE). LIFKE, Valeria [DE/DE]; An der Freiheit 26, 82377 Penzberg (DE). MUNDIGL, Olaf [DE/DE]; Tassiloring 16, 82362 Weilheim (DE). OFFNER, Sonja [DE/DE]; Waxensteinstrasse 27, 82377 Penzberg (DE). OZMEN, Laurence [FR/FR]; 2D, rue des champs, F-68300 Saint Louis (FR). SCHRAEML, Michael [DE/DE]; Hochfeldstrasse 46, 82377 Penzberg (DE).

(74) Agent: BURGER, Alexander; Roche Diagnostics GmbH, Patentabteilung (TR-E), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the International search report:
26 May 2011

(54) Title: USE OF AN ANTI-TAU PS422 ANTIBODY FOR THE TREATMENT OF BRAIN DISEASES

(57) Abstract: An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (pS422), characterized in specifically binding to phosphorylated Tau fragment of SEQ ID NO: 9 and to Tau pS422, but not binding to Tau and to phosphorylated MCAK fragment of SEQ ID NO: 17 is useful in the treatment of a Tauopathy.

WO 2010/142423 A3

ASK

PATENT COOPERATION TREATY

WV

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:	
see form PCT/ISA/220	
Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg	
ASK	05. April 2011
WN	
BK	
WJ	
BUR	
FE	
HIL	
MI	
GH	
TH	
UE	

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No. PCT/EP2010/003437	International filing date (day/month/year) 08.06.2010	Priority date (day/month/year) 10.06.2009
--	--	--

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/18Applicant
F. Hoffmann-La Roche AG

Termin

05.07.2011

(25.05.11)

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Schwachtgen, J Telephone No. +49 89 2399-8933 
--	--	---

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2010/003437

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 5-22

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 5-22

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-4, 23

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-4, 23</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-4, 23</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-4, 23</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item IV

Lack of unity of invention

The present application does not meet the requirements for unity of invention (Rule 13.1, 13.2 and 13.3 PCT). the different groups are as follows:

1. claims: 1-4, 23
An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized in specifically binding to phosphorylated Tau fragment of SEQ ID NO:9 and to Tau pS422, but not binding to Tau and to phosphorylated MCAK fragment of SEQ ID NO:17, for use in the treatment of a Tauopathy.
- 1.1. claims: 5-22(partially)
An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:6, CDR2H of SEQ ID NO:7, and CDR3H of SEQ ID NO:8; subject-matter related thereto
2. claims: 5-22(partially)
An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:23, CDR2H of SEQ ID NO:24, and CDR3H of SEQ ID NO:25; subject-matter related thereto
3. claims: 5-22(partially)
An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:31, CDR2H of SEQ ID NO:32, and CDR3H of SEQ ID NO:33; subject-matter related thereto
4. claims: 5-22(partially)
An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:39, CDR2H of SEQ ID NO:40, and CDR3H of SEQ ID NO:41; subject-matter related thereto
5. claims: 5-22(partially)
An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:47, CDR2H of SEQ ID NO:48, and CDR3H of SEQ ID NO:49; subject-matter related thereto
6. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:55, CDR2H of SEQ ID NO:56, and CDR3H of SEQ ID NO:57; subject-matter related thereto

7. claims: 5-22(partially)

An antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422), characterized by comprising CDR1H of SEQ ID NO:63, CDR2H of SEQ ID NO:64, and CDR3H of SEQ ID NO:65; subject-matter related thereto

Rule 13 PCT states that for unity of invention to be present all subject-matter should be linked by a single general concept. Rule 13 PCT also stipulates that this single general concept must be novel and inventive.

In the present case the only linking concept that can be identified is that all groups address a problem which can be formulated as the provision of an antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (Tau pS422).

This common problem (concept), i.e. the effect to be achieved, was, however, already known from, D3 (EP 1 876 185 A1) which discloses an antibody binding to Tau, phosphorylated at serine 422 (see claims 1-4).

The common linking concept is therefore neither novel nor inventive and cannot provide unity of invention for the present Groups of invention.

No further special technical features, linking the different groups in the sense of Rule 13 PCT could be found in the present application.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents:

D1 WO 98/22120 A1 (WISTAR INST [US]; UNIV PENNSYLVANIA [US]; OTVOS LASZLO [US]; HOFFMANN) 28 May 1998 (1998-05-28) cited in the application

- D2 GONG CHENG-XIN ET AL: "Dysregulation of protein phosphorylation/ dephosphorylation in Alzheimer's disease: a therapeutic target." JOURNAL OF BIOMEDICINE & BIOTECHNOLOGY 2006 LNKD-PUBMED:17047304, vol. 2006, no. 3, 2006 , page 31825, ISSN: 1110-7243
- D3 EP 1 876 185 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 9 January 2008 (2008-01-09) cited in the application

- 2 The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-4 and 23 (completely), 5-22 (partially, insofar as they relate to groups of inventions 1 and 1.1) does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1, and discloses an antibody, which is specific for a synthetic phosphorylated peptide derived from the Tau protein and a method of treating a patient with Alzheimer's disease (AD) comprising the step of administering to the patient said antibody (see claims).

The subject-matter of claim 1 differs from the disclosure in D1 in that a different antibody binding to a different phosphorylated Tau fragment of SEQ ID NO:9 comprising Tau phosphorylated at serine 422 (pS422) is claimed.

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of further antibodies for the treatment of AD (a Tauopathy).

The solution proposed in claim of the present application cannot be considered to involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

The skilled person trying to solve the above objective technical problem would know from D1 that it is possible to treat AD with antibodies raised against multiple Tau fragments that are abnormally phosphorylated in AD patients compared to non AD patients (see page 4, lines 14-16). According to D1, Tau protein fragments are between about 4 and about 20 amino acids in length and desirable fragments include amino acid residue 207 to 222, 224 to 240, or 390 to 408 of Tau. However, D1 teaches that the invention is not limited to these fragments and that one of skill in the art can readily select other appropriate fragments given the guidance provided and the knowledge in the art (see page 9, lines 14-16). Indeed, the skilled person would learn from D2 that Ser422 is a critical phosphorylation site that converts Tau to a toxic

molecule in Tauopathy. D2 further discloses that mutation of Ser422 to Ala prevents Tau aggregation (page 3, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1; page 6, column 1, paragraph 2). The skilled person would, thus, regard the development of an antibody specifically binding to a phosphorylated Tau fragment comprising pS422 for use in the treatment of Tauopathy as an obvious avenue to pursue with reasonable expectation of success, thereby arriving at the subject-matter of present claims 1-4 and 21,22. The fact that the antibody according to claim 1-4 has been raised against a specific Tau fragment of SEQ ID NO:9 comprising pS422 does not render said subject-matter inventive in the absence of any unexpected effects or properties, especially as specific monoclonal antibodies raised against said fragment comprising pS422 were already known in the art (see D3). The same reasoning applies to the subject-matter of claims 5-22 that relate to an antibody binding to Tau pS422 having specific CDR or variable chain sequences.

**Uso de un anticuerpo anti-tau pS422 para el tratamiento de
enfermedades cerebrales**

Resumen-Objeto y Finalidad de la Invención

5

Un anticuerpo, que se une a la tau fosforilada en la serina 422 (pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la tau pS422, pero no se une a la tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, es útil para el tratamiento de una tauopatía.

SECTOR: Industria farmacéutica, en particular inmunoglobulinas como son anticuerpos monoclonales contra material de humanos, y preparaciones farmacéuticas que los contienen las cuales son útiles en el tratamiento de enfermedades neurológicas relacionadas con la proteína asociada al microtúbulo tau humana.

**Uso de un anticuerpo anti-tau pS422 para el tratamiento de
enfermedades cerebrales**

5 La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo, que
se une específicamente al fragmento tau fosforilado de la SEQ
ID NO: 9 (pS422), para el tratamiento de enfermedades cere-
brales.

Antecedentes de la invención

10 La tau humana (proteína tau asociada a microtúbulos
(proteína ovillo neurofibrilar, filamento tau helicoidal pa-
reado, = PHF-tau) es una proteína asociada a microtúbulos
neuronales que se encuentra de forma predominante en los axo-
nes y sirve para promover la polimerización de la tubulina y
15 estabilizar los microtúbulos. Se han encontrado en el cerebro
humano seis isoformas (isoformas A, B, C, D, E, F, G, tau
fetal), la isoforma más larga contiene 441 aminoácidos (iso-
forma F, Uniprot P10636-8). La tau y sus propiedades se han
descrito en Reynolds, C.H. y col., J. Neurochem. 69, 191-198,
20 1997.

La tau, en su forma hiperfosforilada, es el principal
componente de los filamentos helicoidales pareados (PHF), el
bloque de construcción de las lesiones neurofibrilares del
cerebro en la enfermedad de Alzheimer (AD). La tau puede es-
25 tar fosforilada en sus restos serina o treonina por diversas
quinasas diferentes, incluidas la GSK3beta, cdk5, MARK y los
miembros del grupo de quinasas MAP.

Las tauopatías se caracterizan por una hiperfosforilación anormal de la tau y según Iqbal, K. y col. (Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1739, 198-210, 2005) se dividen en:

- enfermedad de Alzheimer, incluida la forma de enfermedad de solo ovillos
- síndrome de Down, casos de adultos
- complejo de parkinsonismo-demencia de Guam
- demencia pugilística
- enfermedad de Pick
- 10 • demencia con gránulos argirófilos
- demencia fronto-temporal
- degeneración córtico-basal
- degeneración pálido-ponto-nigral
- parálisis supranuclear progresiva
- 15 • enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker con ovillos.

Se han encontrado, pues, unos 40 sitios de fosforilación de serina (S)/treonina (T) en la tau de cerebros que han padecido la enfermedad de Alzheimer (Hanger, D.P. y col., J. Biol. Chem. 282, 23645-23654, 2007). El desarrollo de la patología tau en la enfermedad de Alzheimer se ha relacionado con su estado de fosforilación. Sin embargo, la mayor parte de los 40 sitios de fosforilación no están asociados con la patología de la enfermedad, ya que también se han encontrado en la tau extraída de tejidos cerebrales fetales sanos. Solo

25 unas pocas fosforilaciones son exclusivas del estado de la enfermedad y presumiblemente se debe a ellas la insolubilidad anormal característica y la aglomeración que definen a la tau en los PHF de cerebros que han sufrido la enfermedad de Alz-

heimer (Morishima-Kawashima, M. y col., J. Biol. Chem. 270, 823-829, 1995). Según Pei, J.J. y col., Journal of Alzheimer's Disease 14, 385-392, 2008, la bibliografía técnica existente proporciona una información limitada y poco clara
5 acerca de cuáles de estos sitios son específicos de los cerebros que han sufrido la AD. Pei emplea una lista de anticuerpos fosfo-específicos de la tau y mide sus niveles en materiales homogeneizados de la corteza temporal media de 22 personas que han sufrido la AD y de 10 personas de control.

10 Bussiere, T. y col. (Acta Neuropathol. 97, 221-230, 1999) describen que la serina 422 fosforilada de las proteínas tau es un epítotope patológico que se encuentra en diversas enfermedades con degeneración neurofibrilar. Augustinack, J.C. y col. (Acta Neuropathol. 103, 26-35, 2002) describen el
15 pS422 diciendo que guarda relación con la severidad de patología neuronal de la enfermedad de Alzheimer. Guillozet-Bongaarts, A. (J. Neurochem. 97, 1005-1014, 2006) describe la fosforilación de la tau en S422 como parte del proceso de maduración de los PHF. Se ha encontrado también la tau pS422
20 en asociación con el desarrollo de patologías de enfermedad de Alzheimer en varios modelos de ratones transgénicos. Por ejemplo, Deters, N. y col. mencionan en Biochem. Biophys. Res. Commun. 379, 400-405, 2009, que los ratones Dom5/pR5 doblemente transgénicos presentan cifras 7 veces superiores
25 de neuronas en el hipocampo que contienen la tau fosforilada específicamente en el epítotope patológico S422. Goetz, J. y col. (Science 293, 1491-1495, 2001) describen la aparición de la tau fosforilada en S422 de los cerebros de ratones trans-

génicos tau-P301L a los que se han inyectado fibrillas Abeta42.

En la EP 2 009 104 se describen epítopes de la proteína tau que aparecen en estado fosforilado en la proteína tau de los PHF que han sufrido la enfermedad de Alzheimer y el uso de dichos epítopes para la generación de anticuerpos que detectan específicamente la proteína tau de Alzheimer. En WO 2002/062851 y US 7,446,180 se describen anticuerpos que tienen especificidad para la forma anormalmente truncada de la proteína tau y los aspectos diagnósticos y terapéuticos relacionados con la enfermedad de Alzheimer y tauopatías afines.

En WO 98/22120 se describe un método de tratamiento de un paciente que sufra la enfermedad de Alzheimer que consiste en el paso de administrar al paciente un anticuerpo contra el fragmento tau fosforilado que comprende de los aminoácidos aprox. 207 a aprox. 222, aminoácidos de aprox. 224 a aprox. 240 y aminoácidos de aprox. 390 a aprox. 408. Los estudios realizados con animales, en los que el fragmento tau fosforilado 379-408 [P-Ser396,404] se emplea para vacunar a ratones transgénicos tau, se han mencionado en Asuni, A.A. y col., J. Neuroscience 27, 9115-9129, 2007. En la patente US 2008/0050383 se describen métodos de tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer o de otras tauopatías en un sujeto que consiste en administrar un fragmento de la proteína tau.

Los anticuerpos monoclonales contra la tau pS422 se han descrito, por ejemplo, en EP 1 876 185. Los anticuerpos policlonales contra la tau pS422 son productos comerciales (p.ej. de ProSci Inc. y de Biosource International).

Resumen de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo que se une a la tau, fosforilada en la serina 422 (tau pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento tau fosforilado
5 Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 9) y a la tau pS422, pero que no se une a la tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, para utilizarse en el tratamiento de la tauopatía y a dicho método de tratamiento.

10 La invención comprende un anticuerpo que se une a la tau, fosforilada en la serina 422 (tau pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la tau pS422, pero que no se une a la tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, para la
15 fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una tauopatía y dicho método de fabricación.

La invención comprende un anticuerpo que se une a la tau fosforilada, caracterizado porque se une específicamente al mismo epítipo al que se une el Mab2.10.3 (anticuerpo anti-
20 tau pS422).

La invención se refiere al uso de un anticuerpo que se une a la fosforilada Tau, caracterizado porque se une al mismo epítipo al que se une el Mab2.10.3 (anticuerpo anti-tau pS422), para utilizarse en el tratamiento de una tauopatía o
25 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una tauopatía.

El anticuerpo según la invención se une específicamente a la tau pS422 y a la tau fosforilada agregada (fibrilar). El

anticuerpo según la invención no se une a la tau no fosforilada, ni al fragmento tau no fosforilado de la SEQ ID NO: 10 ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17.

Un anticuerpo según la invención es con preferencia del subtipo IgG1 humano. En otra forma de ejecución de la invención, un anticuerpo según la invención es con preferencia del subtipo IgG4 humano.

La invención se refiere a un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene:

- 10 a) CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7 y CDR3H de la SEQ ID NO: 8,
- b) CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H de la SEQ ID NO: 24 y CDR3H de la SEQ ID NO: 25,
- c) CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32 y
15 CDR3H de la SEQ ID NO: 33,
- d) CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H de la SEQ ID NO: 40 y CDR3H de la SEQ ID NO: 41,
- e) CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48 y CDR3H de la SEQ ID NO: 49,
- 20 f) CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56 y CDR3H de la SEQ ID NO: 57, o
- g) CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64 y CDR3H de la SEQ ID NO: 65.

El anticuerpo se caracteriza con preferencia por contener:

- 25 a) CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7, CDR3H de la SEQ ID NO: 8 y CDR1L de la SEQ ID NO: 3, CDR2L de la SEQ ID NO: 4, CDR3L de la SEQ ID NO: 5,

- b) CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H de la SEQ ID NO: 24, y
CDR3H de la SEQ ID NO: 25 y CDR1L de la SEQ ID NO: 27,
CDR2L de la SEQ ID NO: 28, CDR3L de la SEQ ID NO: 29,
- c) CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32, y
5 CDR3H de la SEQ ID NO: 33, y CDR1L de la SEQ ID NO: 35,
CDR2L de la SEQ ID NO: 36, CDR3L de la SEQ ID NO: 37,
- d) CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H de la SEQ ID NO: 40, y
CDR3H de la SEQ ID NO: 41 y CDR1L de la SEQ ID NO: 43,
CDR2L de la SEQ ID NO: 44, CDR3L de la SEQ ID NO: 45,
- 10 e) CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48, y
CDR3H de la SEQ ID NO: 49 y CDR1L de la SEQ ID NO: 51,
CDR2L de la SEQ ID NO: 52, CDR3L de la SEQ ID NO: 53,
- f) CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56, y
CDR3H de la SEQ ID NO: 57 y CDR1L de la SEQ ID NO: 59,
15 CDR2L de la SEQ ID NO: 60, CDR3L de la SEQ ID NO: 61, o
- g) CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64, y
CDR3H de la SEQ ID NO: 65 y CDR1L de la SEQ ID NO: 67,
CDR2L de la SEQ ID NO: 68, CDR3L de la SEQ ID NO: 69.

El anticuerpo se caracteriza con preferencia por conte-
20 ner:

- a) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 1 y una cadena
larga variable de la SEQ ID NO: 2,
- b) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 26 y una cadena
larga variable de la SEQ ID NO: 22,
- 25 c) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 34 y una cadena
larga variable de la SEQ ID NO: 30,
- d) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 42 y una cadena
larga variable de la SEQ ID NO: 38,

- e) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 50 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 46,
- f) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 58 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 54, o
- 5 g) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 66 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 62.

La invención comprende una variante humanizada de un anticuerpo Mab2.10.3 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab2.10.3 anti-tau
10 pS422. La invención comprende una variante carente de epítotope de células T de un anticuerpo Mab2.10.3 anti-tau pS422. El Mab2.10.3 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

La invención comprende una variante humanizada de un
15 anticuerpo Mab 005 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab 005 anti-tau pS422. La invención comprende una variante de un anticuerpo Mab 005 anti-tau pS422 carente del epítotope de células T. El Mab 005 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 26
20 y SEQ ID NO: 22.

La invención comprende una variante humanizada de un anticuerpo Mab 019 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab 019 anti-tau pS422. La invención comprende una variante de un anticuerpo Mab 019
25 anti-tau pS422 carente de epítotope de células T. El Mab 019 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 30.

La invención comprende una variante humanizada de un anticuerpo Mab 020 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab 020 anti-tau pS422. La invención comprende una variante de un anticuerpo Mab 020 anti-tau pS422 carente de epítotope de células T. El Mab 020 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 38.

La invención comprende una variante humanizada de un anticuerpo Mab 085 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab 085 anti-tau pS422. La invención comprende una variante de un anticuerpo Mab 085 anti-tau pS422 carente de epítotope de células T. El Mab 085 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 46.

La invención comprende una variante humanizada de un anticuerpo Mab 086 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab 086 anti-tau pS422. La invención comprende una variante de un anticuerpo Mab 086 anti-tau pS422 carente de epítotope de células T. El Mab 086 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 58 y SEQ ID NO: 54.

La invención comprende una variante humanizada de un anticuerpo Mab 097 anti-tau pS422. La invención comprende una variante quimérica de un anticuerpo Mab 097 anti-tau pS422. La invención comprende una variante de un anticuerpo Mab 097 anti-tau pS422 carente de epítotope de células T. El Mab 097 se caracteriza por sus cadenas variables de las SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 62.

La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7, CDR3H de la SEQ ID NO: 8 y CDR1L de la
5 SEQ ID NO: 3, CDR2L de la SEQ ID NO: 4, CDR3L de la SEQ ID NO: 5 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 1 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 2.

La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H
10 de la SEQ ID NO: 24, y CDR3H de la SEQ ID NO: 25 y CDR1L de la SEQ ID NO: 27, CDR2L de la SEQ ID NO: 28, CDR3L de la SEQ ID NO: 29 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 26 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 22.

15 La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32, y CDR3H de la SEQ ID NO: 33 y CDR1L de la SEQ ID NO: 35, CDR2L de la SEQ ID NO: 36, CDR3L de la SEQ
20 ID NO: 37 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 34 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 30.

La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H
25 de la SEQ ID NO: 40, y CDR3H de la SEQ ID NO: 41 y CDR1L de la SEQ ID NO: 43, CDR2L de la SEQ ID NO: 44, CDR3L de la SEQ ID NO: 45 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 42 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 38.

La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48, y CDR3H de la SEQ ID NO: 49 y CDR1L de la SEQ ID NO: 51, CDR2L de la SEQ ID NO: 52, CDR3L de la SEQ ID NO: 53 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 50 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 46.

La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56, y CDR3H de la SEQ ID NO: 57 y CDR1L de la SEQ ID NO: 59, CDR2L de la SEQ ID NO: 60, CDR3L de la SEQ ID NO: 61 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 58 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 54.

La invención comprende una variante quimérica, humanizada o carente del epítoto de células T de un anticuerpo anti-tau pS422 que contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64, y CDR3H de la SEQ ID NO: 65 y CDR1L de la SEQ ID NO: 67, CDR2L de la SEQ ID NO: 68, CDR3L de la SEQ ID NO: 69 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 66 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 62.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítoto de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7, CDR3H de la SEQ ID NO: 8 y CDR1L de la SEQ ID NO: 3, CDR2L de la SEQ ID NO: 4, CDR3L de la SEQ ID NO: 5 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 1 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 2.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítoto de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7, CDR3H de la SEQ ID NO: 8 y CDR1L de la SEQ ID NO: 3, CDR2L de la SEQ ID NO: 4, CDR3L de la SEQ ID NO: 5 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 1 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 2.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítoto de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H de la SEQ ID NO: 24, CDR3H de la SEQ ID NO: 25 y CDR1L de la SEQ ID NO: 27, CDR2L de la SEQ ID NO: 28, CDR3L de la SEQ ID NO: 29 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 26 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 22.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítoto de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32, CDR3H de la SEQ ID NO: 33 y CDR1L de la SEQ ID NO: 35, CDR2L de la SEQ ID NO: 36, CDR3L de la SEQ ID NO: 37 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 34 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 30.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítoto de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H de la SEQ ID NO: 40, CDR3H de la SEQ ID NO: 41 y CDR1L de la SEQ ID NO: 43, CDR2L de la SEQ ID NO:

44, CDR3L de la SEQ ID NO: 45 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 42 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 38.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítotope de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48, CDR3H de la SEQ ID NO: 49 y CDR1L de la SEQ ID NO: 51, CDR2L de la SEQ ID NO: 52, CDR3L de la SEQ ID NO: 53 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 50 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 46.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítotope de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56, CDR3H de la SEQ ID NO: 57 y CDR1L de la SEQ ID NO: 59, CDR2L de la SEQ ID NO: 60, CDR3L de la SEQ ID NO: 61 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 58 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 54.

La invención comprende un método para humanizar, eliminar el epítotope de las células T o quimerizar un anticuerpo anti-tau pS422, caracterizado porque contiene la CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64, CDR3H de la SEQ ID NO: 65 y CDR1L de la SEQ ID NO: 67, CDR2L de la SEQ ID NO: 68, CDR3L de la SEQ ID NO: 69 o una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 66 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 62.

Con preferencia, el anticuerpo que se une a la tau pS422 y está caracterizado por las secuencias de aminoácidos y fragmentos de secuencias de aminoácidos antes mencionados es del subtipo IgG1 humano. Con preferencia, el anticuerpo
5 que se une a la tau pS422 y está caracterizado por las secuencias de aminoácidos y fragmentos de secuencias de aminoácidos antes mencionados es del subtipo IgG4 humano.

Otra forma de ejecución de la invención es una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención.
10 ción.

Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de una composición farmacéutica.

Otra forma de ejecución de la invención es el uso de un
15 anticuerpo según la invención para el tratamiento de una tauopatía elegida entre el grupo formado por la enfermedad de Alzheimer (AD), incluida la forma de enfermedad de solo ovillos, el síndrome de Down, casos de adultos), el complejo de parkinsonismo-demencia de Guam, la demencia pugilística, la
20 enfermedad de Pick, la demencia con gránulos argirófilos, la demencia fronto-temporal, la degeneración córtico-basal, la degeneración pálido-ponto-nigral, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker con ovillos.

25 Otra forma de ejecución de la invención es un método para la fabricación de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención.

Otra forma de ejecución de la invención es un ácido nucleico que codifica un dominio variable de cadena larga y/o un dominio variable de cadena corta de un anticuerpo según la invención.

5 La invención proporciona además vectores de expresión que contienen un ácido nucleico según la invención, capaces de expresar dicho ácido nucleico en una célula hospedante procariota o eucariota y células hospedantes que contienen tales vectores, para la producción recombinante de dicho an-
10 ticuerpo.

La invención comprende además una célula hospedante procariota o eucariota que contiene un vector según la invención.

La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo recombinante humano o humanizado según
15 la invención, caracterizado porque expresa un ácido nucleico según la invención en una célula hospedante procariota o eucariota y para recuperar dicho anticuerpo de dicha célula o del líquido sobrenadante del cultivo celular. La invención
20 comprende además el anticuerpo que puede obtenerse por dicho método recombinante.

La invención comprende además un método para la selección de un anticuerpo monoclonal según la invención, caracterizado por proporcionar un gran número de anticuerpos monoclonales que se unen a la tau pS422, determinar la unión es-
25 pecífica de dichos anticuerpos al fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9, a la tau y al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17 y seleccionar un anticuerpo que tenga una

unión específica a dicho fragmento tau fosforilado por lo
menos 10.000 veces mayor, si se compara con su unión a la
tau, y que tenga una unión específica a dicho fragmento tau
fosforilado por lo menos 100 mayor, si se compara con su
5 unión al fragmento MCAK fosforilado Ile-Gln-Lys-Gln-Lys-Arg-
Arg-Ser(PO₃H₂)-Val-Asn-Ser-Lys-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 17).

Con preferencia, la invención comprende un método para
la selección de un anticuerpo monoclonal según la invención,
caracterizado por proporcionar un gran número de anticuerpos
10 monoclonales que se unen a la tau pS422, determinar la unión
específica de dicho anticuerpo al fragmento tau fosforilado
de la SEQ ID NO: 9, a la tau pS422, a la tau y al fragmento
MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, y seleccionar un anti-
cuerpo que tenga una unión específica a dicho fragmento tau
15 fosforilado y a dicha tau pS422 por lo menos 10.000 veces
mayor si se compara con su unión a la tau, y que tenga una
unión específica a dicho fragmento tau fosforilado por lo
menos 100 veces mayor, si se compara con su unión al fragmen-
to MCAK fosforilado Ile-Gln-Lys-Gln-Lys-Arg-Arg-Ser(PO₃H₂)-
20 Val-Asn-Ser-Lys-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 17).

Con preferencia, la invención comprende un método para
la selección de un anticuerpo monoclonal según la invención,
caracterizado por proporcionar un gran número de anticuerpos
monoclonales que se unen a la tau pS422, determinar la unión
25 específica de dicho anticuerpo al fragmento tau fosforilado
de la SEQ ID NO: 9, a la tau pS422, a la tau y al fragmento
MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, y seleccionar un anti-
cuerpo que tenga una unión específica a dicho fragmento tau

fosforilado y a dicha tau pS422 por lo menos 10.000 veces mayor si se compara con su unión a la tau, y que tenga una unión específica a dicho fragmento tau fosforilado y a dicha tau pS422 por lo menos 100 veces mayor, si se compara con su
5 unión al fragmento fosforilado Ile-Gln-Lys-Gln-Lys-Arg-Arg-Ser(PO₃H₂)-Val-Asn-Ser-Lys-Ile-Pro-Ala (SEQ ID NO: 17).

Los anticuerpos según la invención despliegan efectos beneficiosos para los pacientes que necesitan una terapia dirigida a la tau. Los anticuerpos según la invención tienen
10 propiedades novedosas y derivadas de la invención, que producen beneficios a un paciente que sufra una tauopatía, en especial una AD.

La invención proporciona además un método para tratar un paciente que sufre una tauopatía, en especial una AD, que
15 consiste en administrar a un paciente, al que se ha diagnosticado que padece tal enfermedad (y, por tanto, que necesita dicha terapia), un anticuerpo que se une a la pS422 según la invención. El anticuerpo se administra con preferencia en una composición farmacéutica.

20 Otra forma de ejecución de la invención es un método para el tratamiento de un paciente que sufre una tauopatía, en especial una AD, caracterizado porque se administra al paciente un anticuerpo según la invención.

La invención comprende además el uso de un anticuerpo
25 según la invención para el tratamiento de un paciente que sufre una tauopatía, en especial una AD, y para la fabricación de una composición farmacéutica según la invención. Ade-

más, la invención comprende un método para la fabricación de una composición farmacéutica según la invención.

La invención comprende también una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención, opcionalmente junto con un tampón y/o un adyuvante útil para la formulación de anticuerpos con fines farmacéuticos.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de ejecución, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo fabricado o en un kit.

El anticuerpo de la presente invención puede utilizarse para el diagnóstico de un trastorno neurológico, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, mediante la detección de polipéptidos fosforilados. El anticuerpo de la presente invención puede utilizarse también para detección específica de la tau pS422 o de la tau fosforilada agregada.

Descripción detallada de la invención

El término "tau" según la invención abarca la isoforma más larga de la tau humana, que contiene 441 aminoácidos (isoforma F, Uniprot P10636-8).

El término "tau fosforilada (pTau)" abarca según la invención la forma fosforilada de la isoforma más larga de la tau humana, que contiene 441 aminoácidos (isoforma F, Uniprot P10636-8), generada por fosforilación de S422 con la quinasa ERK2.

El término "tau fosforilada agregada" o "tau fosforilada agregada (fibrilar)" abarca según la invención la forma

agregada y fosforilada de la isoforma más larga de la tau humana, que contiene 441 aminoácidos (isoforma F, Uniprot P10636-8), generada por fosforilación de la tau agregada con la quinasa ERK2.

5 El término "fragmento tau" abarca según la invención el fragmento tau Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 10)

El término "fragmento tau fosforilado" según la invención abarca el fragmento tau fosforilado Ser-Ile-Asp-Met-Val-
10 Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 9).

El término "MCAK" según la invención abarca la quinesina asociada a centrómero mitótico humano (proteína KIF2C similar a quinesina, UniProt Q99661)). El MCAK humano (88-
15 102)[95-pSer] es un fragmento MCAK fosforilado, formado por los aminoácidos 88-102, fosforilado en la serina 95 (SEQ ID NO: 17). Este fragmento MCAK fosforilado no tiene identidad o similitud de secuencia si se compara con el fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9. Los inventores reconocen que
20 los anticuerpos según el estado de la técnica contra los fragmentos tau fosforilados pueden desplegar una considerable reactividad cruzada con péptidos y proteínas humanos fosforilados no relacionados con la tau. En el caso de los anticuerpos según la invención, que no se unen al fragmento MCAK fosforilado, no se ha detectado tal reactividad cruzada indesea-
25 ble.

La unión a la tau pS422 y la unión a la tau se investiga con un ensayo ELISA de lectura electroquimioluminiscente.

La tau o la tau pS422 se inmoviliza en una concentración de 2 µg/ml y se le añade un anticuerpo de ensayo (p.ej. humano o murino). Para la detección del anticuerpo de ensayo unido se añade una IgG antihumana y antimurina marcada con rutenio, respectivamente, en una concentración de 0,5 µg/ml. Se observa la unión específica a la tau pS422 si la relación de la señal de detección empleando la tau pS422 y la tau es por lo menos 10.000 veces mayor para la señal máxima de unión de la tau pS422.

10 Con el ensayo ELISA se investiga la unión al fragmento tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9, la unión al fragmento tau no fosforilado de la SEQ ID NO: 10 y al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17. Se incubaba un anticuerpo de ensayo con dicho fragmento tau fosforilado inmovilizado y con fines comparativos con dicho fragmento tau no fosforilado inmovilizado o con dicho fragmento MCAK. Se marca el anticuerpo y se detecta el marcador. Se observa una unión específica al fragmento tau fosforilado si la relación de la señal de detección empleando el fragmento tau fosforilado y el fragmento tau no fosforilado es por lo menos de 100 para la señal de unión máxima del fragmento tau fosforilado y si la relación de la señal de detección empleando el fragmento tau fosforilado y el fragmento MCAK fosforilado es también por lo menos de 100 para la señal de unión máxima del fragmento tau fosforilado.

25 El término "epítotope de Mab2.10.3" abarca un epítotope localizado dentro del fragmento tau fosforilado Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp (SEQ ID NO: 9), que se reconocido específicamente por el

Mab2.10.3. La propiedad de unirse al epítoto que tiene un anticuerpo tau según la presente invención se determina mediante un ensayo Biacore "in vitro" de unión con bloqueo cruzado para determinar la capacidad del Mab2.10.3 para impedir
5 estéricamente la unión del anticuerpo de ensayo a la pTau. Para tal ensayo se captura el Mab2.10.3 como anticuerpo primario en el sensor Biacore, después se realizan inyecciones sucesivas de la pTau y se ensaya el anticuerpo secundario. Si el anticuerpo secundario no presenta ninguna señal detectable
10 de unión, entonces el anticuerpo secundario se une al mismo epítoto que el Mab2.10.3.

El anticuerpo según la invención se une a la tau pS422 con una afinidad de $5 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ a 10^{-12} M^{-1} tal como se determina realizando un análisis Biacore.

15 La unión a agregados fibrilares de la tau pS422 se investiga con un análisis Biacore. Para este ensayo se inmoviliza la tau pS422 agregada y se añade el anticuerpo a ensayar en diferentes concentraciones, empleando un factor de dilución de 2 y una concentración máxima de 200 nM. Un anticuerpo
20 según la invención se une a la tau pS422 fibrilar con una K_d de 0,1 a 30, con preferencia con una K_d de 10 a 20 nM.

El término "anticuerpo monoclonal o anticuerpo" abarca las diversas formas de anticuerpo, con un preferencia un anticuerpo monoclonal y con preferencia especial un anticuerpo
25 monoclonal IgG1 o IgG4. El anticuerpo según la invención es con preferencia un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o también un anticuerpo producto de ingeniería genética, en el supuesto de que se conserven

las propiedades características de la invención. Los anticuerpos carentes del epítoto de células T pueden generarse aplicando los métodos descritos en WO 98/08097

Los "fragmentos de anticuerpo" contienen una porción
5 del anticuerpo de longitud completa, con preferencia el dominio variable del mismo, o por lo menos su sitio de unión al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen a los diacuerpos, las moléculas de anticuerpo de cadena simple y los anticuerpos multiespecíficos formados con fragmentos de
10 anticuerpo. Los anticuerpos scFv se han descrito, p.ej. en Huston, J.S., Methods in Enzymol. 203, 46-88, 1991. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de cadena simple, que tienen las características de un dominio V_H , a saber, de ser capaces de ensamblarse con un dominio V_L , o de
15 un dominio V_L para unirse a la tau pS422, a saber, de ser capaces de ensamblarse con un dominio V_H para formar un sitio de unión funcional al antígeno. El término "anticuerpo humanizado" indica los anticuerpos, en los que la estructura y/o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) se
20 han modificado para que contengan el CDR de una inmunoglobulina de una especie diferente si se compara con la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución,

a) la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7, CDR3H de la SEQ ID NO: 8 y CDR1L de la SEQ ID NO: 3, CDR2L
25 de la SEQ ID NO: 4, CDR3L de la SEQ ID NO: 5,

b) la CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H de la SEQ ID NO: 24, CDR3H de la SEQ ID NO: 25 y CDR1L de la SEQ ID NO: 27, CDR2L de la SEQ ID NO: 28, CDR3L de la SEQ ID NO: 29,

c) la CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32, CDR3H de la SEQ ID NO: 33 y CDR1L de la SEQ ID NO: 35, CDR2L de la SEQ ID NO: 36, CDR3L de la SEQ ID NO: 37,

d) la CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H de la SEQ ID NO: 40, CDR3H de la SEQ ID NO: 41 y CDR1L de la SEQ ID NO: 43, CDR2L de la SEQ ID NO: 44, CDR3L de la SEQ ID NO: 45,

e) la CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48, CDR3H de la SEQ ID NO: 49 y CDR1L de la SEQ ID NO: 51, CDR2L de la SEQ ID NO: 52, CDR3L de la SEQ ID NO: 53,

10 f) la CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56, CDR3H de la SEQ ID NO: 57 y CDR1L de la SEQ ID NO: 59, CDR2L de la SEQ ID NO: 60, CDR3L de la SEQ ID NO: 61, o

g) la CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64, CDR3H de la SEQ ID NO: 65 y CDR1L de la SEQ ID NO: 67, 15 CDR2L de la SEQ ID NO: 68, CDR3L de la SEQ ID NO: 69

se ha injertado en la región de estructura de un anticuerpo humano para obtener el "anticuerpo humanizado", véase, p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314, 268-270, 1985.

20 El "dominio variable" (dominio variable de una cadena corta (V_L), el dominio variable de una cadena larga (V_H)) se emplea aquí para indicar cada uno de los pares de dominios de cadena corta y cadena larga que intervienen directamente en la unión del anticuerpo con el antígeno.

25 Los dominios variables de cadena corta y larga tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones de estructura (FR), cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hiper-

variables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones de estructura adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conecten la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de estructura y junto con las CDR de la otra cadena forman el sitio de fijación con el antígeno. Las regiones CDR3 de cadena larga y corta del anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, constituyen otro objeto de la invención.

El término "porción de un anticuerpo que se une al antígeno" se emplea aquí para indicar los restos aminoácido de un anticuerpo que efectúan la unión con el antígeno. La porción de un anticuerpo que se une al antígeno comprende restos aminoácido de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones de "estructura" o "FR" son las regiones de dominio variable distintas de los restos de región hipervariable aquí definidos. Por tanto, las cadenas corta y larga de dominio variable de un anticuerpo comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 del extremo N al extremo C. En especial, la CDR3 de cadena larga es la región que más contribuye a la unión al antígeno y define las propiedades del anticuerpo. La CDR y las regiones FR se determinan con arreglo a la definición estándar dada por Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health,

Bethesda, MD (1991) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

El término "CDR1H" indica la región CDR1 de la región variable de cadena larga, calculada con arreglo a Kabat. La CDR2L, CDR3H, etc. indican las correspondientes regiones de cadena larga (H) o corta (L). Por ejemplo, un anticuerpo caracterizado por contener una CDR1H de la SEQ ID NO: 6 indica que el anticuerpo comprende esta secuencia de aminoácidos como región variable de cadena larga CDR1 en su cadena larga variable. Por ejemplo, un anticuerpo caracterizado por contener la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, la CDR2H de la SEQ ID NO: 7, la CDR3H de la SEQ ID NO: 8 indica que el anticuerpo comprende en su cadena larga como secuencia de la CDR1 la SEQ ID NO: 6, como secuencia de la CDR2 la SEQ ID NO: 7 y como secuencia de la CDR3 la SEQ ID NO: 8.

Los términos "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se emplean aquí para incluir las moléculas de DNA y las moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede tener una hebra simple o una hebra doble, pero con preferencia el DNA es de hebra doble.

El término "aminoácido" se emplea en esta solicitud para indicar el grupo de los α -amino-carboxiácidos de origen natural, que comprende la alanina (código de tres letras: ala; código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F),

prolina (pro, P), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

Un ácido nucleico está "unido operativamente" si está situado en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o líder secretorio está unido operativamente al DNA de un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operativamente a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está posicionado de modo que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que van a unirse son colineales, y, en el caso de un líder secretorio, son contiguas y dentro del marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no necesariamente tienen que estar contiguos. La unión se efectúa por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, entonces se emplean adaptadores o engarces oligonucleótidos sintéticos con arreglo a la práctica convencional.

Los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se emplean aquí de forma indistinta y tales designaciones incluyen a las progenies. Por tanto, los términos "transformantes" y "células transformadas" incluyen las células sujeto primarias y los cultivos derivados de las mismas, con independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica con el contenido del DNA, debido a mutaciones delibera-

das o inadvertidas. Se incluye la progenie variable que tiene la misma función o la misma actividad biológica después de haberse determinado este término por exploración de la célula transformada original.

5 La "parte Fc" de un anticuerpo no participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero presenta varias funciones efectoras. Una "parte Fc de un anticuerpo" es un término que los expertos conocen bien y que se define en base a la descomposición de anticuerpos con papaína. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de
10 sus cadenas largas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (subtipos), p.ej. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Según las
15 regiones constantes de cadena larga, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. El anticuerpo según la invención comprende con preferencia una parte Fc de origen humano que es del subtipo IgG1 o IgG4.

20 Las cadenas corta y larga constantes humanas y las cadenas constantes del subtipo IgG1 o IgG4 son bien conocidas en el estado de la técnica y se han descrito p.ej. en Kabat (véase, p.ej. Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28, 214-218, 2000). Por ejemplo, una región constante de cadena
25 larga humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 ó 14 (IgG1) o de la SEQ ID NO: 15 ó 16 (IgG4). Por ejemplo, una región constante de cadena corta humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una

región constante de cadena corta kappa de la SEQ ID NO: 11. Es preferido además que el anticuerpo sea de origen murino y comprenda el marco de secuencia de variable de anticuerpo de un anticuerpo murino según Kabat (véase p.ej. Sequences of
5 Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.A. y col., 5ª edición, DIANE Publishing (1992)).

La invención comprende un método para el tratamiento de un paciente que necesite una terapia, caracterizado porque se administra al paciente un anticuerpo según la invención.

10 La invención comprende el uso de un anticuerpo según la invención para la terapia.

La invención comprende el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una tauopatía, en especial de una AD.

15 La invención comprende el uso de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de enfermedades cerebrales, con preferencia para el tratamiento de una tauopatía, en especial de la AD.

Otra forma de ejecución de la invención es un método
20 para la producción de un anticuerpo según la invención, caracterizado porque la secuencia de un ácido nucleico que codifica la cadena larga de un anticuerpo según la invención y el ácido nucleico que codifica la cadena corta de dicho anticuerpo se insertan en uno o dos vectores de expresión, dicho(s) vector(es) se inserta(n) en una célula hospedante
25 eucariota, el anticuerpo codificado se expresa y se recupera de la célula hospedante o del líquido sobrenadante.

Los anticuerpos según la invención se producen con preferencia por medios recombinantes. Estos métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y normalmente la purificación que conduce a una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas se insertan los ácidos nucleicos que codifican a las cadenas corta y larga o fragmentos de las mismas en vectores de expresión por método estándar. La expresión se realiza en células hospedantes procariota o eucariota apropiadas, por ejemplo las células CHO, las células NS0, las células SP2/0, las células HEK293, las células COS, la levadura o células de *E. coli* y se recupera el anticuerpo de las células (o del líquido sobrenadante o después de la lisis de las células).

La producción recombinante de anticuerpos se ha descrito por ejemplo en los artículos de revisión de Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17, 183-202, 1999; Geisse, S. y col., *Protein Expr. Purif.* 8, 271-282, 1996; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16, 151-160, 2000; Werner, R.G., *Drug Res.* 48, 870-880, 1998.

Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en el lisado celular o en forma parcial o sustancialmente pura. La purificación se realiza con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, p.ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por métodos estándar (véase Ausubel, F. y col. (coord.), *Current Proto-*

cols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York, 1987).

La expresión de las células NS0 se ha descrito p.ej. en Barnes, L.M. y col., Cytotechnology 32, 109-123, 2000; Barnes, L.M. y col., Biotech. Bioeng. 73, 261-270, 2001. La expresión transitoria se ha descrito p.ej. en Durocher, Y. y col., Nucl. Acids Res. 30, E9, 2002. La clonación de dominios variables se ha descrito en Orlandi, R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833-3837, 1989; Carter, P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289, 1992; Norderhaug, L. y col., J. Immunol. Methods 204, 77-87, 1997. Un sistema preferido de expresión transitoria (HEK 293) se ha descrito en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en Cytotechnology 30, 71-83, (1999) y en Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194, 191-199, 1996.

De modo conveniente, los anticuerpos monoclonales se separan del medio de cultivo por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, por ejemplo, cromatografía de proteínas a través de A-Sepharose, hidroxilapatita, electroforesis a través de gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y el RNA que codifican a los anticuerpos monoclonales se aíslan fácilmente y se secuencian aplicando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuentes de dichos DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en vectores de expresión, que después se transfectan a las células hospedantes, por ejemplo células HEK 293, células CHO o células de mieloma, que de otro modo no producen la proteína de la inmunoglobulina, para sinteti-

zar los anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospedantes.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican a las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-
5 pS422 se obtienen por un gran número de métodos ya conocidos de la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a: el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida
10 a un sitio), mutagénesis por PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo anti-pS422 humanizado.

Los dominios variables de cadena larga y corta según la invención se combinan con secuencias de promotor, inicio de
15 traducción, región constante, región 3' sin traducir, poliadetilación y terminación de transcripción, para formar los constructos de vectores de expresión. Los constructos de expresión de cadena larga y corta pueden combinarse en un solo vector, co-transfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado a células hospedantes, que después se fusionan para formar una célula hospedante individual que expresa ambas cadenas.
20

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, p.ej. una composición farmacéutica, que contiene
25 un anticuerpo o una combinación de anticuerpos monoclonales, o la porción de los mismos que se une al antígeno, de la presente invención, formulados con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se emplea aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción/resorción y similares, que son fisiológicamente compatibles. Con preferencia, el vehículo es idóneo para la inyección o la infusión.

Una composición de la presente invención puede administrarse por una gran variedad de métodos ya conocidos en la técnica. Los expertos podrán entender fácilmente que la vía y/o el modo de administración pueden variar en función de los resultados deseados.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la fabricación de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas ya es conocido en la técnica. Además del agua, el vehículo puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada isotónica.

Con independencia de la vía de administración elegida, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada apropiada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formula en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales, que los expertos ya conocen.

Los niveles actuales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad

de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración concretos, sin que sean tóxicos para el paciente (cantidad eficaz). El nivel de dosificación elegido
5 dependerá de un gran número de factores farmacocinéticos, incluida la actividad de las composiciones concretas de la presente invención que se emplean, o del éster, de la sal o de la amida de los mismos, de la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del com-
10 puesto concreto que se emplee, de otros fármacos, compuestos y/o materiales empleados en combinación con las composiciones concretas que se empleen, la edad, el sexo, el peso, el estado general de salud y el historial médico previo del paciente a tratar y factores similares, bien conocidos en medicina.

15 La invención comprende el uso de los anticuerpos según la invención para el tratamiento de un paciente que sufra una tauopatía, en especial una AD.

La invención comprende también un método para el tratamiento de un paciente que sufra tal enfermedad que consiste
20 en administrar un anticuerpo según la invención al paciente.

La invención proporciona además un método para la fabricación de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención junto con un vehículo farmacéu-
ticamente aceptable y el uso del anticuerpo según la inven-
25 ción para dicho método.

La invención proporciona además el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un agente farmacéu-
tico, con preferencia junto con un vehículo farmacéuticamente

aceptable, para el tratamiento de un paciente que sufra una tauopatía, en especial una AD.

La invención proporciona también el uso de un anticuerpo según la invención para la fabricación de un agente farmacéutico, con preferencia junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que sufra un cáncer, en especial una tauopatía, en especial una AD.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras que siguen se proporcionan para facilitar la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se define en las reivindicaciones anexas. Se da por supuesto que pueden introducirse modificaciones en los procedimientos descritos sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción del listado de secuencias

- 15 SEQ ID NO: 1 Cadena corta variable del Mab 2.10.3
- SEQ ID NO: 2 Cadena larga variable del Mab 2.10.3
- SEQ ID NO: 3 CDR1L
- SEQ ID NO: 4 CDR2L
- SEQ ID NO: 5 CDR3L
- 20 SEQ ID NO: 6 CDR1H
- SEQ ID NO: 7 CDR2H
- SEQ ID NO: 8 CDR3H
- SEQ ID NO: 9 Fragmento tau fosforilado
- SEQ ID NO: 10 SEQ ID NO: 9 no fosforilada
- 25 SEQ ID NO: 11 Región constante de cadena corta kappa humana
- SEQ ID NO: 12 Región constante de cadena corta lambda humana
- SEQ ID NO: 13 Región constante γ 1 humana (alotipo G1m1,17)
- SEQ ID NO: 14 Región constante γ 1 humana (alotipo G1m17)

SEQ ID NO: 15 Región constante de IgG4 humana
SEQ ID NO: 16 Región constante mutante SPLE de IgG4 humana
SEQ ID NO: 17 Fragmento MCAK fosforilado (MCAK_Humano (88-102)[95-pSer]
5 SEQ ID NO: 18 cebador
SEQ ID NO: 19 cebador
SEQ ID NO: 20 cebador
SEQ ID NO: 21 cebador
SEQ ID NO: 22 Cadena larga variable del Mab 005
10 SEQ ID NO: 23 CDRH1
SEQ ID NO: 24 CDRH2
SEQ ID NO: 25 CDRH3
SEQ ID NO: 26 Cadena corta variable del Mab 005
SEQ ID NO: 27 CDRL1
15 SEQ ID NO: 28 CDRL2
SEQ ID NO: 29 CDRL3
SEQ ID NO: 30 Cadena larga variable del Mab 019
SEQ ID NO: 31 CDRH1
SEQ ID NO: 32 CDRH2
20 SEQ ID NO: 33 CDRH3
SEQ ID NO: 34 Cadena corta variable del Mab 019
SEQ ID NO: 35 CDRL1
SEQ ID NO: 36 CDRL2
SEQ ID NO: 37 CDRL3
25 SEQ ID NO: 38 Cadena larga variable del Mab 020
SEQ ID NO: 39 CDRH1
SEQ ID NO: 40 CDRH2
SEQ ID NO: 41 CDRH3

SEQ ID NO: 42 Cadena corta variable del Mab 020
SEQ ID NO: 43 CDRL1
SEQ ID NO: 44 CDRL2
SEQ ID NO: 45 CDRL3
5 SEQ ID NO: 46 Cadena larga variable del Mab 085
SEQ ID NO: 47 CDRH1
SEQ ID NO: 48 CDRH2
SEQ ID NO: 49 CDRH3
SEQ ID NO: 50 Cadena corta variable del Mab 085
10 SEQ ID NO: 51 CDRL1
SEQ ID NO: 52 CDRL2
SEQ ID NO: 53 CDRL3
SEQ ID NO: 54 Cadena larga variable del Mab 086
SEQ ID NO: 55 CDRH1
15 SEQ ID NO: 56 CDRH2
SEQ ID NO: 57 CDRH3
SEQ ID NO: 58 Cadena corta variable del Mab 086
SEQ ID NO: 59 CDRL1
SEQ ID NO: 60 CDRL2
20 SEQ ID NO: 61 CDRL3
SEQ ID NO: 62 Cadena larga variable del Mab 097
SEQ ID NO: 63 CDRH1
SEQ ID NO: 64 CDRH2
SEQ ID NO: 65 CDRH3
25 SEQ ID NO: 66 Cadena corta variable del Mab 097
SEQ ID NO: 67 CDRL1
SEQ ID NO: 68 CDRL2
SEQ ID NO: 69 CDRL3

SEQ ID NO: 70 Región constante (kappa) de inmunoglobulina de conejo

SEQ ID NO: 71 Región constante (gamma) de inmunoglobulina de conejo

5 SEQ ID NO: 72 Región constante (kappa) de inmunoglobulina de ratón

SEQ ID NO: 73 Región constante (gamma) de inmunoglobulina de ratón

Descripción de las figuras

10 Figura 1: localización intracerebral de pS422 de IgG1 después de la administración i.p. en el modelo de ratón tau-PS2APP. Las micrográficas confocales después de la tinción múltiple de fluorescencia con anticuerpos primarios contra la IgG1 conjugados con Alexa488 y anticuerpo AT8 anti-pTau con-
15 jugado con Alexa555 ponen de manifiesto la IgG1 unida (A) y los depósitos de pTau (B) junto con DAPI en los núcleos de las células (C). Las imágenes fusionadas presentan la tinción colocalizada de anti-IgG1 y pTau en algunas células positivas de pTau (D).

20 Figura 2: vehículo de control de localización intracerebral de la IgG1 en el modelo de ratón tau-PS2APP. Las micrográficas confocales después de la tinción múltiple de fluorescencia de la sección de cerebro tau-PS2APP presentan una visión de conjunto de la región CA1 de la formación del
25 hipocampo. La tinción múltiple con anticuerpo primarios contra la IgG1 conjugada con Alexa488 es negativa (A). El anticuerpo AT8 anti-pTau conjugado con Alexa555 pone de manifiesto los depósitos de pTau (B). El DAPI tiñe las células del

núcleo (C). Las imágenes fusionadas se presentan en (D). No se observa una inmunofluorescencia anti-IgG1 apreciable en los ratones tau-PS2APP después de la inyección de vehículo.

Figura 3: localización intracelular de IgG1 después de la administración i.p. en el modelo de ratones tau-PS2APP. Las micrográficas confocales después de la tinción múltiple de fluorescencia de la sección de cerebro tauPS2APP presentan una célula marcada positiva dentro del córtex prefrontal. La tinción múltiple con anticuerpos primarios contra la IgG1 conjugada con Alexa488 y el anticuerpo AT8 anti-pTau conjugado con Alexa555 pone de manifiesto la IgG1 unida (A) y los depósitos de pTau (B). Las imágenes fusionadas presentan la tinción perinuclear y dendrítica colocalizada de los anti-IgG1 y pTau junto con la tinción DAPI de los núcleos de las células en azul (C).

Figura 4: localización intracelular de IgG1 después de la administración i.p. en el modelo de ratones tau-PS2APP. Las micrográficas confocales después de la tinción múltiple de fluorescencia de la sección de cerebro tauPS2APP presentan una célula marcada positiva dentro de la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo. La tinción múltiple con anticuerpos primarios contra IgG1 conjugados con Alexa488 y el anticuerpo AT8 anti-pTau conjugado con Alexa555 ponen de manifiesto la IgG1 unida (A) y los depósitos de pTau (B). Las imágenes fusionadas indican la tinción perinuclear y dendrítica colocalizada del anti-IgG1 y pTau junto con una tinción DAPI de los núcleos de las células (C).

Figura 5: localización intracelular de IgG2a después de la administración i.p. en el modelo de ratones tau-PS2APP. Las micrográficas confocales después de la tinción múltiple de fluorescencia de la sección de cerebro tauPS2APP presentan una célula marcada positiva dentro de la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo. La tinción múltiple con anticuerpos primarios contra IgG2a conjugados con Alexa488 y el anticuerpo AT8 anti-pTau conjugado con Alexa555 ponen de manifiesto la IgG2a unida (A) y los depósitos de pTau (B). Las imágenes fusionadas indican la tinción perinuclear colocalizada del anti-IgG2a y pTau junto con una tinción DAPI de los núcleos de las células (C).

Figura 6: localización intracelular de IgGba después de la administración i.p. en el modelo de ratones tau-PS2APP. Las micrográficas confocales después de la tinción múltiple de fluorescencia de la sección de cerebro tauPS2APP presentan una célula marcada positiva dentro de la región del córtex prefrontal. La tinción múltiple con anticuerpos primarios contra IgGba conjugados con Alexa488 y el anticuerpo AT8 anti-pTau conjugado con Alexa555 ponen de manifiesto la IgGba unida (A) y los depósitos de pTau (B). Las imágenes fusionadas indican la tinción perinuclear colocalizada del anti-IgG2b y pTau, indicada con flechas (C)

Figura 7: análisis del ratón tauPS2APP. A: tinción de plata de Gallyas de una región cerebral sagital de un ratón tau-PS2APP de 16 meses de edad. Las estructuras intraneuronales típicas, de tipo ovillo, son visibles en negro y confirma las neuronas positivas de pTau puestas de manifiesta en la

microscopía de inmunofluorescencia. B: sección ultrafina marcada con oro inmunológico de un ratón tau-PS2APP de 16 meses de edad. El mAb anti-tau pS422 se une específicamente a las estructuras fibrilares en un proceso dendrítico en la región CA1 del hipocampo, tal como se pone de manifiesto con el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal de 10 nm (flecha). El tamaño y la densidad de las fibrillas marcadas sugiere que son comparables a los filamentos helicoidales pareados de las proteínas tau fosforiladas encontradas en las neuronas degeneradas de la enfermedad de Alzheimer.

Figura 8: unión "in vitro" de anticuerpos anti-tau pS422 a las secciones de un cerebro que ha sufrido AD. Las micrográficas de fluorescencia después de la tinción de las secciones cerebrales AD corticales humanas con anticuerpos monoclonales anti-tau pS422 (clones 2.10.3, 2.20.4 y 5.6.11) en la concentración indicada ponen de manifiesto depósitos positivos de pTau marcados. Son notables los depósitos pTau intracelulares, en forma de ovillos neurofibrilares grandes y hebras de neurópilo alargadas.

Figura 9: Selectividad de los anticuerpos anti-tau pS422 para con la tau pS422 por comparación con la tau. Mediación en un ensayo ELISA de selectividad de anticuerpos anti-tau pS422 empleando placas recubiertas con tau (▲) o con tau pS422 (●). Como referencia se representa el anticuerpo 4/2 selectivo de la tau en el panel de la parte superior izquierda.

Figura 10: la tau agregada "in vitro" es fibrilar. Micrográfica electrónica de tau agregada de tinción negativa.

Figura 11: micrográficas fluorescentes de secciones corticales de cerebro humano que ha sufrido AD, teñidas con anticuerpos monoclonales Mab 005 de conejo anti-tau pS422 (primera fila), Mab 019 (segunda fila), Mab 020 (tercera fila), Mab 085 (cuarta fila), Mab 086 (quinta fila) y Mab 097 (sexta fila), que presentan depósitos positivos de pTau marcados y filamentos. Se representan las diluciones en serie de las IgG de cada fila partiendo de 2,0 µg/ml (izquierda), 0,4 µg/ml, 0,08 µg/ml y 0,016 µg/ml.

10 Ejemplo 1

Preparación y purificación de anticuerpos

a) Generación de anticuerpo

Se inmunizan los ratones con un fragmento tau de la SEQ ID NO: 9 (Ser-Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO₃H₂)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr-Leu-Ala-Asp), que corresponde a los aminoácidos 416-430 de la isoforma de tau humana más larga. Para conseguir la condensación dirigida a través del tiol con la K₂KLH se añade una cisteína a la posición N terminal del fragmento tau. El posterior método de inmunización, fusión, clonación y explotación de los anticuerpos específicos anti-tau pS422 se ha descrito en EP 1 876 185.

 b) Purificación de los clones 2.10.3, 2.20.4 y 5.6.11

El líquido sobrenadante del cultivo de hibridomas sin células (250-300 ml) se introduce en la parte superior de una columna MEP Hypercell de 25 ml (pall Biosciences), que se equilibra con TrisCl 50 mM, de pH 8,0. Después de lavar con tampón de equilibrado se eluye el anticuerpo con citrato sódico 30 mM, NaCl 100 mM de pH 4,1. Se reúnen las fracciones

que contienen anticuerpo y se dializan en tubos de diálisis Spectra-Por 6-8000 a 4°C durante una noche con 5 litros de TrisCl 10 mM de pH 8,0. Se introduce el material dializado en una columna Source 17Q de 10 ml (GE Healthcare), que se ha
5 equilibrado con TrisCl 10 mM de pH 8,0 (tampón A). Después de lavar con el tampón A se eluye el anticuerpo con un gradiente de tampón B del 0 al 25% en 10 volúmenes de columna. El tampón B contiene TrisCl 10 mM, NaCl 1M, de pH 8,0. Se eluye el anticuerpo con NaCl aprox. 200 mM. Se determina la pureza de
10 las fracciones individuales mediante un ensayo SDS-PAGE y se reúnen las fracciones más puras.

Un día antes de inyectarse a los ratones, cada anticuerpo se dializa con PBS y se ajusta la concentración de anticuerpo a 3,2 mg/ml.

15 Ejemplo 2

Obtención de la tau, tau pS422, tau agregada y tau pS422 agregada

Se expresa en *E. coli* la tau que contiene en posición N terminal un marcador de fusión (His)₆-SUMO y se purifica cromatografía de intercambio iónico en una columna de HiTrapQ
20 (GE Healthcare, Suiza) y después por cromatografía de afinidad a través de Sefarosa Ni-NTA (Qiagen, Suiza). Después se elimina el marcador de fusión por digestión con una proteasa SUMO (Invitrogen, Holanda) y después con un segundo paso de
25 cromatografía a través de Sefarosa Ni-NTA para eliminar el marcador de fusión.

Se obtiene la tau-pSer422 por incubación de la tau con la proteína-quinasa ERK2. Se elige la proporción molar entre

ERK2 y Tau (aprox. 1:10) para obtener una fosforilación máxima de la S422 y después se incuba a 37°C en TrisCl 10 mM de pH 8,0 que contiene MgCl₂ 1mM y ATP 2mM durante una noche. Se supone que esto equivale a una fosforilación estequiométrica del sitio 422. Se determina la fosforilación con un ensayo "western blot" empleando un anticuerpo monoclonal de producción propia para la pS422 de la tau.

Se obtiene la tau agregada (fibrilar) por incubación de la tau purificada de una concentración final de 5 µM en TrisCl 10 mM de pH 8,0 que contiene ácido araquidónico 50 µM (Sigma, Suiza). Se efectúa la incubación a 37°C durante 16 h. Se determina el estado de agregación por espectroscopia de fluorescencia en presencia de Tio S 10 µM (Barghorn y Mandelkow, Biochemistry 41, 14885-14896, 2002) y por microscopia electrónica (figura 10). Tal como se desprende de la figura 10, la tau agregada tiene un aspecto fibrilar. Se obtiene la tau fosforilada agregada por incubación de la tau preagregada con la quinasa ERK2 del modo antes descrito.

Ejemplo 3

Los anticuerpos monoclonales anti-tau pS422 son muy selectivos de la tau fosforilada en S422

a) Síntesis de péptidos

La síntesis de péptidos se realiza en un sintetizador automatizado de péptidos, aplicando la química de la Fmoc. Mediante ciclos iterativos se ensamblan las secuencias de los péptidos por condensación sucesiva de los correspondientes aminoácidos Fmoc. En cada paso de condensación se elimina el grupo Fmoc del extremo N por tratamiento de la resina con

piperidina al 20 % en N-metil-pirrolidona. Las condensaciones se llevan a cabo empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (1 mmol) activados con HBTU/HOBt (1 mmol de cada) y DIPEA (2 mmoles) en DMF. Después de cada paso de condensación se bloquean los grupos amino que no hayan reaccionado por tratamiento con una mezcla de ácido acético (0,5 M), DIPEA (0,125 M) y HOBt (0,015 M) en NMP (10 min, vórtice). Entre dos pasos sucesivos se lava la resina con N-metilpirrolidona y DMF. La incorporación de aminoácidos impedidos estéricamente se realiza mediante fusiones dobles automatizadas. A tal fin se trata la resina dos veces con 1 mmol del bloque de construcción activado sin paso de bloqueo entre los ciclos de condensación. Se incorpora el correspondiente derivado serina a las secuencias fosforiladas de péptido en forma de bloque de construcción Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH. Una vez completadas las secuencias diana, se incorpora el Fmoc-Glu(biotinil-PEG)-OH (biotina unida mediante un espaciador PEG) al péptido MCAK aplicando condiciones estándar de condensación de aminoácidos, mientras que se unen 4x β -alanina (U) y 1x ϵ -lisina a las secuencias de la fosfo-tau secuencias aplicando condiciones estándar. A continuación se conjuga la DMTr-biotina con los péptidos fosfo-tau, generándose las secuencias diana biotiniladas. Después de la desprotección final del Fmoc (solamente para el MCAK), se colocan todas las resinas peptídicas por separado en fritas de filtro y se trata con una mezcla de ácido trifluoracético, agua y triisopropilsilano (19 ml : 0,5 ml : 0,5 ml) durante 2,5 h. Se filtran las soluciones empleadas para la desprotección y se precipitan los péptidos

por adición de éter de diisopropilo frío (0°C) (300 ml), formándose sólidos incoloros, que se lavan repetidamente con éter de diisopropilo. Se disuelven de nuevo los productos en bruto en una mezcla de ácido acético/agua, se liofilizan y después se purifican por HPLC preparativa en fase inversa, empleando un gradiente de acetonitrilo/agua que contiene un 0,1 % de TFA.

HBTU: hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio

10 HOBt: hidroxibenzotriazol

DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina

NMP: N-metil-2-pirrolidona

b) Ensayo con un péptido tau fosforilado

Se sintetizan péptidos correspondientes a la tau pS422
15 secuencia 416 - 430 (fosforilada y no fosforilada) y al MCAK humano (88-102)[95-pSer] y se biotinilan para recubrir una placa de microvaloración de estreptavidina. Para determinar la unión máxima del fosfopéptido tau a las placas de ensayo se emplean para el recubrimiento diferentes concentraciones
20 del fosfopéptido tau, comprendidas entre 1 ng/ml y 2000 ng/ml. Finalmente se emplean 50 ng/ml del fosfopéptido tau para el recubrimiento a temperatura ambiente durante 60 min. Se incuban los anticuerpos 2.10.3., 2.20.4. y 5.6.11 anti-tau pS422 en placas de microvaloración marcadas con el péptido
25 durante 60 min en concentraciones de hasta 1000 ng/ml. Después de lavado se determina la unión de los anticuerpos empleando un anticuerpo IgG Fc anti-ratón, que está marcado con POD. Después de la incubación con ABTS®, a temperatura ambien-

te durante 20 min se mide la absorbancia (O.D.) a 405 nm - 492 nm. Se determina la unión del anticuerpo por EC₅₀. Se determina un valor típico de EC₅₀ situado en 100 ng/ml para el 2.10.3., 8 ng/ml para el 2.20.4. y 1 ng/ml para el 5.6.11. Se emplean como controles el fragmento tau no fosforilado y el (MCAK_Human (88-102)[95-pSer]). Se observa que los péptidos de control no se unen. Los valores típicos de línea de base se sitúan en torno a 30 mE (tabla 1), que son aprox. un 1% del valor máximo medido para el fragmento tau fosforilado. Por lo tanto, el Mab2.10.3 se une al fragmento tau fosforilado con una selectividad por lo menos 100 veces mayor si se compara con el péptido tau no fosforilado de la SEQ ID NO: 10 y con el MCAK_Human (88-102)[95-pSer]. Los resultados se recogen en la tabla 1.

15 Tabla 1

anti-cuerpo	O.D. máx. de la unión del fragmento tau fosforilado	O.D. máx. de la unión del fragmento tau	relación entre la O.D. del fragmento tau fosforilado y la O.D. del fragmento tau	O.D. del fragmento MCAK fosforilado
2.10.3.	3300 mE	30 mE	110	30 mE

c) Ensayo con la tau de longitud completa y la tau pS422

Se realizan los ensayos en la plataforma Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, Maryland, MD, EE.UU.). Se recubren las placas de microvaloración MSD de 96 hoyos con la tau o tau pS422 en una concentración de 2 µg/ml de tampón PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Se bloquean las placas añ-

diendo PBS que contiene un 5% de BSA y un 1 % de Tween 20 durante 1 h. Se diluyen los anticuerpos en un tampón Low Cross (MSD) que contiene un 0,1% de BSA y un 0.1% de Tween® 20 en una concentración de 30 pg/ml a 20 ng/ml (excepto para el clon 2.10.3, en el que la concentración se sitúa entre 3 ng/ml y 250 ng/ml) y se depositan en las placas recubiertas bloqueadas y se incuban a temperatura ambiente durante 3 h. Se lavan las placas tres veces con tampón PBS que contiene un 1% de Tween. Para la detección del anticuerpo unido se añade la IgG anti-ratón marcada con SULFO (MSD) en una concentración de 0,5 pg/ml y se incuban las placas temperatura ambiente durante 1 h. Después de la adición del tampón de "lectura" (read buffer) (MSD), se leen las placas en un lector llamado MSD Sector Imager 6000 plate reader. En la figura 9 se recogen los datos obtenidos empleando la tau o la tau pS422 como reactivo de unión para los anticuerpos monoclonales anti-tau pS422 (clones 5.6.11, 2.20.4 y 2.10.3). Se comparan los anticuerpos tau pS422 se comparan como referencia con un anticuerpo anti-tau (clon 4/2) que reconocen no solo a la tau sino también a la tau pS422. Comparando la unión a la tau pS422 con la unión a la Tau, se observa que las señales de la unión a la tau no se distinguen de las señales de la línea de base y por lo tanto no se detecta unión a la tau. Por consiguiente se calcula que cada uno de los tres anticuerpos anti-tau pS422 se une a la tau pS422 con una selectividad por lo menos 10.000 veces mayor si se compara con la selectividad de unión a la Tau.

Ejemplo 4

El anticuerpo anti-tau pS422 se une a los agregados fibrilares de la tau pS422

Se realiza un análisis de Biacore para determinar la
5 unión del anti-tau pS422 (clon 2.10.3) a las preparaciones de
tau pS422 agregada fibrilar. Se considera que las fibrillas
fosforiladas son una representación "in vitro" de la forma
PHF de la tau, que aparece en los cerebros que han sufrido la
enfermedad de Alzheimer. Se prepara el material fibrilar y se
10 fosforila del modo descrito en el ejemplo 2.

Inmovilización sobre chips de sensores

Se inmoviliza la tau pS422 agregada mediante un enlace
covalente por condensación con amina sobre un chip sensor
CM5. A tal fin se diluye la tau pS422 agregada 19 veces en
15 acetato sódico 10 mM de pH 5,0. Se pone en contacto la super-
ficie del sensor activado con la solución de proteína hasta
que se inmoviliza el nivel deseado de proteína sobre el chip.
Después se bloquean los ésteres reactivos de la N-hidroxisuccinimida restantes inyectando la etanolamina 1 M de pH
20 8,0. Se inmovilizan 450 unidades de respuesta (RU) de proteína
con el fin de caracterizar el comportamiento de unión del
anti-tau pS422 (clon 2.10.3). Se lleva a cabo el ensayo de
inmovilización a t.amb. y se emplea como tampón de trabajo el
PBS.

25 Valoración cinética

Para la caracterización del anticuerpo, se cambia el
tampón de trabajo por el Tris-Cl 10 mM de pH 8,0, NaCl 250 mM
y se prepara una serie de concentraciones del anticuerpo: 5

concentraciones diferentes, factor de dilución: 2, conc. máx.
= 200 nM. Se inyectan sucesivamente las diferentes soluciones
de anticuerpo partiendo de la concentración más baja. Se re-
genera la superficie del sensor con H_3PO_4 100 mM después de
5 la valoración llamada "cinética". Se efectúan las mediciones
tres veces.

Se realizan las evaluaciones de los datos empleando un
programa informático Biaeval. El cálculo de los parámetros se
basa en la hipótesis de que la unión del anticuerpo a la tau
10 pS422 agregada es totalmente monovalente. Los parámetros ci-
néticos y termodinámico que caracterizan el comportamiento de
fijación del anticuerpo sobre la proteína inmovilizada se
recogen en la tabla 2.

Tabla 2

K_D	k_d	K_a	$R_{\max}$
nM	s^{-1}	M x s	RU
17,0	1×10^{-2}	$6,2 \times 10^5$	208

15 Por tanto el anti-tau pS422 (clon 2.10.3) se une a la
fosfo-tau fibrilar con una K_D de 17 nM.

Ejemplo 5

Unión "in vitro" de anticuerpos monoclonales anti-tau
pS422 a la pTau intracelular de secciones de cerebros de pa-
20 cientes de la enfermedad de Alzheimer.

Se investiga la inmunodecoración específica y sensible
de la patología pTau patológicamente relevante en el tejido
cerebral de la enfermedad de Alzheimer por tinción histoquí-
mica empleando criosecciones de tejido cerebral humano de

pacientes de AD. Se realiza la evaluación empleando tejido cerebral congelado "post mortem" de pacientes de AD, clasificados neuropatológicamente como Braak VI. Se crio-secciona el tejido cerebral y se procesa para la inmunoquímica sin ninguna fijación química, es decir, con aldehídos. La detección de los depósitos de pTau se realiza empleando un anticuerpo secundario marcado con marcador fluorescente, específico de la IgG de ratón y se hace el seguimiento por microscopía luminosa de fluorescencia.

10 Resumiendo, se marcan por inmunofluorescencia indirecta las secciones criostática de tejido cerebral no fijado procedente de regiones cerebrales cortical obtenida "post mortem" de pacientes, a los que se ha diagnosticado positivamente la enfermedad de Alzheimer. En el presente estudio se representan las imágenes obtenidas del tejido del giro frontal orbital de un paciente de AD (caso 01-05; banco interno de cerebros). Se realiza una incubación sucesiva de dos pasos para detectar los anticuerpos murinos fijados de diferentes clones, que se ponen de manifiesto con una IgG de cabra anti-ratón purificada por afinidad (H+L) conjugada con Cy3 (Jackson Immuno Research). La división en secciones, la tinción y la microscopía de fluorescencia se realiza con arreglo a procedimientos estándar.

25 La tinción específica y sensible de la patología pTau es evidente para los clones 2.10.3, 2.20.4 y 5.6.11 (figura 8). Es claramente visible la tinción consistente de todos los tipos de depósitos de pTau, a saber, los ovillos neurofibrilares, las hebras de neurópilo y las neuritas distróficas. Se

determina una concentración eficaz mínima de 0,05 µg/ml para todos los clones investigados, lo cual indica la unión muy sensible a los depósitos de pTau genuina humana.

La detección de los depósitos de pTau puede realizarse también empleando un anticuerpo IgG4 según la invención y un anticuerpo secundario marcado con un marcador fluorescente específico de la IgG4 humana y se hace el seguimiento por microscopía de luz fluorescente.

Ejemplo 6

10 Generación de ratones transgénicos triples de tauPS2APP

Se generan ratones tau-PS2APP transgénicos por cruzamiento de hembras PS2APP homocigóticas de la línea B6.172H (Ozmen, L. y col., Neurodegen. Dis. 6, 29-36, 2009) con machos tau homocigóticos de la línea tau-P301L (Goetz y col., 15 Science 293, 1491-1495, 2001). Los ratones transgénicos resultantes son todos heterocigóticos de la mutante sueca APP humana, la mutante N141I presenilina 2 humana y la mutante tau-P301L humana. La expresión de los transgenes se realiza con un promotor Thy-1 murino en el caso de los transgenes APP 20 y tau humanos y con un promotor prion en el caso del transgén presenilina 2 humano.

Se mantienen los animales en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se les proporciona pienso y agua a placer. Las instalaciones, en las que se alojan los animales, han sido 25 homologadas por la Acreditación de Laboratorios para Cuidado Animal. Todos los procedimientos se realizan en estricto cumplimiento de las regulaciones federales suizas sobre protección de animales y las reglas de la Asociación para la Eva-

luación y Acreditación de Laboratorios para Cuidado Animal y con la aprobación explícita de las autoridades veterinarias locales.

Procesado de los animales para los análisis inmunohistoquímicos: se anestesian los animales empleando isoflurano del 4 % y se sacrifican por decapitación. Se recoge la sangre en tubos recubiertos con EDTANaF (Milian). Se extraen los cerebros, se congelan inmediatamente en hielo seco y se almacenan a -80°C hasta el momento de su utilización.

10 Para los ensayos se emplean ratones machos y hembras de 20 meses de edad. En esta edad ya es evidente la acumulación intensificada de tau hiperfosforilada intracelular y la patología neurofibrilar en los cerebros de todos los ratones sometidos al ensayo hasta el presente.

15 Ejemplo 7

Histología y análisis ultraestructural de los depósitos de pTau en el modelo de ratón tau-PS2APP

El ratón tau-PS2APP desarrolla un fenotipo dependiente de la edad y progresivo con depósitos pTau intraneuronal con
20 estructuras similares a los ovillos neurofibrilares detectables en diversas regiones cerebrales. Se observa la patología pTau sustancial a los 24 meses de edad. Se han encontrado por ejemplo diversas neuronas que son positivas de la tau pS422 intracelular dentro del córtex prefrontal y la capa de células
25 piramidales de la región Cal del hipocampo y adyacentes al subículo. Se ha observado que, en esta edad, la pTau se propaga hacia el estrato oriental y a lo largo de la frontera

del hipocampo álveo hacia la región CA3 y la fimbria y también hacia la estría.

La tinción de plata de Gallyas se realiza del modo descrito (Gallyas, F., Acta Morphologica Acad. Sci. Hung. 19, 1-8, 1971) con modificaciones poco importantes, a saber: la preincubación en ácido peryódico del 3% y después el lavado en ácido acético del 0,5% y un lavado adicional en tiosulfato sódico al 5% durante 2 min. Se efectúa la tinción de contraste con hematoxilina & eosina estándar. La tinción de plata de Gallyas confirma la aparición de numerosos depósitos de tipo ovillo en el hipocampo y en el córtex de los ratones tau-PS2APP (fig. 7A).

Se investiga la ultraestructura de los depósitos pTau por microscopía electrónica de inmunidad. Se someten ratones tau-PS2APP de 16 meses de edad a una perfusión con formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,5% en PBS. Se sumergen las rebanadas de cerebro en Lowicryl HM20 y las secciones ultrafinas se preparan del modo descrito previamente (Richards, J.G. y col., J. Neurosci. 23, 8989-9003, 2003). Resumiendo, se incuban las secciones con anti-tau pS422 a razón de 10 µg/ml en PBS y un 2 % de BSA durante 1 h. Después de 6 lavados con PBS/2% de BSA, se incuban las secciones con una IgG secundaria de cabra anti-ratón (Amersham, Arlington Heights, IL), conjugada con oro 10 nm en proporción 1:20 en PBS/2% de BSA/0,1% de Tween® 20 durante 1 h y se lavan en PBS con un 2% de BSA. Para controles se emplean secciones tratadas con suero normal de ratón, lo cual se traduce en una línea de fondo despreciable de menos de 10 partículas de oro en un área de

10 μm^2 . Las micrográficas electrónicas se registra con un JEOL 1210 a 100 kV.

El examen ultraestructural del hipocampo de un ratón tau-PS2APP de 16 meses de edad con numerosas neuronas positivas de pTau pone de manifiesto los depósitos fibrilares marcados con oro inmunológico para los filamentos helicoidales pareados (PHF) dentro de los procesos dendríticos (figura 7B). Las secciones ultrafinas marcadas con el mAb anti-tau pS422 ponen de manifiesto la unión a las estructuras fibrilares dentro de los procesos dendríticos de la región CA1 del hipocampo, que resultan evidentes por el anticuerpo secundario conjugado con oro coloidal 10 nm, visibles en forma de manchas negras (figura 7B). El marcado con oro inmunológico pone de manifiesto que el epítipo pS422 de la tau está localizado en las estructuras fibrilares intracelulares de las neuronas de los ratones tau-PS2APP investigados. El tamaño y la densidad de las fibrillas marcadas sugieren que son estructuralmente comparables a las PFH observadas en las neuronas degeneradas de pacientes que sufren AD. La locación de las pTau-PHF pone claramente de manifiesto la distribución intracelular de los depósitos de pTau agregada en ratones transgénicos tau-PS2APP.

Ejemplo 8

La unión "in vivo" de anticuerpos monoclonales anti-tau pS422 a la pTau intracelular de cerebros de un modelo de ratón pTau que han sufrido la enfermedad de Alzheimer se pone de manifiesto por inmunohistoquímica y por microscopía de escaneo láser confocal.

Se ensayan los anticuerpos anti-tau pS422 seleccionados (ver tabla 1) en ratones transgénicos triples tau-PS2APP de 24 meses de edad y se evalúa su unión a los depósitos de pTau "in vivo". Los estudios se realizan en un modelo de ratón tau-PS2APP que desarrolla un fenotipo progresivo y dependiente de la edad con depósitos pTau intraneuronales, que incluyen estructuras similares a los ovillos neurofibrilares detectables en diversas regiones cerebrales, tal como se ha descrito en el ejemplo 4.

10 Los anticuerpos utilizados contra la tau pS422 se administran por vía i.p. en una dosis de 20 mg/kg. Las tinciones inmunohistoquímicas se realizan dos días después de la administración i.p. para detectar los depósitos de pTau y los anticuerpos unidos al subtipo IgG de ratón. Los grupos de
15 tres ratones cada uno se sacrifican dos días después de la administración de la dosis. Se anestesian profundamente los ratones (~2 minutos en Forene™ al 5% v/v, hasta alcanzar casi el estado de asfixia), entonces se abre el tórax, se extrae el pericardio, se perfusiona con PBS, se decapitan los ratones,
20 nes, se dividen los cerebros en dos y se congelan rápidamente en hielo seco. Se cortan con un criostato (CM3050S, Leica) secciones criostáticas parasagitales de los cerebros recién congelados de un grosor de 20 µm, se montan en marcos Histo-bond preenfriados (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) y
25 se almacenan a -20°C.

Se aplica una tinción inmuno-fluorescente triple a los anticuerpos anti-tau pS422 unidos detectados. Se hidratan las secciones en PBS y se tratan durante 2 min con acetona al 100

% preenfriada a -20°C . Todos los demás pasos se realizan sucesivamente en un aparato automático de tinción (Autostainer Plus DakoCytomation, High Wycombe, UK) a temperatura ambiente. Se lavan los marcos con las secciones de cerebro PBS que
5 contiene un 0,01% de Tween 20, pH 7,4, durante 5 minutos y se bloquean los sitios de unión inespecífica por incubación sucesiva en PBS con un 1% de albúmina de suero bovino, un 1% de ovalbúmina y un 1% de suero normal de cabra durante 20 minutos. Después de lavar con PBS y un 0,01% de Tween 20, se in-
10 cuban los marcos con anticuerpos de detección específicos del isotipo IgG, es decir, IgG1, IgG2a o IgG2b de cabra anti-ratón purificados por afinidad, conjugados con el colorante Alexa Fluor 488 (A21121, A21131 o A21141, Molecular Probes) a razón de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un 1% de BSA en PBS, pH 7,4, durante 1
15 hora. Después de lavar con PBS con un 0,01% de Tween 20 se evalúa la localización de la pTau marcando con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti-pTau (AT-8, Pierce Biotechnology), un anticuerpo monoclonal murino para el epítipo S202/205 fosforilado en proteína tau que está conjugado mediante enlace covalente
20 con el colorante Alexa Fluor 555 y se aplica en PBS con un 1% de albúmina de suero bovino, un 1% de ovalbúmina y un 1% de suero normal de cabra durante 1 hora. Después de lavar con PBS con un 0,01% de Tween 20, se contratiñen los núcleos de las células con 4,6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a razón de
25 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS durante 5 minutos. Después de lavar con PBS con un 0,01% de Tween[®] 20, se reduce la autofluorescencia de lipofuscina por tratamiento por incubación en CuSO_4 4 mM en acetato amónico 50 mM, pH 5, durante 30 minutos. Después de

enjuagar los marcos con agua bidestilada y un lavado final con PBS y un 0,01% de Tween® 20, se sumergen los marcos en un medio de montaje de fluorescencia (S3023 DakoCytomation, High Wycombe, UK). Se registran sucesivamente las imágenes de proyección máxima en canales de emisión no solapados, empleando un microscopio de escaneo láser confocal de tipo Leica SP2, AOBS, con un ajuste de cráteres (poros) de 1 Airy.

Se nota la patología pTau sustancial en los ratones tau-PS2APP de 24 meses. Se encuentran por ejemplo varias neuronas que son fuertemente positivas de la tau pS422 intracelular dentro del córtex prefrontal y en la capa de células piramidales de la región CA1 del hipocampo y adyacentes al subículo. En esta edad, se encuentra la pTau propagada hacia el estrato oriental y a lo largo de la frontera del hipocampo álveo hacia la CA3 y la región de la fimbria y también hacia la estria terminal.

Las tinciones inmunológicas de la región cortical prefrontal y en la región CA1 de la formación del hipocampo de ratones tau-PS2APP de 24 meses de edad se presentan en imágenes microscópicas confocales (figuras 1-6). La pTau intracelular y los anticuerpos administrados del subtipo IgG se detectan claramente y se encuentran co-localizados en células de las regiones cerebrales con patología pTau sustancial. Los ejemplos representativos de localización intracelular de la IgG1 se presentan en las figura 1, 3 y 4 así como el control de vehículo (figura 2). Se encuentran células positivas de IgG2a (figura 5) y en algunas células también de IgG2b (figura 6). Algunas de las células positivas de pTau presentan una

morfología neurofibrilar típica, que es reminiscente de los ovillos neurofibrilares encontrados en neuronas degeneradas del tejido cerebral de pacientes de AD. La inmunorreactividad co-localizada de anticuerpos de subtipo IgG de ratón, en especial de IgG1 y pTau, se observa en procesos dendríticos, por ejemplo en el córtex prefrontal y en la capa de células granulares de la región CA1 de la formación del hipocampo (figuras 3 y 4).

Todos los anticuerpos anti-tau pS422 ensayados presentan una unión específica a los depósitos pTau intracelulares. Sin embargo, la extensión de la unión varía entre los tres subtipos de IgG, tal como se recoge en la tabla 3.

Tabla 3

anticuerpo	subtipo IgG	intensidad de tinción en cerebro de ratón tau-PS2APP
Tau_2.10.3	IgG1	XXX
Tau_2.20.4	IgG2a	X
Tau_5.6.11	IgG2b	X

en la que X = reactividad IHC débil, XX = moderada y XXX = fuerte.

Ejemplo 9

El tratamiento crónico con anticuerpos monoclonales anti-tau pS422 reduce la patología tau en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer

La capacidad de los Mab murinos anti-tau pS422 de reducir la patología tau en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer se comprueba en ratones mediante la administración del anticuerpo a ratones transgénicos triples tau-PS2APP du-

rante un período de 4 meses. Para ello se trata un grupo de 20 ratones transgénicos triples tau-PS2APP, de 7 meses de edad, una vez por semana con la administración i.p. de Mab anti-tau pS422 murino (clon 2.10.3). Se administra el anticuerpo en una concentración de 2 mg/ml en un vehículo (histidina 20 mM, NaCl 140 mM de pH 6,0) hasta alcanzar una dosis final de 20 mg/kg. A un segundo grupo de 20 ratones transgénicos triples se le administra un volumen equivalente de vehículo. Pasados 4 meses se sacrifican todos los ratones y se les extraen los cerebros del modo descrito en el ejemplo 5. Se divide cada cerebro en dos hemisferios, uno de ellos se prepara para el análisis inmunohistoquímico del modo descrito en el ejemplo 5. El segundo hemisferio se emplea para la determinación cuantitativa de los niveles de la pTau mediante el inmunoensayo descrito a continuación.

1. Extracción de cerebros de ratón para los ensayos de la tau y la pTau

Se pesan los cerebros y se homogeneizan en un homogeneizador de vidrio con 10 volúmenes de tampón enfriado con hielo que contiene TrisCl 25 mM, NaCl 800 mM, un 10 % de sucrosa, de pH 7,5. Se centrifugan los materiales homogeneizados a 20.000 x g. Se diluyen los líquidos sobrenadantes resultantes con PBS/1% de BSA/1% de Tween® 20 en proporción 1:100 (para los ensayos de la tau) o de 1:10 (para los ensayos de la pTau).

2. Ensayos tau y pTau

Todos los ensayos se realizan empleando la plataforma Meso Scale Discovery (MSD, Gaithersburg, Maryland, MD,

EE.UU.). Los anticuerpos de captura y detección se marcan con biotina y SULFO-Tag™, respectivamente, con arreglo a los métodos estándar facilitados por MSD. Para los ensayos se emplean los anticuerpos siguientes: (i) 5A6, un anticuerpo murino dirigido contra los aminoácidos 19-46 de la tau, del modo descrito por Johnson, G.V. y col., J. Neurochem 68, 430-433, 1997; (ii) AT180, un anticuerpo murino detectado contra la pT231 en la tau [Innogenetics, Bélgica]; (iii) el clon 2.5.2 murino anti-tau pS422 descrito en EP-1876185-A1; (iv) el clon 4/53 murino anti-tau desarrollado contra la tau de longitud completa. Se emplea el anticuerpo 5A6 como anticuerpo de captura, los demás anticuerpos se emplean como anticuerpos de detección.

Se recubren las placas MSD de 96 hoyos con estreptavidina y se bloquean con un 5% de BSA a t.amb. durante 1 h. Se lavan las placas 3 veces con tampón de lavado (PBS, un 0,05% de Tween® 20). Después se añade el anticuerpo de captura, diluido en tampón de ensayo (PBS/1% de BSA/1% de Tween® 20) y se incuban las placas a 4°C durante 30 minutos. Después se lavan las placas una vez. A continuación se añaden 75 µl de tampón de ensayo a cada hoyo, después 25 µl del líquido sobrenadante cerebral diluido y 25 µl de anticuerpo de detección marcado con Sulfo. Se agitan las placas a 4°C durante 1 h y después se lavan una vez. Finalmente se añaden 170 µl de tampón de lectura MSD y se leen las placas en un aparato del tipo MSD Sector Imager 6000.

Para la determinación cuantitativa de la tau y tau-pS422 en los extractos de cerebros de ratón, se construyen

curvas estándar empleando la tau y tau-pS422 preparadas del modo descrito en el ejemplo 2.

Disminuyendo la patología tau en los ratones transgénicos triples tau-PS2APP por un tratamiento crónico con anticuerpos monoclonales anti-tau pS422 se pone de manifiesto una reducción de la patología tau típica observada en ratones de 11 meses de edad tratados con anticuerpo si se compara con los ratones de la misma edad tratados con vehículo. Esta reducción se manifiesta en una carga reducida de ovillos neurofibrilares, detectada por inmunohistoquímica, y por un nivel reducido de varias especies tau presentes en los extractos cerebrales, determinado en un inmunoensayo cuantitativo.

Ejemplo 10

Preparación y purificación de anticuerpos de conejo

15 a) Inmunización

Para la inmunización se emplean conejos NZW suministrados por la empresa Charles River Laboratories International, Inc. Se disuelve el fosfopéptido tau (416-430)[pS422] condensado con KLH en tampón K_3PO_4 de pH 7,0 en una concentración de 20 1 mg/ml y se mezcla (1:1) con un adyuvante completo de Freund (CFA) hasta la formación de una emulsión estable. A tres conejos se les aplica una inyección intradérmica (i.d.) de 2 ml de emulsión, después una segunda inyección intramuscular (i.m.) y una tercera inyección subcutánea (s.c.) de 1 ml cada 25 una en un intervalo de una semana. La cuarta inyección i.m. de 1 ml se aplica dos semanas más tarde, después se aplican dos inyecciones s.c. más de 1 ml en intervalos de cuatro semanas. Se extraen muestras de 10 ml de sangre total periféri-

ca de cada animal 4-6 días después de la inyección tercera, cuarta, quinta y sexta que se emplean para la clasificación de las células individuales en el FACS. Al mismo tiempo se recogen otros 0,5 ml de suero de cada animal que se emplean
5 para la determinación de la respuesta al anticuerpo específico de la tau (416-463)[pS422].

b) Respuesta al anticuerpo

La respuesta del anticuerpo a la inmunización se determina por una dilución en serie de los sueros realizando un
10 ensayo ELISA, en el que se incuban 30 ng de tau biotinilada (416-430)[pS422] por hoyo en 1x PBS a 4°C durante una noche en placas de microvaloración de 96 hoyos prerrecubiertas con estreptavidina (MC1347, Micro Coat Biotechnologie GmbH, Bernried, Alemania). Para la detección se emplea la IgG de cabra
15 anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (The Jackson laboratory) en una dilución de 1:16000. Para la visualización se emplea la solución de sustrato BM Blue POD precipitado con tetrametilbencidina (TMB), lista para el uso, suministrada por Roche Diagnostics GmbH. La reacción se inter-
20 rrumpe con HCl 1N y se mide en un aparato Tecan Infinite a 450/690 nm.

c) Clonación de células B

Recubrimiento de las placas

Se incuban placas de 6 hoyos (tipo apto para cultivo
25 celular) estériles, recubiertas con estreptavidina, con una mezcla de 3 péptidos biotinilados de control (Tau (416-430) no fosforilada, MCAK_Humano (88-102)[95-pSer] y MAP2_Humano (1802-1816)[pSer-1802]) o con el fosfo-péptido tau biotinila-

do (416-430)[pS422], cada uno de ellos en una concentración de 0,5 a 1 µg/ml en PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavan las placas con PBS estéril tres veces antes del uso. Se recubren las placas de 6 hoyos de cultivo celular con 2
5 µg/ml de KLH (hemocianina de lapa de ojo de cerradura, key hole limpet hemocyanine) en tampón carbonato (bicarbonato sódico 0,1 M, hidrogenocarbonato disódico 34 mM, de pH 9,55) a 4°C durante una noche. Se lavan las placas con PBS estéril tres veces antes del uso.

10 Aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica de conejo (PBMC)

Se diluye dos veces la sangre total que contiene EDTA con 1x PBS antes de la centrifugación de densidad en linfocitos de mamífero (Cedarlane Laboratories), que se efectúa para
15 aislar las PBMC de conejo. Se lavan las PBMC dos veces antes de la tinción con anticuerpos.

Medio EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biootech, Aidenbach, Alemania) suplementado con un 10% de FCS (Hyclone, Logan, UT, EE.UU.), glutamina 2 mM, solución al 1% de penicilina/estreptomicina (PAA,
20 Pasching, Austria), piruvato sódico 2 mM, HEPES 10 mM (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) y beta-mercaptoetanol 0,05 mM (Gibco, Paisley, Escocia).

Eliminación de macrófagos/monocitos

25 Se emplean placas estériles de 6 hoyos (aptas para el cultivo celular) para eliminarlos macrófagos y monocitos por adhesión inespecífica. Se recubren los hoyos con KLH (key hole limpet hemocyanine) o con estreptavidina y los péptidos

de control. Se introducen en cada hoyo como máximo 4 ml de medio y hasta 6×10^6 células mononucleadas de sangre periférica del conejo inmunizado y se hacen reaccionar o unir en el incubador a 37°C durante 1 h. Se emplea el 50% de las células del líquido sobrenadante para el paso del lavado en cuba; el 50% restante de las células se somete a una tinción de fluorescencia inmune y se clasifican las células individuales.

Lavado en cuba de células B sobre péptidos

Se siembran las placas de cultivo de tejido celular de 6 hoyos recubiertas con estreptavidina y con el péptido tau biotinilado (416-430)[pS422] con un número de 6×10^6 células por 4 ml de medio y se dejan reaccionar en el incubador a 37°C durante 1 h. Se eliminan las células no adheridas por lavado cuidadosa de los hoyos 1-2 veces con 1x PBS. Se arrancan las células pegajosas restantes por tratamiento en el incubador con tripsina a 37°C durante 10 min y después se lavan dos veces con el medio. Se guardan las células sobre hielo hasta la tinción inmunofluorescente.

Tinción inmunofluorescente y clasificación de células individuales

La IgG FITC anti-conejo empleada para la clasificación de células individuales es de AbD Serotec (STAR121F, Düsseldorf, Alemania). Para la tinción superficial se incuban las células del paso de eliminación y lavado en cuba con en anticuerpo IgG FITC anti-conejo en PBS con agitación durante 30 min en una cámara fría a 4°C en la oscuridad. Después de la centrifugación, se separan los líquidos sobrenadantes por aspiración. Se someten las PBMC a 2 ciclos de centrifugación

y lavado con PBS enfriado con hielo. Finalmente se vuelven a suspenden las PBMC en PBS enfriado con hielo y se someten inmediatamente a los análisis FACS. Se añade el yoduro de propidio en una concentración de 5 µg/ml (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) antes de los análisis FACS para discriminar las células vivas de las muertas. Se efectúan el FACS en un equipo Becton Dickinson FACSAria provisto del programa informático FACSDiva (BD Biosciences, EE.UU.) y se depositan las células vivas individuales, marcadas con FITC, en placas de 96 hoyos.

Cultivo de células B

Se preparan los cultivos de células B por un método similar al descrito por Zubler, R.H. y col., J. Immunol. 134, 3662-3668, 1985. Resumiendo, las células B clasificadas individuales se cultivan en el incubador en placas de 96 hoyos con 210 µl/hoyo del medio EL-4 B5 con células de pansorbina (1:20000) (Calbiochem (Merck), Darmstadt, Alemania), un 5% de líquido sobrenadante de timocito de conejo y células de timoma murina EL-4-B5 expuestas de radiación gamma (2×10^4 /hoyo) a 37°C durante 7 días en una atmósfera que contiene un 5% de CO₂. Se separan los líquidos sobrenadantes del cultivo de células B por exploración y se recogen inmediatamente las células para la clonación de genes de región variable o se congelan a -80°C en 100 µl de tampón RLT (Qiagen, Hilden, Alemania).

d) Exploración de clones de células B

Se exploran los líquidos sobrenadantes de cultivos de células B para la fijación sobre la tau biotinilada (416-

430)[pS422] en un ensayo ELISA. Como antígenos de control se emplean la tau no fosforilada (416-430), la KLH (key hole limpet hemocyanine) y el fosfo-péptido MCAK_Humano no afín (88-102)[95-pSer]. Para la preparación de las placas ELISA se
5 incuban las placas de microvaloración prerrecubiertas con estreptavidina con tau biotinilada (415-430)[pS422] a razón de 50 ng/ml a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realiza el recubrimiento con KLH o péptidos de control a razón de 1 µg/ml. Se diluyen los líquidos sobrenadantes de células B en
10 proporción de 1:5 a 1:10 y se incuban en las placas de microvaloración recubiertas con antígeno durante 60 min. Después de un lavado intensivo se detecta la unión de los anticuerpos de conejo empleando un anticuerpo de detección conjugado con digoxigenina IgG de oveja anti-conejo (Chemicon AQ301D). Después de la incubación con TMB a temperatura ambiente se mide
15 la absorbancia a 370 nm - 492 nm. Los clones de células B, que generan señales por encima de la línea de fondo con la tau biotinilada (416-430)[pS422] pero no con la KLH y MCAK_Humano (88-102)[95-pSer], se consideran también y se
20 someten a una clonación de genes de región variable.

e) Amplificación por PCR de los dominios V y secuenciación

Se prepara el RNA total empleando el kit denominado NucleoSpin 8/96 RNA (Macherey & Nagel; 740709.4, 740698) con
25 arreglo a las instrucciones del fabricante. Todos los pasos se efectúan en un sistema de tratamiento de líquidos epMotion 5075 (Eppendorf). Se eluye el RNA con 60 µl de agua libre de RNasa. Se emplean 6 µl de RNA para generar el cDNA por reac-

ción de la transcriptasa inversa empleando la mezcla llamada Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen 18080-400) y un cebador oligo dT con arreglo a las instrucciones del fabricante. Se emplean 4 µl de cDNA para amplifi-
5 car las regiones variables de cadena larga y corta de la inmunoglobulina (VH y VL) con la mezcla llamada AccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040) en un volumen final de 50 µl empleando los cebadores rbHCfinal.up y rbHCfinal.do para la cadena larga y rbLCfinal.up y rbLCfinal.do para la cadena
10 corta (tabla 4). Las condiciones aplicadas en la PCR son las siguientes: inicio en caliente a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de 20 s a 94°C, 20 s a 70°C, 45 s a 68°C y una extensión final a 68°C durante 7 min.

Tabla 4

rbHCfinal.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
rbHCfinal.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
rbLCfinal.up	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC
rbLCfinal.do	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC

15 Se introducen 8 µl de 50 µl de la solución de la PCR en 48 E-Gel 2% (Invitrogen G8008-02). Las reacciones PCR positivas se limpian con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel; 740609250) con arreglo a las instrucciones del fabricante y se eluyen con 50 µl del tampón de elución. Se secuen-
20 cian directamente en ambas direcciones 12 µl de los productos purificados de la PCR empleando el rbHCfinal.up y rbHCfinal.do para las cadenas largas y el rbLCfinal.up y rbLCfinal.do para las cadenas cortas (tabla 4).

d) Expresión recombinante de anticuerpos monoclonales de conejo y anticuerpos quiméricos de conejo/ratón

Para la expresión recombinante de los anticuerpos monoclonales de conejo se clonan los productos de la PCR, que
5 codifican a las VH o VL, en forma de cDNA con vectores de expresión por el método de clonación de voladizo (overhang) (Haun, R.S. y col., *Biotechniques* 13, 515-518, 1992; Li, M.Z. y col., *Nature Methods* 4, 251-256, 2007). Los plásmidos de expresión lineal, que codifican a la región constante kappa o
10 gamma de conejo y la V1 de los insertos VH, se amplifican por PCR empleando cebadores de solapamiento. Los productos purificados de la PCR se incuban con T4 DNA-polimerasa, que genera voladizos de hebra simple. Se interrumpe la reacción por adición de dCTP. En el paso siguiente se combinan el plásmido
15 y el inserto y se incuban con recA, lo cual induce la recombinación específica de sitio. Los plásmidos recombinados se transforman en *E. coli*. Al día siguiente se recogen las colonias cultivadas y se comprueba si los plásmidos recombinados son correctos mediante la preparación de plásmido, análisis
20 de restricción y secuenciación del DNA. Para la expresión del anticuerpo, los plásmidos HC y LC aislados se co-transfectan de modo transitorio a células HEK293 y después de 1 semana se recogen los líquidos sobrenadantes. Para la clonación y la expresión de los anticuerpos quiméricos de conejo y ratón se
25 amplifican las regiones VH y VL por PCR y se subclonan en vectores de expresión que contienen la región kappa constante de ratón o la región gamma 1 constante de ratón. Se aíslan los plásmidos HC y LC quiméricos de conejo/ratón, se comprue-

ban por análisis de restricción y secuenciación de DNA para determinar si es correcta la inserción y se co-transfectan de modo transitorio en células HEK293. Una semana después de la transfección se recogen los líquidos sobrenadantes.

5 e) Purificación de anticuerpos

Los anticuerpos de conejo expresados de forma recombinante se purifican a partir de los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares en columnas MabSelectSuRe (GE Healthcare). Antes de la introducción de las muestras, las columnas se
10 equilibran con 25 mmol/l de Tris-HCl, 25 mmol/l de NaCl, de pH 7,4. Se realiza la elución del anticuerpo con 50 mmol/l de acetato, de pH 3,14. La muestra eluida se introduce inmediatamente en una columna desalinizadora (Sephadex G25, GE Healthcare) y se eluye en 20 mmol/l de His-
15 HCl, 140 mmol/l de NaCl de pH 6,0. Se utiliza también este tampón para el almacenaje del anticuerpo purificado. La temperatura general de almacenaje es de 4°C, temperatura ambiente durante el proceso de purificación y -80°C después de la división en parte alícuotas. Los anticuerpos quiméricos de
20 conejo/ratón expresados de modo recombinante se purifican a partir de los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares en columnas MabSelectSuRe (GE Healthcare). Antes de la introducción de las muestras, las columnas se equilibran con 1 x PBS, de pH 7,4. Se realiza la elución de los anticuerpos con
25 100 mmol/l de citrato, de pH 3,0. Se neutraliza inmediatamente la muestra eluida con 2 moles/l de Tris/HCl, de pH 9,0. Después se introducen los anticuerpos en una columna de exclusión de tamaños (Superdex 200, GE Healthcare) y se eluyen

con 20 mmoles/l de His-HCl, 140 mmoles/l de NaCl de pH 6,0. Este tampón se emplea también para el almacenaje de los anticuerpos purificados. La temperatura general de almacenaje es de 4°C, temperatura ambiente durante el proceso de purificación y -80°C después de la división en partes alícuotas.

Ejemplo 11

Los anticuerpos monoclonales de conejo anti-tau pS422 son muy selectivos de la tau fosforilada en el sitio pS422 y se unen a los agregados fibrilares de la tau pS422

10 a) ELISA

Los anticuerpos monoclonales de conejo se expresan de modo recombinante en células HEK 293. Se comprueban con un ensayo ELISA los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares o los anticuerpos purificados de conejo para determinar su unión a la tau biotinilada (416-430)[pS422], la tau no fosforilada (416-430), la KLH (key hole limpet hemocyanine) y el fosfo-péptido no afín MCAK_Human (88-102)[95-pSer]. Para la preparación de las placas ELISA, se preincubaban las placas de microvaloración, prerrecubiertas con estreptavidina, con la tau biotinilada (415-430)[pS422] a razón de 50 ng/ml a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realiza el recubrimiento con KLH o los péptidos de control a razón de 1 µg/ml. Se incuban los anticuerpos de conejo anti-tau pS422 (Abcam AB51071) o los líquidos sobrenadantes que contienen los anticuerpos de conejo en placas de microvaloración marcadas con antígeno en diversas concentraciones durante 60 min. Después de un lavado intensivo se determina la unión de los anticuerpos de conejo empleando un anticuerpo de detección IgG de

oveja anti-conejo conjugado con digoxigenina (Chemicon AQ301D). Después de la incubación con TMB a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 370 nm - 492 nm. Se caracteriza la unión de los anticuerpos por sus valores EC50. Se caracteriza la unión de los anticuerpos a los péptidos de la tau biotinilada (416-430)[pS422] y de la tau no fosforilada (416-430) por sus valores EC50. Se estima la reactividad cruzada con la KLH o el fosfopéptido MCAK por medición de puntos individuales de concentraciones elevadas, es decir, en una dilución 1:5 de los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares. Los resultados se recogen en la tabla 5. Se observa que los valores EC50 de la unión al fosfopéptido más de 100 veces inferiores a los valores EC50 de la unión al péptido tau, lo cual indica que la selectividad es por lo menos 100 mayor para el fragmento tau fosforilado que para el péptido tau no fosforilado. La unión a la KLH y al fosfopéptido de control MCAK se sitúa en el nivel de la línea de base para todos los anticuerpos, que es aprox. 1<3% del valor máximo medido para el fosfopéptido tau.

20 Tabla 5

				OD de la dilución 1:5 del líquido sobrenadante	
	EC50 del péptido tau fosforilado (µg/ml)	EC50 del péptido tau no fosforilado (µg/ml)	concentración de IgG en el líquido sobrenadante (µg/ml)	KLH (mE)	MCAK (mE)
Mab 005	< 0,003	3,727	5,818	0,026	0,067
Mab 019	< 0,003	1,076	6,958	0,026	0,023
Mab 020	0,002	>3,369	3,369	0,016	0,010

Mab 085	0,0009	0,146	6,46	0,029	0,062
Mab 086	0,0011	0,266	8,84	0,046	0,104
Mab 097	0,0013	1,281	19,87	0,042	0,029

Se comprueba también la especificidad con respecto a la tau pS422 de longitud completa soluble y agregada. Se recubre a t.amb. durante una noche una placa de microvaloración MaxiSorb (Nunc) basada en poliestireno con los agregados fibrilares de la tau pS422 (300 µg/ml). De igual manera se recubre una placa de microvaloración MaxiSorb con la tau soluble de longitud completa y con la tau pS422. Se añaden el anticuerpo de control de conejo anti-tau pS422 (Abcam AB51071) o anticuerpos de conejo purificados y se incuban durante 60 min en concentraciones de hasta 1000 ng/ml. Después de un lavado intensivo se determina la unión de los anticuerpos de conejo empleando un anticuerpo de detección IgG de oveja anti-conejo conjugado con digoxigenina (Chemicon AQ301D). Después de la incubación con TMB a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 370 nm - 492 nm. Se caracteriza la unión del anticuerpo por sus valores EC50. Los resultados se recogen en la tabla 6.

Tabla 6

Mab de conejo	EC50 de la proteína tau pS422 (µg/ml)	EC50 de la proteína tau (µg/ml)	EC50 de la tau pS422 fibrilar (µg/ml)
Mab 005	0,00034	sin unión	0,00755
Mab 019	0,00038	sin unión	0,00059
Mab 020	0,00036	sin unión	0,00042
Mab 085	0,00025	sin unión	0,00074
Mab 086	0,00023	sin unión	0,00048
Mab 097	0,00040	sin unión	0,01358

Los anticuerpos monoclonales de conejo se unen a la proteína tau-pS422 con valores EC50 inferiores a 1 ng/ml. Se detecta la tau pS422 fibrilar con valores EC50 situados entre 0,4 ng/ml y 14 ng/ml. Las señales de unión a la proteína tau de longitud completa no fosforilada no se pueden distinguir de los niveles de la línea de base. Por lo tanto, se estima que los anticuerpos se unen a la tau pS422 y a la tau pS422 fibrilar con una selectividad por lo menos 100 superior si se compara con la Tau.

10 b) Biacore

Se investiga también la unión a los agregados de la tau pS422 fibrilar y se confirman con un análisis BIAcore. Las mediciones se realizan a 37°C con un instrumento BIAcore 3000. El tampón del sistema y del muestreo es el HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, un 0,005% de Polisorbato 20 (v/v)). Se somete un chip sensor BIAcore CM5 al procedimiento de preacondicionado. Se inyectan sucesivamente SDS del 0,1 %, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H₃PO₄ 100 mM durante 30 s para células de flujo FC1, FC2, FC3 y FC4. Se efectúa el procedimiento de condensación con amina con arreglo a las instrucciones del fabricante empleando el programa informático BIAcore 3000 Wizard v. 4.1. Después de la activación con EDC/NHS de la superficie del sensor, se inmoviliza un anticuerpo mAb <TAU>M-4/53-IgG anti-tau no fosfoselectivo sobre células de flujo sensoras FC2, FC3 y FC4. Como control se captura un anticuerpo contra la CK-MM (isotipo de creatinaquinasa), que recogen a un antígeno irrelevante, sobre la FC1. Se diluyen el mAb <TAU>M-4/53-IgG y el anticuerpo contra

la CK-MM a razón de 30 µg/ml en NaAc 10 mM de pH 5,0 y se inyectan a razón de 10 µl/min durante un tiempo de contacto de 7 min para inmovilizar 10.000 RU del sistema de captura de anticuerpo. Se desactiva la superficie por saturación con etanolamina 1M. Se acondiciona el sensor durante 5 ciclos con proteína tau fosforilada filamentosa (solución patrón 0,3 mg/ml diluida 1:100 en HBS-EP) como analito en una solución de 10 µl/min durante 2 min. Se efectúa la regeneración con glicina 10 mM de pH 2,5 a razón de 30 µl/min durante 3 min.

10 Se supone que la unión del analito con el mAb 4/53 no disocia los filamentos de la pTau, porque no se observa la disociación de los filamentos de la pTau del mAb 4/53. Para los restantes ciclos de medición se diluyen 0,3 mg/ml de filamentos de pTau en proporción 1:100 con tampón HBS-EP y se inyectan a

15 razón de 10 µl/min durante 1 min con el fin de presentar la pTau a los respectivos analitos de anticuerpo en modo sandwich homogéneo. Se diluyen los analitos de anticuerpo en tampón HBS-EP hasta una concentración de 100 nM y se inyectan en el sistema a razón de 20 µl/min durante 3 min. Después de una

20 disociación de 3 min se regenera la superficie del sensor con 2 inyecciones de glicina 10 mM de pH 2,5 durante 1 min con 100 µl/min y posterior lavado con HBS a razón de 100 µl/min durante 15 s. Se hace el seguimiento de las fases de asociación y disociación de las interacciones. Dado que el analito

25 del anticuerpo en solución es bivalente, se caracteriza la cinética del anticuerpo pTau cargado de avidéz con modelo bifásico de disociación, que consiste en un paso de disociación temprana basada en la afinidad en ayunas y un cinético

paso posterior de avidéz estabilizada, pero limitador de la velocidad de la disociación del complejo ulterior. 10 s (temprano) y 50 s (tardío) después de finalizada la inyección del analito se determinan cuantitativamente la k_d y la $t/2$ disoc, si es posible. Las mediciones cinéticas se evalúan con un procedimiento de doble referencia. En primer lugar se sustrae la señal de la referencia FC1 para corregir el efecto de masa del tampón y la unión inespecífica. En segundo lugar se sustrae la inyección de analito 0 nM para corregir la disociación de los anticuerpos primarios del correspondiente sistema de captura. Se evalúan las velocidades cinéticas empleando un modelo de ajuste de disociación 1,1 de Langmuir 1.1 con arreglo al programa informático de evaluación Biacore v. 4.1. Se calcula la vida media (min) de estabilidad del complejo antígeno/anticuerpo con arreglo a la fórmula $\ln(2)/60 \cdot k_d$.

Los resultados se recogen en la tabla 7.

Tabla 7

	temprano (10 s)		tardío (50 s)	
clon	k_d (1/s)	$t/2$ disoc (min)	k_d (1/s)	$t/2$ disoc (min)
Mab 005	2.19E-03	5.3	3.12×10^{-3}	4
Mab 019	1.43E-02	0.8	6.17×10^{-4}	19
Mab 020	3.28E-03	3.5	4.08×10^{-4}	28
Mab 085	n.d.	n.d.	6.60×10^{-4}	18
Mab 086	1.62E-03	7.2	3.68×10^{-4}	32
Mab 097	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Ejemplo 12

Unión de los anticuerpos monoclonales de conejo anti-tau pS422 a la pTau intracelular de secciones de cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer.

5 Se efectúa la detección inmunohistoquímica específica y sensible de la patología pTau en los tejidos de cerebros que han sufrido la enfermedad de Alzheimer con anticuerpos monoclonales de conejo anti-tau pS422 anticuerpos con ensayos de tinción inmunofluorescente empleando criosecciones de tejido
10 cerebral humano de pacientes de la AD. Básicamente, este procedimiento es el mismo que se ha descrito en el ejemplo X (anticuerpo murinos). Las IgG de conejo se detectan con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo conjugados con AlexaFluor488 (Invitrogen/MolecularProbes A11034). La tinción
15 específica y sensible de los depósitos y filamentos de pTau se evidente para los clones Mab 005, Mab 019, Mab 020, Mab 085, Mab 086 y Mab 097. Son notables los depósitos de pTau intracelular, al igual que los ovillos neurofibrilares grandes y hebras alargadas de neurópilo. Se determina la concen-
20 tración mínima eficaz que se sitúa entre 0,08 y 0,016 µg/ml para todos los clones investigados, lo cual indica una unión muy sensible con respecto a los depósitos genuinos de pTau humana.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo que se une a la Tau fosforilada en la serina 422 (Tau pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento Tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la Tau pS422, pero que no se une a la Tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, para el uso en el tratamiento de una Tauopatía.

2. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo es de los subtipos IgG1 o IgG4 humanos.

3. Uso de un anticuerpo que se une a la Tau fosforilada en la serina 422 (Tau pS422), caracterizado porque se une específicamente al fragmento Tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la Tau pS422, pero no se une a la Tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una Tauopatía.

4. Uso según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho anticuerpo es de los subtipos IgG1 o IgG4 humanos.

5. Un anticuerpo que se une a la Tau, fosforilada en la serina 422 (Tau pS422), caracterizado porque contiene:

a) la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7 y CDR3H de la SEQ ID NO: 8,

b) la CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H de la SEQ ID NO: 24 y CDR3H de la SEQ ID NO: 25,

c) la CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32 y CDR3H de la SEQ ID NO: 33,

- d) la CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H de la SEQ ID NO: 40 y CDR3H de la SEQ ID NO: 41,
- e) la CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48 y CDR3H de la SEQ ID NO: 49,
- 5 f) la CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56 y CDR3H de la SEQ ID NO: 57, o
- g) la CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64 y CDR3H de la SEQ ID NO: 65.

6. Un anticuerpo según la reivindicación 5, caracteri-
10 zado porque contiene

- a) la CDR1H de la SEQ ID NO: 6, CDR2H de la SEQ ID NO: 7, CDR3H de la SEQ ID NO: 8 y CDR1L de la SEQ ID NO: 3, CDR2L de la SEQ ID NO: 4, CDR3L de la SEQ ID NO: 5,
- b) la CDR1H de la SEQ ID NO: 23, CDR2H de la SEQ ID NO: 24,
15 CDR3H de la SEQ ID NO: 25 y CDR1L de la SEQ ID NO: 27, CDR2L de la SEQ ID NO: 28, CDR3L de la SEQ ID NO: 29,
- c) la CDR1H de la SEQ ID NO: 31, CDR2H de la SEQ ID NO: 32, CDR3H de la SEQ ID NO: 33 y CDR1L de la SEQ ID NO: 35, CDR2L de la SEQ ID NO: 36, CDR3L de la SEQ ID NO: 37,
- 20 d) la CDR1H de la SEQ ID NO: 39, CDR2H de la SEQ ID NO: 40, y CDR3H de la SEQ ID NO: 41, y CDR1L de la SEQ ID NO: 43, CDR2L de la SEQ ID NO: 44, CDR3L de la SEQ ID NO: 45,
- e) la CDR1H de la SEQ ID NO: 47, CDR2H de la SEQ ID NO: 48, CDR3H de la SEQ ID NO: 49 y CDR1L de la SEQ ID NO: 51, CDR2L
25 de la SEQ ID NO: 52, CDR3L de la SEQ ID NO: 53,
- f) la CDR1H de la SEQ ID NO: 55, CDR2H de la SEQ ID NO: 56, CDR3H de la SEQ ID NO: 57 y CDR1L de la SEQ ID NO: 59, CDR2L de la SEQ ID NO: 60, CDR3L de la SEQ ID NO: 61, o

g) la CDR1H de la SEQ ID NO: 63, CDR2H de la SEQ ID NO: 64, CDR3H de la SEQ ID NO: 65 y CDR1L de la SEQ ID NO: 67, CDR2L de la SEQ ID NO: 68, CDR3L de la SEQ ID NO: 69.

5 7. Un anticuerpo según la reivindicación 6, caracterizado porque contiene

- a) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 1 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 2,
- b) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 26 y una cadena
- 10 larga variable de la SEQ ID NO: 22,
- c) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 34 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 30,
- d) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 42 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 38,
- 15 e) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 50 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 46,
- f) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 58 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 54, o
- g) una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 66 y una cadena
- 20 larga variable de la SEQ ID NO: 62.

8. Un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 7, caracterizado por ser de los subtipos IgG1 o IgG4 humanos.

9. Un anticuerpo quimérico, humanizado o carente del epítotope de las células T, variante del anticuerpo según las

25 reivindicaciones de 5 a 8.

10. Uso de un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una Tauopatía.

11. Uso según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho anticuerpo es de los subtipos IgG1 o IgG4 humanos.

12. Una composición farmacéutica, caracterizada porque contiene un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9.

13. Uso de un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9 para la fabricación de una composición farmacéutica.

10 14. Uso de un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9 para el tratamiento de una Tauopatía elegida entre el grupo formado por la enfermedad de Alzheimer (AD), incluida la forma de enfermedad de solo ovillos, el síndrome de Down (casos adultos), el complejo de parkinsonismo-demencia de 15 Guam, la demencia pugilística, la enfermedad de Pick, la demencia con gránulos argirófilos, la demencia fronto-temporal, la degeneración córtico-basal, la degeneración pálido-ponto-nigral, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker con ovillos.

20 15. Método para la fabricación de una composición farmacéutica, caracterizada porque contiene un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9.

16. Ácido nucleico, caracterizado porque codifica un dominio variable de cadena larga y/o a dominio variable de cadena corta de un 25 anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9.

17. Método para la producción de un anticuerpo recombinante humano o humanizado según las reivindicaciones de 5 a 9, caracterizado porque expresa un ácido nucleico según la reivindicación

16 en una célula hospedante procariota o eucariota y porque recupera anticuerpo de dicha célula o del líquido sobrenadante del cultivo celular.

18. Método para el tratamiento de un paciente que sufre una
5 Tauopatía, en especial una AD, caracterizado porque se administra al paciente un anticuerpo según las reivindicaciones de 5 a 9.

19. Uso de un anticuerpo, caracterizado porque se une específicamente al mismo epítotope de la Tau fosforilada en la serina 422, al que se une el anticuerpo que contiene una cadena corta variable de la
10 SEQ ID NO: 1 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 2, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una Tauopatía.

20. Uso según la reivindicación 19, caracterizado porque el anticuerpo es de los subtipos IgG1 o IgG4.

15

21. Un anticuerpo caracterizado porque se une específicamente al mismo epítotope de la Tau fosforilada en la serina 422, al que se une un anticuerpo que contiene una cadena corta variable de la SEQ ID NO: 1 y una cadena larga variable de la SEQ ID NO: 2, para el uso en el trata-
20 miento de una Tauopatía.

22. Un anticuerpo para el uso según la reivindicación 20, caracterizado porque el anticuerpo es de los subtipos IgG1 o IgG4.

23. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une a la Tau, fosforilada en la serina 422 (Tau pS422), el cual se une específicamente al
25 fragmento Tau fosforilado de la SEQ ID NO: 9 y a la Tau pS422, pero que no se une a la Tau ni al fragmento MCAK fosforilado de la SEQ ID NO: 17, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Listado de secuencias

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
<120> Uso de un anticuerpo anti-tau pS422 para el tratamiento de enfermedades cerebrales
10 <130> 26157 FT
<150> EP 09007656.3
<151> 2009-06-10
15 <150> EP 09008487.2
<151> 2009-06-30
<160> 73
20 <170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 112
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
25 <400> 1
Glu Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
30 Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
35 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
40 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Pro Gly Val Pro
50 55 60
45 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
50 Ile Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
55 <210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
60

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

5 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr
20 25 30

10 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Ala Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

15 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Asn Val
50 55 60

20 Arg Glu Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asp Thr Leu Tyr
65 70 75 80

25 Leu Gln Met Ser Arg Leu Glu Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

30 Thr Arg Arg Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Gly Ser Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

35 <210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40 <400> 3

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

45 <210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

50 <400> 4

Arg Met Ser Thr Leu Ala Pro
1 5

55 <210> 5
<211> 9
<212> PRT

60 <213> *Mus musculus*

<400> 5
Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5
5
<210> 6
<211> 5
<212> PRT
10 <213> *Mus musculus*
<400> 6
Thr Tyr Gly Met Ser
15 1 5
<210> 7
<211> 17
20 <212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 7
25 Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Asn Val Arg
1 5 10 15
30 Glu
<210> 8
<211> 12
35 <212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 8
40 Arg Tyr Gly Tyr Asp Gly Gly Gly Ser Phe Asp Val
1 5 10
<210> 9
45 <211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> FOSFORILACIÓN
55 <400> 9
Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp
1 5 10 15
60
<210> 10

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 10
 Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 10
 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 11
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 20
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 25
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 30 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 35 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 40 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 45
 <210> 12
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 12
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 55
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30
 60
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

35 40 45

5 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

10 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

15 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

20 <210> 13
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

30 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

35 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

40 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

45 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

50 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

55 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

60 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

5 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

10 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

15 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

20 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

25 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

30 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

35 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

40 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

45 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

50 <210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 14

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

60 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

	20	25	30
5	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45		
10	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60		
15	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80		
20	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95		
25	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 100 105 110		
30	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125		
35	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140		
40	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 145 150 155 160		
45	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175		
50	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190		
55	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205		
60	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220		
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu 225 230 235 240		
	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255		
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270		

115

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
5

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
10

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

15 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 15
20 <211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15
25 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

30 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
40

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

45 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

50 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
55 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
60

- 90 -

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

5 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

10 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

15 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

20 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

25 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

30 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

35 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

40 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

45 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 16
50 <211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16
55 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

60 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

5 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 10 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 15 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 20 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 25 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 30 Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 35 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 40 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 45 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 50 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 55 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 60 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 65 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 70 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 75 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

5 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

10 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

15 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

20 <210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> FOSFORILACIÓN

30 <400> 17
Ile Gln Lys Gln Lys Arg Arg Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Ala
1 5 10 15

35 <210> 18
<211> 37
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador

45 <400> 18
aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc
37

50 <210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador

60 <400> 19
ccattggtga ggggtgccga g
21

<210> 20

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

5 <220>
<223> Cebador

<400> 20
aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc
10 34

<210> 21
<211> 26
15 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 21
cagagtrctg ctgaggttgt aggtac
26

25 <210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 22

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

35 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Ser Asn Ala
20 25 30

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

45 Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

50 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Gly Asp
85 90 95

55 Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

60 <210> 23

<211> 10
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 23

Gly Leu Ser Leu Ser Ser Asn Ala Ile Asn
1 5 10

10 <210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 24

Tyr Ile Ser Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

20 <210> 25
<211> 3
<212> PRT
25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 25

Gly Asp Leu
30 1

<210> 26
<211> 112
35 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 26

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

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn
45 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
50 35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
55 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80

60 Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Ser Cys Asp Ser Ser
85 90 95

Ser Asn Asn Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

5

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
10 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 27

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

<210> 28
<211> 7
20 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 28

25 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 29
30 <211> 13
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 29

35 Leu Gly Ser Cys Asp Ser Ser Ser Asn Asn Cys Val Ala
1 5 10

40 <210> 30
<211> 114
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 30

45

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

50

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr
20 25 30

55 Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile Gly
35 40 45

60 Phe Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Ser Trp Thr Arg Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

5 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly
85 90 95

10 Gly Gly Ser Gly Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

15

<210> 31
<211> 10
20 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 31

25 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr Met Asn
1 5 10

<210> 32
30 <211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 32

35 Phe Ile Asn Ser Gly Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Ser Trp Thr Arg Gly
1 5 10 15

40 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

45 <400> 33

Tyr Gly Gly Gly Ser Gly Phe Asp Leu
1 5

50 <210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

55 <400> 34

Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
1 5 10 15

60

- 97 -

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Arg
20 25 30

5 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

10 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80

20 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ile Asn Ile Phe
85 90 95

Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105

25 <210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 35

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Arg Leu Ala
1 5 10

35 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 36

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

45 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
50 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 37

55 Ala Gly Gly Tyr Ile Asn Ile Phe Ala
1 5

60 <210> 38
<211> 109
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 38

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

10 Leu Thr Leu Thr Cys Lys Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp
20 25 30

15 Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
35 40 45

Ala Ile Ser Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

20 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Thr
65 70 75 80

25 Ser Pro Thr Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ser
85 90 95

30 Ser Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
100 105

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
35 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 39

40 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Asn
1 5 10

<210> 40
<211> 16
45 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 40

50 Ala Ile Ser Thr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

55 <210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 41

60 Gly Ser Ser Ile

1

5 <210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 42
Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Ser
1 5 10 15

15 Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn
20 25 30

20 Tyr Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

25 Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln
65 70 75 80

30 Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Asn
85 90 95

35 Ser Ala Asp Cys Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

40 <210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

45 <400> 43
Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10

50 <210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

55 <400> 44
Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

60

- 100 -

<210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
5
<400> 45
Leu Gly Gly Tyr Asp Cys Asn Ser Ala Asp Cys Trp Ala
1 5 10
10
<210> 46
<211> 108
<212> PRT
15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 46
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
20 1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Ser Ser Asn Ala
25 20 25 30
Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
30 35 40 45
Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60
35 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
Ser Pro Thr Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Lys Ser Asn
40 85 90 95
Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
45 100 105
<210> 47
<211> 10
<212> PRT
50 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 47
Gly Leu Ser Leu Ser Ser Asn Ala Ile Asn
55 1 5 10
<210> 48
<211> 16
<212> PRT
60 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 48
5 Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 49
<211> 3
10 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 49
15 Ser Asn Ile
1

<210> 50
20 <211> 111
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 50
25 Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly Ile
1 5 10 15

30 Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Lys
20 25 30

35 Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

40 Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

45 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys
65 70 75 80

45 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Tyr Asp Cys Ser Ile
85 90 95

50 Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

55 <210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 51
60 Gln Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Lys Leu Ala

1 5 10

5 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 52
 Ser Ala Ser Thr Leu Asp Ser
 1 5

15 <210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 53
 Leu Gly Tyr Tyr Asp Cys Ser Ile Ala Asp Cys Val Ala
 1 5 10

25 <210> 54
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 54
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

35 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala
 20 25 30

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

45 Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

50 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80

55 Ser Pro Thr Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Lys Ser Asn
 85 90 95

60 Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Leu
 100 105

<210> 55

<211> 10
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 55

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Asn Ala Ile Asn
1 5 10

10
<210> 56
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

15
<400> 56

Tyr Ile Ala Val Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

20
<210> 57
<211> 3
<212> PRT
25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 57

Ser Asn Ile
30 1

<210> 58
<211> 111
35 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 58

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Lys
45 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu Ile
50 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
55 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys
65 70 75 80

60 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser Ile
85 90 95

Ala Asp Cys Val Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

5

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 59

Gln Ser Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Lys Leu Ala
15 1 5 10

<210> 60
<211> 7
20 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 60

25 Ser Ala Ser Thr Leu Asp Phe
1 5

<210> 61
30 <211> 13
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 61

35 Leu Gly Tyr Phe Asp Cys Ser Ile Ala Asp Cys Val Ala
1 5 10

40 <210> 62
<211> 109
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

45 <400> 62

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

50 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ser
20 25 30

55 Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

60 Phe Ile Gly Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

- 105 -

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

5 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
85 90 95

10 Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 63
15 <211> 10
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 63
20 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ser Ile Thr
1 5 10

25 <210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 64

Phe Ile Gly Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

35 <210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 65

Gly Gly Asp Leu
1

45 <210> 66
<211> 109
<212> PRT

50 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 66

Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
55 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Asn Val Tyr Asn Asn Asn
20 25 30

60

- 106 -

Lys Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

5 Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys
50 55 60

10 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu
65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Gly Asn
85 90 95

15

Ile Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105

20
<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

25
<400> 67

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

30
<210> 68
<211> 7
<212> PRT
35 <213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 68

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
40 1 5

45
<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
<400> 69

50 Leu Gly Gly Tyr Ser Gly Asn Ile Tyr Thr
1 5 10

55
<210> 70
<211> 104
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

60

<400> 70
Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp
1 5 10 15
5
Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr
20 25 30
10
Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr
35 40 45
15
Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr
50 55 60
20
Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser
65 70 75 80
His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val
85 90 95
25
Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
100
30
<210> 71
<211> 323
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*
35
<400> 71
Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly
1 5 10 15
40
Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30
45
Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn
35 40 45
50
Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
55
Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys
65 70 75 80
Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala
85 90 95
60

- 108 -

	Pro	Ser	Thr	Cys	Ser	Lys	Pro	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				100					105					110		
5	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			115					120					125			
10	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln
		130					135					140				
15	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Thr	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Gln	Val
	145					150					155					160
20	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Ile
					165					170					175	
25	Arg	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Ala	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Arg	Gly
				180					185					190		
30	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	His	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			195					200					205			
35	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val
		210					215					220				
40	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Pro	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser
	225					230					235					240
45	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Asn	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu
				245					250						255	
50	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	Asp	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Ala
			260						265					270		
55	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ser	Val
			275					280					285			
60	Pro	Thr	Ser	Glu	Trp	Gln	Arg	Gly	Asp	Val	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Met
		290					295					300				
65	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Ile	Ser	Arg	Ser
	305					310					315					320
70	Pro	Gly	Lys													

- 109 -

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5
<400> 72

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

10
Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

15
Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

20
Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

25
Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

30
Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

35
Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

<210> 73
<211> 324
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40
<400> 73

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
1 5 10 15

45
Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

50
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

55
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

60
Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
65 70 75 80

- 110 -

	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	
				85						90					95		
5	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	
			100						105					110			
10	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	
			115					120						125			
15	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	
		130					135					140					
20	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	
	145					150					155					160	
	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	
				165						170					175		
25	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
			180						185					190			
30	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	
			195					200					205				
35	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	
	210						215					220					
40	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	
	225					230					235					240	
	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	
				245						250					255		
45	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	
			260						265					270			
50	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	
		275						280					285				
55	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	
	290						295					300					
60	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	
	305					310					315					320	

- 111 -

Ser Pro Gly Lys

Fig. 1

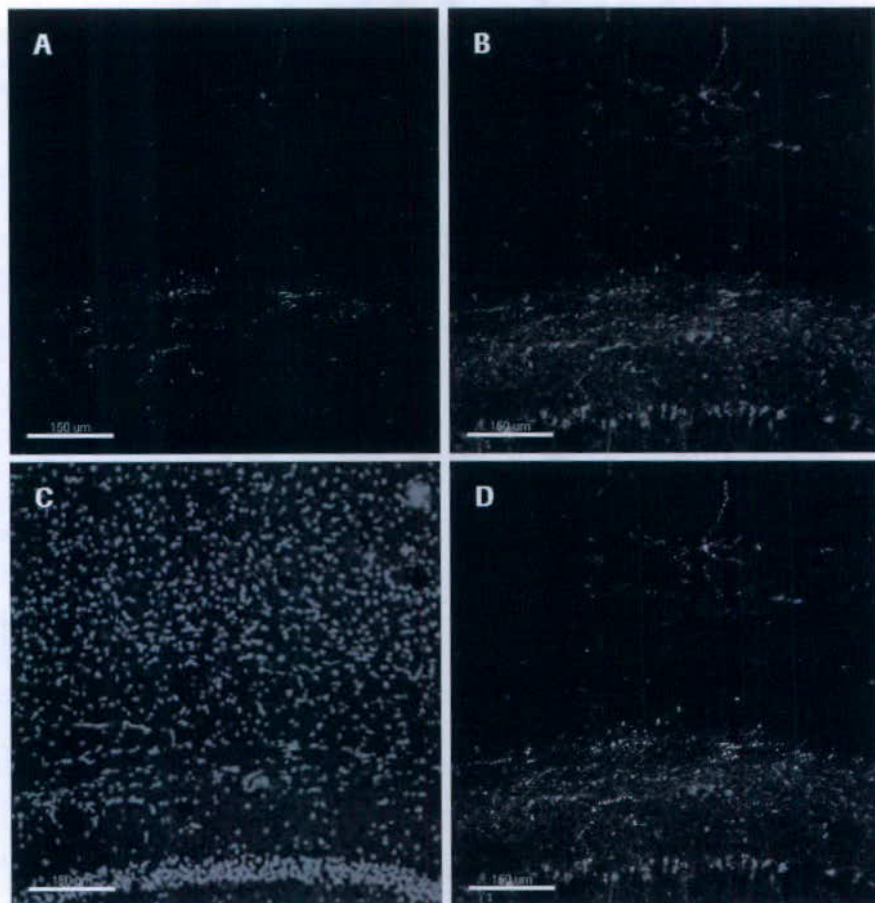


Fig. 2

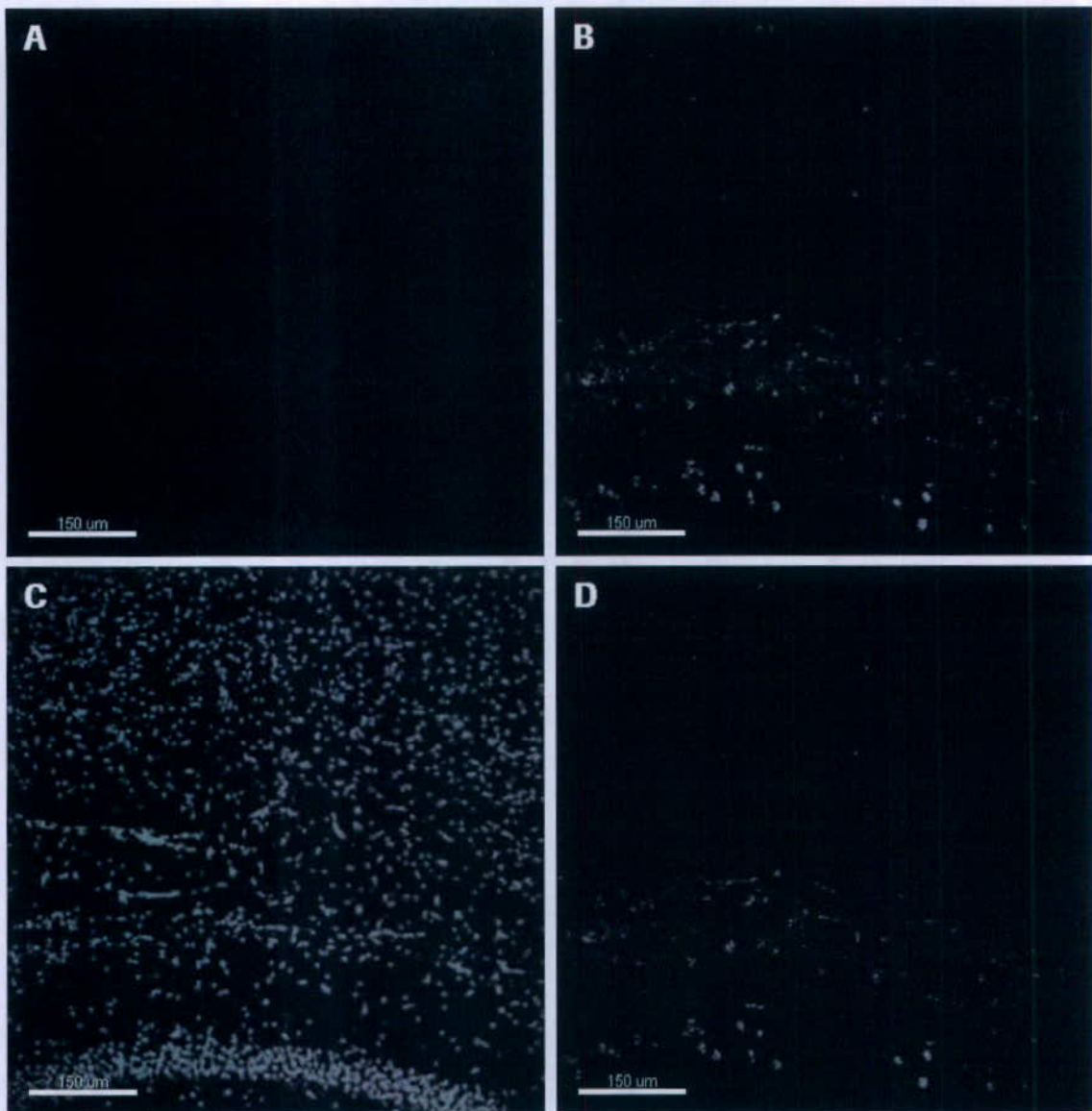
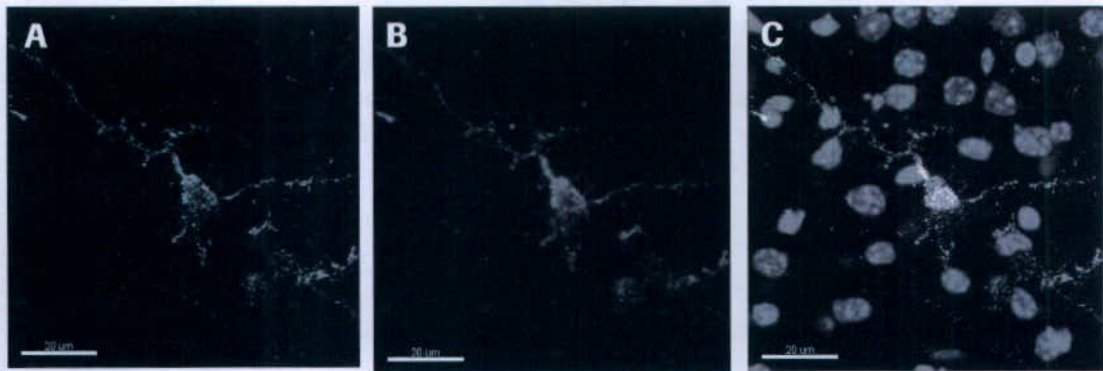
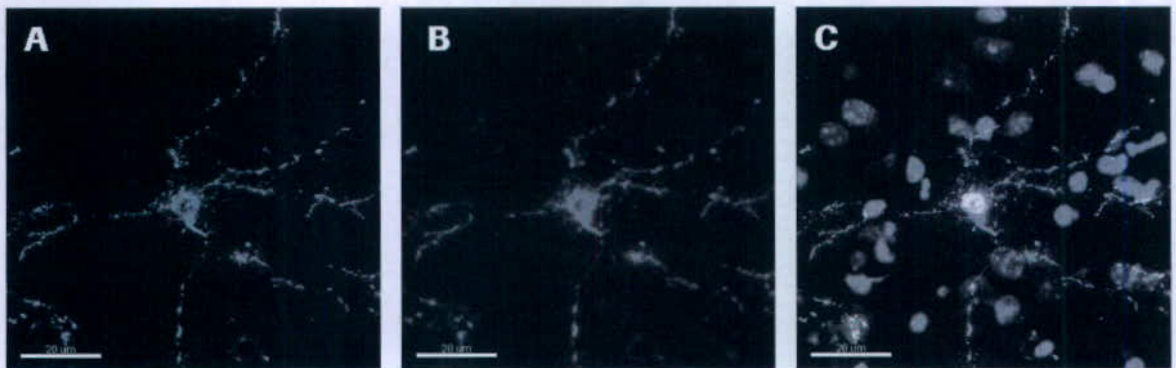


Fig. 3



5 Fig. 4



10 Fig. 5

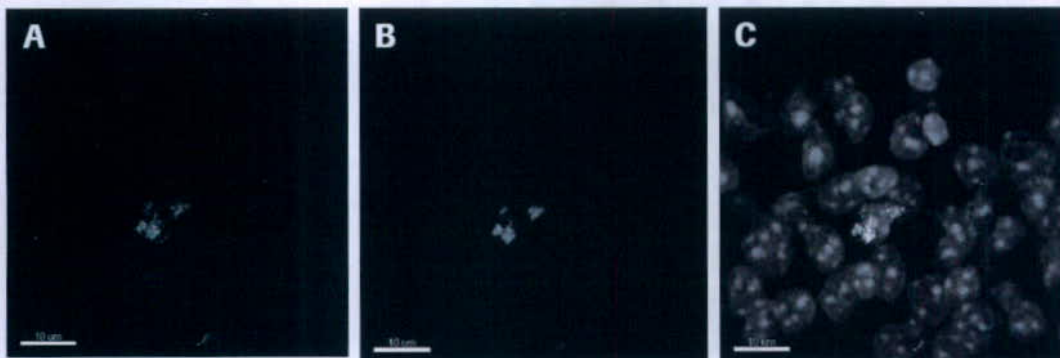
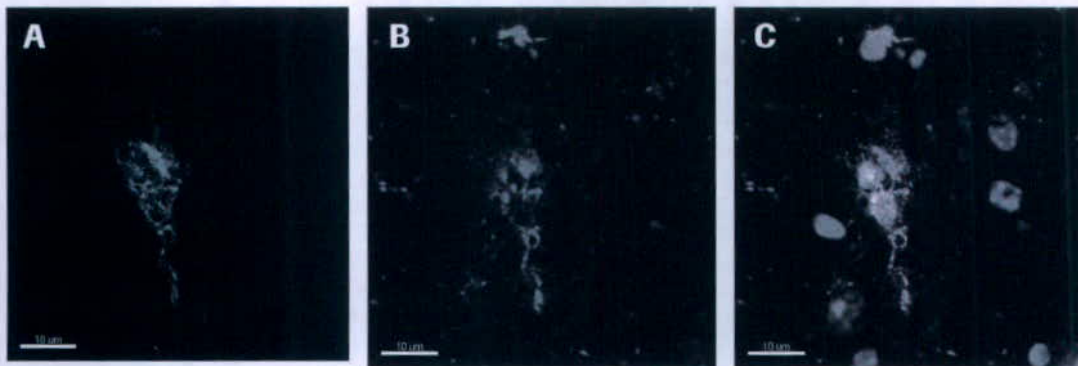


Fig. 6



5

Fig. 7

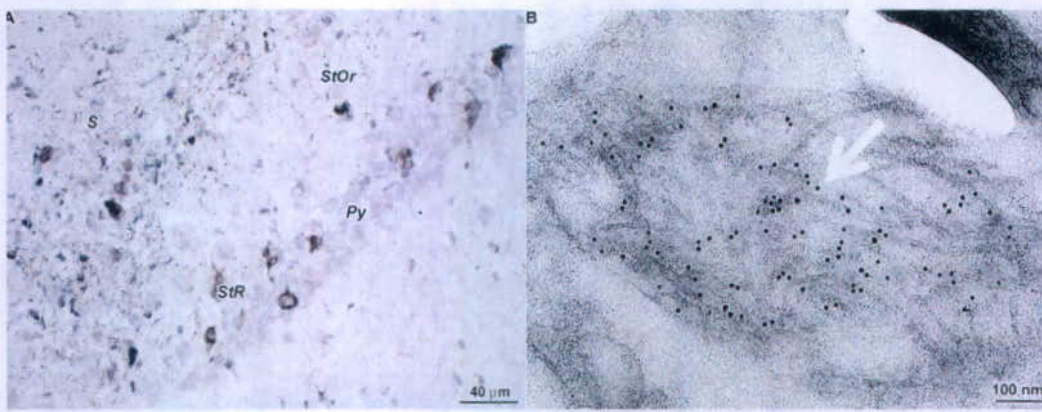


Fig. 8

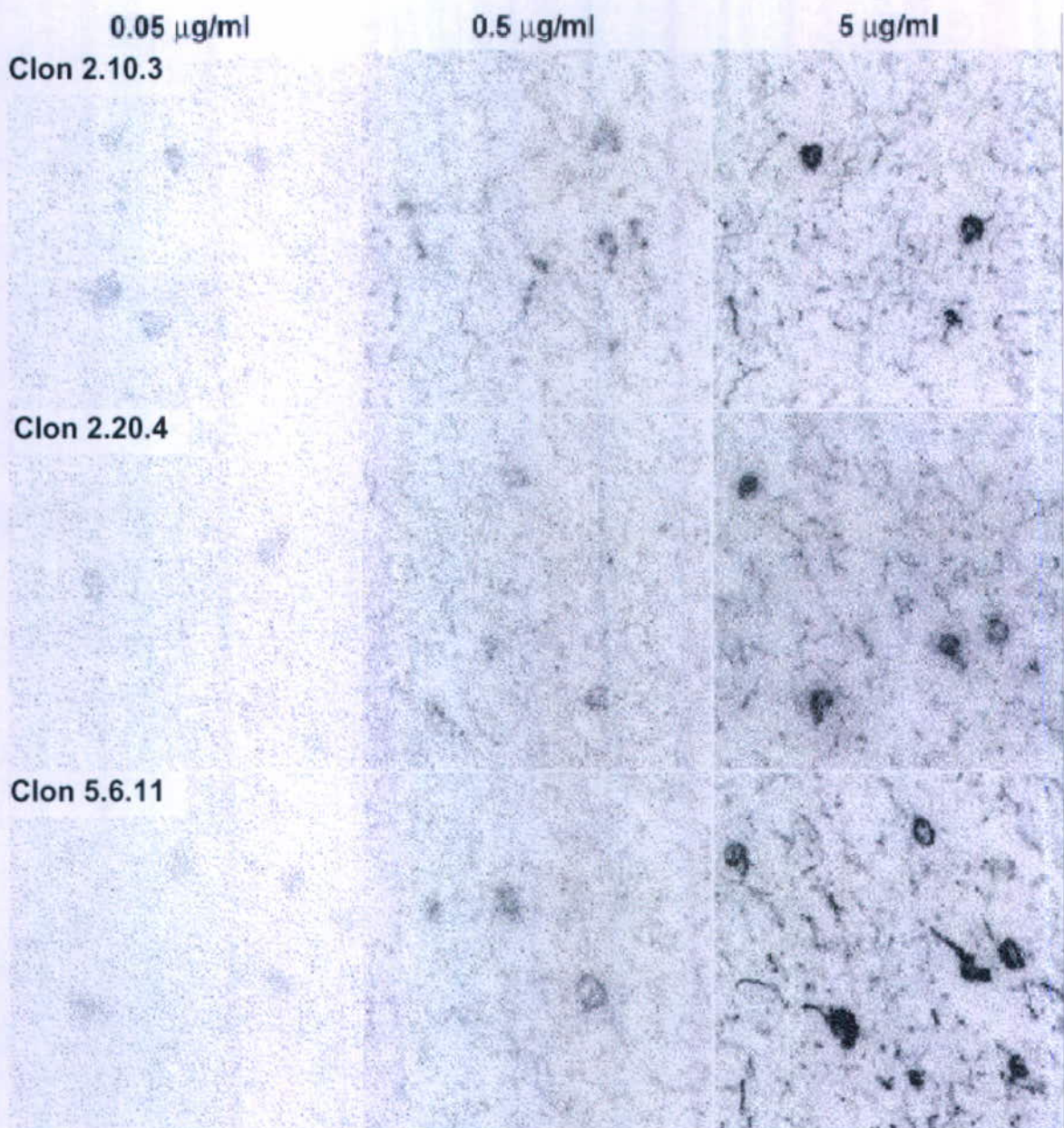


Fig. 9a

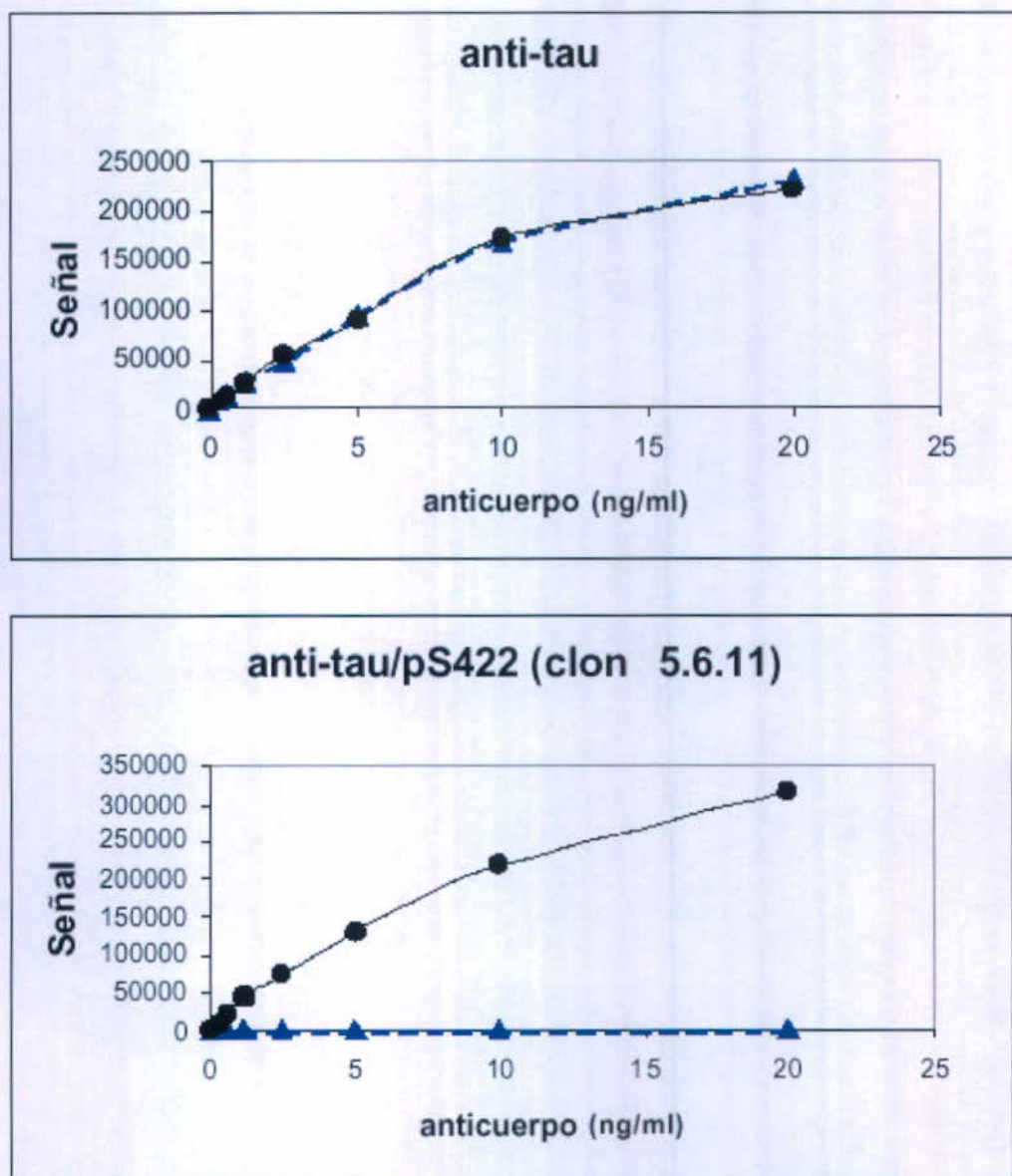
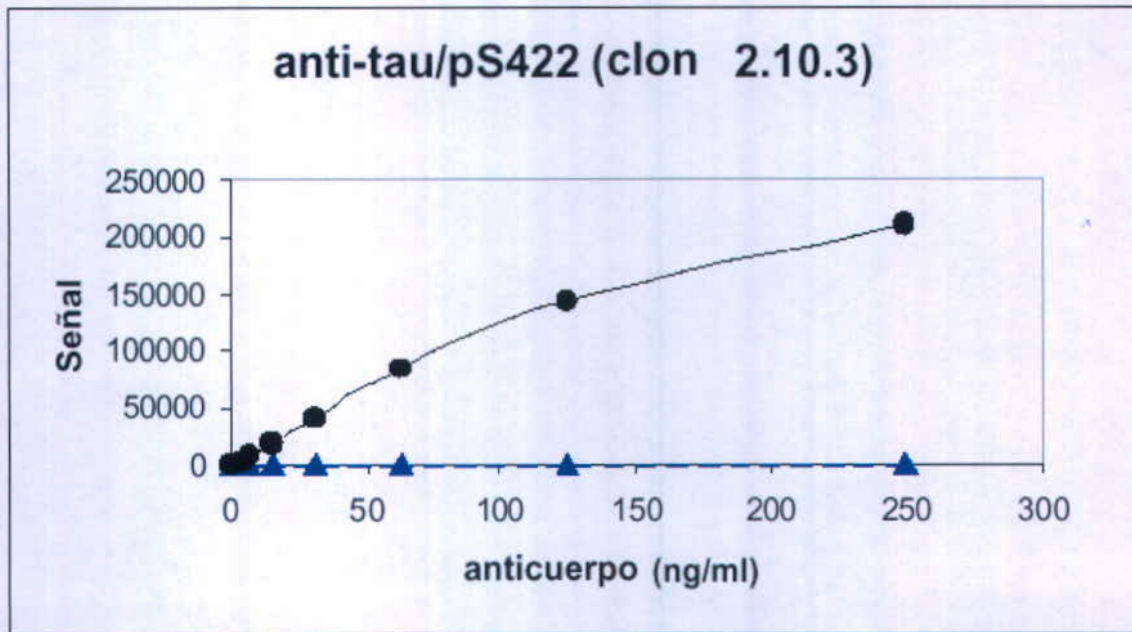


Fig. 9b



5

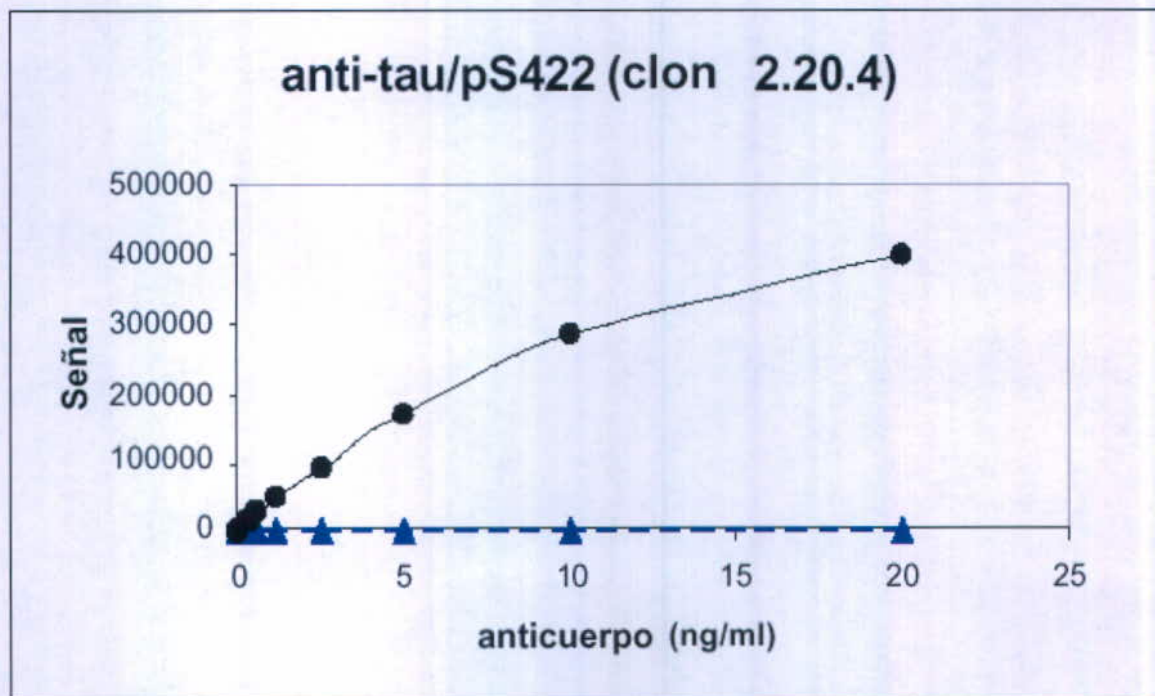


Fig. 10

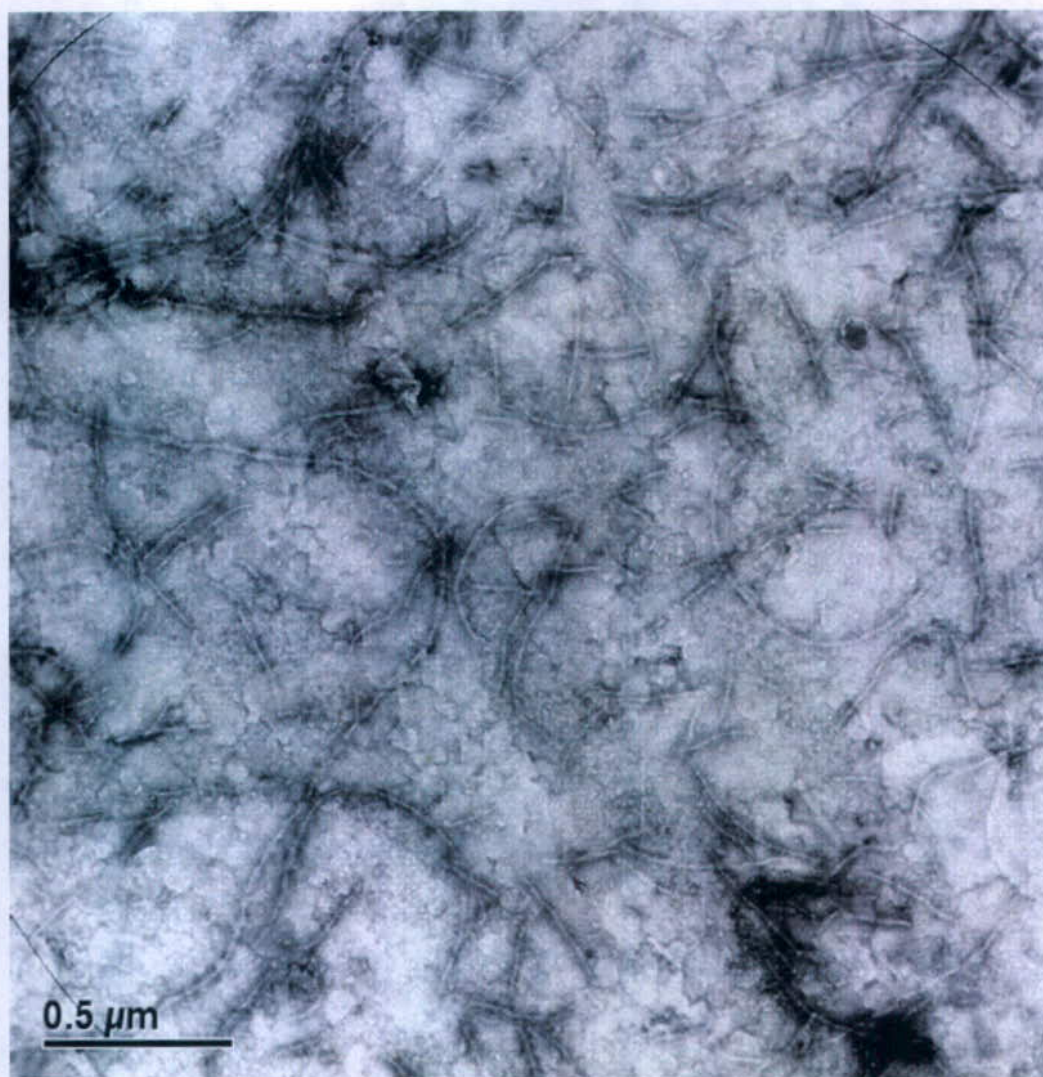
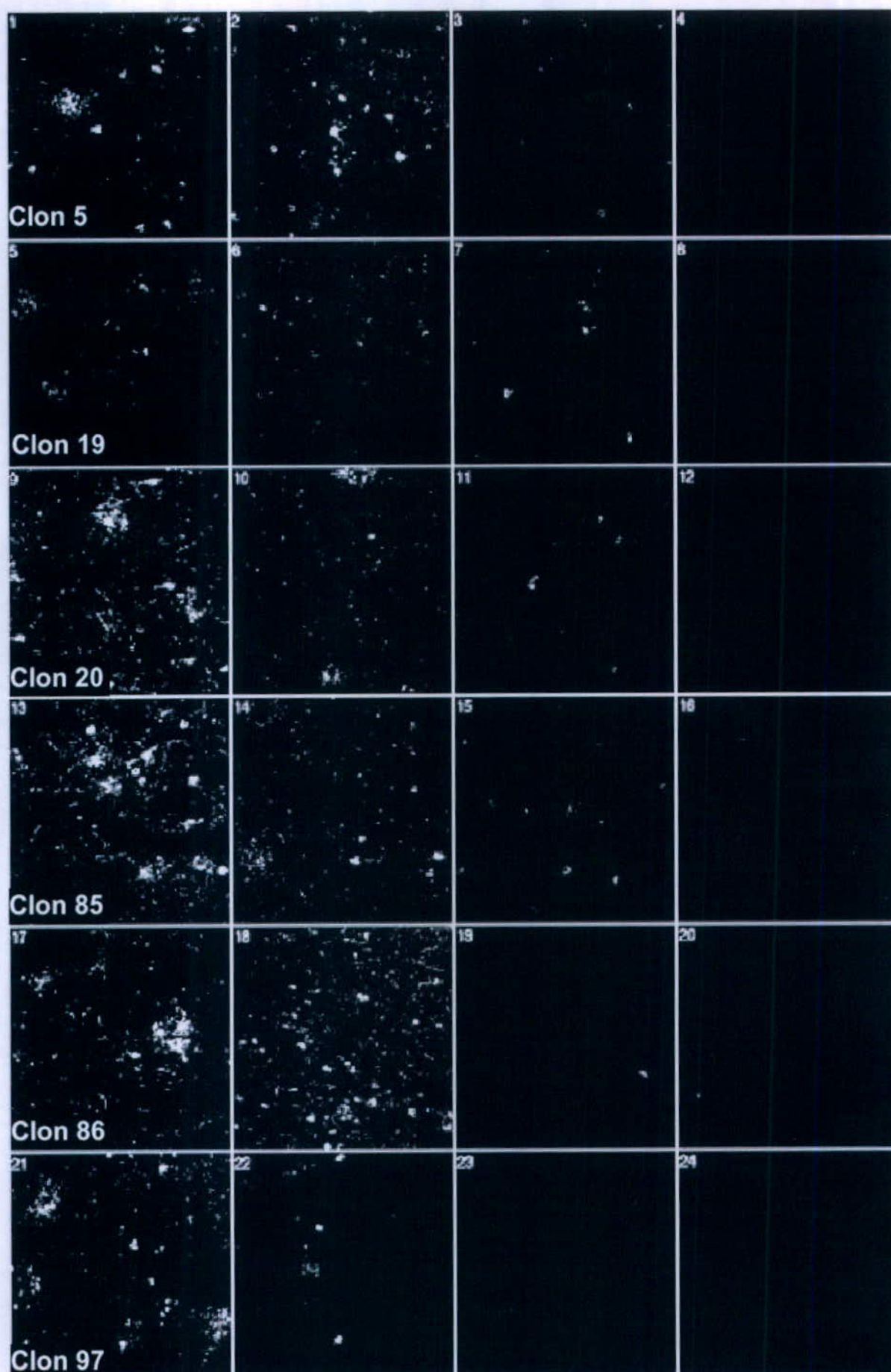


Fig. 11



742

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que solicita una patente
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art .33 Decisión 486/00, Circular Única

- (1) ☒ Indicación que se solicita una PCT
- (2) ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resume)
- (139) ☒ Dibujos de ser estos pertinentes.
- (2) ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación grafica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐