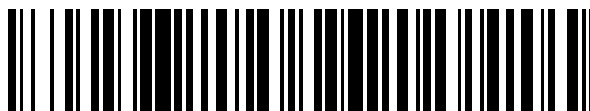


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 442**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/IB2012/002246**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041962**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12788639 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2758433**

54 Título: **Terapia basada en proteínas y diagnóstico de una patología mediada por tau en la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

19.09.2011 US 201161536339 P

30.05.2012 US 201261653115 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**AXON NEUROSCIENCE SE (100.0%)
4 Arch, Makariou & Kalograion, Nicolaides, Sea
View City, Block C, 5th Floor, Flat 506
Larnaca, Cyprus, CY**

72 Inventor/es:

**NOVÁK, MICHAL;
KONTSEKOVÁ, EVA;
KOVÁČECH, BRANISLAV y
ZILKA, NORBERT**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 656 442 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia basada en proteínas y diagnóstico de una patología mediada por tau en la enfermedad de Alzheimer.

5 **Campo**

10 Son divulgados en la presente memoria unos procedimientos basados en proteínas, (por ejemplo, anticuerpos, péptidos) y unos medios para interferir en la producción y la eliminación de ciertas formas de tau que están implicadas en la promoción y/o el desarrollo de agregados de tau-tau patológicos en la enfermedad de Alzheimer, así como procedimientos para producir anticuerpos anti-tau que son útiles para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. La presente divulgación se refiere además a unos procedimientos y unos medios para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, incluyendo unos procedimientos para determinar el estadio y evaluar la progresión del tratamiento.

15 **Antecedentes**

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que destruye estructuras cerebrales superiores, tales como las implicadas en la memoria y la cognición. La enfermedad conduce a déficits de la función cognitiva y deterioros de la memoria, aprendizaje, lenguaje y de la capacidad para realizar movimientos intencionados y decididos. La AD también es acompañada por deterioro conductual, emocional, interpersonal y social conjunto. Estos déficits cognitivos y conductuales dificultan la vida (Burns *et al.*, 2002). Los pacientes con AD de estadio tardío son con frecuencia incapaces de hablar, comprender el lenguaje, y controlar sus propios cuidados básicos personales, requiriendo con el tiempo cuidados y supervisión a tiempo completo, y con frecuencia dependen de los miembros de la familia y residencias con asistencia médica. La AD es la principal causa de demencia senil, y se predice que aumente su prevalencia a medida que aumenta la proporción de personas mayores en la población. Se predice que el número total de personas con AD aumentará por lo menos tres veces únicamente entre 2000 y 2050, haciendo de la AD un problema de salud pública global (Sloane *et al.*, 2002). El tratamiento clínico de la AD sigue siendo en gran medida paliativo. Es decir, se proporciona a los pacientes unos tratamientos dirigidos para la prevención, el control o el alivio de las complicaciones y los efectos secundarios de la AD, y para mejorar su comodidad y calidad de vida. Aún hay una necesidad no cubierta de tratamientos que se dirijan directamente al proceso de la enfermedad y tengan efectos modificadores de la enfermedad.

La AD se caracteriza histológicamente por la presencia de placas extraneuronales y ovillos neurofibrilares intracelulares y extracelulares en el cerebro. Las placas están compuestas principalmente por β amiloide ($A\beta$), mientras que los ovillos comprenden formas patológicas de tau, tales como conformeros patológicos de tau y sus agregados. La relación entre placas y ovillos y el proceso de enfermedad siguen sin resultar claros, aunque algunos estudios sugieren una relación entre la patogénesis de amiloide y de tau (Hardy *et al.*, 1998; Oddo *et al.*, 2004; Rapoport *et al.*, 2002; Roberson, *et al.*, 2007; Shipton *et al.*, 2011). Se propuso inicialmente un papel central para $A\beta$ en la patología de AD en una hipótesis llamada la "cascada de $A\beta$ ", en la que la deposición de $A\beta$ es seguida de fosforilación de tau y formación de ovillos, y después muerte neuronal (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Selkoe, 2002; para una revisión véase, Walsh y Selkoe, 2004; véase también Seabrook *et al.* 2007). En consecuencia, los enfoques terapéuticos iniciales para AD se centraron principalmente en dirigirse a $A\beta$. Sin embargo, existe una falta de correlación documentada entre el alcance de la patología de $A\beta$ en el cerebro en los pacientes de AD y la progresión clínica de la enfermedad (Braak y Braak, 1991). Además, los individuos asintomáticos han mostrado deposición de amiloides extensiva, con frecuencia difusa, en la autopsia (Braak y Braak, 1991), y por lo menos en AD de estadio temprano, se produce pérdida neuronal y deposición de amiloides en diferentes regiones del cerebro (Carter y Lippa, 2001). Por lo tanto dirigirse a $A\beta$ solamente no puede ser suficiente para alterar el proceso de enfermedad en ninguno o todos los pacientes. No obstante, las terapias que se dirigen a la enfermedad más avanzadas que se someten a ensayos clínicos en pacientes con AD siguen siendo las dirigidas a la producción y eliminación de $A\beta$. Estas terapias incluyen inmunoterapias pasivas, por ejemplo, BAPINEUZUMAB, SOLANEUZUMAB y PONEZUMAB, así como el inhibidor de gamma-secretasa de moléculas pequeñas SEMAGACESTAT (para una revisión véase Citron *et al.*, 2010).

Se ha demostrado un papel reconocido para tau en la patología de AD en numerosos estudios. Por ejemplo, Braak mostró que la correlación más próxima para la neurodegeneración por AD era la presencia de ovillos de tau, y no de placas amiloides (Braak y Braak, 1991). En otro estudio, la neurotoxicidad de $A\beta$ en neuronas cultivadas parecía depender de tau (Rapoport *et al.*, 2002). Recientemente, la reducción de tau endógena evitó déficits conductuales en ratones transgénicos que expresaban la proteína precursora amiloide humana, sin alterar sus niveles de $A\beta$ altos (Roberson *et al.*, 2007). La reducción de tau también protegió ratones tanto transgénicos como no transgénicos contra la excitotoxicidad. Misma referencia. Santacruz *et al.* demostraron que una reducción de la cantidad de tau restauró la función de memoria en un modelo de tauopatía (Santacruz *et al.*, 2005). Por lo tanto, las terapias dirigidas a reducir tau pueden representar una estrategia eficaz para tratar AD y otras enfermedades relacionadas con tau.

Tau pertenece a una familia de proteínas intrínsecamente desordenadas, caracterizadas por la ausencia de una estructura tridimensional rígida en su ambiente fisiológico (Zilka *et al.*, 2008) Sin embargo, el truncamiento de tau

y su hiperfosforilación pueden provocar transformaciones patológicas de un estado intrínsecamente desordenado a múltiples estructuras desordenadas erróneamente solubles e insolubles, incluyendo filamentos helicoidales emparejados (PHF) y otros agregados (Wischnik *et al.*, 1988a; Wischnik *et al.*, 1988b; Novak *et al.*, 1993; Skrabana *et al.*, 2006; Zilka *et al.*, 2008; Kovacech *et al.*, 2010). Estos cambios estructurales conducen a una ganancia de función tóxica, a una pérdida de función fisiológica de la proteína nativa, o ambos (Zilka *et al.*, 2008; Kovacech *et al.*, 2010).

La función fisiológica de tau es la mediación del ensamblaje de monómeros de tubulina en microtúbulos que constituyen la red de microtúbulos neuronal (Buee *et al.*, 2000). Tau se une con microtúbulos mediante regiones repetidas localizadas en la parte C-terminal de la proteína. Misma referencia. Estos dominios repetidos (R1-R4), no son idénticos entre sí, sino que comprenden 31-32 aminoácidos altamente conservados (Taniguchi *et al.*, 2005b). En el cerebro humano, se encuentran seis isoformas únicas de tau, que difieren entre sí por la presencia o ausencia de ciertos aminoácidos en la parte N-terminal de tau, en combinación con tres (R1, R3, y R4) o cuatro (R1-R4) dominios repetidos, en el extremo C terminal de la proteína. Véase también figura 1, que muestra las seis isoformas humanas (2N4R, 1N4R, 2N3R, 0N4R, 1N3R y 0N3R). Se ha propuesto que la parte más potente de tau para inducir polimerización de microtúbulos es la región 274-KVQIINKK-281 (SEC ID nº 113), que se solapa con R1-R2. Misma referencia. Además, las funciones patológicas y fisiológicas de tau parecen resultar afectadas por la conformación estructural específica, y la estructura desordenada intrínsecamente, adoptadas por las isoformas proteicas de longitud completa y sus fragmentos. Por ejemplo, Kontsekova *et al.* describieron una región conformacional (que comprende los restos 297- IKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSL-325 (SEC ID nº 114)) dentro de ciertas moléculas tau truncadas que tenían una relación significativa con la función de las moléculas tau truncadas en el ensamblaje de microtúbulos (documento WO 2004/007547).

Además de su función fisiológica, se cree que las repeticiones de tau participan en la formación de agregados de tau patológicos y otras estructuras. Por lo tanto, existe la necesidad de enfoques terapéuticos y de diagnóstico dirigidos a tau que puedan diferenciar entre actividades mediadas por repetición fisiológicas y patológicas. Por ejemplo, el núcleo resistente a pronasa de filamentos helicoidales emparejados (PHF) patológicos consiste en las regiones de unión a microtúbulos de isoformas de tau de 3 y 4 repeticiones (Jakes *et al.*, 1991; Wischnik, *et al.* 1988a; Wischnik, *et al.* 1988b). Además, Novak *et al.* mostraron que el núcleo resistente a proteasa de los PHF, que es de 93-95 aminoácidos de longitud, se restringía a tres repeticiones en tándem (Novak *et al.*, 1993). Von Bergen *et al.* determinaron un motivo de interacción/péptido de tau mínimo (306-VQIVYK-311, SEC ID nº 115), así como un segundo sitio en tau (275-VQIINK-280) (SEC ID nº 116), que forman láminas beta y se describen como potencialmente responsables del inicio de la formación de PHF, un agregado de tau patológico (Von Bergen *et al.*, 2000; documentos EP 1 214 598, WO 2001/18546). Véase la figura 2 para un mapa funcional de tau. En consecuencia, las estrategias actuales se dirigen a la generación de fármacos antiagregantes que no alteran el papel intracelular de tau en la estabilización de microtúbulos.

Además, aunque en circunstancias fisiológicas tau se considera una proteína citoplásmica intracelular, puede liberarse tau intracelular al espacio extracelular y contribuir a la neurodegeneración (Gómez-Ramos *et al.*, 2006). De hecho, la pérdida neuronal se ha relacionado con la distribución topográfica de los ovillos neurofibrilares (compuestos de proteína tau) en cerebros con AD (West *et al.*, 1994; Gómez-Isla *et al.*, 1996, 1997). Además, los niveles de tau total y tau fosforilada aumentan en el líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes con AD (Hampel *et al.*, 2010), y la tau extracelular se ha descrito como "ovillos fantasma" en el cerebro (Frost y Diamond, 2009), lo que indica que se libera tau intracelular al espacio extracelular. Además, los agregados de tau extracelulares pueden entrar en células y estimular la formación de fibrillas de tau intracelular, sembrando adicionalmente monómeros de tau para la producción de agregados de tau patológicos (Frost *et al.*, 2009). Dichos estudios han destacado que la tau insoluble, extracelular podría actuar como un agente transmisible para propagar la patología de tau por todo el cerebro de una manera de tipo priónico (Frost *et al.*, 2009; Frost y Diamond, 2009). La eliminación de los ovillos de tau extracelulares puede reducir la patología extracelular e intracelular asociada a tau. Véase, por ejemplo, Asuni *et al.*, 2007. Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos que puedan reducir tau extracelular, bien impidiendo su formación, promoviendo su eliminación, o ambos, así como de tratamientos que reduzcan la tau de enfermedad intracelular.

En general, aunque tau parece desempeñar un papel patológico en la manifestación clínica de AD, el desarrollo de fármacos que actúen contra tau ha sido lento, en parte debido a la importancia de tau en la dinámica fisiológica de los microtúbulos y a su biología compleja (Dickey y Petrucelli, 2006). Sin embargo, una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a las transformaciones patológicas de tau ha abierto la posibilidad de dirigirse específicamente a modificaciones patológicas de tau para fines terapéuticos. Como resultado, han surgido varios enfoques terapéuticos que se dirigen directa o indirectamente a la cascada de tau (para artículos de revisión, véase, por ejemplo, Dickey y Petrucelli, 2006; Schneider y Mandelkow, 2008; Zilka *et al.*, 2008), incluyendo compuestos que previenen o invierten la agregación de tau (Wischnik *et al.*, 1996; Necula *et al.* 2005; Pickhardt *et al.*, 2005; Taniguchi *et al.*, 2005a; Larbig *et al.*, 2007), fármacos de tipo molécula pequeña que inhiben las tau cinasas o activan tau fosfatasa (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2004; Noble *et al.*, 2005, Iqbal y Grundke-Iqbal, 2007), fármacos estabilizadores de microtúbulos (Zhang *et al.*, 2005.), fármacos que facilitan la degradación proteolítica de proteínas tau plegadas erróneamente (Dickey *et al.*, 2005, Dickey *et al.* 2006; Dickey y Petrucelli, 2006), y fármacos inmunosupresores (Zilka *et al.*, 2008), así como estrategias inmunoterapéuticas incluyendo inmunización activa y pasiva (Schneider y Mandelkow *et al.*, 2008; Zilka *et al.*, 2008; Tabira, T.

Immunization Therapy for Alzheimer disease: A Comprehensive Review of Active Immunization Strategies. *Tohoku J. Exp. Med.*, 220: 95-106 (2010)).

Más en general, los anticuerpos monoclonales nuevos (mAb) han estado introduciéndose en estudios clínicos a un índice de más de 40 cada año desde 2007. A finales de 2010, por lo menos 25 mAb y cinco proteínas de fusión Fc estaban en estudios clínicos de fase 2/3 o fase 3 en los Estados Unidos (Reichert, 2011). Esta tendencia demuestra que la inmunoterapia pasiva es un enfoque creciente en el tratamiento de trastornos humanos, incluyendo AD. Véase, por ejemplo, Citron *et al.*, 2010. De hecho, aunque los tratamientos de AD se enfrentan al obstáculo de superar la barrera hematoencefálica (BBB), un número creciente de estudios preclínicos y clínicos indican que las terapias mediadas por anticuerpo pueden eliminar agregados de AD del cerebro, y proponen múltiples mecanismos de acción, tales como (i) captación de anticuerpos en el cerebro mediante una permeabilidad de la BBB alterada en AD, o una filtración de BBB; (ii) anticuerpos que actúan como "sumideros periféricos" para especies amiloides formadoras de placas solubles, (iii) entrada de células secretoras de anticuerpos de la periferia al cerebro, suministrando los anticuerpos localmente, y (iv) transporte de IgG dentro de y entre las células. Véase, por ejemplo, Citron *et al.*, 2010, y Asuni *et al.*, 2007, para una revisión. En consecuencia, los anticuerpos terapéuticos que se dirigen a formas de enfermedad de tau representan un enfoque posible para el tratamiento y/o diagnóstico de AD y otras tauopatías (documentos WO 2004/007547, US2008/0050383).

Uno de los enfoques inmunoterapéuticos para dirigirse a patología de tau se basa en la noción de que los anticuerpos anti-tau podrían evitar la agregación de tau, eliminar agregados de tau, o ambos. Aunque los estudios han descrito anticuerpos que se unen con secuencias de tau, y se ha indicado que algunos de esos anticuerpos interfieren con la agregación y eliminación de tau (Asuni *et al.*, 2007), no se ha indicado que ningún anticuerpo anti-tau monoclonal se esté sometiendo a ensayos clínicos o preclínicos *in vivo* en AD. De hecho, se ha predicho que un mAb tenía tres sitios de unión dentro del dominio de unión a microtúbulo de tau murino (concretamente, en R3, R4 y posiblemente R1), pero no bloqueaba la unión de microtúbulos. (Dingus *et al.*, 1991). Dingus no describió un papel para este anticuerpo en la agregación de tau y, por lo tanto, no hay razón para creer que el Dingus bloquee la agregación de tau. En otros informes, se han generado mAb que distinguen isoformas de tau, pero de nuevo no se sugiere que tengan ningún efecto en la agregación de tau (DeSilva *et al.*, 2003; Ueno *et al.*, 2007). Taniguchi *et al.* demostraron que ciertos mAb anti-tau contra R1 o R2 inhibían la agregación en PHF *in vitro*, promoviendo a la vez el ensamblaje de tubulina inducido por tau (Taniguchi *et al.*, 2005b). Los anticuerpos RTA-1 y RTA-2 de Taniguchi se unieron específicamente a R1 y R2, respectivamente. Ninguno de los anticuerpos se unió a más de una repetición de tau y no se ha indicado que ninguno se ensayara con respecto a efectos *in vivo* en la agregación o eliminación de tau. A pesar de la existencia de por lo menos tres anticuerpos anti-amiloides en ensayos clínicos para terapia basada en inmunización pasiva de AD (es decir, una en la que los anticuerpos se administran al paciente), no están disponibles aún informes de ensayos clínicos de inmunoterapias basadas en tau pasivas para AD.

Se descubrió que un enfoque de inmunización activa (es decir, uno en el que el cuerpo del paciente en sí mismo genera inmunidad contra la diana) era eficaz en la eliminación de depósitos de A β e inversión de lesiones neuropatológicas en varios estudios de ratones transgénicos de APP de AD (véase, por ejemplo, Schenk *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000; Sigurdsson *et al.*, 2001). Recientemente, la inmunoterapia activa con un epítipo de tau fosforilado (Tau 379-408 [P-Ser 396, 404]) redujo el alcance de tau agregado en el cerebro y ralentizó la progresión del fenotipo conductual en modelos de ratón de patología de ovillos de tau (Asuni *et al.*, 2007; Boutajangout *et al.* 2010; documentos US2008/0050383; US/2010/00316564). Los animales tratados produjeron anticuerpos anti-tau, que se detectaron en el cerebro y se localizaron conjuntamente con anticuerpos que reconocían tau patológica (Asuni *et al.*, 2007). Este enfoque inmunoterapéutico era sustancialmente más eficaz en los estadios tempranos de alteraciones funcionales en los animales (5 meses) que en estadios tardíos (8 meses), lo que sugiere que la eliminación de tau patológica en estadio temprano puede ser terapéuticamente beneficioso (Asuni *et al.*, 2007; Zilka *et al.*, 2008). De hecho, es conocido que no toda la tau es susceptible o quizás incluso adecuada para alteración y eliminación. Algunos han sugerido que la alteración de agregados de tau podría aumentar la abundancia de especies intermedias tóxicas, mientras que otros han sugerido que los agregados de tau detectables no son necesariamente tóxicos y pueden incluso desempeñar un papel protector (Lee *et al.*, 2005). Por lo tanto, aunque los enfoques inmunoterapéuticos para dirigir a tau han sido prometedores de forma preclínica, aún existe la necesidad de productos terapéuticos que se dirijan específicamente a formas tempranas, aberrantes de tau cuya eliminación produzca beneficios duraderos, mejorados. No obstante, existe también la necesidad de identificar las especies de tau que sean dianas adecuadas para inmunoterapia.

Para este fin, otra consideración para desarrollar mAb contra tau es la identificación y caracterización de las diversas formas estructurales de tau (fisiológica, de enfermedad temprana, de enfermedad tardía) y los estadios de patología de tau diana. Oddo *et al.* observaron que aunque la inmunoterapia de A β eliminó placas de A β y patología de tau temprana en un modelo de ratón transgénico de AD, los agregados de tau madura permanecían intactos (Oddo *et al.*, 2004). De forma similar, una reducción genética (no inmunoterapéutica) de la expresión de tau en un modelo de tau P301L de tauopatía mejoró la memoria, incluso aunque se continuaron acumulando ovillos neurofibrilares (Santacruz *et al.*, 2005).

A pesar de su prevalencia, la AD sigue siendo la mayor necesidad médica no satisfecha en neurología (Citron,

2010). El enfoque médico más prevalente es proporcionar terapia sintomática, lo que no es eficaz incluso después de varios años de tratamiento. Nuevos enfoques y estrategias terapéuticos para AD necesitan ir más allá del tratamiento de los síntomas para evitar el deterioro cognitivo y contrarrestar los procesos patológicos fundamentales de la enfermedad. En particular, existe la necesidad de desarrollar moléculas que interfieran solas o en combinación con otros fármacos dirigidos a AD con por lo menos algunos de los estadios más tempranos de la enfermedad. Dichas moléculas proporcionarían nuevas opciones ventajosas en el diagnóstico temprano (lo que por sí solo podría mejorar los resultados del tratamiento), prevención y tratamiento de AD.

Sumario de la invención

El objeto de la invención es definido por las reivindicaciones.

En una forma de realización, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo se une con uno o más epítomos de tau y puede dos o más de los siguientes:

- a) presentar una mayor afinidad por tau patológica que por tau fisiológica;
- b) inhibir la agregación tau-tau; y
- c) mediar en la captación y degradación de proteína tau patológica por microglía;

y en el que cada epítomo de tau comprende una región promotora de la agregación de tau.

En una forma de realización, el anticuerpo aislado es tal que cada uno del o los epítomos se seleccionan independientemente de epítomos dentro de:

- i. posición 267-273 o restos KHQPGGG (SEC ID nº 98), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 298-304 o restos KHVPGGG (SEC ID nº 99), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 329-335 o restos HHKPGGG (SEC ID nº 100), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 361 -367 o restos THVPGGG (SEC ID nº 101), en relación con tau₄₄₁.

En ciertas formas de realización, el anticuerpo aislado que presenta las propiedades descritas en las formas de realización de los párrafos anteriores puede unirse con una o más formas de tau patológica seleccionadas de tau ordenada erróneamente, tau desordenada erróneamente, tau insoluble en sarcosilo, ovillos neurofibrilares, hilos de neurópilos, y placas neuríticas en una biopsia cerebral de un paciente con enfermedad de Alzheimer humana, en una muestra cerebral de un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, o en ambos. En ciertas formas de realización, el anticuerpo aislado es tal que por lo menos uno de los epítomos que reconoce es un epítomo conformacional.

En una forma de realización, se proporciona en la presente memoria un anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo se une con uno o más epítomos de tau y puede dos o más de los siguientes:

- a) presentar una mayor afinidad por tau patológica que por tau fisiológica;
- b) inhibir la agregación tau-tau; y
- c) mediar en la captación y degradación de proteína tau patológica por microglía;

y en el que cada epítomo de tau comprende una región promotora de la agregación de tau.

En una forma de realización, este anticuerpo aislado es tal que cada uno del o los epítomos se selecciona independientemente de los epítomos dentro de:

- i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁.

En una forma de realización, este anticuerpo aislado es tal que cada uno del o los epítomos con los que se une se selecciona independientemente de los epítomos dentro de:

- i. posición 268-273 o los restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 299-304 o los restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o los restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 362-367 o los restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;

y el anticuerpo comprende:

- a) una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende:
 - i. QSLNSRTRKKNY (SEC ID nº 117) o SEC ID nº 247 para CDR1;

- ii. WAS (SEC ID nº 118) o SEC ID nº 253 para CDR2; y
- iii. KQSFYLRT (SEC ID nº 119) o una cualquiera de SEC ID nº 255, 257, 258, 259 y 260 para CDR3; y

b) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende:

- iv. GYIFTDYVIS (SEC ID nº 120), SEC ID nº 261 o SEC ID nº 262 para CDR1;
- v. IFPRSGST (SEC ID nº 121), SEC ID nº 264 o SEC ID nº 265 para CDR2; y
- vi. ARDYYGTSFAMDY (SEC ID nº 122), SEC ID nº 266, SEC ID nº 267 o SEC ID nº 269 para CDR3.

Se proporciona en la presente memoria un anticuerpo aislado, en el que dicho anticuerpo aislado se une con uno o más epítopos en tau de una manera conformacionalmente específica en el que:

a) cada uno del o los epítopos se selecciona independientemente de epítopos dentro de:

- i. posición 267-273 o restos KHQPGGG (SEC ID nº 98), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 298-304 o restos KHVPGGG (SEC ID nº 99), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 329-335 o restos HHKPGGG (SEC ID nº 100), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 361-367 o restos THVPGGG (SEC ID nº 101), en relación con tau₄₄₁;

b) cero, uno, dos o tres de los epítopos son epítopos lineales; y

c) uno, dos, tres o cuatro de los epítopos son epítopos conformacionales.

Es divulgado asimismo en la presente memoria un anticuerpo aislado, uniéndose dicho anticuerpo a uno o más epítopos en tau de una manera conformacionalmente específica en el que:

a) cada uno del o los epítopos se selecciona independientemente de epítopos dentro de:

- i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;

b) cero, uno, dos o tres de los epítopos son epítopos lineales; y

c) uno, dos, tres o cuatro de los epítopos son epítopos conformacionales.

En una forma de realización, este anticuerpo es DC8E8, en el que DC8E8 es un anticuerpo producido por el hibridoma depositado en la American Type Culture Collection Tipo con el nº de depósito de patente PTA-11994.

En ciertas formas de realización, el anticuerpo aislado se une con uno o más de los mismos epítopos en tau que los que se unen con DC8E8. En una forma de realización, el anticuerpo aislado compite con el anticuerpo monoclonal DC8E8 por la unión con tau.

La invención también proporciona un anticuerpo aislado que comprende en su dominio de unión a epítipo una o más secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) seleccionadas de:

- i. QSLNSRTRKNY (SEC ID nº 117)
- ii. WAS (SEC ID nº 118)
- iii. KQSFYLRT (SEC ID nº 119)
- iv. GYIFTDYVIS (SEC ID nº 120)
- v. IFPRSGST (SEC ID nº 121); y
- vi. ARDYYGTSFAMDY (SEC ID nº 122).

La invención también proporciona que cualquiera de los anticuerpos descritos en cualquier forma de realización descrita en los párrafos anteriores puede ser tal que el anticuerpo aislado comprenda:

a) una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende:

- i. QSLNSRTRKNY (SEC ID nº 117) para CDR1;
- ii. WAS (SEC ID nº 118) para CDR2; y
- iii. KQSFYLRT (SEC ID nº 119) para CDR3; y

b) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende:

- iv. GYIFTDYVIS (SEC ID nº 120) para CDR1
- v. IFPRSGST (SEC ID nº 121) para CDR2; y
- vi. ARDYYGTSFAMDY (SEC ID nº 122) para CDR3.

La invención también proporciona que cualquiera de los anticuerpos descritos en las formas de realización anteriores pueda ser tal que el anticuerpo aislado comprenda:

- a) una o más secuencias de las CDR de cadena ligera del anticuerpo monoclonal DC8E8, o una o más secuencias que presenten por lo menos 80%, 90% o 95% de identidad después del alineamiento óptimo con una de estas CDR de cadena ligera; y
- b) una o más secuencias de las CDR de cadena pesada del anticuerpo monoclonal DC8E8, o una o más secuencias que presenten por lo menos 80%, 90% o 95% de identidad después de alineamiento óptimo con una de estas CDR de cadena pesada;

y en el que:

- i. las CDR de cadena ligera comprenden una secuencia seleccionada de QSLNSRTRKNY (SEC ID nº 117), WAS (SEC ID nº 118), y KQSFYLRT (SEC ID nº 119); y
- ii. las CDR de cadena pesada comprenden una secuencia seleccionada de GYIFTDYVIS (SEC ID nº 120), IFPRSGST (SEC ID nº 121) y ARDYYGTSFAMDY (SEC ID nº 122).

Cualquiera de los anticuerpos descritos en las formas de realización anteriores puede consistir en o comprender un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, cualquier otro fragmento de unión a antígeno; o una parte de anticuerpo de unión a antígeno del mismo; que presenta una o más de las siguientes características de unión inmunológicas:

1. el anticuerpo se une con uno o más epítopos de tau de una manera conformacionalmente específica, en el que:
 - a) cada uno del o los epítopos de tau se selecciona independientemente de epítopos dentro de:
 - i. posición 267-273 o restos KHQPGGG (SEC ID nº 98), en relación con tau₄₄₁;
 - ii. posición 298-304 o restos KHVPGGG (SEC ID nº 99), en relación con tau₄₄₁;
 - iii. posición 329-335 o restos HHKPGGG (SEC ID nº 100), en relación con tau₄₄₁; y
 - iv. posición 361-367 o restos THVPGGG (SEC ID nº 101), en relación con tau₄₄₁;
 - b) cero, uno, dos, o tres de los epítopos son un epítipo lineal;
 - c) uno, dos, tres o cuatro de los epítopos son un epítipo conformacional;
2. El anticuerpo se une con dos o más epítopos de tau y puede presentar una mayor afinidad por tau patológica que por tau fisiológica, en el que los dos epítopos de tau se seleccionan de epítopos dentro de:
 - v. posición 267-273 o restos KHQPGGG (SEC ID nº 98), en relación con tau₄₄₁;
 - vi. posición 298-304 o restos KHVPGGG (SEC ID nº 99), en relación con tau₄₄₁;
 - vii. posición 329-335 o restos HHKPGGG (SEC ID nº 100), en relación con tau₄₄₁; y
 - viii. posición 361-367 o restos THVPGGG (SEC ID nº 101), en relación con tau₄₄₁.

Cualquiera de los anticuerpos descritos en las formas de realización anteriores puede consistir en o comprender un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, FV, cualquier otro fragmento de unión a antígeno; o una parte de anticuerpo de unión a antígeno del mismo; que presenta una o más de las siguientes características de unión inmunológicas:

1. el anticuerpo se une con uno o más epítopos de tau de una manera conformacionalmente específica, en el que:
 - a) cada uno del o los epítopos de tau se selecciona independientemente de epítopos dentro de:
 - i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
 - ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
 - iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
 - iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁.
 - b) cero, uno, dos o tres de los epítopos son un epítipo lineal;
 - c) uno, dos, tres o cuatro de los epítopos son un epítipo conformacional;
2. El anticuerpo se une con dos o más epítopos de tau y puede presentar una mayor afinidad por tau patológica que por tau fisiológica, en el que los dos epítopos de tau se seleccionan de epítopos dentro de:
 - i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;

- ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁.

- 5 Son asimismo divulgados unos anticuerpos aislados que se unen de manera competitiva con tau contra cualquiera de los anticuerpos aislados descritos en las formas de realización anteriores. En una forma de realización, el anticuerpo aislado se une de manera competitiva con tau cuando se ensaya contra DC8E8 aislado por unión con tau.
- 10 En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEC ID nº 141. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEC ID nº 138. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende SEC ID nº 141 y una cadena ligera que comprende SEC ID nº 138.
- 15 La invención proporciona que los anticuerpos proporcionados por la invención puedan seleccionarse de entre:
- a) un anticuerpo monoclonal;
 - b) un anticuerpo policlonal;
 - c) un anticuerpo recombinante;
 - 20 d) un anticuerpo quimérico;
 - e) un anticuerpo humanizado;
 - f) un anticuerpo humano; y
 - g) un fragmento de unión a antígeno o parte de unión a antígeno de uno cualquiera de (a) a (f).
- 25 Cualquiera de los anticuerpos aislados proporcionados en la presente memoria puede inducirse en un mamífero. En ciertas formas de realización, el anticuerpo aislado se produce por un animal recombinante o por una célula hospedadora recombinante.
- 30 La invención proporciona que cualquiera de los anticuerpos anti-tau aislados proporcionados en la presente memoria puedan ser tales que se marquen de manera detectable con uno o más agentes marcadores. En ciertas formas de realización, por lo menos un agente marcador se selecciona de entre una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo, un marcador de resonancia magnética nuclear, y un metal pesado.
- 35 En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende por lo menos un fármaco (agente de combinación) unido con la molécula de anticuerpo.
- 40 Son proporcionados asimismo unos ácidos nucleicos aislados que codifican por lo menos una CDR, o por lo menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina de cualquiera de los anticuerpos anti-tau descritos en las formas de realización anteriores. También se proporcionan vectores aislados que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos. Se proporciona asimismo una célula hospedadora aislada que comprende uno o más de estos ácidos nucleicos y vectores aislados.
- 45 Se proporciona asimismo una estirpe celular aislada que expresa cualquiera de los anticuerpos anti-tau descritos en las formas de realización anteriores. En una forma de realización, la estirpe celular aislada es un hibridoma. En una forma de realización, la estirpe celular aislada es el hibridoma del que se produce el anticuerpo monoclonal DC8E8, y dicha estirpe celular se ha depositado en la American Type Culture Collection Tipo, Manassas, VA, Estados Unidos, el 13 de julio de 2011, con la designación de depósito de patente de ATCC PTA-11994.
- 50 Se proporciona asimismo la utilización de cualquiera de los anticuerpos anti-tau, ácidos nucleicos y células proporcionados en la presente memoria, como un fármaco o en la preparación de un medicamento para el diagnóstico, la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada.
- 55 En algunas formas de realización, los anticuerpos están comprendidos en una composición farmacéutica, que comprende además un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende una combinación de anticuerpos y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que la combinación comprende por lo menos dos anticuerpos diferentes, y en el que cada uno de los anticuerpos se selecciona independientemente de entre los anticuerpos descritos en las formas de realización anteriores. En una forma de realización, por lo menos uno de los anticuerpos es DC8E8, o una versión humana de DC8E8, o una versión humanizada de DC8E8.
- 60 En algunas formas de realización, los anticuerpos están comprendidos en una composición, que comprende además un diluyente y/o un vehículo. La composición puede ser una composición farmacéutica, una composición de diagnóstico o cualquier otra composición. En algunas formas de realización, la composición puede comprender además por lo menos un compuesto o agente seleccionado de un marcador detectable, hemocianina de lapa californiana, toxoide del tétanos o un toxoide derivado de otras bacterias patógenas, albúminas del suero, albúmina de suero bovino, una molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma,
- 65

tiroglobulina, ovoglobulina, un epítipo de linfocitos T universal, una citocina, una quimiocina, interleucina 1-alfa (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-10, interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1 α), MIP1 β y RANTES (regulada tras activación, expresada en linfocitos T normales y secretada).

Se proporciona asimismo un artículo de fabricación (por ejemplo, un kit) para su utilización farmacéutica o diagnóstica, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende una solución de una forma liofilizada de uno cualquiera o más de los anticuerpos anti-tau proporcionados en la presente memoria. En ciertas formas de realización, el recipiente es un componente de un dispositivo o sistema para el suministro del anticuerpo a un sujeto.

Se proporciona asimismo un dispositivo médico que comprende un anticuerpo anti-tau como se proporciona en la presente memoria (ver anteriormente), en el que el dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar el anticuerpo mediante por lo menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intercerebelar, intracerebroventricular, intratecal, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraosteal, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniano, intraespinal, intrasínovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, embolada, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

En una forma de realización, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para tratar o prevenir la progresión de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de por lo menos uno de los anticuerpos anti-tau proporcionados en la presente memoria. En algunas formas de realización, el procedimiento puede reducir el deterioro motor, mejorar la función motora, reducir el deterioro cognitivo, mejorar la función cognitiva o una combinación de los mismos.

En ciertas formas de realización, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para aliviar por lo menos uno de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de por lo menos uno de los anticuerpos anti-tau proporcionados en la presente memoria.

Todavía en otra forma de realización, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para diagnosticar o explorar a un sujeto con respecto a la presencia de enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada, comprendiendo el procedimiento:

- a) poner en contacto el sujeto, o una célula, tejido, órgano, fluido o cualquier otra muestra del sujeto, con una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo anti-tau como se proporciona en la presente memoria; y
- b) determinar la presencia de un complejo que comprende tau patológica y el anticuerpo, en el que la presencia del complejo es un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada asociada con la presencia de tau patológica.

En una forma de realización relacionada, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para controlar a un sujeto con respecto a la presencia, progresión, regresión o estabilización de enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, o para determinar el estadio de enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- a) poner en contacto el sujeto, o una célula, tejido, órgano, fluido o cualquier otra muestra del sujeto, con una cantidad eficaz de por lo menos uno de los anticuerpos anti-tau proporcionados en la presente memoria; y
- b) determinar la presencia y/o las características de un complejo que comprende tau patológica y el anticuerpo, en el que la presencia del complejo es un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada asociada con la presencia de tau patológica.

En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por vía intracerebroventricular, por vía intratecal o como un aerosol.

En algunas formas de realización de los procedimientos para tratar o prevenir la progresión de enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, y de los procedimientos para aliviar por lo menos uno de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, la cantidad eficaz de cada anticuerpo es de por lo menos 1 mg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de cada anticuerpo es de por lo menos 10 mg/kg de peso corporal del sujeto, por

5 dosis. En algunas formas de realización, por lo menos uno de los anticuerpos se administra en múltiples dosificaciones durante un período de por lo menos seis meses. En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra de forma periférica a un sujeto humano para ejercer sus efectos beneficiosos. En algunas formas de realización, el anticuerpo, cuando se administra de forma periférica a un sujeto humano, se une con tau soluble, tau insoluble en sarcosilo, o ambas. En algunas formas de realización, el anticuerpo, cuando se administra de forma periférica a un sujeto humano, se une con tau, en el que tau está en una o más formas patológicas seleccionadas de tau ordenada erróneamente, tau desordenada erróneamente, tau insoluble en sarcosilo, ovillos neurofibrilares, hilos de neurópilos, y placas neuríticas en una biopsia cerebral de un paciente con enfermedad de Alzheimer humana, en una muestra cerebral de un modelo animal de enfermedad de Alzheimer. En algunas formas de realización, el anticuerpo, cuando se administra de forma periférica a un sujeto humano, ejerce uno o más efectos beneficiosos mediados por función efectora en el sujeto. En algunas formas de realización, el anticuerpo se suministra periféricamente por inyección/implantación de una célula que expresa el anticuerpo en el cerebro del sujeto. En algunas formas de realización, la célula que expresa el anticuerpo es una célula de hibridoma. En algunas formas de realización, la célula de hibridoma es un hibridoma que expresa DC8E8.

En ciertas formas de realización relacionadas, la divulgación proporciona un péptido aislado, en el que:

- a) el péptido aislado es un fragmento de tau que es de por lo menos 6 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 7 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 9 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 10 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 12 restos de aminoácidos de longitud o 30 restos de aminoácidos de longitud; y
- b) el péptido aislado comprende un epítipo terapéutico de tau.

En algunas formas de realización relacionadas, el epítipo terapéutico comprende un epítipo terapéutico seleccionado de los que están dentro de:

- i. posición 267-273 o restos KHQPGGG (SEC ID nº 98), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 298-304 o restos KHVPGGG (SEC ID nº 99), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 329-335 o restos HHKPPGGG (SEC ID nº 100), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 361-367 o restos THVPGGG (SEC ID nº 101), en relación con tau₄₄₁.

En ciertas formas de realización relacionadas, la divulgación proporciona un péptido aislado, en el que:

- a) el péptido aislado es un fragmento de tau que es de por lo menos 6 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 7 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 9 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 10 restos de aminoácidos de longitud, por lo menos 12 restos de aminoácidos de longitud, o 30 restos de aminoácidos de longitud; y
- b) el péptido aislado comprende un epítipo terapéutico de tau.

En algunas formas de realización relacionadas, el epítipo terapéutico comprende un epítipo terapéutico seleccionado de los que están dentro de:

- i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁;
- iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁.

En algunas formas de realización relacionadas, el epítipo terapéutico se selecciona de:

- i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁.

En otras formas de realización, el péptido aislado es una secuencia seleccionada de SEC ID nº 1-4, SEC ID nº 9-101 y SEC ID nº 108-112, NIKAVPGGGS (SEC ID nº 200), NIKHVPGGGS (SEC ID nº 201), IKHVPGGGS (SEC ID nº 202), KHVPGGGSV (SEC ID nº 203), HVPGGGSVQ (SEC ID nº 204), VPGGGSVQ (SEC ID nº 205), GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250), SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251), ANIKHVPGGGS (SEC ID nº 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID nº 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID nº 149), DNIAHVPGGGS (SEC ID nº 151), DNIAVPGGGS (SEC ID nº 159), DNIKHPGGGS (SEC ID nº 161) y DNIKHVPGGGS (SEC ID nº 171).

En otras formas de realización, el péptido aislado es una secuencia seleccionada de SEC ID nº 270 (TENLKHQPGGGK); SEC ID nº 271 (KHQPGGG), SEC ID nº 272 (HQPGGG); SEC ID nº 275 (ENLKHQPGGGKVIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEC ID nº 276 (KHVPGGG), SEC ID nº

277 (HVPGGG), SEC ID nº 280 (DNIKHVPGGGQIVYKPV), SEC ID nº 281 (HHKPGGG), SEC ID nº 282 (HKPGGG) y SEC ID nº 283 (THVPGGG).

En otras formas de realización, el péptido aislado es una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 270 (TENLKHQPGGGK); SEC ID nº 271 (KHQPGGG), SEC ID nº 272 (HQPGGG); SEC ID nº 275 (ENLKHQPGGGKQIINKKLDLSNVQSKGSKDNIKHVPGGGS), SEC ID nº 276 (KHVPGGG), SEC ID nº 277 (HVPGGG), SEC ID nº 280 (DNIKHVPGGGQIVYKPV), SEC ID nº 281 (HHKPGGG), SEC ID nº 282 (HKPGGG), y SEC ID nº 283 (THVPGGG); y el epítipo terapéutico se selecciona de entre:

- i. posición 268-273 o restos HQPGGG (SEC ID nº 223), en relación con tau₄₄₁;
- ii. posición 299-304 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁;
- iii. posición 330-335 o restos HKPGGG (SEC ID nº 224), en relación con tau₄₄₁; y
- iv. posición 362-367 o restos HVPGGG (SEC ID nº 154), en relación con tau₄₄₁.

En otras formas de realización, el péptido aislado es una secuencia seleccionada de SEC ID nº 272 (HQPGGG) y SEC ID nº 277 (HVPGGG).

En ciertas formas de realización, el péptido aislado está activo en por lo menos un ensayo, seleccionado de ensayos que miden la capacidad del péptido para:

- a) competir con tau por la unión con el anticuerpo monoclonal DC8E8;
- b) reducir el nivel de tau insoluble en sarcosilo, *in vivo*;
- c) promover la eliminación de tau del cerebro, *in vivo*;
- d) reducir el nivel de por lo menos un marcador bioquímico de AD, *in vivo*;
- e) reducir la carga de ovillos neurofibrilares (NFT), *in vivo*;
- f) mejorar por lo menos un parámetro neuroconductual, *in vivo*;
- g) modificar beneficiosamente el desarrollo de AD en un sujeto;
- h) reducir el nivel de tau en el cerebro, en el líquido cefalorraquídeo, o en ambos; y/o
- i) actuar como un inmunógeno en la preparación de un anticuerpo que puede competir con DC8E8 monoclonal por la unión con tau.

La divulgación también se refiere a compuestos que comprenden cualquiera de los péptidos aislados proporcionados en la presente memoria y un resto. En ciertas formas de realización, el resto es N-terminal, C-terminal, o está unido con un aminoácido interno del péptido, y en el que el resto se selecciona de entre uno o más de un resto de cisteína, un grupo fosfo, hemocianina de lapa californiana, toxoide del tétanos o un toxoide derivado de otras bacterias patógenas, albúminas del suero, albúmina de suero bovino, una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, tiroglobulina, ovoglobulina, un epítipo de linfocitos T universal, una citocina, una quimiocina, interleucina 1-alfa (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-10, interferón gamma (IFN- γ), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP1 α), MIP1 β , y RANTES (regulado tras la activación, expresado por linfocitos T normales y secretado).

También se proporcionan unas composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los péptidos aislados y/o compuestos proporcionados por la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y/o un diluyente y/o un adyuvante. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se adapta para proporcionar una dosificación del péptido o del compuesto entre 1 ng y 10 mg. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se adapta para proporcionar una dosificación del péptido o del compuesto superior a 10 microgramos.

La divulgación también se refiere a un artículo de fabricación (por ejemplo, un kit) para uso farmacéutico o de diagnóstico, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende una solución de una forma liofilizada de un péptido y/o compuesto proporcionado en la presente memoria. En algunas formas de realización, el recipiente es un componente de un dispositivo o sistema para suministro del péptido o el compuesto a un sujeto.

También se proporcionan dispositivos médicos que comprenden un péptido, un compuesto y/o una composición de péptido/compuesto como se proporciona anteriormente, en el que el dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar el anticuerpo mediante por lo menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intercerebelar, intracerebroventricular, intratecal, intracólico, intracervical, intragástrico,

intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, embolada, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

En formas de realización relacionadas, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la progresión de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de por lo menos un péptido y/o por lo menos un compuesto como se proporciona en la presente memoria. En algunas formas de realización, el procedimiento puede reducir el deterioro motor, mejorar la función motora, reducir el deterioro cognitivo, mejorar la función cognitiva o una combinación de los mismos.

En formas de realización relacionadas, la divulgación proporciona un procedimiento para aliviar por lo menos uno de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de por lo menos un péptido y/o por lo menos un compuesto como se proporciona en la presente memoria.

En algunos de estos procedimientos de tratamiento, prevención o alivio de por lo menos uno de los síntomas asociados con un procedimiento para aliviar por lo menos uno de los síntomas asociados con enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada en un sujeto, el procedimiento comprende administrar a un paciente humano un péptido y/o un compuesto como se proporciona anteriormente, y/o un adyuvante que aumenta la respuesta inmunitaria, efectuando dicho procedimiento una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra tau patológica, tratando, evitando la progresión de o aliviando de este modo por lo menos uno de los síntomas asociados con AD en el paciente humano.

Se proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que puede competir con DC8E8 por la unión con tau, comprendiendo el procedimiento inmunizar a un sujeto con por lo menos un péptido y/o con por lo menos un compuesto como se proporciona en la presente memoria. En algunas formas de realización, por lo menos un péptido es un péptido seleccionado de una cualquiera de entre SEC ID nº 1-4, SEC ID nº 9-101 y SEC ID nº 108-112, NIKHVPGGGS (SEC ID nº 201), IKHVPGGGS (SEC ID nº 202), KHVPGGGSV (SEC ID nº 203), HVPGGGSVQ (SEC ID nº 204), VPGGGSVQ (SEC ID nº 205), GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250), SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251), ANIKHVPGGGS (SEC ID nº 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID nº 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID nº 149), DNIAHVPGGGS (SEC ID nº 151), DNIKAVPGGGGS (SEC ID nº 159), DNIKHAPGGGS (SEC ID nº 161), y DNIKHVPGGGS (SEC ID nº 171). En una forma de realización, el péptido se selecciona de SEC ID nº 1-4. En otra forma de realización, el péptido es SEC ID nº 108. En una forma de realización, el péptido es GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250). En ciertas formas de realización, el péptido es SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251). En ciertas formas de realización el péptido se selecciona de SEC ID nº 270 (TENLKHQPGGGK); SEC ID nº 271 (KHQPGGG), SEC ID nº 272 (HQPGGG); SEC ID nº 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEC ID nº 276 (KHVPGGG), SEC ID nº 277 (HVPGGG), SEC ID nº 280 (DNIKHVPGGGSVQIVYKPV), SEC ID nº 281 (HHKPGGG), SEC ID nº 282 (HKPGGG), y SEC ID nº 283 (THVPGGG). En otras formas de realización, el péptido se selecciona de SEC ID nº 272 (HQPGGG) y SEC ID nº 277 (HVPGGG).

También se proporciona un procedimiento para aislar DC8E8, o aislar un anticuerpo que puede competir con DC8E8 por la unión con tau, comprendiendo el procedimiento poner en contacto DC8E8 o el anticuerpo con un péptido y/o con un compuesto como se proporciona en la presente memoria.

En formas de realización relacionadas, se proporciona un procedimiento para diagnosticar o explorar a un sujeto con respecto a la presencia de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas, comprendiendo el procedimiento:

a) poner en contacto el sujeto, o una célula, tejido, órgano, fluido o cualquier otra muestra del sujeto, con una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo como se proporciona por la invención; y

b) determinar la presencia de un complejo que comprende tau patológica y el anticuerpo, en el que la presencia del complejo es una diagnóstico de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas asociadas con la presencia de tau patológica.

En ciertas formas de realización, se proporciona un procedimiento para controlar un sujeto con respecto a la presencia, progresión, regresión o estabilización de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas, o para determinar el estadio de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

a) poner en contacto (por ejemplo, administrar) al sujeto, o una célula, tejido, órgano, fluido o cualquier otra muestra del sujeto, con una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo como se proporciona mediante por lo menos una forma de realización de la invención; y

- b) determinar la presencia y/o características de un complejo que comprende tau patológica y el anticuerpo, en el que la presencia del complejo es diagnóstica de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas asociadas con la presencia tau patológica.

5 En algunas formas de realización del procedimiento de controlar a un sujeto con respecto a la presencia, progresión, regresión o estabilización de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas, o para determinar el estadio de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, el anticuerpo, péptido y/o compuesto se administra por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intranasal, por vía intracerebroventricular, por vía intratecal, o como un aerosol. En algunas formas de
10 realización, la cantidad eficaz de cada péptido y/o compuesto es de por lo menos 1 µg por dosis, por lo menos 10 µg por dosis, por lo menos 100 µg por dosis. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de cada péptido y/o compuesto es de por lo menos 10 µg por dosis en presencia de un adyuvante, y por lo menos 100 µg por dosis en ausencia de un adyuvante. En algunas formas de realización, por lo menos un péptido o compuesto se administra en múltiples dosificaciones durante un período de por lo menos seis meses.

15 De acuerdo con una forma de realización relacionada, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la progresión de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo de la invención y/o por lo menos un péptido, y/o por lo menos un compuesto como se proporciona por la invención, en combinación con por lo menos un agente de combinación seleccionado de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), quelantes metálicos de transición, factores de crecimiento, hormonas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antioxidantes, agentes reductores de lípidos, inhibidores de fosfodiesterasa selectivos, inhibidores de la agregación de tau, inhibidores de proteína cinasas, inhibidores de proteínas de choque térmico, inmunización pasiva y activa anti-amiloide, inhibidores de agregación anti-amiloide e
20 inhibidores de secretasa. En algunas formas de realización, el procedimiento puede reducir el deterioro motor, mejorar la función motora, reducir el deterioro cognitivo, mejorar la función cognitiva o una combinación de los mismos.

25 En una forma de realización relacionada, se proporciona un procedimiento para aliviar por lo menos uno de los síntomas asociados con enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, comprendiendo el procedimiento administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo de la invención, por lo menos un péptido y/o por lo menos un compuesto como se proporciona en la presente memoria, en combinación con por lo menos un agente de combinación seleccionado de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, quelantes metálicos de transición, factores de crecimiento, hormonas, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), antioxidantes, agentes reductores de lípidos, inhibidores de fosfodiesterasa selectivos, inhibidores de agregación de tau, inhibidores de proteína cinasas, inhibidores de proteínas de choque térmico, reactivos de inmunización pasiva y activa anti-amiloide, inhibidores de agregación anti-amiloide e inhibidores de secretasa.

30 En algunas formas de realización de los procedimientos de tratamiento, prevención o alivio de por lo menos uno de los síntomas asociados con enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, el procedimiento comprende administrar a un paciente humano una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo de la invención, por lo menos un péptido, y/o por lo menos un compuesto como se proporciona en la presente memoria, y/o un adyuvante que aumenta la respuesta inmunitaria; en combinación con por lo menos un agente
35 de combinación seleccionado de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, quelantes metálicos de transición, factores de crecimiento, hormonas, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), antioxidantes, agentes reductores de lípidos, inhibidores de fosfodiesterasa selectivos, inhibidores de agregación de tau, inhibidores de proteína cinasas, inhibidores de proteínas de choque térmico, inmunización anti-amiloide pasiva y activa, inhibidores de agregación anti-amiloide, e inhibidores de secretasa; en el que el procedimiento efectúa una respuesta inmunitaria que comprende anticuerpos contra tau patológica, tratando, evitando la progresión de, o aliviando de este modo por lo menos uno de los síntomas asociados con AD en el paciente humano.

40 En algunas formas de realización de los procedimientos de tratamiento, prevención o alivio de por lo menos uno de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto, el agente de combinación se administra antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo de la invención, un péptido y/o un compuesto como se proporciona en la presente memoria.

45 En una forma de realización relacionada, la divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable; y

- 50 a) un anticuerpo de la invención; y/o
b) un péptido como se proporciona en la presente memoria; y/o
c) un compuesto como se proporciona en la presente memoria;

65 en combinación con por lo menos un agente de combinación seleccionado de inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, quelantes metálicos de transición, factores de crecimiento, hormonas,

fármacos anti-inflamatorios no esteroides (AINE), antioxidantes, agentes reductores de lípidos, inhibidores de fosfodiesterasa selectivos, inhibidores de la agregación de tau, inhibidores de proteína cinasas, inhibidores de proteínas de choque térmico, reactivos de inmunización pasivos y activos anti-amiloides, inhibidores de agregación antiamiloides e inhibidores de secretasa. En algunas formas de realización, el anticuerpo es DC8E8. En ciertas formas de realización, el anticuerpo comprende por lo menos una CDR de DC8E8. En algunas formas de realización, el anticuerpo comprende por lo menos una cadena variable (ligera o pesada) de DC8E8. En ciertas formas de realización, puede usarse una versión humanizada o humana de DC8E8. En algunas formas de realización, se selecciona por lo menos un péptido de una cualquiera de SEC ID n° 1-4, SEC ID n° 9-101 y SEC ID n° 108-112, NIKHVPGGGS (SEC ID n° 201), IKHVPGGGS (SEC ID n° 202), KHVPGGGSV (SEC ID n° 203), HVPGGGSVQ (SEC ID n° 204), VPGGGSVQ (SEC ID n° 205), GWSIHSPGGGSC (SEC ID n° 250), SVFQHLPGGGSC (SEC ID n° 251), ANIKHVPGGGS (SEC ID n° 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID n° 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID n° 149), DNIAHVPGGGS (SEC ID n° 151), DNIKAVPGGGGS (SEC ID n° 159), DNIKHAPGGGS (SEC ID n° 161) y DNIKHVPGGGS (SEC ID n° 171). En una forma de realización, el péptido se selecciona de SEC ID n° 1-4. En otra forma de realización, el péptido es SEC ID n° 108. En una forma de realización, el péptido es GWSIHSPGGGSC (SEC ID n° 250). En ciertas formas de realización, el péptido es SVFQHLPGGGSC (SEC ID n° 251). En ciertas formas de realización, el péptido se selecciona de SEC ID n° 270 (TENLKHQPGGGK); SEC ID n° 271 (KHQPGGG), SEC ID n° 272 (HQPGGG); SEC ID n° 275 (ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS), SEC ID n° 276 (KHVPGGG), SEC ID n° 277 (HVPGGG), SEC ID n° 280 (DNIKHVPGGGSVQIVYKP), SEC ID n° 281 (HHKPGGG), SEC ID n° 282 (HKPGGG), y SEC ID n° 283 (THVPGGG). En otras formas de realización, el péptido se selecciona de SEC ID n° 272 (HQPGGG) y SEC ID n° 277 (HVPGGG).

Se expondrán los objetivos y las ventajas adicionales de las formas de realización en parte en la descripción a continuación, y en parte resultarán evidentes a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de las formas de realización. Los objetivos y las ventajas de las formas de realización se realizarán y obtendrán por medio de los elementos y combinaciones indicados particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

Debe apreciarse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada a continuación son únicamente ejemplificativas y explicativas y no limitativas de las formas de realización, como se reivindica.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y forman parte de la presente memoria descriptiva, ilustran varias formas de realización y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las formas de realización. Las publicaciones analizadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación debido a invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar independientemente.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Esquema de seis isoformas de tau humana.

Figura 2: Mapa funcional esquemático de tau humana (2N4R). La figura 2 revela "VQIINK" y "VQIVYK" como SEC ID n° 116 y 115, respectivamente.

Figura 3: Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de regiones variables de DC8E8 y su alineamiento con las secuencias de línea germinal de ratón más próximas. La figura representa unas secuencias de nucleótidos (SEC ID n° 165) (A) y aminoácidos (SEC ID n° 141) (para la cadena ligera variable) y 117-119 (para cada una de sus CDR, de acuerdo con IMGT), respectivamente, en orden de aparición); (B) de la región de cadena ligera variable (VL) de DC8E8 (el alineamiento desvela SEC ID n° 166 y 168, respectivamente, en orden de aparición); y (C) el alineamiento del gen V de cadena ligera variable de DC8E8 con la secuencia de línea germinal de ratón más próxima IGKV8-21'01 (el alineamiento desvela las SEC ID n° 166 y 167, respectivamente, en orden de aparición; seguido del alineamiento del gen J de VL de DC8E8 (SEC ID n° 168) con el gen de J de ratón más cercano, IGKJ1'01 (SEC ID n° 169). La figura muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID n° 170) (en D) y de aminoácidos de la cadena pesada variable de DC8E8 y sus tres CDR (SEC ID n° 171 y 120-122, respectivamente, en orden de aparición). En (F) se muestran los siguientes alineamientos para DC8E8: en primer lugar, el gen V de cadena pesada variable (VH) de DC8E8 (SEC ID n° 172) con la secuencia de línea germinal de ratón más cercana IGHV1-81'01 (SEC ID n° 172); en segundo lugar, el gen D de cadena pesada variable (VH) de DC8E8 (SEC ID n° 174) con la secuencia de línea germinal de ratón más cercana IGHD2-14'01 (SEC ID n° 175); y finalmente, el gen J de cadena pesada variable (VH) de DC8E8 (SEC ID n° 176) con la secuencia de línea germinal de ratón más cercana IGHJ4'01 (SEC ID n° 177). También se muestran la secuencia de región constante de cadena ligera kappa DC8E8 (SEC ID n° 178) (G) y secuencia de región constante de cadena pesada (SEC ID n° 179) (H). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están subrayadas en las secuencias proteicas (B) y (E) y se identificaron de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT.

Figura 4: Alineamiento de la secuencia de cadena ligera variable (VL) de DC8E8 (SEC ID nº 166 (gen V) y 168 (gen J), respectivamente, con el gen VL de línea germinal humano más cercano (SEC ID nº 180-181, respectivamente, en orden de aparición).

Figura 5: Alineamiento de la secuencia de cadena pesada variable (VH) de DC8E8 (SEC ID nº 172, 174 y 176, para los genes V, D y J, respectivamente) con el gen VH de línea germinal humana más cercano (SEC ID nº 182-183 y 185, respectivamente, en orden de aparición).

Figura 6: mapeo de epítomos de DC8E8 por mutantes de delección de tau usando ELISA. (A) Esquema de proteínas tau usado para mapeo de epítomos de DC8E8, y (B) su secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 186-197, 102, 104 y 198-199, respectivamente, en orden de aparición). (C) Lecturas de ELISA. DC8E8 reconoce las siguientes proteínas tau: Δ 358-441, Δ 421-441, Δ 134-168, Δ 1-220, Δ 1-126, 2N4R, 2N3R, Δ (1-296, 392-441) y Δ (1-150, 392-441)/4R. DC8E8 no reconoce las siguientes proteínas tau: Δ 222-427, Δ 306-400, Δ 228-441, Δ 300-312, Δ 257-400, Δ 137-441, Δ 283-441.

Figura 7: (A) y (B) Esquema de péptidos sintéticos (SEC ID nº 206, 207, 208, 2, 210, 211, 212, 3, 214, 215, 4, 217, 26, 219, 36, 221, 222, 109 y 88, respectivamente, en orden de aparición) para el mapeo de epítomos y sus secuencias, respectivamente. (C) Mapeo de epítomos de DC8E8 con péptido sintético por ELISA. (D) Esquema de epítomos con los que DC8E8 puede unirse dentro de tau. DC8E8 puede unirse con una cualquiera de cuatro regiones de unión separadas, cada una de las cuales es un epítopo separado, llamado epítopo 1 a 4. Los cuatro epítomos se localizan por separado cada uno dentro del 1^{er} (epítopo nº 1), 2^o (epítopo nº 2), 3^{er} (epítopo nº 3) y 4^o (epítopo nº 4) dominio repetido de proteína tau. Como se muestra, los cuatro epítomos DC8E8 están cada uno comprendido respectivamente dentro de una de cada una de las siguientes secuencias de aminoácidos: 267-KHQPGGG-273 (SEC ID nº 98) (dentro del 1^{er} dominio repetido de proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID nº 99) (dentro del 2^o dominio repetido de proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID nº 100) (dentro del 3^{er} dominio repetido de proteína tau) y 361-THVPGGG-367 (SEC ID nº 101) (dentro del 4^o dominio repetido de proteína tau), respectivamente.

Figura 8: (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de tau humana (SEC ID nº 225) con la secuencia de proteína tau de otra especie (SEC ID nº 226-245, respectivamente, en orden de aparición). La longitud completa de proteína tau humana se usó para el alineamiento; sólo se muestran los aminoácidos 265-368 de tau humana del alineamiento. Las regiones que comprenden los cuatro epítomos de DC8E8 separados en tau humana y las secuencias alineadas están encuadradas y se muestran en negrita. (B) ELISA de competición que muestra la capacidad de seis péptidos de tau (SEC ID nº 201-205 y 200, respectivamente, en orden de aparición) para competir con tau Δ (1-150; 392-441)/4R (SEC ID nº 199) por la unión con el anticuerpo DC8E8, capaz. (C) ELISA de competición que muestra la capacidad de siete péptidos tau (SEC ID nº 144, 146, 149, 151, 159, 161 y 171) para competir con tau Δ (1-150; 392-441)/4R por la unión con el anticuerpo DC8E8, que puede reconocer por lo menos uno de los epítomos de tau implicados en la agregación de tau-tau.

Figura 9: (A). Resonancia de plasmón superficial (SPR) para caracterizar la unión de DC8E8 con tau Δ (1-150, 392-441)/4R y 2N4R. (B). Resonancia de plasmón superficial (SPR) para caracterizar la unión de DC8E8 con tau Δ (1-150, 392-441)/3R y 2N3R.

Figura 10: (A). Tasas de asociación y disociación de la unión de DC8E8 con tau Δ (1-150; 392-441)/4R y con tau 2N4R, como se determina por SPR. (B). Tasas de asociación y disociación de la unión de DC8E8 con tau Δ (1-150; 392-441)/3R y con tau 2N3R, como se determina por SPR. Las concentraciones usadas en las mediciones están indicadas en las representaciones, se interpolaron líneas discontinuas por el programa informático software BIA evaluation 4.1 (Biacore AB) a partir de datos medidos para cálculos de parámetros cinéticos.

Figura 11: El anticuerpo monoclonal DC8E8 puede diferenciar entre AD preclínica, AD clínicamente incipiente y AD de estadio final completamente desarrollada. DC8E8 presenta tinción de estadios tempranos (monómeros, dímeros de tau) de tau patológica en AD preclínica humana - estadio I de Braak. (A). El anticuerpo reconoce el estadio de oligómeros de tau patológica (flechas) y el estadio de polímeros de tau patológica (ovillos) (cabeza de flecha) (B). En enfermedad de Alzheimer completamente desarrollada (estadio final - estadio VI de Braak), DC8E8 reconoce principalmente polímeros de tau patológica en formas de ovillos neurofibrilares (cabeza de flecha), placas neuríticas (dentro del círculo) e hilos neuríticos (dentro del pentágono) (C). Barra de escala: 100 μ m. El anticuerpo monoclonal DC8E8 reconoce todos los estadios de desarrollo de la formación de ovillos en enfermedad de Alzheimer (D). DC8E8 reconoce estadios de desarrollo tempranos de la formación de ovillos - estadio monomérico, dimérico y oligomérico temprano (D1), y estadio oligomérico tardío, preovillo (D2), así como estadios de desarrollo tardíos de polímeros de tau patológica - ovillos neurofibrilares intracelulares (D3) y extracelulares (D4). La cabeza de flecha indica agregados de tau oligoméricos pequeños dentro de neuronas del hipocampo piramidales (D1). Barra de escala: 10 μ m.

Figura 12: (A) El anticuerpo monoclonal DC8E8 reconoce degeneración neurofibrilar en ratas transgénicas SHR72. DC8E8 reconoce el estadio oligomérico de tau (flecha) y estadio de ovillo (cabeza de flecha) de la

neurodegeneración de tau. Además, el anticuerpo reacciona con tau plegada erróneamente que se localiza en las fibras axonales (dentro del rectángulo). (B) En cerebros de ratas de control de la misma edad el anticuerpo no presenta tinción intraneuronal. Barra de escala: 20 μ m. DC8E8 también reconoce todos los estadios del desarrollo de la formación de ovillos en cerebro de rata transgénica (SHR72) como en la enfermedad de Alzheimer humana. DC8E8 reconoce estadios tempranos del desarrollo de la formación de ovillos - estadio monomérico, dimérico y oligomérico temprano (C) y estadio preovillo oligomérico tardío (D), así como estadios del desarrollo tardíos de polímeros de tau patológica - ovillos neurofibrilares intracelulares (E) y extracelulares (sin núcleo) (F). La cabeza de flecha en (C) indica agregados de tau oligoméricos pequeños dentro de las neuronas (A). Barra de escala: 10 μ m.

Figura 13: (A) Tinción de DC8E8 de ovillos neurofibrilares en la corteza de ratas transgénicas SHR24, que expresan tau Δ (1-150; 392-441)/3R. (B) DC8E8 reconoció ovillos neurofibrilares en el tronco encefálico de las ratas transgénicas SHR72, que expresan tau Δ (1-150, 392-441)/4R. Las secciones tisulares se contratiñeron con verde metilo. Flechas - ovillos neurofibrilares. Barra de escala: 50 μ m.

Figura 14: El anticuerpo monoclonal DC8E8 reconoce proteína tau tanto soluble (A) como insoluble (B) en las muestras de cerebro aisladas del modelo de rata transgénica SHR24 (isocórtex) y pacientes con enfermedad de Alzheimer (tejido de alocórtex incluyendo hipocampo, corteza entorrinal y temporal). Cabeza de flecha - tau truncada humana, flecha - tau endógena de rata. Para fracciones de tau solubles se cargaron 15 μ g de proteína por carril. Para fracciones de tau insolubles los sedimentos se disolvieron en tampón de carga de muestras de dodecil sulfato sódico (SDS) 1 x en volumen 1/50 del 1 S, se cargó el mismo volumen que en el caso de fracciones solubles. El anticuerpo monoclonal DC8E8 reconoce proteínas tau tanto solubles como insolubles en las muestras de cerebro aisladas de pacientes con enfermedad de Alzheimer (tejido de alocórtex incluyendo hipocampo, corteza entorrinal y temporal) (C) y del modelo de rata transgénica SHR72 (tronco encefálico) (D). Flecha - proteínas tau humanas fisiológicas (A) y tau endógena de rata (B), cabeza de flecha - tau truncada humana (tau Δ (1-150, 392-441)/4R) expresada como un transgén en las neuronas de ratas SHR72 (D). Para fracciones de tau soluble se cargaron 15 μ g de proteína total por carril. Para fracciones de tau insolubles los sedimentos se disolvieron en tampón de carga de muestras de dodecil sulfato sódico (SDS) 1 x en volumen 1/50 del 1 S, se cargó el mismo volumen que en el caso de fracciones solubles.

Figura 15: DC8E8 inhibe la interacción tau-tau patológica en ensayo de formación de fibrillas de tau basado en fluorescencia. Tau Δ (1-150, 392-441)/4R (figura 15A) o tau Δ (1-296, 392-441)/4R (figura 15B) se indujeron por heparina para someterse a un cambio conformacional y formar fibrillas como se mide por fluorescencia de Tioflavina T; los mAb DC8E8, Rab50 y DC11 se ensayaron con respecto a su capacidad para prevenir el cambio de conformación patológico.

Figura 16: Análisis del potencial inhibitorio de DC8E8 para evitar la formación de dímeros, trímeros y oligómeros de tau por proteína tau truncada tau Δ (1-296; 392-441)/4R por inmunotransferencia usando el mAb DC25 conjugado con HRP.

Figura 17: Captación y degradación de tau Δ (1-150, 392-441)/4R por células BV2 de microglía. Tau Δ (1-150, 392-441)/4R se añadió a células BV2 de ratón sola (1 μ M) o en complejo con el anticuerpo monoclonal DC8E8 (Tau Δ (1-150, 392-441)/4R 1 μ M + DC8E8 1 μ M). Después de incubación durante diversos periodos de tiempo (2, 4, 6 y 12 horas), las células BV2 se lavaron con ácido, se extrajeron proteínas celulares y se analizaron los niveles de tau internalizada por transferencia de Western con anticuerpo pan-tau DC25. Se inmunomarcó tau Δ (1-150; 392-441)/4R en lisados celulares (tau intracelular) (A) y en medio de cultivo celular (tau extracelular) (B). El anticuerpo DC8E8 se visualizó con antianticuerpo conjugado con HRP antirratón. Se cargaron 20 μ g de proteína por carril.

Figura 18: Estabilidad (período de validez) de DC8E8 a 37°C, como se ensaya por ELISA. El anticuerpo reconoció tau Δ (1-150, 392-441)/4R después de varios meses de almacenamiento (1, 2, 3 y 4 meses). Las barras representan diluciones en serie del anticuerpo como se indica. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Figura 19: DC8E8 reconoce y se dirige a tau plegada erróneamente (enferma) en los tejidos cerebrales de la enfermedad de Alzheimer humana.

(A) Análisis de transferencia de Western con anticuerpo DC25 pan-tau:

- 1) extracción bioquímica de tau patológica de los tejidos cerebrales de enfermedad de Alzheimer humana (Greenberg y Davies, 1989);
- 2) el anticuerpo de simulación (Rab50) no reconoce tau;
- 3) DC8E8 reconoce y se dirige a tau plegada erróneamente (enferma) en tejidos cerebrales de enfermedad de Alzheimer humana; y

(B) tinción de Ponceau S: 2), 3) control de la cantidad de anticuerpo (Rab50 y DC8E8) usada en el experimento.

Figura 20: DC8E8 reconoce y se dirige a tau plegada erróneamente (enferma) en tejidos cerebrales del modelo de rata SHR72 de AD.

(A) Transferencia de Western con anticuerpo DC25 pan-tau:

4) extracción bioquímica de tau patológica de tejidos cerebrales de enfermedad de Alzheimer humana (Greenberg y Davies, 1989);

5) el anticuerpo de simulación (Rab50) no reconoce tau;

6) DC8E8 reconoce y se dirige a tau plegada erróneamente (enferma) en tejidos cerebrales de enfermedad de Alzheimer humana; y

(B) tinción de Ponceau S: 2), 3) control de la cantidad de anticuerpo (Rab50 y DC8E8) usado en el experimento.

Figura 21: *In vivo*, DC8E8 se dirige a formas patológicas de tau en el cerebro de ratas transgénicas (SHR72) y transporta tau patológica del cerebro a la sangre periférica. (A) La concentración del anticuerpo DC8E8 en el suero de animales tratados con DC8E8 alcanzó 466, 200 y 273 µg/ml, respectivamente. (B) Se observó transporte *in vivo* de los complejos de DC8E8-tau del cerebro a la sangre periférica. La tau patológica alcanzó la concentración media de 350 µg/ml del suero. El transporte activo de tau por DC8E8 elimina las proteínas tau patológicas del cerebro. Por otro lado, no se detectaron proteínas tau en los sueros de los animales tratados con anticuerpo de simulación (Rab50), que reconoce el virus de la rabia (Macikova *et al.*, 1992). La concentración de tau en el suero de los animales tratados se determinó por ELISA Htau Innostest (Innogenetics, Bélgica). La gráfica muestra la media con errores típicos de la media (SEM). Cada una de las 8 barras para las ratas A-C indica una dilución en suero secuencial diferente (de 100 veces a 12800 veces, de izquierda a derecha).

Figura 22: el anticuerpo monoclonal DC8E8 retira tau patológica del cerebro de ratas transgénicas (SHR72). (A) La aplicación intracerebral de DC8E8 (panel izquierdo) retira (flechas) tau patológica de las neuronas en comparación con animales tratados con simulación (panel derecho). (B) La cuantificación de la cantidad de tau patológica en las neuronas de los animales tratados con simulación y tratados con DC8E8 mostró reducción radical de la cantidad de tau patológica en animales tratados con DC8E8 ($P < 0,0001$).

Figura 23: el fragmento scFv recombinante (scDC8E8v) del anticuerpo monoclonal DC8E8, expresado en bacterias, reconoce tauΔ (1-150, 392-441)/4R desordenada erróneamente patológica. (A) tinción con azul brillante de Coomassie de lisados en bruto de bacterias BL21 de control y bacterias que albergan plásmido de expresión de scDC8E8v, separados por SDS-PAGE al 10%: carril 1, lisado en bruto de bacterias BL21 de control; carril 2, lisado en bruto de bacterias BL21 que expresan scDC8E8v; y carril M, marcador de peso molecular proteico (escalera de proteínas preteñida Page Ruller nº SM0672, Fermentas). (B) Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau S que contiene proteínas tau: carril 1, tauΔ (1-150; 392-441)/4R, 500 ng; carril 2, tauΔ (1-150, 392-441)/4R, 250 ng, carril 3, tauΔ (1-150; 392-441)/4R, 125 ng, carril 4 tauΔ 228-441, 50 ng; y carril M, marcador de peso molecular proteico. (C) membrana de nitrocelulosa/transferencia de Western que contiene proteínas tau, cargadas como en B), detectadas con lisado de bacterias que expresan scDC8E8v. (D) membrana de nitrocelulosa/transferencia de Western que contiene proteínas tau, cargada como en B), desarrollada con lisado bacteriano de control negativo.

Figura 24: El fragmento scFv recombinante del anticuerpo monoclonal DC8E8 (scDC8E8v) muestra propiedades de unión a tau similares al anticuerpo DC8E8, reconoce selectivamente tauΔ (1-150, 392-441)/4R. (A) Determinación de la afinidad cinética por SPR de la unión de scDC8E8v con tauΔ (1-150, 392-441)/4R de AD. (B) Determinación de la afinidad cinética por SPR de la unión de scDC8E8v con tau 2N4R. (C) Constantes de velocidad (k_{ON} y k_{OFF}) y constante de asociación en equilibrio para la unión de scDC8E8v.

Figura 25: Identificación de restos en el sitio de combinación de scDC8E8v que influyen en el reconocimiento de scDC8E8v/DC8E8 de tau desordenada erróneamente. (A) Tinción con azul brillante de Coomassie de geles de poliácridamida después de separación de proteínas de lisado en bruto de bacterias BL21 que alojan plásmido de expresión de scDC8E8v (wt) y sus formas mutantes. Cada carril numerado corresponde al número de clon respectivo, (por ejemplo, el carril 2 corresponde a 2-VL-R33A). Las proteínas de cadena sencilla expresada se indican por asteriscos. Los cultivos bacterianos de control no expresan proteínas monocatenarias. (B) Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau S que contiene proteínas tau: carril 1, tauΔ (1-150; 392-441)/4R, 500 ng; carril 2, tauΔ (1-150, 392-441)/4R, 250 ng; carril 3, tauΔ (1-150; 392-441)/4R, 125 ng. (C) Transferencia de Western en membranas de nitrocelulosa que contienen proteínas tau, cargadas como en B), detectadas con lisados de bacterias que expresan scDC8E8v (gel wt) o una de sus formas mutantes (transferencias de 1-VL-N31A hasta 22-VH-G102A).

Figura 26: (A) Esquema de tau 2N4R (SEC ID nº 102) con los cuatro epítomos de DC8E8 mostrados en cajas discontinuas dentro de la región ampliada entre los restos 261 y 373 (SEC ID nº 246): SEC ID nº 98-101, respectivamente. (1) Esquema de inmunógenos peptídicos derivados de tau que comprenden por lo menos una de las cuatro regiones de tau reconocidas por el anticuerpo DC8E8, para su uso como vacunas activas o para purificar anticuerpos DC8E8 y similares; (2) posibilidades generales para otros péptidos y compuestos modificados y de diseño con restos opcionales. (B) Sumario de análisis de inmunotransferencia de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas transgénicas (SHR72, que expresan tau Δ (1-150; 392-441)/4R) tratadas con péptidos SEC ID nº 1-8 y 108. El análisis de inmunotransferencia se realizó con diversos mAb para determinar la reducción de tau insoluble de los siguientes epítomos relevantes para AD: mAb DC25 (tau 347-353), mAb DC217 (tau pThr217), mAb DC209 (tau pThr 231), mAb AT8 (tau pSer202/pThr205) y mAb AT270 (tau pThr181). (C) análisis de inmunotransferencia densitométrica de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas tratadas con tau 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280 (SEC ID nº 1) combinada con adyuvante y de ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 27: Evaluación neuroconductual de ratas transgénicas (SHR72) modelado de AD tratados con tau 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280 (SEC ID nº 1). Diez días después de la 5ª dosis del inmunógeno, las ratas transgénicas se usaron para ensayo conductual. Los diagramas representan la media $\pm$ SEM. Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 28: Vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 1 dio como resultado 49% de reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 29: análisis de inmunotransferencia cuantitativa de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas transgénicas (SHR72) tratadas con tau 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 (SEC ID nº 2) con adyuvante o ratas de control tratados con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 30: Evaluación neuroconductual de ratas transgénicas (SHR72) tratados con tau 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 (SEC ID nº 2). Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 31: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 2 dio como resultado 60% de reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para la evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 32: análisis de inmunotransferencia cuantitativa de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas transgénicas (SHR72) tratados con tau 256- VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 con Ser262 fosforilada (SEC ID nº 2) con el adyuvante o ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 33: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 2/fosfo dio como resultado 77% de reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 34: análisis de inmunotransferencia cuantitativa de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas transgénicas (SHR72) tratadas con tau 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288 (SEC ID nº 3) con adyuvante o ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 35: Evaluación neuroconductual de ratas transgénicas (SHR72) tratadas con tau 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288 (SEC ID nº 3). Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 36: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 3 dio como resultado 58% de reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 37: Análisis de inmunotransferencia cuantitativa de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas transgénicas (SHR72) tratadas con tau 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEC ID nº 4) o ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con

el error típico de la media.

Figura 38. La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 4 mostró mejora moderada de los parámetros neuroconductuales. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5 cm). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5 cm). (C) Neuroescala. Los datos se presentan como valores medios con error típico de la media.

Figura 39: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 4 dio como resultado 66% de reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 40: Análisis de inmunotransferencia de tau insoluble preparado a partir del tronco encefálico de ratas transgénicas (SHR72) inmunizadas con tau 201-GSPGTPGSRSTPSLPTPPTREPKKVAVVR-230/que porta treonina fosforilada en la posición 217 (SEC ID nº 5) con adyuvante o ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 41: Evaluación neuroconductual de ratas transgénicas (SHR72) tratadas con tau 201-GSPGTPGSRSTPSLPTPPTREPKKVAVVR-230/que portan treonina fosforilada en la posición 217 (SEC ID nº 5). Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 42: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 5 no mostró efecto en la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para la evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 43: Análisis de inmunotransferencia de tau insoluble preparada a partir del tronco encefálico de ratas transgénicas (SHR72) inmunizadas con tau 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPVSGDTSRHL-408 que porta restos de serina fosforilada en la posición 396 y 404 (SEC ID nº 6) y adyuvante o ratas de control tratados con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 44: Evaluación neuroconductual de ratas transgénicas (SHR72) tratadas con tau SEC ID nº 6 fosforilada en Ser396/Ser404. Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 45: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 6 no mostró reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para la evaluación de NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 46: Análisis de inmunotransferencia de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas (SHR72) inmunizadas con tau 181-TPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSR-210 que porta resto de serina fosforilada en la posición 202 y resto de treonina en 205 (SEC ID nº 7) con adyuvante o ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 47: Evaluación neuroconductual de ratas SHR72 tratadas con tau 181-TPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSR-210 que porta resto de serina fosforilada en la posición 202 y resto de treonina en 205 (SEC ID nº 7). Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 48: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 7 no mostró efectos en la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para la evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 49: Análisis de inmunotransferencia de tau insoluble preparada a partir de los troncos encefálicos de ratas (SHR72) inmunizadas con tau 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 (SEC ID nº 8) con adyuvante o ratas de control tratadas con adyuvante solamente. Los valores medios se presentan con el error típico de la media.

Figura 50: Evaluación neuroconductual de ratas con AD transgénicas (SHR72) tratadas con tau 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317 (SEC ID nº 8). Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico. (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5). (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5). (C) Neuroescala.

Figura 51: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 8 no mostró reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para la evaluación de los

NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 52: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau (SEC ID nº 108) redujo de forma estadísticamente significativa la tau patológica insoluble ($p < 0,001$). Se extrajo tau insoluble patológica de los cerebros de ratas transgénicas SHR72 inmunizadas con péptido de tau y analizadas por inmunotransferencia. Los valores de la media se presentan con el error típico de la media.

Figura 53: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau (SEC ID nº 108) mejoró de forma estadísticamente significativa los parámetros neuroconductuales ($p < 0,05$). (A) Ensayo de caminar por una viga (viga de 3,5 cm). (B) Número de deslizamientos de las extremidades posteriores (viga de 3,5 cm). (C) Neuroescala. Los datos se presentan como los valores medios con el error típico de la media.

Figura 54: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau (SEC ID nº 108) dio como resultado 60% de reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El anticuerpo AT8 se usó para la evaluación de los NFT en los tejidos cerebrales de ratas transgénicas SHR72.

Figura 55: El ELISA de antisueros generados de inmunización de ratas transgénicas (SHR72) con péptido tau 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEC ID nº 4) muestra una diferencia en la unión del antisero con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica humana y tau 2N4R fisiológica humana.

Figura 56: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo la formación de anticuerpos que se unían preferentemente con proteína tau patológica. La media geométrica de los títulos de anticuerpo medidos con ELISA muestra que los anticuerpos inducidos por vacunación con péptido de tau SEC ID nº 108 mostraron mayor actividad de unión con inmunógeno (péptido de SEC ID nº 108) y con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica. La tau fisiológica (tau2N4R) que se usó como un control, se reconocía más débilmente.

Figura 57: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo preferentemente la formación de isotipos de anticuerpos IgG específicos de tau patológica. Se muestra el perfil de isotipo de anticuerpos inducidos por el péptido de tau SEC ID nº 108. Se diluyeron los sueros de ratas individuales 1:800 y se analizó la actividad de unión con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica por ELISA.

Figura 58: Determinación de afinidad por SPR de antisueros generados de la inmunización de ratas SHR72 con el péptido tau 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEC ID nº 4) para unión con tau Δ (1-150; 392-441)/4R humana y tau 2N4R humana.

Figura 59: Tinción inmunohistoquímica de cerebros de un paciente con AD humana con anticuerpos de rata generados de la inmunización de ratas transgénicas (SHR72) con tau 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEC ID nº 4). (A) Los antisueros reconocieron lesiones neurofibrilares en cerebro con enfermedad de Alzheimer, hipocampo. (B) La ampliación mayor mostró ovillos neurofibrilares. Barras de escala: 100 μ m (A), 10 μ m (B).

Figura 60: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo que los anticuerpos reconocieran proteínas tau patológicas en secciones de tejidos cerebrales con enfermedad de Alzheimer humana. La inmunotinción representativa del suero de la rata nº 3 (A), 5 (B), 6 (C), 7 (D) y 8 (E) muestran que todos los anticuerpos de suero de rata ensayados reconocieron ovillos neurofibrilares en la capa Pre- α de la corteza entorrinal de un paciente con la enfermedad de Alzheimer. Los sueros agrupados de ratas inmunizadas solamente con adyuvante se usaron como un control negativo (F). Se usaron secciones tisulares de cerebro en serie de la corteza entorrinal. Barra de escala: 50 μ m.

Figura 61: La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo que anticuerpos específicos reconocieran proteínas tau patológicas en cerebros con enfermedad de Alzheimer humana así como en los cerebros de ratas transgénicas SHR72. Se extrajo tau patológica de tejidos cerebrales humanos y de rata y se analizó por inmunotransferencia con sueros agrupados de ratas transgénicas SHR72 inmunizadas con el péptido SEC ID nº 108. Los anticuerpos del suero reconocieron tau patológica monomérica (carril nº 1, 2 y nº 3) y oligomérica (carril nº 2 y nº 3) incluyendo tau patológica A68 característica de la AD.

Figura 62: La inmunización de ratones con el péptido de tau SEC ID nº 109 indujo anticuerpos con actividad de unión estadísticamente significativamente mayor con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica que con tau 2N4R fisiológica ($p = 0,0115$). La gráfica representa la evaluación estadística de los resultados de ELISA para sueros individuales diluidos a 1:800. Los valores medios se muestran con el error típico de la media.

Figura 63: La inmunización de ratones con el péptido de tau SEC ID nº 110 indujo anticuerpos que mostraban actividad de unión estadísticamente significativamente mayor con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica que con tau 2N4R fisiológica ($p = 0,0029$). La gráfica representa la evaluación estadística de los resultados de

ELISA para sueros individuales diluidos a 1:800. Se muestran los valores medios con el error típico de la media.

Figura 64: La inmunización de ratones con el péptido de tau SEC ID nº 111 indujo anticuerpos que mostraban actividad de unión estadísticamente significativamente mayor con tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica que con tau 2N4R fisiológica ($p = 0,0007$). La gráfica representa la evaluación estadística de resultados de ELISA para sueros individuales diluidos a 1:800. Se muestran los valores medios con el error típico de media.

Figura 65: La inmunización de ratones con el péptido de tau SEC ID nº 112 indujo anticuerpos que mostraban actividad de unión estadísticamente significativamente mayor con tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica que con tau 2N4R fisiológica ($p < 0,001$). La gráfica representa la evaluación estadística de los resultados de ELISA para sueros individuales diluidos a 1:800. Los valores medios se muestran con el error típico de la media.

Figura 66: Los epítomos terapéuticos de diseño GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251) compitieron con tauΔ (1-150; 392-441) 4R patológica por la unión con el anticuerpo DC8E8.

Figura 67: Los epítomos terapéuticos de diseño GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251) indujeron la producción de anticuerpos que diferenciaban de forma estadísticamente significativa entre tauΔ (1-150; 392-441) 4R patológica y tau 2N4R fisiológica, como se ensaya por ELISA. Se ensayaron sueros (a dilución 1:3200) de ratones inmunizados con uno de los péptidos 250 y 251 con respecto a anticuerpos específicos para proteínas tau: tauΔ (1-150; 392-441) 4R patológica y tau 2N4R fisiológica por ELISA.

Figura 68: La inmunización con epítomos terapéuticos de diseño GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251) indujo la producción más robusta de anticuerpos de isotipo IgG1.

Figura 69: Las mediciones de SPR (resonancia de plasmón superficial) cuantitativas muestran que los anticuerpos inducidos por el epítomo terapéutico de diseño 1 (GWSIHSPGGGSC, SEC ID nº 250) (Figura 69A) y el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) (Figura 69B) diferenciaron de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente) entre tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica.

Figura 70: Tinción inmunohistoquímica de tejidos cerebrales enfermos con AD humana con sueros generados contra el epítomo terapéutico de diseño 1 (GWSIHSPGGGSC, SEC ID nº 250) y epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251). (A) Los antisueros contra el epítomo terapéutico de diseño 1 reconocieron la patología neurofibrilar en el cerebro del paciente con AD. (C) Aumento alto del ovillo neurofibrilar y los hilos de neurópilos (flechas). (B) Los antisueros contra el epítomo terapéutico de diseño 2 reconocieron la patología neurofibrilar en el cerebro de paciente con AD. (D) Ampliación alta del ovillo neurofibrilar teñido e hilos de neurópilos (flechas). Los antisueros contra el epítomo terapéutico de diseño 1 y epítomo terapéutico de diseño 2 no reconocieron tau normal en el cerebro humano de control (E, F). Barra de escala: 50 μm (A, B, E, F), 20 μm (C, D). (G) El suero generado contra el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) reconoce lesiones neurofibrilares en ratas transgénicas SHR72. (H) En cerebros de ratas de control de la misma edad el anticuerpo no presenta tinción intraneuronal. El suero reconoce el estadio preovillo oligomérico (I), así como el intracelular (J). Barra de escala: 20 μm (A, B), 10 μm (C, D).

Figura 71: Los anticuerpos inducidos por el epítomo terapéutico de diseño 1 (GWSIHSPGGGSC, SEC ID nº 250) y el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) reconocieron tau patológica soluble e insoluble en sarcosilo aislada de los tejidos cerebrales de enfermedad de Alzheimer humana.

Figura 72: Los anticuerpos inducidos por el epítomo terapéutico de diseño 1 (GWSIHSPGGGSC, SEC ID nº 250) y el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) reconocieron tau patológica soluble (carril 1, 3, 5) e insoluble (carril 2, 4, 6) aislada de los cerebros del modelo de rata de enfermedad de Alzheimer (SHR72).

Figura 73: La inmunoterapia con el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) mostró una mejora significativa en los parámetros neuroconductuales (Neuroescala) o ratas SHR72 tratadas. (A) Ensayo de caminar por una viga. (B) Número de deslizamientos de extremidades posteriores ($p < 0,05$). (C) Neuroescala. Las ratas tratadas con el epítomo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) mostraron: a) tiempos de espera de escape reducidos en 27% en el ensayo de caminar por una viga, b) número reducido de los deslizamientos de extremidades posteriores en 44% ($p < 0,05$), y c) la puntuación de Neuroescala reducida en 26% con respecto a las ratas de control transgénicas que recibieron solamente adyuvante. Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico.

Figura 74: La inmunoterapia con el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) mostró una reducción estadísticamente significativa de tau patológica en cerebros de ratas SHR72

transgénicas con Alzheimer inmunizadas. La inmunoterapia redujo de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) la cantidad de tau insoluble patológica en animales inmunizados en comparación con las ratas transgénicas de control que recibieron solamente adyuvante. La reducción de tau insoluble patológica se observó en todos los epítomos de tau analizados ($p < 0,05$).

Figura 75: (A) Esquema de péptidos sintéticos usados para evaluación adicional del epítipo mínimo de DC8E8 (unidad central terapéutica) y determinación de la potencia inmunogénica y (B) sus secuencias de aminoácidos.

Figura 76: Determinación del epítipo mínimo de DC8E8 (unidad central terapéutica) usando péptidos sintéticos por ELISA competitivo. Diez péptidos tau (SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281, 282 y 283) que contienen por lo menos 6 aminoácidos de la secuencia de reconocimiento de DC8E8 pueden competir con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica por la unión con el anticuerpo DC8E8. Los péptidos de tau que contienen solamente 5 aminoácidos de la secuencia de reconocimiento DC8E8 (SEC ID nº 273, 274, 278 y 279) no compiten con tau Δ (1-150; 392-441)/4R (SEC ID nº 199) por la unión con el anticuerpo DC8E8.

Figura 77: Inducción de anticuerpos específicos de tau después de inmunización de ratones C57BL con péptidos de tau. (A) Péptidos de 12 unidades, 7 unidades y 6 unidades (SEC ID nº 270, 271 y 272, respectivamente) son inmunógenos. Los anticuerpos inducidos por inmunización muestran actividad de unión estadísticamente significativamente mayor con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica que con tau 2N4R fisiológica ($p < 0,0079$; $p < 0,0052$; $p < 0,0079$, respectivamente). Los péptidos de 5 unidades SEC ID nº 273 y 274 no son inmunógenos. (B) Los péptidos de 42 unidades, 19 unidades, 7 unidades y 6 unidades (SEC ID nº 275, 280, 276 y 277, respectivamente) son inmunógenos. Los anticuerpos inducidos por estos péptidos diferenciaron de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0079$, $p < 0,0159$, $p < 0,0079$ y $p < 0,0379$, respectivamente) entre tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica. Los péptidos de 5 unidades SEC ID nº 278 y 279 no son inmunógenos. (C) Los péptidos de 7 unidades (SEC ID nº 281 y 283) son inmunógenos. Los antisueros contra estos péptidos diferencian de forma estadísticamente significativa ($p < 0,0379$ y $p < 0,0286$, respectivamente) entre tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica. Los niveles de los anticuerpos para tau patológica y tau fisiológica inducidos por el péptido de 6 unidades SEC ID nº 282 fueron muy bajos. Las gráficas representan la evaluación estadística de los resultados de ELISA para sueros individuales diluidos a 1:800. Se muestran los valores medios con el error típico de la media.

Figura 78: Media geométrica de los títulos de anticuerpo de anticuerpos específicos de tau después de inmunización de ratones C57BL con péptidos de tau. La vacunación de ratones C57BL con el péptido de tau SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283 indujo la formación de anticuerpos específicos de tau. La media geométrica de los títulos de anticuerpo medidos con ELISA muestra que los anticuerpos inducidos por vacunación con péptido de tau SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283 mostraron mayor actividad de unión con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica que con tau fisiológica (tau2N4R). Se detectaron títulos menores de anticuerpos específicos de tau después de inmunización de ratones con péptidos de tau SEC ID nº 273, 274, 278, 279 y 282.

Figura 79A y 79B: Se muestra el perfil de isotipo de anticuerpos inducidos por péptidos de tau. La inmunización de ratones C57/BL con péptidos de tau que portan epítipo de DC8E8 mínimo indujo preferentemente la formación de isotipos de anticuerpo IgG1 e IgG2b específicos de tau patológica. Los sueros agrupados de ratones individuales se diluyeron 1:800 y se analizó la actividad de unión con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica por ELISA.

Figura 80: Evaluación cuantitativa de la capacidad de unión de los anticuerpos, que se indujeron en ratones C75BL inmunizados con péptidos de tau, con tau Δ (1-150; 392-441)/4R y 2N4R. Las mediciones de resonancia de plasmón superficial (SPR) mostraron que los anticuerpos contra péptidos de tau SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283 diferenciaron de forma estadísticamente significativa ("... $p < 0,001$ y ... $p < 0,01$) entre tau Δ (1-150, 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica. KA - la constante de unión de asociación en equilibrio.

Figura 81: Los anticuerpos inducidos en ratones inmunizados con péptidos tau reconocen formas patológicas de tau en transferencia Western. La vacunación de ratones C57BL con péptidos de tau SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283 indujo anticuerpos específicos, que reconocen proteínas tau patológicas aisladas de tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer humana así como de los troncos encefálicos de ratas transgénicas SHR72. Los antisueros después de inmunización de ratones con péptidos SEC ID nº 273, 274, 278, 279 y 282 no reconocieron formas de tau patológicas.

Figuras 82A-C: Ovillos neurofibrilares reconocidos por anticuerpos inducidos por péptido de tau en tejidos cerebrales con AD humana. La vacunación de ratones C57BL con péptidos de tau SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283 indujo anticuerpos que reconocían lesiones neurofibrilares en el hipocampo de cerebro con enfermedad de Alzheimer. Los sueros de ratones inmunizados con adyuvante solamente se usaron como un control negativo. Se usaron secciones titulares cerebrales del CA1 del hipocampo. Barra de

escala: 100 µm.

Figura 83: Sumario de la tinción inmunohistoquímica (e intensidades relativas respectivas) de tejidos cerebrales de un paciente con AD humana con anticuerpos del suero generados de inmunización de ratones C57BL con péptidos de tau SEC ID nº 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282 y 283.

Descripción detallada de la invención

El término “anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina, bien modificada por ingeniería genética, natural, o completa o parcialmente producida de forma sintética o recombinante. Todos los derivados, partes y fragmentos del mismo que mantienen propiedades de unión a antígeno y por lo menos una de las propiedades características relacionadas con tau divulgado en la presente memoria también se incluyen en el término. El término también comprende cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o en gran medida homólogo de un dominio de unión de inmunoglobulina. Estas proteínas también pueden proceder de fuentes naturales, o producirse parcial o completamente de forma sintética o recombinante. Un anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede ser un miembro de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo cualquiera de las clases humanas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Se prefieren derivados de la clase IgG en algunas formas de realización.

Las expresiones “anticuerpo aislado” y “péptido aislado” se refieren a una proteína o péptido producido a partir de ADNc, ARN recombinante, o cualquier otro origen sintético, o alguna combinación de los mismos; así como a proteínas y péptidos que, según su origen, o fuente de derivación, (1) no están asociadas con proteínas halladas en la naturaleza, (2) están libres de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libres de proteínas murinas, (3) se expresan por una célula de una especie diferente o (4) no aparecen en la naturaleza.

Los anticuerpos divulgados en la presente memoria incluyen, además, dichos anticuerpos que tienen “modificaciones de secuencia conservativas”, modificaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no afectan a o alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo. Las modificaciones pueden introducirse por técnicas convencionales conocidas en este campo, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen algunas en las que el resto de aminoácido se reemplaza con un resto de aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-tau puede reemplazarse, por ejemplo con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

“Fragmentos de anticuerpo” y “partes de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente por lo menos de la parte/dominio de unión a antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias, inmunotoxinas y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de una tau patológica de unión a cadena VH, concretamente que puede ensamblarse junto con una cadena VL o de una cadena VL que se une con tau patológica, concretamente que puede ensamblarse junto con una cadena VH para formar un bolsillo de unión a antígeno funcional y proporcionar de este modo la propiedad de unión con tau patológica. Las expresiones también comprenden fragmentos que por sí solos no pueden proporcionar funciones efectoras (por ejemplo, ADCC/CDC) pero proporcionan esta función después de combinarse con el dominio o los dominios constantes de anticuerpo apropiados.

La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, región de unión, de una fuente o especie y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado por técnicas de ADN recombinante. Se prefieren especialmente anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de “anticuerpos quiméricos” comprendidos en la presente memoria son en los que en la clase o subclase se ha modificado o cambiado de la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos “quiméricos” también se denominan “anticuerpos de clase cambiada”. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de transfección génica y de ADN recombinante convencionales conocidas actualmente en este campo. Véase, por ejemplo, Morrison, S. L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; Patente US nº 5.202.238 y 5.204.244.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos en los que las regiones marco conservadas (FR)

y/o las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una forma de realización, una CDR murina se injerta en la región marco conservada de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. CDR particularmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen los antígenos y epítomos descritos en la presente memoria como "epítomos terapéuticos" en tau.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente memoria, incluya anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Las regiones constantes del anticuerpo pueden ser, por ejemplo, regiones constantes de tipo IgG1 humano. Dichas regiones pueden ser alotípicas y se describen, por ejemplo, por Johnson, G., y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218 y las bases de datos a las que se hace referencia en el mismo, y son preferentemente útiles para algunas formas de realización, siempre que se conserven las propiedades de inducción de ADCC y por ejemplo CDC divulgadas en la presente memoria.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente memoria, incluya todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula hospedadora tal como una célula NSO o CHO o de un animal (por ejemplo, un ratón, tal como un XENOMOUSE, un ratón modificado genéticamente que produce anticuerpos que tienen secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos, por ejemplo, secuencias de aminoácidos de región marco conservada humana (FR) y constante humana, que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana en una forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

La expresión "funciones efectoras" incluye, pero sin limitación, unión de C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión del receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; BCR).

El término "epítomo" se usa en la presente memoria para hacer referencia a sitios de unión reconocidos por una proteína de unión o un anticuerpo. Los epítomos pueden ser cualquier molécula o agrupamiento de las mismas, incluyendo, pero sin limitación, aminoácidos, cadenas laterales de aminoácidos, azúcares y lípidos, y puede tener una estructura o conformación tridimensional específica. Por lo tanto, un epítomo puede comprender cualquier parte de una molécula peptídica/proteica de tau que incluya estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria, como se conocen generalmente estos términos en este campo. Un "epítomo lineal" está compuesto de una secuencia continua de restos de aminoácidos. Un epítomo lineal es uno que está presente en tau fisiológica (por ejemplo, está presente en tau 2N/4R). Un "epítomo conformacional" es un epítomo con el que se une el anticuerpo o la proteína de unión de una manera específica conformacional. En el caso de epítomos basados en proteínas, la unión puede depender de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de la proteína que porta el epítomo. En otras palabras, el anticuerpo se une de una manera específica de estructura, una manera específica de estructura terciaria, o una manera específica de estructura cuaternaria. Un epítomo conformacional es uno que está presente en tau patológica (por ejemplo, presente en tau Δ (1-150; 392-441)/4R)).

La expresión "epítomo terapéutico" se refiere a regiones dentro de tau que se identificaron en la presente memoria y se descubrió que promovían la agregación tau-tau, cuando están en ciertas conformaciones (reconocidas por el anticuerpo DC8E8). Los anticuerpos (y otras proteínas de unión) que se unen a una o más de estas regiones inhiben los estadios tempranos y tardíos de la agregación de tau, incluyendo la conversión de monómero a dímero de tau, y la conversión a formas agregadas superiores; es decir, los anticuerpos inhiben la conversión de tau fisiológica a tau patológica. Estas regiones dentro de tau pueden estar implicadas en la promoción de la formación de fibrillas de tau en filamentos helicoidales emparejados (PHF), promoviendo la formación de láminas beta dentro de regiones adyacentes de tau. Los epítomos terapéuticos están comprendidos dentro de 267-KHQPGGG-273 (dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 361 -THVPGGG- 367 (dentro del 4^o dominio repetido de la proteína tau). En algunas formas de realización, los epítomos terapéuticos están comprendidos cada uno dentro de 268-HQPGGG-273 (dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 299-HVPGGG-304 (dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 330-HKPGGG-335 (dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 362-HVPGGG-367, respectivamente.

La expresión "que presenta una mayor afinidad por tau patológica que por tau fisiológica" se refiere a un mayor grado de interacción entre el anticuerpo y por lo menos una forma de tau patológica que entre el anticuerpo y por

lo menos una forma de tau fisiológica. La interacción puede medirse, por ejemplo, mediante ELISA o resonancia de plasmón superficial (SPR), como se describe en los ejemplos a continuación.

Las expresiones “específicamente se une”, “se une específicamente” y “específico para”, son intercambiables y significan que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (u otra proteína de unión) forma un complejo con un antígeno o epítipo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación de aproximadamente 1×10^{-6} M o menor, por ejemplo menos de aproximadamente 100 nM y más por ejemplo, menos de 10 nM. Se conocen en la técnica procedimientos para determinar si dos moléculas se unen específicamente e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Típicamente, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado es una molécula que se une con el antígeno o un epítipo con una constante de disociación tal de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} M o menor, pero no se une con otras moléculas con dicha constante de disociación.

“Se une preferentemente” se refiere a unión con mayor afinidad con tau patológica que con tau fisiológica, por ejemplo, unión con mayor afinidad con tau Δ (1-150; 392-441)/4R que con 2N4R.

Un “epítipo de linfocitos T universal” es una secuencia seleccionada de hemaglutinina de la gripe: HA307-319 (PKYVKQNTLKLAT) (SEC ID n° 123); PADRE (AKXVAAWTLKAAA) (SEC ID n° 124); Malaria CS: epítipo T3 (EKKIAMEKASSVFNV) (SEC ID n° 125); antígeno de superficie de hepatitis B: HBsA919_28 (FFLLTRILT) (SEC ID n° 126); proteína de choque térmico 65: hsp65153_171 (DQSIGDLIAEAMDKVGNEG) (SEC ID n° 127); bacilo de Calmette-Guerin (QVHFQPLPPAVVKL) (SEC ID n° 128); Toxoide del tétano: TI830-844 (QYIKANSKFIGITEL) (SEC ID n° 129); Toxoide del tétano: TI947-967 (FNNFTVSFWLRV/PKVSASHLE) (SEC ID n° 130); y gp120 T1 de VIH (KQIINMWQEVGKAMYA) (SEC ID n° 131).

La expresión “tau intrínsecamente desordenada” se refiere a la forma normal/fisiológica de la proteína tau, que carece de ninguna estructura 3D definida. Existe en el cerebro sano (Kovacech *et al.*, 2010).

La “tau desordenada erróneamente” se refiere a las formas de tau que difieren conformacionalmente de la tau desordenada intrínsecamente normal/fisiológica, y no tienen una estructura tridimensional firme/definida. La tau truncada desordenada erróneamente puede inducir degeneración neurofibrilar *in vivo*. No existe en un cerebro sano (Kovacech *et al.*, 2010). “Tau ordenada erróneamente” se refiere a una forma patológica estructurada de tau ensamblada en polímeros de PHF, que forman NFT. La tau ordenada erróneamente no existe en un cerebro sano (Kovacech *et al.*, 2010).

“SHR24” se refiere a la línea de rata transgénica que expresa tau de tipo IIB (151-391/R3). Las ratas transgénicas desarrollaron degeneración neurofibrilar dependiente de edad progresiva en las áreas cerebrales corticales. Los ovillos neurofibrilares (NFT) en ratas SHR24 satisfacen varios criterios histológicos clave usados para identificar degeneración neurofibrilar en enfermedad de Alzheimer humana incluyendo argirofilia, birrefringencia de rojo Congo, y reactividad a tioflavina S. Estos criterios pueden usarse para análisis de degeneración neurofibrilar en sujetos que reciben cualquiera de las formas de realización de la invención. También se identificaron ovillos neurofibrilares con anticuerpos usados para detectar tau patológica en el cerebro humano, incluyendo DC11, que reconoce una conformación de tau anómala y anticuerpos que son específicos para formas hiperfosforiladas de proteína tau. Además, la degeneración neurofibrilar se caracterizó por formación extensiva de complejos de proteína tau insolubles en sarcosilo consistentes en especies de tau endógenas y truncadas de rata (Filipcik *et al.*, 2010).

“SHR72” se refiere a ratas transgénicas que expresan tau Δ (1-150; 392-441)/4R truncada humana de acuerdo con la solicitud de patente internacional PCT WO 2004/007547), en varias regiones del cerebro y la médula espinal. La generación de esta línea de rata se ha descrito en Zilka *et al.*, 2006, y la patología de tau se ha descrito en Koson *et al.*, 2008.

“Tau de tipo IA” se refiere a proteínas tau truncadas dobles en el extremo N y C terminal que tienen por lo menos los primeros 236 aminoácidos N terminales y por lo menos los últimos 45 aminoácidos C terminales de la tau43 que contiene 4 repeticiones truncados. Las moléculas pueden detectarse en tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer mientras que las moléculas no son detectables en tejido cerebral sano normal (documento WO2004/007547 A2).

“Tau de tipo IB” se refiere a proteínas tau truncadas dobles en el extremo N y C terminal que tienen por lo menos los primeros 236 aminoácidos N terminales y por lo menos los últimos 45 aminoácidos C terminales de la tau44 que contiene 3 repeticiones truncados. Las moléculas son detectables en tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer mientras que las moléculas no son detectables en tejido cerebral sano normal (documento WO2004/007547 A2).

“Tau de tipo IIA” se refiere a proteínas tau truncadas dobles en el extremo N y C terminal que tienen por lo menos los primeros 68 aminoácidos N terminales y por lo menos los últimos 40 aminoácidos C terminales de la tau43 que contiene 4 repeticiones truncados. Las moléculas son detectables en tejido cerebral con enfermedad

de Alzheimer mientras que las moléculas no son detectables en tejido cerebral sano normal (documento WO2004/007547 A2).

5 “Tau de tipo IIB” se refiere a proteínas tau truncadas dobles en el extremo N y C terminal que tienen por lo menos los primeros 68 aminoácidos N terminales y por lo menos los últimos 20 aminoácidos C terminales de la tau44 que contiene 3 repeticiones truncados. Las moléculas son detectables en el tejido cerebral con enfermedad de Alzheimer mientras que las moléculas no son detectables en tejido cerebral sano normal (documento WO2004/007547 A2).

10 Como se usa en la presente memoria, los términos “tratamiento”, “tratar” y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico con respecto a evitar completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico con respecto a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. “Tratamiento”, como se usa en la presente memoria, también comprende cualquier tratamiento de AD o tauopatías relacionadas en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o en riesgo de adquirir la enfermedad pero aún no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad. Se analizan a continuación adicionalmente formas de realización preferidas de “tratamiento”. En algunas formas de realización, “tratar” se refiere a administrar un agente terapéutico a un paciente que se sospecha que padece o que ya padece AD u otra tauopatía. También puede referirse a reducir, eliminar o por lo menos detener parcialmente, así como a ejercer cualquier efecto beneficioso, en uno o más síntomas de la enfermedad y/o asociados con la enfermedad y/o sus complicaciones.

25 “Prevención” se refiere a la administración a un paciente susceptible de, o en riesgo de otro modo de, una enfermedad particular. Cualquiera en la población general está en riesgo de AD. Algunos individuos tienen un riesgo genético, aumentado para AD. La prevención puede eliminar o reducir el riesgo o retardar la aparición de la enfermedad. El retardo de la aparición o progresión puede medirse basándose en tiempos convencionales de progresión de la enfermedad en poblaciones o individuos similares.

30 “Tauopatía” se refiere a una enfermedad asociada con la formación de tau patológica.

“Tau fisiológica” se refiere a una cualquiera de las 6 isoformas de tau humana normal, concretamente:

35 2N4R (SEC ID nº 102)
1N4R (SEC ID nº 103)
2N3R (SEC ID nº 104)
0N4R (SEC ID nº 105)
1N3R (SEC ID nº 106)
40 0N3R (SEC ID nº 107)

Se excluyen de esta definición las que portan una cualquiera de las fosforilaciones asociadas con enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

45 “Tau patológica” incluye confórmeros y estructuras de tau patológica y comprende todos los siguientes: tau de tipo IA, IB, IIA y IIB, tau ordenada erróneamente, desordenada erróneamente (monómero, dímero, trímero, oligómero), tau soluble desordenada erróneamente, tau insoluble en sarcosilo, depósitos de tau extracelular, agregados de tau, filamentos helicoidales emparejados, patología neurofibrilar, incluyendo lesiones neurofibrilares, ovillos, hilos, fibrillas, esferoides axonales, formas altamente fosforiladas de tau truncada y de tau de longitud completa o cualquier otra forma de tau asociada con AD u otra tauopatía.

50 “Ligado” se refiere a la unión de un resto con un péptido, anticuerpo o compuesto. El resto puede estar acoplado, o en complejo, o unido covalente o no covalentemente. El resto puede estar reticulado químicamente o expresado o sintetizado como una fusión con el péptido o anticuerpo.

55 “Resto” se refiere a cualquier compuesto, orgánico, péptido, proteína, ácido nucleico, vehículo, adyuvante, que pueda unirse con el péptido, anticuerpo o proteína de unión, pero que no es el péptido, anticuerpo o proteína de unión reivindicado en sí mismo.

60 “Inmunógeno” se refiere a algo que puede inducir una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser mediada por anticuerpos o células, o ambos.

“Adyuvante” se refiere a una sustancia que puede aumentar, amplificar o modular la respuesta inmunitaria al péptido acompañante.

65 “Otra terapia” se refiere a terapias adicionales que pueden recibir los pacientes objeto.

“Eliminación” se refiere a una reducción en los niveles o detección de tau patológica y/o una estructura de tau

patológica. La eliminación no tiene que ser una desaparición completa de la tau patológica, es decir, puede ser una desaparición parcial.

El término “promover” comprende inducir, mejorar o aumentar.

“Tejido cerebral” se refiere a cualquier tejido neuronal, por ejemplo, del cerebro, tronco encefálico y médula espinal.

La expresión “unión específica” y “alta afinidad”, respectivamente, se refieren a unión de anticuerpo con un antígeno predeterminado, es decir, el epítipo de tau definido anteriormente. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^{-6} M o menos, y se une con el antígeno predeterminado con una K_D que es por lo menos dos veces menor que su K_D para la unión con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína o cualquier otro polipéptido especificado) distinto del antígeno predeterminado. Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de forma intercambiable en la presente memoria con la expresión “un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno”. Como se usa en la presente memoria unión “altamente específica” significa que la K_D relativa del anticuerpo por tau desordenada erróneamente es por lo menos 4 veces menor que la K_D para la unión de ese anticuerpo con otros ligandos o con tau de longitud completa normal.

Se entiende que el término “procariota” incluye todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con una molécula de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo de la invención o una o más de las cadenas de inmunoglobulina correspondientes. Los huéspedes procariotas pueden incluir bacterias gram negativas así como gram positivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Se entiende que el término “eucariota” incluye células de levadura, plantas superiores, de insectos y por ejemplo mamíferos, más por ejemplo, células HEK 293, NSO y CHO.

La expresión “derivado químico” describe una molécula que contiene restos químicos adicionales que no forman normalmente parte de la molécula base. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, semivida, absorción, etc. de la molécula base. Alternativamente los restos pueden atenuar efectos secundarios indeseables de la molécula base o reducir la toxicidad de la molécula base.

Las expresiones “ácido nucleico”, “secuencia nucleica”, “secuencia de ácido nucleico”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia polinucleotídica” y “secuencia de nucleótidos” se usan de forma intercambiable en la presente descripción, y se refieren a una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, que definen un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene nucleótidos no naturales o no, y que es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o productos de transcripción de dichos ADN.

La expresión “polinucleótido aislado” o “ácido nucleico aislado” como se usa en la presente memoria significarán un polinucleótido de ADNc, genómico o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que según su origen (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que se encuentra el “polinucleótido aislado” en la naturaleza, (2) está unido operativamente con un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza, o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

Anticuerpos para diagnóstico, inmunización pasiva, suministro farmacológico y terapia de AD

Se describen en la presente memoria nuevos anticuerpos aislados, específicos de uno o más epítipos de tau presentados por formas patológicas de tau. Estos epítipos se localizan dentro de regiones de tau a las que se asigna por primera vez un papel en la agregación de tau patológica, concretamente dentro de: 267-KHQPGGG-273 (SEC ID nº 98) (es decir, el epítipo nº 1 está localizado dentro de 267-KHQPGGG-273, que permanece dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID nº 99) (epítipo nº 2, dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID nº 100) (epítipo nº 3, dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 361-THVPGGG-367 (SEC ID nº 101) (epítipo nº 4, dentro del 4^o dominio repetido de la proteína tau). Estos anticuerpos pueden reconocer tau ordenada erróneamente y desordenada erróneamente en cerebros con AD humana, así como en modelos de ratas transgénicas de AD y tauopatías relacionadas, que expresan tau Δ (1-150, 392-441)/3R o tau Δ (1-150; 392-441)/4R truncada desordenada erróneamente humana. Los anticuerpos aislados también pueden interferir con una o varias de las múltiples actividades mediadas por tau que contribuyen a la patología de la AD, incluyendo: (i) transición de tau ordenada erróneamente o fisiológica a tau desordenada erróneamente; (ii) formación de monómeros, dímeros, trímeros de “tau patológica” y otros multímeros de tau; (iii) formación de agregados de tau insoluble; y (iv) promoción de la eliminación de tau extracelular.

La invención divulgada se basa, en parte, en el descubrimiento de que los anticuerpos que se unen específicamente a una de cuatro regiones funcionales previamente no identificadas de tau seleccionadas de 267-KHQPGGG-273 (SEC ID nº 98) (dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID nº 99) (dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID nº 100) (dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 361-THVPGGG-367 (SEC ID nº 101) (dentro del 4^o dominio repetido de la proteína tau) pueden inhibir la formación de agregados de tau patológica, y de detectar diversas formas

patológicas de tau, algunas de las cuales son las formadas más temprano en la enfermedad (por ejemplo, monómeros patológicos). Se exploraron hibridomas producidos contra tau II desordenada erróneamente humana (151-391/4R), que también se denomina en la presente solicitud tauΔ (1-150; 392-441)/4R, con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales específicos para PHF humanos tanto mediante inmunohistoquímica (IHC) como mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA). El conjunto resultante incluía el anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) DC8E8, que es de la subclase IgG1. El mapeo de epítomos de DC8E8 reveló que se unía a cuatro epítomos previamente no identificados en tau humana. Además, el análisis funcional adicional de DC8E8 reveló que cada epítomo representa una región funcional distinta dentro de tau. Estas regiones, que pueden describirse como nuevas dianas para el diagnóstico y terapia de AD, y por lo tanto se denominan "epítomos terapéuticos", están comprendidas dentro de 267-KHQPGGG-273 (SEC ID n° 98) (dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID n° 99) (dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID n° 100) (dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 361-THVPGGG-367 (SEC ID n° 101) (dentro del 4^o dominio repetido de la proteína tau). En algunas formas de realización, uno o más de los epítomos terapéuticos está comprendido dentro de 268-HQPGGG-273 (SEC ID n° 223) (dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 299-HVPGGG-304 (SEC ID n° 154) (dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 330-HKPGGG-335 (SEC ID n° 224) (dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 362-HVPGGG-367 (SEC ID n° 154) (dentro del 4^o dominio repetido de la proteína tau). En algunas formas de realización, por lo menos uno de los epítomos terapéuticos está comprendido dentro de 299-HVPGGG-304 (SEC ID n° 154) (dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau). En algunas formas de realización, uno o más de los epítomos terapéuticos es 299-HVPGGG-304 (SEC ID n° 154).

De hecho, DC8E8 puede diferenciar entre proteínas tau patológicas y normales, lo que sugiere que por lo menos uno de estos cuatro epítomos es conformacional. En otras palabras, DC8E8 reveló que por lo menos una de las regiones comprendidas por cada uno de los cuatro epítomos terapéuticos muestra una conformación en tau patológica que es diferente de la forma o las formas que asume en tau intrínsecamente desordenada (tau normal). DC8E8 puede notar o detectar ese cambio porque se une con tau patológica con una mayor afinidad que con la que se une a tau fisiológica. Además, la unión de DC8E8 con tau puede inhibir las interacciones tau-tau que conducen a la formación de agregados de tau patológica, como se mide por la capacidad de DC8E8 para inhibir la formación de agregados de tau insoluble *in vitro*. Por ejemplo, la unión de DC8E8 con tau normal puede prevenir uno o más de los cambios conformacionales/de forma analizados anteriormente para las regiones que comprenden los epítomos terapéuticos.

Además, la unión de DC8E8 con tau normal en una o más de estas regiones o epítomos terapéuticos impide ciertos otros cambios conformacionales en otra parte de la molécula que son necesarios para la producción de tau patológica. Sin resultar vinculado a ningún mecanismo específico, se contempla que uno o más de estos epítomos/regiones dentro de tau que se reconocen por DC8E8, actúan dentro de tau como un promotor de la agregación de tau-tau. Por ejemplo, la estructura/forma/conformación de uno o más de estos epítomos influye en la estructura de regiones adyacentes, de modo que la fijación de su forma dentro de la molécula de tau por unión de DC8E8 con ella interfiere con la capacidad o tendencia de la región adyacente (por ejemplo, 274-281) para formar láminas beta, cuando se necesita formación de láminas beta para agregación tau-tau. Por lo tanto, se contempla que la unión de DC8E8 con una de estas cuatro regiones dentro de tau normal puede evitar uno de los cambios patológicos más tempranos en tau identificados hasta la fecha: un cambio que es necesario para promover, o que en sí mismo promueve o permite la formación de láminas beta dentro de tau. Además, se contempla también que la unión de DC8E8 con una de estas cuatro regiones dentro de tau desordenada erróneamente/patológica, es decir, después de que una o más de las cuatro ya se ha cambiado a una conformación patológica, aún puede inhibir la agregación de tau-tau patológica por lo menos debido a que aún inhibe la formación de lámina beta, bloquea la interacción física tau-tau, o ambas.

Por lo tanto, el uso de DC8E8 como una herramienta para identificar nuevas dianas o regiones funcionales dentro de tau, se asignó a cuatro sitios de unión de DC8E8 específicos en tau un papel en la enfermedad de Alzheimer. Esto se realizó mediante el reconocimiento de que uno o más de estos sitios de tau están implicados en la formación de monómeros y multímeros de tau patológica, por lo menos debido a que la unión de DC8E8 con uno o más de ellos puede inhibir esos procesos. Además, los anticuerpos (por ejemplo, DC8E8) que se unen con uno o más de estos epítomos terapéuticos, pueden promover la eliminación de tau patológica del ambiente extracelular, por lo menos debido a que pueden mediar en la captación y degradación de tau patológica por microglía, *in vitro*; una reducción en la tau extracelular e intracelular en el cerebro, *in vivo*; o ambas. En otras palabras, estos anticuerpos tienen la capacidad de ayudar a reducir el daño que dichas formas patológicas de tau provocan al cerebro.

En consecuencia, se describen en la presente memoria anticuerpos que se unen específicamente con uno o más epítomos terapéuticos en tau, en los que cada uno de los epítomos terapéuticos se localizan por separado dentro de los restos de aminoácidos 267-KHQPGGG-273 (SEC ID n° 98) (epítomo n° 1, dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID n° 99) (epítomo n° 2, dentro del 2^o dominio repetido de la proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID n° 100) (epítomo n° 3, dentro del 3^{er} dominio repetido de la proteína tau) y 361-THVPGGG-367 (SEC ID n° 101) (epítomo n° 4, dentro del 4^o dominio repetido de la proteína tau). En algunas formas de realización, los epítomos terapéuticos n° 1 a 4 están comprendidos dentro de 268-HQPGGG-273 (SEC ID n° 223) (dentro del 1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 299-HVPGGG-304 (SEC ID n° 154)

(dentro del 2º dominio repetido de la proteína tau), 330-HKPGGG-335 (SEC ID nº 224) (dentro del 3º dominio repetido de la proteína tau), y 362-HVPGGG-367 (SEC ID nº 154) (dentro del 4º dominio repetido de la proteína tau). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. También se incluyen partes de anticuerpo de unión a antígeno, fragmentos de anticuerpo, variantes de anticuerpo, proteínas modificadas por ingeniería genética y armazones poliméricos. Estos incluyen cualquier molécula que contenga proteína o péptido que comprenda por lo menos una parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como, pero sin limitación, por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una parte de unión a ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco conservada, o cualquier parte de las mismas.

Como ejemplo no limitativo, un anticuerpo adecuado, parte de anticuerpo, fragmento, o variante, como se proporciona en la presente memoria, puede unirse con por lo menos uno de los epítopos terapéuticos descritos. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de digestión de anticuerpos, partes de anticuerpos específicas y variantes de las mismas, incluyendo anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígeno que se unen con uno o más epítopos terapéuticos. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse con un epítipo terapéutico que incluyen, pero sin limitación fragmentos Fab (por ejemplo, por digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, por digestión con pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (por ejemplo, por digestión con pepsina), facb (por ejemplo, por digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, por digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión con pepsina, reducción parcial o reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, por técnicas de biología molecular). Véase también, William E. Paul (ed.) *Fundamental Immunology*, 6ª Edición, Lippincott Williams y Wilkins, NY, N.Y. (2008). Ciertos fragmentos pueden producirse por escisión enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como se conoce rutinariamente en este campo, o como se proporcionan en la presente memoria. También pueden producirse anticuerpos en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de parada cadena arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen de combinación que codifique una parte de cadena pesada de F(ab')₂ para incluir secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH1 y/o región bisagra de la cadena pesada. Las diversas partes de anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente por técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética rutinarias.

Es conocido que la unidad estructural de anticuerpo básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La parte carboxilo-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Ver, en general, *Fundamental Immunology* C. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forma el sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son iguales. Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones marco conservadas, permitiendo la unión con un epítipo específico. Del extremo N terminal al C terminal, las cadenas tanto ligeras como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de IMGT. Un experto ordinario en la materia también conoce definiciones alternativas. Véase, por ejemplo, *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una cualquiera de SEC ID nº 141, 143, 152 y 153. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de cualquiera de SEC ID nº 141, 143, 152 y 153 en solamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos. Los expertos ordinarios en la materia pueden determinar qué aminoácidos en una región variable de cadena ligera pueden alterarse. Por ejemplo, comparando las secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena ligera de anticuerpos con la misma especificidad, los expertos ordinarios en la materia pueden determinar qué aminoácidos pueden alterarse sin alterar la especificidad. Véase los ejemplos para una comparación de secuencias de aminoácidos de CDR de la cadena ligera del anticuerpo DC8E8 ejemplificativo. Además, puede determinarse si la especificidad está alterada usando un ensayo de unión a antígeno. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone

en una cualquiera de SEC ID nº 141, 143, 152 y 153.

En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una cualquiera de SEC ID nº 138, 140, 147 y 148. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una cualquiera de SEC ID nº 138, 140, 147 y 148 en solamente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos. Los expertos ordinarios en la materia pueden determinar qué aminoácidos en una región variable de cadena pesada pueden alterarse. Por ejemplo, comparando las secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena pesada de anticuerpos con la misma especificidad, los expertos en la materia pueden determinar qué aminoácidos pueden alterarse sin alterar la especificidad. Véase, por ejemplo, figura 3E y 25B para una comparación de secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada de anticuerpo DC8E8 ejemplificativa. Además, puede determinarse si la especificidad está alterada usando un ensayo de unión a antígeno. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de SEC ID nº 138, 140, 147 y 148.

En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 141 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 138. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 141 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 140. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 141 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 147. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 141 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 148. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 143 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 138. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 143 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 140. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 143 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 148. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 152 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 138. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 152 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 140. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 152 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 147. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 152 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 148. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 153 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 138. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 153 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 140. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 153 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 147. En algunas formas de realización, un anticuerpo objeto comprende una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 153 y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 148.

En algunas formas de realización, el anticuerpo objeto comprende una región variable de cadena ligera que comprende por lo menos una, por lo menos dos o tres CDR seleccionadas de SEC ID nº 117-119. En algunas formas de realización, el anticuerpo objeto comprende una región variable de cadena pesada que comprende por lo menos una, por lo menos dos o tres CDR seleccionadas de SEC ID nº 120-122. También se proporcionan formas de realización en las que una cualquiera de estas seis CDR está alterada como se describe en el Ejemplo 14. En algunas formas de realización, por lo menos una de las CDR alteradas en la cadena ligera se selecciona de SEC ID nº 247 para CDR1, SEC ID nº 253 para CDR2 y una cualquiera de SEC ID nº 255, 257, 258, 259 y 260 para CDR3. En algunas formas de realización, por lo menos una de las CDR alteradas en la cadena pesada

se selecciona de SEC ID nº 261 o SEC ID nº 262 para CDR1, SEC ID nº 264 o SEC ID nº 265 para CDR2 y SEC ID nº 266, SEC ID nº 267 o SEC ID nº 269 para CDR3.

Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que presenta dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una diversidad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny *et al.* J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). La producción de anticuerpos biespecíficos puede ser un procedimiento relativamente trabajoso en comparación con la producción de anticuerpos convencionales y los rendimientos y grado de pureza son generalmente menores para anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos no existen en forma de fragmentos que tengan un único sitio de unión (por ejemplo, Fab, Fab' y Fv).

La invención no se refiere a anticuerpos en forma natural, es decir, no se toman de su ambiente natural sino que se aíslan y se obtienen por purificación de fuentes naturales, o se obtienen por recombinación genética o síntesis química, y de este modo pueden portar aminoácidos no naturales. Por lo tanto, como se usa en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology-A Synthesis (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, aminoácidos D, Nle, Nva, Cha, Orn, Hle, Chg, Hch o Har) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos alfa, alfa disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos divulgados en la presente memoria. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen (es decir, no se limitan a): 4-hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, épsilon-N,N,N-trimetil-lisina, épsilon-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, sigma-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en la presente memoria, la dirección izquierda es la dirección amino terminal y la dirección derecha es la dirección carboxilo-terminal, de acuerdo con el uso convencional y la costumbre.

De forma similar, la presente divulgación no se refiere a secuencias de nucleótidos en su ambiente cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención se han aislado y purificado, es decir, se tomaron directa o indirectamente, por ejemplo, por una copia, habiéndose modificado por lo menos parcialmente su ambiente. También se proporcionan ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, por medio de, por ejemplo, células hospedadoras, u obtenidos por síntesis química.

En relación con la presente divulgación, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos o restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias para comparar, obtenido después de alineamiento óptimo, siendo este porcentaje puramente estadístico y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias de forma aleatoria a lo largo de su longitud. La comparación de dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, pudiendo realizarse dicha comparación por segmento o usando una "ventana de alineamiento". El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación puede llevarse a cabo, además de por comparación manual, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math.2:482], por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], por medio del procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:2444] o por medio de software informático usando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por software de comparación BLAST NR o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos se determina comparando las dos secuencias alineadas de forma óptima en las que la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos para comparar pueden tener adiciones o deleciones en comparación con la secuencia de referencia para alineamiento óptimo entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que el nucleótido o resto de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, por ejemplo entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de alineamiento y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol. 1999, Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, puede usarse con los parámetros por defecto (notablemente para los parámetros "penalización de hueco abierto": 5, y "penalización de extensión de hueco": 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa); el porcentaje de identidad entre las dos secuencias para comparar se calcula directamente por el programa.

Para la secuencia de aminoácidos que muestran por lo menos 80%, por ejemplo 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, los ejemplos preferidos incluyen los que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, notablemente una delección, adición o sustitución de por lo

menos un aminoácido, truncamiento o extensión. En el caso de sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplacen por aminoácidos “equivalentes”. Se entiende que la expresión “aminoácidos equivalentes” indica cualquier aminoácido que probablemente sustituya a uno de los aminoácidos estructurales sin modificar sin embargo las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de los ejemplos específicos definidos a continuación.

Los aminoácidos equivalentes pueden determinarse en su homología estructural con los aminoácidos a los que sustituyen o en los resultados de ensayos comparativos de la actividad biológica entre los diversos anticuerpos que probablemente se generen. Como ejemplo no limitativo, la tabla posterior resume las posibles sustituciones que probablemente se lleven a cabo sin dar como resultado una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente; las sustituciones inversas son posibles naturalmente en las mismas condiciones.

Resto original	Sustitución o sustituciones
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

La invención proporciona un anticuerpo producido por la estirpe celular de hibridoma de ratón depositada en la American Type Culture Collection Tipo (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA, Estados Unidos) el 13 de julio de 2011, con la Designación de Depósito de Patente de ATCC PTA-11994 (expedida el 29 de julio de 2011) como se describe en los Ejemplos 1-2. Otros anticuerpos adecuados pueden producirse por una estirpe celular, una estirpe celular mixta, una célula inmortalizada o población clonal de células inmortalizadas, como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, N. Y. (1987-2001)); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, (Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (3ª Ed.), Vol. 1 -3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 (colectivamente, “Sambrook”); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)); Colligan, *et al.* (Eds.), *Current Protocols in Immunology*, (John Wiley & Sons, Inc., N. Y. (1994 - 2001)); Colligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, (John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)).

En un enfoque para producir los anticuerpos se produce un hibridoma fusionando una estirpe celular inmortal adecuada (por ejemplo, una estirpe celular de mieloma) con una de una diversidad de células productoras de anticuerpo. Las estirpes celulares inmortalizadas adecuadas incluyen, pero sin limitación, Sp2/0, Sp2/0-AG14, P3/NS1/Ag4-1, NSO, P3X63Ag8.653, MCP-11, S-194, heteromielomas, productos de fusión de los mismos o cualquier célula o célula de fusión derivada de los mismos, o cualquier otra estirpe celular adecuada como se conoce en la técnica, y/o disponible en el mercado para este fin (por ejemplo, ATCC). Las células productoras de anticuerpo adecuadas incluyen, pero sin limitación, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdala u otras células inmunitarias o que contienen linfocitos B, o cualquier otra célula que exprese secuencias constantes o variables de cadena pesada o ligera o marco conservadas o de CDR, como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como ADN genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, ARNhn, ARNm, ARNt, recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de alga, procariota, de anfibio, de insecto, de reptil, de pez, de mamífero, de roedor, equino, ovino, de cabra, de oveja, de primate, eucariota, mono-, bi- o tricatenario, hibridado y similares o cualquier combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, Ausubel, mencionado anteriormente, y Colligan, *Immunology*, mencionado anteriormente, Capítulo 2.

Otros enfoques para producir los anticuerpos de las diversas formas de realización descritas anteriormente incluyen, pero sin limitación, procedimientos que seleccionan anticuerpos recombinantes de bibliotecas de

péptidos o proteínas, incluyendo los disponibles en el mercado de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, Reino Unido; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Del.; Biovation, Aberdeen, Escocia, Reino Unido; Biolnvent, Lund, Suecia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif; Ixsys; Applied Molecular Evolution; y similares; procedimientos que se basan en la inmunización de animales transgénicos que pueden producir conjuntos seleccionables de anticuerpos humanos (generalmente estos ratones comprenden por lo menos un transgén que comprende ADN de por lo menos un locus de inmunoglobulina humana que está funcionalmente reordenado, o que puede someterse a reordenamiento funcional; los loci de inmunoglobulina endógenos en dichos ratones pueden alterarse o suprimirse para eliminar la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por genes endógenos); procedimientos de selección incluyendo presentación de ribosomas, tecnologías productoras de anticuerpo de células individuales (por ejemplo, el procedimiento de anticuerpo de linfocitos seleccionados ("SLAM")), y selección de linfocitos B; inmunización sustractiva usando tratamiento con ciclofosfamida; así como cualquier otro procedimiento rutinario en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en la solicitud publicada USA nº 2005/0142609).

En algunas formas de realización, los anticuerpos son anticuerpos de longitud completa optimizados, quiméricos o humanizados, que pueden producirse por una cualquiera o una combinación de técnicas conocidas, como se enumeran y ejemplifican en, por ejemplo, los capítulos 3, 4 y 5, de "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging Technologies and new therapeutic candidates, por James Shirvill, 2010" tales como: injerto de CDR, tal como tecnología SLAM de UBC, tecnología SMART de PDL, superhumanización de Arana Therapeutics plc, parchado de marcos, técnicas para realizar anticuerpos humanos compuestos, plataforma ATLab de BioAtla LLC, humanización, estrategias guiadas por linaje mutacional (MLG) estrategias de desinmunización, estrategias de humanización, modificación por ingeniería genética humana (por ejemplo, tecnología HE de XOMA), FcX, sistema LEX de Biolex Therapeutics Inc (Pittsboro, NC, Estados Unidos), Enfoques Potelligent (por ejemplo, BioWa), tecnología Compelgent, BestMab, ImmunoBody, EB66, Plataformas de expresión Synageva, XmaB de Xencor Inc., anticuerpos modificados por ingeniería genética con azúcar (por ejemplo, Seattle Genetics Inc (Bothell, WA, Estados Unidos)), anticuerpos "Wox" (oxidados con triptófano) (por ejemplo, InNexus Biotechnology Inc (Vancouver, BC, Canadá)); y similares. En algunas formas de realización, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos y pueden producirse por una o una combinación de plataformas de tecnología, como se enumeran y ejemplifican, por ejemplo, en el Capítulo 4 de "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, por James Shirvill, 2010", e incluyendo, pero sin limitación: presentación de fagos (por ejemplo, PDL, Dyax Corp, Cambridge, MA, Estados Unidos); exploración de anticuerpos basada en moléculas (MBAS) (por ejemplo, Affitech A/S descrito, por ejemplo, en los documentos EP0547201 y US 6.730.483); plataformas de selección de anticuerpos basada en células (CBAS); bibliotecas de anticuerpos combinatorias humanas (HuCAL, por ejemplo, MorphoSys AG); plataformas MAbstract (por ejemplo, Crucell NV), incluyendo las de la estirpe celular PER.C6; plataformas Adimab; XenoMouse; plataformas UltiMab; plataformas SEBVI; plataformas VelocImmune, plataformas Open Monoclonal Technology, plataformas Xenex; plataformas Cloning the Human Response (por ejemplo, IQ Therapeutics) y "anticuerpos de inmunidad instantánea"; plataformas Viventia (por ejemplo, Fusogenics, UnLock, ImmunoMine); plataformas de "anticuerpos humanos naturales" (por ejemplo, OncoMab, Patrys, Acceptys); MablgX (por ejemplo, Kenta Biotech); plataformas de medicina traduccional inversa (por ejemplo, Neuimmune Therapeutics); I-STAR (por ejemplo, Theraclone Sciences); CellSpot (por ejemplo, Trellis Bioscience); iBioLaunch (por ejemplo, iBio Inc.); y similares.

En algunas formas de realización, los anticuerpos se modifican uniéndolos con agentes no de anticuerpo, usando una o más de las plataformas de tecnología y procedimientos como se describen en el capítulo 5 de "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, por James Shirvill, 2010", incluyendo: conjugado de fármaco y anticuerpo (por ejemplo, ADC, Seattle Genetics); carga útil de anticuerpo dirigida (TAP; Immunogen Inc); Probody (por ejemplo, CytomX Therapeutics); ocultación de anticuerpos (por ejemplo, BioTransformations); terapia fotodinámica dirigida (por ejemplo, PhotoBiotics); AlbudAb (por ejemplo, GSK); hyFc (por ejemplo, Genexine); trampas de ligandos (por ejemplo, Biologix); CovX-Body (por ejemplo, CovX); entrecruzamiento dinámico (por ejemplo, InNexus Biotechnology); tecnología LEC (por ejemplo, Pivotal Biosciences, Morphotek); y similares.

En algunas formas de realización, el anticuerpo o sus ADNc codificantes pueden modificarse adicionalmente. Por lo tanto, en una forma de realización adicional, la invención proporciona procedimientos para producir los anticuerpos de las diversas formas de realización, en los que los procedimientos comprenden una cualquiera de la etapa o etapas de producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o un análogo de uno cualquiera de ellos. En algunas formas de realización, la producción de anticuerpos quiméricos es como se ha descrito en la solicitud internacional WO89/09622. Se describen procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados, por ejemplo, en la patente US nº 6.548.640 o la patente CA nº 1.340.879 (injerto de CDR).

Además, el anticuerpo o sus ADNc codificantes pueden modificarse adicionalmente. Por lo tanto, en una forma de realización adicional, son proporcionados asimismo unos procedimientos que comprenden una cualquiera de la etapa o las etapas de producir un anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de uno cualquiera de estos. Como se ha expuesto anteriormente, el anticuerpo divulgado en la presente memoria puede existir en una diversidad de formas

además de anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas. Véase, por ejemplo la solicitud internacional WO88/09344. Además, se conocen bien por los expertos en la materia díacuerpos y moléculas de unión a dominio de tipo V; véase, por ejemplo, patente US nº 7.166.697.

5 En algunas formas de realización, los anticuerpos (por ejemplo, DC8E8) se modifican o actúan como la base para realizar moléculas de unión con una o más de las propiedades de unión a antígeno descritas para el anticuerpo DC8E8. Estas proteínas de unión pueden realizarse por una o más de las técnicas enumeradas y ejemplificadas en, por ejemplo, el capítulo 6 de "Business Insights, Preclinical Development of Monoclonal Antibodies and Related Biologicals-Emerging technologies and new therapeutic candidates, por James Shirvill, 10 2010", incluyendo: Fab, TetraMAB (por ejemplo, Galileo Oncologics); scFv; Immuna (por ejemplo, ESBA Tech AG); [scFv]₂, incluyendo moléculas de unión que se unen a dos cualesquiera de las cuatro epítopos terapéuticos de DC8E8; BiTE (Affitech, Micromet AG); Avibodies (por ejemplo, Avipep Pty); TandAb (por ejemplo, Affimed Therapeutics); Flexibody (por ejemplo, Affimed), V-NAR (por ejemplo, AdAlta); Nanocuerpo (Ablynx NV); anticuerpos de dominio (por ejemplo, Diversys Ltd. GSK, Patente US nº 6.248.516 y documento EP0368684); 15 heteropolímero (por ejemplo, Elusys Therapeutics Inc.); Unicuerpo (por ejemplo, GenMab A/S); anticuerpos de dominio intercambiado (por ejemplo, Calmune Corporation Science, 27 jun 2003; 300 (5628):2065-71); productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y moléculas SCORPION (por ejemplo, Trubion Pharmaceuticals); inmunoglobulina de dominio variable doble, DVD-Ig (Abbott Laboratories); y similares.

20 Los anticuerpos de la presente invención o su cadena o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en este campo, por ejemplo, usando delección o delecciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones y/o recombinación o recombinaciones de aminoácidos y/o cualquier otra modificación o modificaciones conocidas en la técnica solas o en combinación. Véase, por ejemplo, los ejemplos proporcionados a continuación. Se conocen 25 por los expertos en la materia procedimientos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN que subyace a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Sambrook (mencionado anteriormente) y Ausubel (mencionado anteriormente). Las modificaciones del anticuerpo incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones de cadena principal, y modificaciones N y C terminales incluyendo acetilación, 30 hidroxilación, metilación, amidación y la unión o retirada de restos de carbohidratos o lípidos, cofactores y similares. De forma similar, la presente divulgación comprende la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo amino terminal fusionado con una molécula heteróloga tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo carboxilo terminal. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO00/30680 para detalles técnicos correspondientes.

35 En una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un anticuerpo o un fragmento de unión o cadena o cadenas de inmunoglobulina del mismo, comprendiendo el procedimiento

- (a) cultivar una célula como se ha descrito anteriormente; y
- 40 (b) aislar dicho anticuerpo o fragmento de unión o cadena del cultivo.

En algunas formas de realización, el aislamiento comprende poner en contacto la muestra que contiene anticuerpo con uno de los péptidos proporcionados en la presente memoria, con los que se une el anticuerpo.

45 Los huéspedes transformados pueden dejarse crecer en fermentadores y cultivarse de acuerdo con técnicas conocidas en este campo para conseguir crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina proporcionadas en la presente memoria, pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, 50 electroforesis en gel y similares; véase, Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N. Y. (1982). El anticuerpo o su cadena o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden después aislarse del medio de cultivo, lisados celulares, o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación de, por ejemplo, los anticuerpos expresados de forma recombinante o cadenas de inmunoglobulina proporcionadas en la presente memoria puede realizarse por medios convencionales tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas 55 preparatorias y separaciones inmunológicas, como las que implican el uso de los anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos contra la región constante del anticuerpo.

Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de por lo menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y se prefiere más del 98 a 99% o más homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez 60 purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad que se desee, los anticuerpos pueden después usarse terapéuticamente (incluyendo de forma extracorpórea) o en el desarrollo y realización de procedimientos de ensayo.

65 Son proporcionados asimismo unos anticuerpos acoplados con otros restos para fines tales como aplicaciones de dirección farmacológica y formación de imágenes. Dicho acoplamiento puede realizarse químicamente después de la expresión del anticuerpo en el sitio de unión o el producto de acoplamiento puede introducirse por ingeniería genética en el anticuerpo de la invención al nivel de ADN. Los ADN se expresan después en un

sistema hospedador adecuado, y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan, si es necesario.

Se proporciona asimismo un procedimiento para producir células que pueden expresar un anticuerpo de la invención o su cadena o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes que comprende modificar por ingeniería genética células con el polinucleótido o con el vector de la invención. Las células que pueden obtenerse por este procedimiento pueden usarse, por ejemplo, para ensayar la interacción del anticuerpo de la invención con su antígeno.

La invención proporciona también estirpes celulares productoras de anticuerpo y células recombinantes, como una fuente de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. La presente invención se refiere además a ensayos de diagnóstico y kits que comprenden los anticuerpos proporcionados por la invención y a procedimientos terapéuticos basados en los mismos.

Son asimismo proporcionados unos procedimientos para producir anticuerpos que pueden competir con DC8E8 y también pueden inhibir las interacciones tau-tau patológicas. Esos anticuerpos pueden explorarse con respecto a su capacidad para competir suficientemente con DC8E8 por la unión con tau y unión con uno, dos, tres o los cuatro epítopos "terapéuticos" identificados en la presente memoria.

La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos que codifican uno o más de los agentes basados en anticuerpos proporcionados en la presente memoria. En ciertos casos, el nucleótido por ejemplo codifica por lo menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina de los anticuerpos descritos anteriormente. Típicamente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de la VH y/o VL de la región variable de dicho anticuerpo. El experto en la materia conoce que cada dominio variable (el VH de cadena pesada y VL de cadena ligera) de un anticuerpo comprende tres regiones hipervariables, en ocasiones denominadas regiones determinantes de complementariedad o "CDR" flanqueadas por cuatro regiones marco relativamente conservadas o "FR" y se refieren a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. De acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, las regiones hipervariables o CDR del subtipo IgG humano del anticuerpo comprenden restos de aminoácidos de los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o los restos de un bucle hipervariable, es decir, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada como se describe en Chothia *et al.*, J. Mol.Biol. 196 (1987), 901 -917. En el sistema de numeración único de IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1ª-CYS), triptófano 41 (TRP CONSERVADO), aminoácido 89 hidrófobo, cisteína 104 (2ª-CYS), fenilalanina o triptófano 118 (J-PHE o J-TRP). Véase, por ejemplo, Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003). La numeración única de IMGT proporciona una delimitación normalizada de las regiones marco conservadas (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad CDR1-IMGT: 27 a 38, la CDR2-IMGT: 56 a 65 y la CDR3-IMGT: 105 a 117. La numeración única de IMGT se usa en representaciones gráficas 2D, designadas como collares de perlas IMGT. Véase, por ejemplo, Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002); Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21 -30 (2007). También se usa para representar estructuras tridimensionales. Véase, por ejemplo, IMGT/3Dstructure-DB Kaas, Q., Ruiz, M. y Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004). Los restos marco o FR son los restos de dominio variable distintos de y que flanquean las regiones hipervariables.

Se proporciona asimismo un ácido nucleico aislado caracterizado por que se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos (incluyendo cualquier código genético degenerado):

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención;
- b) un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico como se define en a);
- c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que puede hibridar en condiciones altamente rigurosas, con por lo menos una de las CDR seleccionadas de SEC ID nº 117-122 y SEC ID nº 247, 253, 255, 257-259, 122, 261, 262, 264, 265-267 y 269; y
- d) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos que puede hibridar en condiciones altamente rigurosas con por lo menos la cadena ligera de la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº 165 y/o la cadena pesada de la secuencia de ácido nucleico SEC ID nº 170, o una secuencia con por lo menos 80%, por ejemplo 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después del alineamiento óptimo con las secuencias SEC ID nº 165 y/o SEC ID nº 170, por ejemplo con por lo menos una de las CDR de las mismas de acuerdo con la numeración de IMGT.

Las secuencias nucleicas que muestran un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, por ejemplo 85%, 90%, 95% y 98%, después de alineamiento óptimo con una secuencia preferida, significan secuencias nucleicas que muestran, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tales como, en particular, una delección, un truncamiento, una extensión, una fusión quimérica y/o una sustitución, notablemente puntual. En algunas formas de realización, se encuentran secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácidos que la secuencia de referencia, estando esta relacionada con la degeneración del código genético, o secuencias complementarias que probablemente hibriden específicamente con las secuencias de referencia, por ejemplo, en condiciones altamente rigurosas, notablemente las definidas a continuación.

La hibridación en condiciones altamente rigurosas significa que las condiciones relacionadas con temperatura y fuerza iónicas se seleccionan de tal modo que permitan mantener la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios. De una manera puramente ilustrativa, las condiciones altamente rigurosas de la etapa de hibridación para el fin de definir los fragmentos polinucleotídicos descritos anteriormente son provechosamente las siguientes.

Se lleva a cabo hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante tres horas en tampón fosfato (20 mM, pH 7,5) que contiene SSC 5 x (SSC 1 x corresponde a una solución de NaCl 0,15 M + citrato sódico 0,015 M), formamida 50%, dodecil sulfato sódico al 7% (SDS), Denhardt 10 x, dextran sulfato 5% y ADN de esperma de salmón 1%; (2) hibridación primaria durante 20 horas a una temperatura que depende de la longitud de la sonda (es decir: 42°C para una sonda de > 100 nucleótidos de longitud) seguido de dos lavados de 20 minutos a 20°C en SSC 2 x + SDS 2%, un lavado de 20 minutos a 20°C en SSC 0,1 x + SDS 0,1%. El último lavado se lleva a cabo en SSC 0,1 x + SDS 0,1% durante 30 minutos a 60°C para una sonda de > 100 nucleótidos de longitud. Las condiciones de hibridación altamente rigurosas descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido pueden adaptarse por un experto en la materia para oligonucleótidos más largos o más cortos, de acuerdo con los procedimientos descritos en Sambrook, *et al.* (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3ª edición, 2001).

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado; véase, por ejemplo, Pope ME, Soste MV, Eyford BA, Anderson NL, Pearson TW. (2009) J Immunol Methods. 341 (1-2):86-96. y procedimientos descritos en la presente memoria. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide usando diferentes condiciones, por ejemplo, concentración salina, pH. Por lo tanto, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, K sub D, CI50, se realizan por ejemplo con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un amortiguador normalizado.

El dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable anteriormente descrito puede usarse para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseadas. Por lo tanto, son asimismo divulgados en la presente memoria los polipéptidos y anticuerpos que comprenden por lo menos una CDR del dominio variable anteriormente descrito y que provechosamente tienen sustancialmente las mismas o similares propiedades de unión que el anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos. El experto ordinario en la materia apreciará que usando los dominios variables o CDR descritos en la presente memoria pueden construirse anticuerpos de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las solicitudes de patente europea EP 0 451 216 A1 y EP 0 549 581 A1. Además, el experto en la materia sabe que la afinidad de unión puede potenciarse realizando sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901 -917) que se solapan parcialmente con las CDR, como se definen por Kabat. Por lo tanto, son divulgados asimismo los anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprenden una o más, por ejemplo, no más de dos sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina dos o las tres CDR de las regiones variables como se expone en las figuras 3B y 3E. En algunas formas de realización, el anticuerpo de la invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina dos o las tres CDR como se exponen en la figura 25B.

Los polinucleótidos o ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anteriormente descritos pueden ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producido de forma sintética o una molécula de ácido nucleico quimérica producida de forma recombinante que comprende cualquiera de esos polinucleótidos solo o en combinación. En algunas formas de realización, el polinucleótido es parte de un vector. Dichos vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección de dicho vector en una célula hospedadora adecuada y en condiciones adecuadas.

En algunas formas de realización, el polinucleótido está unido operativamente con una o más secuencias de control de la expresión, permitiendo la expresión en células procariotas o eucariotas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm traducible. Los expertos en la materia conocen elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucariotas, por ejemplo células de mamífero. Habitualmente comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales y/o regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas.

A este respecto, el experto en la materia apreciará que los polinucleótidos que codifican por lo menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina o solamente una. De forma similar, dichos polinucleótidos pueden estar bajo el control del mismo promotor o pueden controlarse por separado con respecto a expresión. Posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas comprenden, por ejemplo, el promotor PL, lac, trp o tac en *E. coli*, y son ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras eucariotas el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor de CMV, SV40, RSV, potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y otros animales.

Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, cadena abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, pueden añadirse a la secuencia codificante de los polinucleótidos secuencias líderes que pueden dirigir el polipéptido a un compartimiento celular o secretarlo al medio, y se conocen en la técnica. La secuencia o las secuencias líderes se ensamblan en fase apropiada con secuencias de inicio y terminación de la traducción, y opcionalmente una secuencia líder que puede dirigir la secreción de proteína traducida, o una parte de la misma, al espacio periplásmico o medio extracelular. En algunas formas de realización, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C o N terminal que transmite características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado. En este contexto, se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados e incluyen, sin limitación, el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen) y pSPORT1 (GIBCO BRL).

En algunas formas de realización, las secuencias de control de la expresión pueden ser sistemas promotores eucariotas en vectores que pueden transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas, pero también pueden usarse secuencias de control para huéspedes procariotas. Una vez que se ha incorporado el vector en el hospedador apropiado, el hospedador se mantiene en condiciones adecuadas para expresión a alto nivel de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, puede continuar la recogida y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, dímeros de cadena ligera/pesada de inmunoglobulina o anticuerpos intactos, fragmentos de unión u otras formas de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y., (1979).

Además, se proporcionan vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención; opcionalmente en combinación con un polinucleótido de la invención que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo de la invención. En algunas formas de realización, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de dirección o transferencia génica. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociado, virus del herpes o virus del papiloma bovino, pueden usarse para el suministro de los polinucleótidos o vector de la invención a población celular diana. Puede usarse cualquier procedimiento que se conozca por los expertos en la materia para construir vectores virales recombinantes. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook (mencionado anteriormente) y Ausubel (mencionado anteriormente). Alternativamente, los polinucleótidos y vectores proporcionados por la divulgación pueden reconstituirse en liposomas para suministro a células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos proporcionados por la divulgación (por ejemplo, las secuencias que codifican el dominio o los dominios variables pesados y/o ligeros de las cadenas de inmunoglobulina y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora por procedimientos conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, se utiliza habitualmente transfección de cloruro cálcico para células procariotas, mientras que puede usarse tratamiento con fosfato cálcico o electroporación para otros hospedadores celulares.

La presente invención se refiere además a células hospedadoras transformadas con un polinucleótido o vector proporcionado por la invención. La célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota. El polinucleótido o vector que está presente en la célula hospedadora puede estar integrado en el genoma de la célula hospedadora o puede mantenerse de forma extracromosómica. La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal o humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, en particular las de la especie *S. cerevisiae*. Dependiendo del hospedador utilizado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o cadenas de inmunoglobulina codificados por el polinucleótido de la presente divulgación pueden estar glucosilados o pueden estar no glucosilados. Ciertos anticuerpos proporcionados por la divulgación, o las cadenas de inmunoglobulina correspondientes, también pueden incluir un resto de aminoácido metionina inicial. Puede usarse un polinucleótido de la invención para transformar o transfectar el hospedador usando cualquiera de las técnicas habitualmente conocidas por los expertos ordinarios en la materia. Además, se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar genes unidos operativamente, fusionados, y expresarlos en, por ejemplo, células de mamífero y bacterias. Véase, por ejemplo, Sambrook. Las construcciones genéticas y procedimientos descritos en el mismo pueden utilizarse para la expresión de los anticuerpos proporcionados por la divulgación, o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes, en

huéspedes eucariotas o procariotas. En general, se usan vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficaz del polinucleótido insertado en relación con el hospedador. El vector de expresión típicamente contiene un origen de replicación, un promotor y un terminador, así como genes específicos que pueden proporcionar selección fenotípica de las células transformadas. Las células fuente adecuadas para las secuencias de ADN y células hospedadoras para expresión y secreción de inmunoglobulina pueden obtenerse a partir de varias fuentes, tales como la American Type Culture Collection Tipo ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas," 5ª edición (1985) Manassas, VA, Estados Unidos, y otra versión disponible). Además, pueden usarse animales transgénicos, por ejemplo mamíferos, que comprendan células de la invención para la producción a gran escala del anticuerpo de la invención.

Adicionalmente, la presente descripción comprende péptidos pequeños incluyendo los que contienen una molécula de unión como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, que contienen la región CDR3 de la región variable de uno cualquiera de los anticuerpos mencionados, en particular CDR3 de la cadena pesada puesto que se ha observado frecuentemente que, para ciertos anticuerpos, la CDR3 de cadena pesada (HCDR3) es la región que tiene un mayor grado de variabilidad y una participación predominante en interacción antígeno-anticuerpo. Dichos péptidos pueden sintetizarse o producirse por medios recombinantes para producir un agente de unión útil de acuerdo con la presente divulgación. Dichos procedimientos se conocen por los expertos ordinarios en la materia. Los péptidos pueden sintetizarse por ejemplo, usando sintetizadores peptídicos automáticos que están disponibles en el mercado. Los péptidos también pueden producirse por técnicas recombinantes incorporando el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y transformando células con el vector de expresión para producir el péptido.

Las proteínas de fusión anteriormente descritas pueden comprender además un enlazador escindible o sitio de escisión para proteinasas, que pueden llamarse restos espaciadores. Estos restos espaciadores, a su vez, pueden ser insolubles o solubles (Diener *et al.*, Science 231 (1986), 148) y pueden seleccionarse para permitir la liberación farmacológica del anticuerpo en el sitio diana. Son ejemplos de agentes terapéuticos que pueden acoplarse con los anticuerpos de la presente invención para inmunoterapia fármacos, radioisótopos, lectinas y toxinas. Los fármacos que pueden conjugarse con los anticuerpos y antígenos de la presente invención incluyen compuestos que se denominan clásicamente fármacos tales como mitomicina C, daunorrubicina y vinblastina. En el uso de anticuerpos o antígenos conjugados de forma radioisotópica de la invención para, por ejemplo, inmunoterapia, ciertos isótopos pueden ser más preferidos que otros dependiendo de factores tales como la distribución de leucocitos así como la estabilidad y emisión de isotipo. Dependiendo de la respuesta autoinmunitaria, algunos emisores pueden ser preferidos a otros. En general, se prefieren radioisótopos emisores de partículas alfa y beta en inmunoterapia. En ciertos casos preferidos, los radioisótopos son emisores alfa de alta energía, de corto alcance, tales como ²¹²Bi. Son ejemplos de radioisótopos que pueden unirse con los anticuerpos o antígenos de la invención para fines terapéuticos ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ²¹²Bi, ²¹²At, ²¹¹Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd y ¹⁸⁸Re. En ciertos casos, el radiomarcador es ⁶⁴Cu. Otros agentes terapéuticos que pueden acoplarse al anticuerpo o antígeno, así como protocolos terapéuticos *ex vivo* e *in vivo*, se conocen, o pueden determinarse, por los expertos ordinarios en la materia. Siempre que sea apropiado, el experto ordinario habitual en la materia puede usar un polinucleótido que codifica (y como la fuente para) uno cualquiera de los anticuerpos, antígenos anteriormente descritos o los vectores correspondientes, en lugar del material proteico en sí mismo.

Se proporciona asimismo la utilización de una molécula de unión o un anticuerpo, como se proporciona en la presente memoria, para la preparación de una composición para su uso *in vivo* para suprimir la formación de, o para reducir de otro modo los niveles de, tau desordenada erróneamente y/u ordenada erróneamente en un sujeto; o para la extracción extracorpórea de compuestos de tau patológica o sus precursores de fluidos corporales. Estos procedimientos pueden usarse para mejorar la cognición o ralentizar o invertir el deterioro cognitivo asociado con las enfermedades. El anticuerpo proporcionado por la invención, o derivados químicos del mismo, pueden administrarse directamente a la sangre o LCR y secuestrarse en una etapa posterior por captura de afinidad de la sangre o LCR, por lo que la tau ordenada erróneamente y desordenada erróneamente se secuestra junto con la molécula de unión anteriormente mencionada. Por lo tanto, se proporciona asimismo un procedimiento para tratar o prevenir la aparición o progresión de la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas en un sujeto que comprende retirar sangre o LCR del cuerpo del sujeto, someter la sangre y LCR, y devolver al sujeto la sangre y LCR, respectivamente, obtenido de este modo.

Las moléculas y partículas con un anticuerpo de la invención, péptido o molécula/proteína de unión como se divulga en la presente memoria también tienen utilidad de diagnóstico. La invención proporciona anticuerpos que reconocen y distinguen formas diferentes de proteína tau que están presentes en estadios distintos de enfermedad de Alzheimer. Estos anticuerpos pueden detectar tau (y sus diversos cambios conformacionales) tanto *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos pueden distinguir entre tau fisiológica y patológica en una diversidad de ensayos, incluyendo ensayos bioquímicos, de inmunoprecipitación, ELISA, de transferencia de Western, e inmunohistoquímicos (por ejemplo, nuevo, fijado, congelado, incluido en parafina), así como formación de imágenes *in vivo* usando, por ejemplo, DC8E8 radiomarcado (incluyendo fragmentos de DC8E8 tal como DC8E8 monocatenario), que distingue tau fisiológica de patológica (véase ejemplos). Pueden hacerlo en muestras y biopsias tanto sólidas como líquidas (por ejemplo, sangre, plasma, LCR, homogeneizados) de animales (por ejemplo, roedores, seres humanos). Algunos de estos ensayos de detección se describen en los ejemplos a continuación. Otros procedimientos rutinarios para detectar proteínas se conocen por los expertos ordinarios en

la materia, y por lo tanto pueden adaptarse de forma rutinaria a los anticuerpos, péptidos y moléculas de unión a tau, proporcionados en la presente memoria. Los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse (por ejemplo, fluorescentes, radiactivos, enzimas, magnéticos nucleares, metales pesados) y usarse para detectar dianas específicas *in vivo* o *in vitro*, incluyendo ensayos de tipo inmunoquímica *in vitro* (ver, por ejemplo, los ejemplos descritos posteriormente). Además, *in vivo*, podrían usarse de una manera similar a técnicas de formación de imágenes de medicina nuclear para detectar tejidos, células u otro material que tenga tau desordenada erróneamente y depósitos de la misma. La dirección a tau intracelular y extracelular desordenada erróneamente y lesiones neurofibrilares con sondas de formación de imágenes de diagnóstico detectables por MRI o PET proporcionaría un marcador biológico para un diagnóstico premórtem más definitivo de AD, así como un medio para controlar la eficacia de las terapias que se dirigen a proteína tau. Por lo tanto, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para la preparación de una composición para, y en procedimientos de, detección de tau y/o dirección de un agente de diagnóstico a tau patológica y lesiones neurofibrilares del cerebro para diagnóstico de AD. Estas composiciones y procedimientos pueden usarse como parte de un protocolo de tratamiento para AD y tauopatías relacionadas.

Son proporcionados asimismo unos anticuerpos adecuados para su uso en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unidos con un vehículo de fase sólida. Son ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar dichos anticuerpos son los inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Son ejemplos de dichos inmunoensayos el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo de tipo sándwich (ensayo inmunométrico), citometría de flujo y la transferencia de western. Los anticuerpos pueden unirse con uno de muchos vehículos diferentes y usarse para aislar células específicamente unidas a los mismos. Los ejemplos de vehículos conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polivinil cloruro, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. El vehículo puede ser soluble o insoluble. Existen muchos marcadores y procedimientos de marcaje diferentes conocidos por los expertos en la materia.

Los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse incluyen enzimas, radioisótopos y radionúclidos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, grupos de biotín, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores epitópicos), y compuestos químico/electroquímico/bioluminiscentes. Las enzimas incluyen peroxidasa (por ejemplo, HRP), luciferasa, fosfatasa alcalina, α -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. Alternativamente, el marcador es biotina, digoxigenina o 5-bromo-desoxiuridina. Los marcadores fluorescentes también pueden combinarse con los anticuerpos de la invención y proteínas de unión a tau proporcionadas en la presente memoria, incluyendo rodamina, fósforos de lantánidos, fluoresceína y sus derivados, fluorocromos, rodamina y sus derivados, proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP) y otras, dansilo, umbeliferona. En dichos conjugados, los anticuerpos/proteínas de unión pueden prepararse por procedimientos conocidos por un experto en la materia. Pueden unirse con enzimas o marcadores fluorescentes directamente; mediante un grupo espaciador o un grupo de enlace tal como polialdehído, glutaraldehído, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); o en presencia de otros agentes de unión tales como los conocidos habitualmente en la técnica. Pueden prepararse conjugados que portan marcadores de fluoresceína, por ejemplo, mediante reacción con un isotiocianato. En ciertas situaciones, el marcador o etiqueta también puede ser terapéutico.

Otros conjugados pueden incluir marcadores quimioluminiscentes tales como luminol y dioxetano, marcadores bioluminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o marcadores radiactivos tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo^{133,131}, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹ y yodo¹³¹. Pueden usarse como radioisótopos de diagnóstico procedimientos existentes conocidos por un experto en la materia para marcar anticuerpos con radioisótopos, directamente o mediante un agente quelante tal como el EDTA o DTPA mencionado anteriormente. Véase, por ejemplo, marcaje con [¹²⁵]Na por la técnica de cloramina-T [Hunter W.M. y Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495]; marcaje con tecnecio^{99m} como se describe en Crockford *et al.* (patente US nº 4.424.200); y unidos mediante DTPA como se describe en Hnatowich (patente US nº 4.479.930).

Los anticuerpos de la invención y otras moléculas de unión a tau también pueden usarse en un procedimiento para el diagnóstico de un trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal del individuo, que puede ser una muestra sanguínea, una muestra de linfa o cualquier otra muestra de fluido corporal y poniendo en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno. La presencia y/o cantidad de dichos complejos se determina después por procedimientos conocidos en este campo, indicando un nivel significativamente mayor que el formado en una muestra de control la presencia de enfermedad en el individuo ensayado. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende un anticuerpo de la invención.

Además, la presente divulgación se refiere a técnicas de formación de imágenes *in vivo* que utilizan una cualquiera de las moléculas de unión a tau divulgadas en la presente memoria. Por ejemplo, la técnica de

formación de imágenes médicas tomografía de emisión de positrones (PET) que produce una imagen tridimensional de partes del cuerpo se basa en la detección de radiación de la emisión de positrones. Típicamente, una biomolécula está marcada con radiactividad, por ejemplo, incorpora un isótopo indicador radioactivo. Tras la administración de la biomolécula marcada al sujeto, típicamente por inyección en la circulación sanguínea, la biomolécula marcada con radiactividad se concentra en tejidos de interés. El sujeto se coloca después en el explorador de formación de imágenes, que detecta la emisión de positrones. En una forma de realización, se administra una molécula de unión marcada, por ejemplo, marcada con ^{64}Cu tal como un anticuerpo a un sujeto y se realiza detección de la molécula de unión y por lo tanto tau desordenada erróneamente u ordenada erróneamente colocando el sujeto en un explorador de formación de imágenes y detectando la emisión de positrones, indicando de este modo un trastorno neurológico si se detecta emisión. La presente divulgación comprende por lo tanto un procedimiento para formación de imágenes de PET, que comprende la etapa de administrar una molécula de unión marcada con ^{64}Cu o marcada con equivalente divulgada en la presente memoria a un sujeto.

Se proporciona asimismo en la presente memoria un artículo de fabricación, tal como envases o kits farmacéuticos y de diagnóstico que comprenden uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes anteriormente descritos, es decir molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión del mismo, polinucleótido, vector o célula. Puede asociarse con dicho recipiente o dichos recipientes un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana. Además o como alternativa el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico apropiados. La composición o kit de la presente invención es adecuado para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas.

La actividad biológica de los anticuerpos proporcionados por la invención, sugiere que tienen suficiente afinidad para hacerlos candidatos para localización farmacológica/suministro farmacológico a células o tejido. La dirección y unión a depósitos de tau desordenada erróneamente podría ser útil para el suministro de agentes activos de forma terapéutica o diagnóstica y la terapia génica/suministro génico. Por lo tanto, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para la preparación de una composición para, y en procedimientos de, detección y/o dirección de un agente terapéutico o de diagnóstico a tau patológica y lesiones neurofibrilares del cerebro. Estas composiciones y procedimientos pueden usarse como parte de un protocolo de tratamiento para AD y tauopatías relacionadas.

Se proporcionan unas composiciones que comprenden uno o más de los compuestos anteriormente mencionados, incluyendo moléculas de unión, anticuerpos, fragmentos de unión; derivados químicos de los mismos; polinucleótidos, vectores y células. Ciertas composiciones pueden comprender además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables. Ciertos derivados químicos comprenden restos químicos que normalmente no forman parte de la molécula base o célula (por ejemplo, del anticuerpo, molécula de unión, polinucleótidos, vectores y células) pero se unen a ellos por procedimientos rutinarios. Dichos restos pueden actuar para, por ejemplo, mejorar la solubilidad, semivida, visualización, detectabilidad y/o absorción de la molécula o célula base. Alternativamente, los restos pueden atenuar efectos secundarios indeseables de la molécula base o reducir la toxicidad de la molécula base.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden combinaciones de los anticuerpos de la invención con agentes adicionales, tales como con interleucinas o interferones, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Por ejemplo, para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer el agente adicional puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-tau, anticuerpos anti-beta-amiloide y combinaciones de los mismos. Otros agentes incluyen, pero sin limitación, inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, quelantes metálicos de transición, factores de crecimiento, hormonas, fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE), antioxidantes, agentes reductores de lípidos, inhibidores de fosfodiesterasa selectivos, inhibidores de la agregación tau, inhibidores de proteína cinasas, inhibidores de proteínas de choque térmico, reactivos de inmunización pasiva y activa anti-amiloide, inhibidores de agregación antiamiloides, e inhibidores de secretasa. Por lo tanto, en una forma de realización, la molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión de la presente invención o de una molécula de unión que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión de uno cualquiera de los mismos, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención pueden utilizarse para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratar o prevenir la progresión de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas; para el alivio de síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas; para diagnosticar o explorar a un sujeto con respecto a la presencia de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas, para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas.

Péptidos para diagnóstico, inmunización activa y terapia de AD

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que ciertos fragmentos de tau son activos en la inducción de una respuesta inmunitaria a tau patológica cuando se inyectan en modelos de rata de AD, y se esperaba que hicieran lo mismo en seres humanos. Se descubrió que estos fragmentos de tau inmunógenos,

que comprenden una o más de las regiones de tau identificadas anteriormente, a través de DC8E8, como promotores o por lo menos participantes en el desarrollo y progresión de AD, eran capaces de (i) promover la eliminación de depósitos de tau extracelulares dentro de cerebros con AD (modelos de rata); (ii) inducir la producción de anticuerpos protectores contra AD en un modelo animal; y/o (iii) ralentizar la progresión de AD en los sujetos receptores, como se mide por uno o más ensayos bioquímicos y neurológicos, en un modelo animal. También pueden interferir físicamente directamente con la capacidad de tau para formar interacciones tau-tau patológicas a lo largo de estas regiones.

Son divulgados en la presente memoria unos inmunógenos o péptidos inmunógenos derivados de regiones de nueva identificación de la proteína tau que son importantes para la formación del núcleo de PHF y promover el ensamblaje de PHF *in vitro*. La dirección estratégica a estas regiones ("epítomos terapéuticos") puede conducir al tratamiento exitoso de AD y tauopatías relacionadas. Los inmunógenos pueden explorarse con respecto a eficacia terapéutica en un modelo animal, tal como los modelos de rata transgénica descritos a continuación.

En una forma de realización, los péptidos de tau por ejemplo comprenden una de las siguientes secuencias de aminoácidos, dentro de las que está comprendido por separado cada uno de los cuatro epítomos terapéuticos: a) SEC ID nº 98 tau 267-KHQPGGG-273, b) SEC ID nº 99 tau 298-KHVPGGG-304, c) SEC ID nº 100 tau 329-HHKPGGG-335, y d) SEC ID nº 101 tau 361-THVPGGG-367 (numerados de acuerdo con la isoforma de tau humana más larga tau 2N4R, de 441 restos de longitud, véase SEC ID nº 102). En otra forma de realización, los péptidos de tau comprenden por lo menos un epítomo terapéutico, en el que el epítomo terapéutico se selecciona de entre SEC ID nº 223 tau 268-HQPGGG-273, SEC ID nº 154 tau 299-HVPGGG-304, SEC ID nº 224 tau 330-HKPGGG-335 y SEC ID nº 154 tau 362-HVPGGG-367.

La presente divulgación proporciona inmunógenos de 30 aminoácidos de longitud, tales como una cualquiera de las SEC ID nº representadas en la Tabla 1. Cada uno de los inmunógenos incluidos en la Tabla 1 es un fragmento aislado de tau que contiene uno de los epítomos terapéuticos, localizados dentro de SEC ID nº 98, SEC ID nº 99, SEC ID nº 100 y SEC ID nº 101.

Tabla 1: Péptidos de 30 unidades de tau que portan cada uno un epítomo terapéutico.

SEC ID nº	Inmunógeno	Secuencias
SEC ID nº:1	Tau251-280	PDLKNVSKIGS TENLKHQPGGGKVQIINK
SEC ID nº:2	Tau256-285	VKSKIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLS
SEC ID nº:3	Tau259-288	KIGSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQ
SEC ID nº:4	Tau275-304	VQIINKKLDL SNVQSKCGSK DNIKHVPGGG
SEC ID nº:9	Tau244-273	QTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGG
SEC ID nº:10	Tau245-274	TAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
SEC ID nº:11	Tau246-275	APVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKV
SEC ID nº:12	Tau247-276	PVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQ
SEC ID nº:13	Tau248-277	VPMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQI
SEC ID nº:14	Tau249-278	PMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQII
SEC ID nº:15	Tau250-279	MPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN
SEC ID nº:16	Tau252-281	DLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKK
SEC ID nº:17	Tau253-282	LKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKL
SEC ID nº:18	Tau254-283	KNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLD
SEC ID nº:19	Tau255-284	NVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDL
SEC ID nº:20	Tau257-286	KSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSN
SEC ID nº:21	Tau258-287	SKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNV
SEC ID nº:22	Tau260-289	IGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQS
SEC ID nº:23	Tau261-290	GSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSK
SEC ID nº:24	Tau262-291	STENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKC
SEC ID nº:25	Tau263-292	TENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCG
SEC ID nº:26	Tau264-293	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
SEC ID nº:27	Tau265-294	NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSK
SEC ID nº:28	Tau266-295	LKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKD
SEC ID nº:29	Tau267-296	KHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDN
SEC ID nº:30	Tau 276-305	QIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS
SEC ID nº:31	Tau 277-306	IINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSV
SEC ID nº:32	Tau 278-307	INKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQ
SEC ID nº:33	Tau 279-308	NKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQI
SEC ID nº:34	Tau 280-309	KKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV
SEC ID nº:35	Tau 281-310	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVY
SEC ID nº:36	Tau 282-311	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
SEC ID nº:37	Tau 283-312	DLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKP
SEC ID nº:38	Tau 284-313	LSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV

SEC ID nº	Inmunógeno	Secuencias
SEC ID nº:39	Tau 285-314	SNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
SEC ID nº:40	Tau 286-315	NVQSKCGSKDN IKHVPGGGSVQIVYKPVDL
SEC ID nº:41	Tau 287-316	VQSKCGSKDN IKHVPGGGSVQIVYKPVDLS
SEC ID nº:42	Tau 288-317	QSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSK
SEC ID nº:43	Tau 289-318	SKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKV
SEC ID nº:44	Tau 290-319	KCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVT
SEC ID nº:45	Tau 292-321	GSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSK
SEC ID nº:46	Tau 293-322	SKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKC
SEC ID nº:47	Tau 294-323	KDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCG
SEC ID nº:48	Tau 295-324	DNKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGS
SEC ID nº:49	Tau 296-325	NIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSL
SEC ID nº:50	Tau 297-326	IKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLG
SEC ID nº:51	Tau 298-327	KHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGN
SEC ID nº:52	Tau 307-336	QIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQ
SEC ID nº:53	Tau 308-337	IVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQV
SEC ID nº:54	Tau 309-338	VYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVE
SEC ID nº:55	Tau 310-339	YKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEV
SEC ID nº:56	Tau 311-340	KPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVK
SEC ID nº:57	Tau 312-341	PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKS
SEC ID nº:58	Tau 313-342	VDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE
SEC ID nº:59	Tau 314-343	DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK
SEC ID nº:60	Tau 315-344	LSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKL
SEC ID nº:61	Tau 316-345	SKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD
SEC ID nº:62	Tau 317-346	KVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDF
SEC ID nº:63	Tau 318-347	VTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFK
SEC ID nº:64	Tau 319-348	TSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKD
SEC ID nº:65	Tau 320-349	SKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDR
SEC ID nº:66	Tau 321-350	KCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRV
SEC ID nº:67	Tau 322-351	CGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SEC ID nº:68	Tau 323-352	GSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQS
SEC ID nº:69	Tau 324-353	SLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSK
SEC ID nº:70	Tau 325-354	LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKI
SEC ID nº:71	Tau 326-355	GNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIG
SEC ID nº:72	Tau 327-356	NIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGS
SEC ID nº:73	Tau 328-357	IHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSL
SEC ID nº:74	Tau 329-358	HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLD
SEC ID nº:75	Tau339-368	VKSEKLDFKDRVQSKIGSLDN ITHVPGGN
SEC ID nº:76	Tau340-369	KSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNK
SEC ID nº:77	Tau341-370	SEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKK
SEC ID nº:78	Tau342-371	EKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKI
SEC ID nº:79	Tau343-372	KLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIE
SEC ID nº:80	Tau344-373	LDKDRVQSKIGSLDN ITHVPGGNKKIET
SEC ID nº:81	Tau345-374	DFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETH
SEC ID nº:82	Tau346-375	FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHK
SEC ID nº:83	Tau 347-376	KDRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKL
SEC ID nº:84	Tau 348-377	DRVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLT
SEC ID nº:85	Tau 349-378	RVQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTF
SEC ID nº:86	Tau 350-379	VQSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFR
SEC ID nº:87	Tau351-380	QSKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFRE
SEC ID nº:110	Tau352-381	SKIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFREN
SEC ID nº:89	Tau353-382	KIGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFRENA
SEC ID nº:90	Tau354-383	IGSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFRENAK
SEC ID nº:91	Tau355-384	GSLDNITHVPGGNKKIETHKLTFRENAKA
SEC ID nº:92	Tau356-385	SLDNITHVPGGNKKIETHKLTFRENAKAK
SEC ID nº:93	Tau357-386	LDNITHVPGGNKKIETHKLTFRENAKAKT
SEC ID nº:94	Tau358-387	DNITHVPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTD
SEC ID nº:95	Tau359-388	NITHVPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDH
SEC ID nº:96	Tau360-389	ITHVPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHG
SEC ID nº:97	Tau361-390	THVPGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGA

En algunas formas de realización, el péptido inmunógeno se selecciona de entre SEC ID nº 1 tau 251-PDLKNVSKS IGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280; SEC ID nº 2 tau 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285; SEC ID nº 3 tau 259- KIGSTENLKHQPGGGKVQIINK

KLDLSNVQ-288; y SEC ID nº 4 tau 275- VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304.

La presente divulgación también proporciona péptidos inmunógenos más cortos y más largos para su uso como se describe en la presente memoria que contienen una o más de las secuencias de aminoácidos de SEC ID nº 98 267-KHQPGGG-273, o aminoácidos SEC ID nº 99 298- KHVPGGG-304, o aminoácidos SEC ID nº 100 329-HHKPGGG-335, o aminoácidos SEC ID nº 101 361-THVPGGG-367 que pueden derivar de una cualquiera de las seis isoformas de proteína tau humana. En una forma de realización, un péptido inmunógeno comprende por lo menos un epítipo terapéutico, en el que el epítipo terapéutico se selecciona de SEC ID nº 223 tau 268-HQPGGG-273, SEC ID nº 154 tau 299-HVPGGG-304, SEC ID nº 224 tau 330-HKPGGG-335 y SEC ID nº 154 tau 362-HVPGGG-367. En una forma de realización, el péptido inmunógeno comprende una secuencia seleccionada de SEC ID nº 109 tau 314-DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE-342; SEC ID nº 110 tau 352- SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR-380; SEC ID nº 111 tau 325- LGNIHHKPGGGQ-336; SEC ID nº 112 tau 357-LDNITHVPGGGN-368; SEC ID nº 108 tau 294-305 KDNIKHVPGGGGS. En algunas de formas de realización, por lo menos un péptido inmunógeno se selecciona de uno cualquiera de entre SEC ID nº 1-4, SEC ID nº 9-101 y SEC ID nº 108-112, NIKAVPGGGGS (SEC ID nº 200), NIKHVPGGGGS (SEC ID nº 201), IKHVPGGGGS (SEC ID nº 202), KHVPGGGSV (SEC ID nº 203), HVPGGGSVQ (SEC ID nº 204), VPGGGSVQ (SEC ID nº 205), GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251), ANIKHVPGGGGS (SEC ID nº 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID nº 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID nº 149), DNIAHVPGGGGS (SEC ID nº 151), DNIKAVPGGGGS (SEC ID nº 159), DNIKHAPGGGS (SEC ID nº 161), y DNIKHVPGGGGS (SEC ID nº 171).

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las isoformas de tau humana se proporcionan en las SEC ID nº 102-107.

SEC ID nº 102 (2N4R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP
TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK
KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKQGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR
RTPSLPTPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQ GGGKVQIINK
KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV
QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

SEC ID nº 103 (1N4R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP
TAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKQGQANAT
RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTTP TREPKKVVAVV RTPPKSPSSA
KSRLQTAPVP MPDLKNVSKS IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN KLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV
YKPVDSLKVTSK SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDRV VQSKIGSLDN ITHVPGGGNKKI ETHKLTFR
ENAKAKTDHG AEIVYKSPW SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

SEC ID nº 104 (2N3R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP
TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIEPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK
KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKQGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR
RTPSLPTPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQ GGGKVQIVYK
PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK PGGGQVEVKS EKLDKDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFR
AKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV SPQLATLA DEVSASLAKQGL

SEC ID nº 105 (0N4R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKQGQANA TRIPAKTPPA PKTPSSGEP
PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPLPTP PTREPKKVVAV VRTPPKSPSS AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS
KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIKH VHPGGGSVQI VYKPVDSLKV TSKCGSLGNI
HHKPGGGQVE VKSEKLDKDRV RVQSKIGSLD NITHVPGGGN KKIETHKLTFR RENAKAKTDH GAEIVYKSPV
VSGDTSPRHL SNVSSTGSID MVDSPQLATL ADEVASLAKQGL

SEC ID nº 106 (1N3R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG SETSDAKSTP
TAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKQGQANAT
RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTTP TREPKKVVAVV RTPPKSPSSA
KSRLQTAPVP MPDLKNVSKS IGSTENLKHQ PGGGKVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIH KPGGGQVEVK

SEKLDKDRV QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN
VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

SEC ID nº 107 (0N3R):

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAGI GDTPSLEDEA
AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA PKTPPSSGEP
PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKAV VRTPPKSPSS AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS
KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN
ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPW SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA
DEVASLAKQ GL.

La utilización de vacunas basadas en péptidos para inducir respuestas inmunitarias en enfermedades para las que aún no están disponibles vacunas convencionales es atractivo (Brown, 1994; BenYedidia, *et al.*, 1997). Sin embargo, en muchos casos los péptidos pequeños son inmunógenos pobres porque actúan como haptenos que carecen de los péptidos de linfocitos Th necesarios y/o que se capturan con baja eficacia por células presentadoras de antígenos (APC). En una forma de realización de la presente invención, los epítopos inmunógenos pueden ser polipéptidos más largos que incluyan un epítipo protector de péptido de tau, o análogo junto con otros aminoácidos.

Algunos de los agentes descritos en la presente memoria para inducir una respuesta inmunitaria contienen el epítipo apropiado para inducir una respuesta inmunitaria contra tau patológica y depósitos de tau pero son demasiado pequeños para ser inmunógenos. En este caso, un inmunógeno peptídico puede estar unido con un vehículo adecuado para ayudar a inducir una respuesta inmunitaria. En ciertas formas de realización, los vehículos adecuados incluyen albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide del tétano o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, *E. coli*, cólera, o *H. pylori*, o un derivado tóxico atenuado. Otros vehículos para estimular o potenciar una respuesta inmunitaria incluyen citocinas tales como IL-1, péptidos IL-1 α y β , IL-2, γ INF, IL-10, GM-CSF, y quimiocinas, tales como M1P1 α y β y RANTES. Los agentes inmunógenos también pueden unirse con péptidos que potencian el transporte entre tejidos, como se describe en O'Mahony, documento WO 97/17613 y WO 97/17614.

Los agentes inmunógenos pueden unirse con vehículos por entrecruzamiento químico. Las técnicas para unir un inmunógeno con un vehículo incluyen la formación de enlaces disulfuro usando N-succinimidil-3-(2-piridil-tio) propionato (SPDP) y succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (si el péptido carece de un grupo sulfhidrilo, este puede proporcionarse por adición de un resto de cisteína). Estos reactivos crean un enlace disulfuro entre ellos mismos y restos de cisteína peptídicos en una proteína y un enlace amida a través del épsilon amino en una lisina, u otro grupo amino libre en otros aminoácidos. Se describe una diversidad de dichos agentes formadores de amida/disulfuro en Immun. Rev. 62, 185 (1982). Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en lugar de un enlace disulfuro. Muchos de estos agentes formadores de tio-éter están disponibles en el mercado e incluyen ésteres reactivos de ácido 6- maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético y ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil) ciclohexano-1-carboxílico. Los grupos de carboxilo pueden activarse combinándolos con succinimida o ácido 1-hidroxil-2-nitro-4-sulfónico, sal sódica.

Los péptidos inmunógenos también pueden expresarse como proteínas de fusión con vehículos. El péptido inmunógeno puede unirse en el extremo amino terminal, el extremo carboxilo terminal, o en un sitio en cualquier parte dentro del péptido (de forma interna) para el vehículo. En algunas formas de realización, pueden estar presentes múltiples repeticiones del péptido inmunógeno en la proteína de fusión.

Por ejemplo, también se proporcionan inmunógenos que incluyen proteínas de fusión que comprenden un péptido tau que porta un epítipo de linfocitos B protector unido con un epítipo de linfocitos Th Pan DR no natural promiscuo que induce una respuesta de linfocitos B contra el epítipo protector. En una alternativa adicional, son proporcionados unos inmunógenos que pueden diseñarse como polímeros (Jackson *et al.*, 1997), sistemas de múltiples péptidos antigénicos (MAP) (Tam y Recent, 1996), complejos inmunoestimuladores (ISCOM) (Barr, I.G. y Mitchell, 1996) y posiblemente otros polipéptidos anfotéricos ramificados (Wilkinson *et al.*, 1998) o péptidos quiméricos producidos por colinealización de los epítopos (Marussig *et al.*, 1997).

En ciertas formas de realización, los péptidos terapéuticos pueden aplicarse solos o en combinación, unidos o no con un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyendo KLH, toxoide del tétanos, proteína de unión a albúmina, albúmina de suero bovino, dendrímero (MAP; Biol. Chem. 358: 581) así como sustancias adyuvantes, o sus combinaciones, descritas por ejemplo, en O'Hagan *et al.* (2003) (en particular, los compuestos inmunopotenciadores endógenos y sistemas de distribución descritos en la misma) y en Wilson-Welder *et al.* (2009) (en particular los indicados en la Tabla 2 y 3 de dicho documento) o mezclas de los mismos.

En ciertas formas de realización, un agente inmunógeno como se describe en la presente memoria puede estar unido o ligado a un vehículo adecuado por entrecruzamiento químico para aumentar la respuesta inmunitaria contra tau patológica, incluyendo depósitos de tau. En ciertas formas de realización, el vehículo

farmacéuticamente aceptable unido o ligado es hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide del tétano, albúmina de suero bovino (BSA), molécula de inmunoglobulina (Ig), tiroglobulina u ovoglobulina. Otros vehículos para la estimulación de respuesta inmunitaria incluyen citocinas (tales como IL-1, IL-2, IL-10 IFN γ , GM-CSF) y quimiocinas (tales como M1P1 α y β).

Los péptidos o análogos de tau pueden sintetizarse por síntesis peptídica de fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse a partir de fuentes naturales. Los sintetizadores peptídicos automáticos están disponibles en el mercado a partir de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems, EZBiolab o Antagene. Los sistemas de expresión recombinante pueden incluir bacterias, tales como *E. coli*, levadura, células de insecto o células de mamífero. Se describen procedimientos para la manipulación de ADN y preparación de construcciones de ADN para expresión recombinante en Sambrook *et al.* (1989), se describen procedimientos para la producción de proteínas recombinantes en detalle en *Current Protocols in Protein Science* (Capítulo 5 "Production of Recombinant Proteins", UNIDADES 5.1-5.24, DOI: 10.1002/0471140864, también disponible en línea en onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471140864/toc).

Los agentes inmunógenos divulgados en la presente memoria pueden expresarse por un virus o bacteria como un vector o vehículo. Un ácido nucleico que codifica el péptido inmunógeno se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacteria. Finalmente, los péptidos inmunógenos pueden expresarse como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de superficie externa de un virus o pueden presentarse como una proteína transmembranaria de bacteria. Los virus o bacterias usados en dichos procedimientos son generalmente no patógenos o atenuados. Los virus adecuados incluyen adenovirus, VHS, virus de la encefalitis equina venezolana y otros virus alfa, virus de la estomatitis vesicular y otros rabdo virus, vaccinia y viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen *Salmonella* y *Shigella*. Alternativamente, es adecuada la fusión de un péptido inmunógeno con HBsAg de VHB.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere al agente terapéutico o inmunógeno, que también puede ser un análogo de los diversos péptidos descritos en las diversas formas de realización (por ejemplo, SEC ID n° 1-4; 9-97) o de fragmentos de los mismos.

La presente divulgación también se basa en el descubrimiento de péptidos nuevos, designados en la presente solicitud epítomos terapéuticos de diseño. A pesar de tener una secuencia primaria que es diferente de la de tau y fragmentos de tau, la presente divulgación presenta epítomos terapéuticos de diseño que pueden presentar una forma (por ejemplo, una estructura intrínsecamente desordenada, una estructura terciaria, una conformación) que imita la de uno o más de los "epítomos terapéuticos" de tau descritos anteriormente. Imitando una o más de estas regiones, estos epítomos terapéuticos de diseño pueden ser útiles para generar anticuerpos contra ellos, tales como anticuerpos que compitan con DC8E8. Estos péptidos pueden competir con tau o fragmentos de tau por la unión con el anticuerpo DC8E8, divulgado anteriormente.

También se incluyen epítomos terapéuticos de diseño inmunógenos que pueden inducir una respuesta inmunitaria a tau patológica cuando se inyectan en modelos de rata de AD y que se esperaría que hicieran lo mismo en seres humanos. Además, también se divulgan anticuerpos/antisueros de ratón, producidos en respuesta a inmunización con uno o más epítomos terapéuticos de diseño, y que pueden (i) reconocer uno o más epítomos que son o imitan los de DC8E8; (ii) diferenciar entre tau patológica y tau normal; y/o (iii) reconocer lesiones neurofibrilares en cerebro con AD humana y/o en modelos de rata transgénica de AD.

Se proporcionan asimismo unas composiciones para la prevención, el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, en las que la composición comprende (i) unos medios para tratar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto inhibiendo la agregación tau-tau; y (2) un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se proporcionan asimismo unas composiciones para la prevención, el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, en las que la composición comprende (i) unos medios para tratar enfermedad de Alzheimer en un sujeto uniéndose con uno o más "epítomos terapéuticos" en tau patológica; y (2) un vehículo y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Se proporcionan asimismo unas composiciones para la prevención, el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, en las que la composición comprende (i) unos medios para reducir la agregación tau-tau uniéndose con uno o más "epítomos terapéuticos" en tau patológica; y (2) un vehículo y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Formulaciones

Los agentes de la invención pueden administrarse como formulaciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo o péptido, como se ha descrito anteriormente) y uno o más de otros componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidridas, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que el principio activo en la formulación no esté

inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman W N "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J. Pharm. Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citas en las mismas para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos conocidos por químicos farmacéuticos.

Se conocen en la técnica una amplia diversidad de excipientes farmacéuticamente aceptables y no es necesario analizarlos en detalle en la presente memoria. Se han descrito ampliamente excipientes farmacéuticamente aceptables en una diversidad de publicaciones, incluyendo, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20ª edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel *et al.*, eds., 7ª ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe *et al.*, eds., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

La formulación seleccionada depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las formulaciones también pueden incluir vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración animal o humana. El diluyente se selecciona para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina tamponada con fosfato fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. La composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos y similares. Sin embargo, algunos reactivos adecuados para administración a animales, tales como adyuvante completo de Freund no se incluyen típicamente en composiciones para uso humano.

Se conocen en la técnica ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Pueden formularse composiciones que comprenden dichos vehículos por procedimientos convencionales conocidos. Se describen adicionalmente más vehículos a continuación.

Adyuvantes

Pueden administrarse agentes terapéuticos, inmunógenos, descritos en la presente memoria en combinación con adyuvantes, es decir, sustancias que no provocan en sí mismas respuestas inmunitarias adaptativas, pero amplifican o modulan la respuesta a un antígeno acompañante. Puede usarse una diversidad de adyuvantes en combinación con los péptidos y anticuerpos terapéuticos de la presente invención, para inducir una respuesta inmunitaria. El adyuvante o los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afectarían a la forma cualitativa de la respuesta.

En ciertas formas de realización, el adyuvante es una sal de aluminio (alumbre), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y sulfato de aluminio (Hunter, 2002). Dichos adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como 3 des-O-acilado monofosforil lípido A (MPL) o 3-DMP, aminoácidos poliméricos o monoméricos, tales como ácido poliglútamico o polilisina. Dichos adyuvantes pueden usarse con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos, tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) theramide™), u otros componentes de la pared celular bacteriana. Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua e incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837 de Van Nest *et al.*), que contiene escualeno 5%, Tween 80 0,5% y Span 85 0,5% (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidificador tal como microfluidificador modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (b) SAF, que contiene escualeno 10%, Tween 80 0,4%, polímero L121 bloqueado con pluronic 5%, y thr-MDP, microfluidificado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor, y (c) sistema adyuvante Ribi.TM. (RAS), (Ribi InunoChem, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno 2%, Tween 80 0,2%, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), por ejemplo MPL + CWS (Detox.TM.). En algunas formas de realización, el adyuvante es una saponina, tal como Stimulon™ (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas generadas a partir del mismo tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA), citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-2), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Alternativamente, pueden acoplarse péptidos de tau y sus análogos inmunógenos con un adyuvante. Por ejemplo, puede prepararse una versión lipopeptídica de un péptido de tau "A" acoplando ácido palmítico u otros lípidos directamente con el extremo N terminal de "A" como se ha descrito para la vacunación con antígeno de hepatitis B (Livingston, J. Immunol. 159, 1383 - 1392 (1997)). Sin embargo, dicho acoplamiento no debería

cambiar sustancialmente la conformación del péptido de tau "A" como para afectar a la naturaleza de la respuesta inmunitaria al mismo.

Un adyuvante puede administrarse con un inmunógeno como una composición individual, o puede administrarse antes de, simultáneamente con, o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y adyuvante pueden envasarse y proporcionarse en el mismo frasco o pueden envasarse en frascos separados y mezclarse antes de su uso. El inmunógeno y adyuvante típicamente se envasan con una etiqueta, que indica la aplicación terapéutica pretendida. Si el inmunógeno y adyuvante se envasan por separado, el envasado típicamente incluye instrucciones para mezclar antes de su uso. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, el programa de dosificación, la eficacia del adyuvante para la especie que se vacuna y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que se ha aprobado o puede aprobarse para administración a seres humanos por los cuerpos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para administración humana. Sin embargo, alumbre, MPL o el adyuvante incompleto de Freund (Chang *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 32:173-186 (1998)) solos u opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos son adecuados para administración humana.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir macromoléculas metabolizadas lentamente, grandes, tales como proteínas, polisacáridos como quitosano, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos y copolímeros (por ejemplo, sefarsa funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, y similares), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados lipídicos (por ejemplo, gotas de aceite o liposomas). Adicionalmente, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimuladores (es decir, adyuvantes).

Combinaciones

Se proporcionan en la presente memoria composiciones y procedimientos de tratamiento que combinan los anticuerpos y péptidos descritos en la presente memoria con otros tratamientos para AD y tauopatías relacionadas. Por ejemplo, actualmente, las estrategias terapéuticas relacionadas con tau se centran principalmente en los fármacos que inhiben tau cinasas o activan fosfatasa (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2004, 2005, 2007; Noble *et al* 2005), los fármacos que estabilizan microtúbulos (Zhang *et al* 2005), los fármacos que facilitan la degradación proteolítica de proteína tau plegada erróneamente (Dickey *et al* 2005; Dickey y Petrucelli, 2006; Dickey *et al* 2006), compuestos que evitan o invierten la agregación de tau (Wischik *et al* 1996; Pickhardt *et al* 2005; Taniguchi *et al* 2005; Necula *et al* 2005; Larbig *et al* 2007) o eliminación mediada por vacuna de tau agregada (Asuni *et al* 2007). Por lo tanto, la dirección múltiple (por ejemplo, dirección tanto de tau como de beta amiloide) puede aumentar sustancialmente la eficacia del tratamiento.

En el caso de enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas, en las que aparece tau soluble y tau insoluble patológica (depósitos de tau) en el cerebro, los agentes divulgados en la presente memoria también pueden administrarse junto con otros agentes que aumentan el paso de los agentes a través de la barrera hematoencefálica.

Métodos de administración

Los agentes para inducir una respuesta inmunitaria (pasiva o activa), para reducir el nivel de tau, o para cualquiera de los procedimientos de prevención, tratamiento o diagnóstico (*in vivo*) descritos en la presente memoria, pueden administrarse por medio parenteral, tópico, intradérmico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Una vía típica de administración es subcutánea aunque otras pueden ser igualmente eficaces. Otra vía típica es inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza más típicamente en los músculos del brazo o la pierna. También son eficaces inyecciones intravenosas así como inyecciones intraperitoneales, inyecciones intraarteriales, intracraneales o intradérmicas en la generación de una respuesta inmunitaria. En algunas formas de realización, los agentes se inyectan directamente a un tejido particular en el que se han acumulado depósitos.

Las formulaciones de aerosol tales como formulaciones de pulverización nasal incluyen soluciones acuosas purificadas u otras del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan por ejemplo a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Pueden presentarse formulaciones para administración rectal o vaginal como un supositorio con un vehículo adecuado.

Para administración parenteral, los péptidos terapéuticos divulgados en la presente memoria pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceite, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en composiciones sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes de pH y similares. Otros componentes de composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético. El aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite mineral son todos ejemplos de materiales útiles. En general, son vehículos líquidos preferidos los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, particularmente para soluciones inyectables. También pueden administrarse agentes divulgados en la presente memoria en

forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación prolongada del principio activo. Una composición ejemplificativa comprende el anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en tampón acuoso consistente en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen suministradores de fluidos y nutrientes, suministradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida o copolímero para efecto adyuvante potenciado, como se ha analizado anteriormente (véase Langer, *Science* 249, 1527 (1990) y Hanes, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97 -119 (1997)). Los agentes divulgados en la presente memoria pueden administrarse en forma de una inyección de depósito o preparación de implante que puede formularse de tal manera que permita una liberación prolongada o por pulsos del principio activo.

Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales, intranasales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas.

Para supositorios, los aglutinantes y vehículos incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo de 0,5% a 10%, por ejemplo 1%-2%. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación prolongada o polvos y contienen 10% -95% de principio activo, por ejemplo 25% -70%.

La aplicación tópica puede dar como resultado suministro transdérmico o intradérmico. La administración tópica puede facilitarse por coadministración del agente con toxina del cólera o derivados detoxificados o subunidades de los mismos u otras toxinas bacterianas similares (Véase Glenn *et al.*, *Nature* 391, 851 (1998)). Puede conseguirse coadministración usando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas por entrecruzamiento químico o expresión como una proteína de fusión.

Alternativamente, puede conseguirse suministro transdérmico usando un parche cutáneo o usando transferosomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol* 25, 3521 -24 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1368, 201-15 (1998)). Se consigue administración subcutánea de un anticuerpo, péptido o compuesto objeto, usando procedimientos y dispositivos convencionales, por ejemplo, aguja y jeringa, un sistema de suministro de orificio de inyección subcutánea, y similares. Se consigue administración intramuscular por medios convencionales, por ejemplo, aguja y jeringa, sistema de suministro continuo, etc. En algunas formas de realización, se suministra un anticuerpo, péptido y/o compuesto objeto por un sistema de suministro continuo. La expresión "sistema de suministro continuo" se usa de forma intercambiable en la presente memoria con "sistema de suministro controlado" y comprende dispositivos médicos de suministro continuo (por ejemplo, controlado) (por ejemplo, bombas) en combinación con catéteres, dispositivos de inyección y similares, una amplia diversidad de los cuales se conocen en la técnica. También pueden ser adecuadas bombas de infusión mecánica o electromecánica para su uso como se divulga en la presente memoria. Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen los descritos en, por ejemplo, las patentes US n° 4.692.147; n° 4.360.019; n° 4.487.603; n° 4.360.019; n° 4.725.852; n° 5.820.589; n° 5.643.207; n° 6.198.966; y similares. En general, los presentes procedimientos de suministro farmacológico pueden conseguirse usando cualquiera de una diversidad de sistemas de bomba rellenables. Las bombas proporcionan liberación uniforme, controlada a lo largo del tiempo.

Los agentes también pueden administrarse por el procedimiento convencional de taladrar un pequeño agujero en el cráneo para administrar un fármaco. En un aspecto preferido, la molécula de unión, especialmente anticuerpo o fármaco basado en anticuerpo de la presente invención puede cruzar la barrera hematoencefálica, lo que permite la administración intravenosa u oral.

En formas de dosificación farmacéuticas, los agentes (anticuerpos, péptidos, compuestos divulgados en la presente memoria) pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o también pueden usarse solos o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Los procedimientos y excipientes descritos en la presente memoria son únicamente ejemplificativos y no son de ningún modo limitativos. Un anticuerpo, péptido o compuesto objeto puede

formularse en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilen glicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes. Las formas de dosificación unitarias para inyección o administración intravenosa pueden comprender el agente activo en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "forma de dosificación unitaria" o "dosis", como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un anticuerpo objeto calculado en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las presentes formas de dosificación unitarias dependen del compuesto particular utilizado y el efecto para conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el hospedador.

También pueden inducirse respuestas inmunitarias contra proteínas tau patológicas y depósitos de tau mediante administración de ácidos nucleicos que codifican péptidos de tau terapéuticos. Dichos ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica el inmunógeno está unido con elementos reguladores, tales como un promotor y potenciador que permiten la expresión de dicho segmento de ADN en las células diana pretendidas de un paciente. Habitualmente, los elementos promotores y potenciadores de genes de inmunoglobulina (cadena ligera o pesada) o el promotor y potenciador temprano intermedio mayor del CMV son adecuados para dirigir la expresión en las células sanguíneas, que son la diana deseable para la inducción de una respuesta inmunitaria. Los elementos reguladores unidos y secuencias codificantes se clonan con frecuencia en un vector.

Están disponibles varios sistemas de vector viral incluyendo sistemas retrovirales (véase, por ejemplo, Lawrie *et al.*, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993)); vectores adenovirales (Bett *et al.*, J. Virol 67:591 1 (1993)); vectores de virus adenoasociados (Zhou *et al.*, J. Exp. Med. 179: 1867 (1994)), vectores virales de la familia de la viruela incluyendo virus vaccinia y los virus de la viruela aviar, vectores virales del género de virus alfa, tales como los derivados de virus Sindbis y del bosque de Semliki (Dubensky *et al.*, J. Virol 70:508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase patente US nº 5.643.576 de Johnston *et al.*) y rabdovirus, tales como virus de la estomatitis vesicular (véase documento WO 96/34625 de Rose) y papilomavirus (Ohe, *et al.*, Human Gene Therapy 6:325-333 (1995), documento WO 94/12629 de Woo *et al.*, y Xiao y Brandsma, Nucleic Acids Res. 24:2630-2622 (1996)).

El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que contiene el mismo, puede envasarse en liposomas. Se describen lípidos adecuados y análogos relacionados por las patentes USA nº 5.208.036, nº 5.264.618, nº 5.279.833 y nº 5.283.185. Los vectores y ADN que codifican un inmunógeno pueden adsorberse en o asociarse con vehículos en partículas, ejemplos de los cuales incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas y poli (lactida-co-glicolidas), véase, por ejemplo, McGee *et al.*, J. Micro Encap. (1996).

Pueden suministrarse vectores de terapia génica o ADN desnudo *in vivo* mediante la administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, infusión intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o intracraneal) o aplicación tópica (véase, por ejemplo, patente US nº 5.399.346). El ADN también puede administrarse usando una pistola génica (véase la patente US nº 6.436.709). En esta aplicación, el ADN que codifica un inmunógeno se precipita en la superficie de perlas metálicas microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas helio en expansión, y penetran tejidos hasta una profundidad de varias capas celulares (revisado en Haynes *et al.*, 1996). Por ejemplo, el dispositivo de suministro génico Accel™ fabricado por Agacetus, Inc. (Middleton, WI) o la pistola génica Helios fabricada por Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) son adecuados. Para fines terapéuticos, el ADN también puede suministrarse por electroporación (por ejemplo, como se describe en Trollet *et al.*, 2008 y referencias en la misma). Alternativamente, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente aplicando puntualmente el ADN en la piel con irritación química o mecánica (véase documento WO 95/05853) o por tatuaje (por ejemplo, como se describe en Van den Berg *et al.*, 2009).

En una variación diferente, el ADN o los vectores que codifican inmunógenos pueden suministrarse a células *ex vivo*, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia tisular) o células madre hematopoyéticas de donante universal, seguido de reimplantación de las células en un paciente, por ejemplo después de verificación de la expresión del inmunógeno y habitualmente después de selección de células que han incorporado el vector.

Otro enfoque prometedor aunque potencialmente más arriesgado para el tratamiento humano ha sido transfectar células dendríticas (DC, mediante suministro directo de ADN o usando estrategias virales) para producir el antígeno por sí mismas (Xing *et al.*, 2005), proporcionando de este modo un aporte continuo de antígeno intacto presentado mediante MHC I.

Sujetos susceptibles de tratamiento

Los sujetos susceptibles de tratamiento incluyen individuos en riesgo de enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas pero que no muestran síntomas, así como pacientes que ya muestran síntomas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive el tiempo suficiente. Por lo tanto, los presentes tratamientos o terapias pueden incluso administrarse de forma profiláctica a la población en general sin ninguna evaluación del riesgo del paciente objeto. Las vacunas presentadas en la presente patente pueden ser especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen los que tienen parientes que han padecido esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se ha determinado por la presencia de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo de aparición temprana de enfermedad de Alzheimer familiar incluyen mutaciones en el gen APP, genes de la presenilina PS1 y PS2, y marcadores para aparición tardía de enfermedad de Alzheimer en el gen de ApoE4 (recientemente revisados en Bertram y Tanzi, 2008). Los factores de riesgo adicionales incluyen historial familiar de AD, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que padecen en la actualidad enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse a partir de la demencia característica, así como la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varios ensayos de diagnóstico para identificar a individuos que tienen AD. Estos incluyen medición de los niveles de tau total, fosfo-tau y β amiloide (1-42) en el LCR. Los niveles elevados de tau y/o fosfo-tau y reducidos de β amiloide (1-42) indican la presencia de AD. Los individuos que padecen enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por MMSE, ADRDA u otros criterios.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Sin embargo, puede no ser necesario comenzar el tratamiento hasta que un paciente alcanza 40, 50, 60 o 70. El tratamiento puede implicar múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse ensayando el anticuerpo o las respuestas de linfocitos T o linfocitos B activados al agente terapéutico (por ejemplo, péptido de tau) a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosificación de refuerzo. En el caso de pacientes con síndrome de Down potencial, que tienen mayor riesgo de AD o tauopatías relacionadas, el tratamiento puede comenzar prenatalmente, administrando agente terapéutico a la madre, o poco después del nacimiento.

En algunas formas de realización, DC8E8 (o un derivado/parte/fragmento del mismo quimérico, humanizado, humano u otro) es el anticuerpo o vacuna pasiva que se pretende usar en pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) inmunosenescente envejecidos que muestran reducciones significativas en los niveles de la molécula coestimuladora CD28 en linfocitos T. Una reducción de la molécula coestimuladora CD28 es indicativa de la respuesta inmunitaria alterada (Saurwein-Teissl *et al.*, 2002). Los clones de linfocitos T CD8⁺ CD28⁺ que son frecuentemente CD45RA⁺ (inmunofenotipo: CD8⁺ CD28⁺ CD45RA⁺) producen una gran cantidad de citocina pro-inflamatoria IFN- γ y cantidades mínimas de IL-5. Estos clones se acumulan durante el envejecimiento normal e inducen desequilibrio en la producción de citocinas Th₁ y Th₂. Por lo tanto, la acumulación de clones de linfocitos T CD8⁺ CD28⁺ CD45RA⁺ junto con la reducción de la población de linfocitos B vírgenes (Siegrist y Aspinall, 2009) son los que más contribuyen al deterioro de las funciones inmunológicas que afecta a aproximadamente un tercio de la población mayor (Weng *et al.*, 2009, Saurwein-Teissl *et al.*, 2002).

En consecuencia, la inmunoterapia pasiva (por ejemplo, con DC8E8 (o un derivado/parte/fragmento del mismo quimérico, humanizado, humano u otro) proporciona un medio para evitar la insuficiencia del sistema inmunitario de una gran población de pacientes con AD y dirigirse a las proteínas tau patológicas que provocan degeneración neurofibrilar.

En algunas formas de realización, uno de los epítopos terapéuticos de tau (o un péptido que comprende uno de los epítopos terapéuticos de tau descritos en la presente memoria) se usa como una vacuna activa, que se pretende usar en pacientes con enfermedad de Alzheimer inmunocompetentes envejecidos. El inmunofenotipo de pacientes inmunocompetentes es CD8⁺ CD28⁺ CD45RA⁺. Por lo tanto los niveles de la molécula coestimuladora CD28 en linfocitos T CD8⁺ se determinarán y se usará como un marcador de selección de pacientes para vacunación activa.

Además, antes del tratamiento, se ensayará LCR y sangre tomada de pacientes con respecto a anticuerpos contra *Borrelia*, *Treponema*, *Chlamydia*, Herpesvirus y otros patógenos cerebrales para excluir individuos con trastornos del SNC inflamatorios e infecciosos crónicos que puedan imitar o agravar los síntomas de AD (Balin *et al.*, 2008; Itzhaki y Wozniak, 2008; Miklossy, 2008; Andreasen, 2010). Las infecciones del SNC con frecuencia comprometen la función de la barrera hematoencefálica (BBB), especialmente las infecciones por *Chlamydia* de las células endoteliales cerebrales, lo que puede conducir a un flujo de entrada aumentado de monocitos al parénquima del cerebro y de este modo pueden influir en la respuesta inmunitaria local (Balin *et al.*, 2008). También se ha mostrado que los sujetos mayores con niveles mayores de IgG para citomegalovirus (CMV) padecieron velocidades más rápidas de deterioro cognitivo (Itzhaki y Wozniak, 2008). Por lo tanto, para prevenir efectos adversos después de inmunización con uno de los agentes divulgados en la presente memoria (por ejemplo, reacción inmunitaria descontrolada a tau normal), los pacientes con enfermedad de Alzheimer con infecciones del SNC o los que dieron resultado positivo para anticuerpos contra los patógenos anteriormente mencionados se tratarán con una vacuna altamente selectiva.

Antes del tratamiento, el LCR y la sangre tomados de pacientes pueden ensayarse con respecto a anticuerpos contra *Borrelia*, *Treponema*, *Chlamydia*, *Herpesvirus* y otros patógenos cerebrales para excluir a individuos con trastornos del SNC inflamatorios e infecciosos crónicos que puedan imitar o agravar los síntomas de AD (Balin *et al.*, 2008; Itzhaki y Wozniak, 2008; Miklosy, 2008; Andreasen, 2010). Para evitar posibles efectos adversos promovidos por diversas infecciones crónicas, este grupo de pacientes se tratarán con un anticuerpo más selectivo o vacuna que contiene epítipo terapéutico. En algunos casos, la vacuna activa es un epítipo de diseño (por ejemplo, véase Ejemplos), que inducen la producción de anticuerpos estrictamente selectivos que se dirigen al epítipo terapéutico en proteínas tau patológicas. En algunas formas de realización, la vacuna no contiene ninguna secuencia de aminoácidos compartida con proteína tau normal/fisiológica.

Regímenes de tratamiento

En aplicaciones profilácticas, se administran composiciones farmacéuticas o medicamentos a un paciente susceptible de, o de otro modo en riesgo de, una enfermedad particular en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo o retardar la aparición de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones o medicamentos a un paciente que se sospecha que, o que ya padece dicha enfermedad en una cantidad suficiente para curar, o por lo menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una dosis terapéuticamente o farmacéuticamente eficaz. En regímenes tanto profilácticos como terapéuticos, los agentes se administran habitualmente en varias dosificaciones hasta que se ha conseguido una respuesta inmunitaria suficiente. Típicamente, la respuesta inmunitaria se controla y se proporcionan dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a desaparecer.

Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones anteriormente descritas, varían dependiendo de muchos factores, incluyendo los medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, u otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano. No es necesario valorar las dosificaciones de tratamiento para optimizar la seguridad y eficacia. En consecuencia, el tratamiento con un anticuerpo o proteína de unión a tau típicamente implicará múltiples dosificaciones durante un período de tiempo. Para inmunización pasiva con un anticuerpo, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg del peso corporal del hospedador. En algunas aplicaciones, la cantidad de anticuerpo o proteína de unión a tau puede administrarse a una dosificación de por lo menos 0,1 mg/kg de peso corporal, a una dosificación de por lo menos 0,5 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, o cualquier combinación de dosificaciones entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal. En algunos procedimientos, el anticuerpo o proteína de unión a tau pueden administrarse en múltiples dosificaciones (iguales o diferentes) durante un período de por lo menos 1 mes, por lo menos 3 meses o por lo menos 6 meses. El número total de dosis durante cualquier período de tratamiento puede ser, por ejemplo, entre 4 y 6, aunque pueden usarse otros números dependiendo de los factores analizados anteriormente. El tratamiento puede controlarse por cualquiera de los procedimientos descritos adicionalmente a continuación.

La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra adyuvante, requiriéndose dosificaciones mayores en ausencia de adyuvante. La cantidad de un inmunógeno para administración en ocasiones varía de 1 µg - 500 µg por paciente y más habitualmente de 5 - 500 µg por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis mayor de 1 - 2 mg por inyección. Típicamente se usan aproximadamente 10, 20, 50 o 100 µg para cada inyección humana. El momento de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez cada década. En cualquier día dado en que se proporcione una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor de 1 µg/paciente y habitualmente mayor de 10 µg/paciente si también se administra adyuvante, y mayor de 10 µg/paciente y habitualmente mayor de 100 µg/paciente en ausencia de adyuvante. Un régimen típico consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos de 6 semanas. Otro régimen consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses después. Otro régimen implica una inyección cada dos meses durante toda la vida. Alternativamente, las inyecciones de refuerzo pueden ser de una manera irregular como se indica por el control de la respuesta inmunitaria. En algunas formas de realización, la vacuna activa se formulará con un vehículo adecuado, preferentemente KLH, e hidróxido de aluminio como un adyuvante. Preferentemente, se aplicarán 100 µg de péptido/dosis/paciente (pero también se aplicarán 1 µg, 10 µg, 100 µg y 1 µg en la fase preclínica y 10 µg, 100 µg, 200 µg en los estudios de toxicidad de la fase I) una vez cada 4 semanas, 5 dosis en total.

Las dosis para ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, de 100 ng a 100 mg, de 1 µg a 10 mg o de 30 a 300 µg de ADN por paciente. Las dosis para vectores virales infecciosos varían de 10³-10⁹, o más, viriones por dosis. El tratamiento puede controlarse ensayando el anticuerpo, o las respuestas de linfocitos B o linfocitos T activados al agente terapéutico a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, puede indicarse una dosis de refuerzo.

En última instancia, el régimen de dosificación se determinará por el médico tratante y por los factores clínicos. Como se conoce en la técnica médica, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular para

administrar, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 mg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplificativo, especialmente considerando los factores anteriormente mencionados. En general, el régimen como una administración regular de la composición farmacéutica debería estar en el intervalo de 1 mg a 10 mg de unidades por día. Si el régimen es una infusión continua, también debería estar en el intervalo de 1 mg a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. Puede controlarse el progreso por evaluación periódica.

Además, puede ser deseable la coadministración o administración secuencial de otros agentes. En algunas formas de realización, una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del principio activo suficiente para aliviar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y toxicidad de dichos compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL50 (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación DL50/DE50. En algunas formas de realización, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar las propiedades cognitivas y/o conductuales normales en el caso de enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas.

Puede depender de diferentes medidas para la evaluación de la eficacia del tratamiento con cualquiera de los agentes divulgados en la presente memoria. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, niveles reducidos de una o más formas de tau patológica (por ejemplo, dentro del cerebro), aumento de la eliminación de tau patológica del cerebro y/o LCR; mejora de las medidas de rendimiento cognitivo, tales como funciones cognitivas (ensayadas, por ejemplo, por la clasificación de demencia clínica - CDR, escala de evaluación de enfermedad de Alzheimer - subescala cognitiva - ADAS- minexamen del estado mental Cog - MMSE); ensayos de mejora de la función motora (por ejemplo, ensayo de fuerza de agarre, ensayo Timed Up and Go (TUG), manual de TUG, ensayo de hablar mientras se camina, escala de clasificación de enfermedad de Parkinson unificada - UPDRS); ensayos de la mejora de la realización de actividades básicas de la vida diaria (ADL) (por ejemplo, higiene, vestirse, continencia, alimentación, preparación de comidas, hablar por teléfono, salir fuera, finanzas y correspondencia; ensayos de evaluación de discapacidad en demencia); y reducción de la gravedad/gradación de fuerza de agarre, locomoción deterioradas por AD y apraxia (que tienen correlaciones directas con los modelos animales y ensayos descritos posteriormente, en los ejemplos), deterioro de la memoria, afasia, agnosia, desorientación en el tiempo y el espacio y depresión.

Para evaluar la eficacia del tratamiento, los niveles y distribución de tau (dentro del cerebro, y en los fluidos corporales) puede ensayarse por cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria y/o por cualesquier otro procedimiento disponible para detectar tau. Por ejemplo, los niveles de tau podrían medirse *in vivo* (tomografía de emisión de positrones) usando el nuevo radioindicador de formación de imágenes 18F-THK523, que se une selectivamente con tau y la patología de tau *in vitro*, *ex vivo* (cortes tisulares) e *in vivo* (ratones transgénicos) (Fodero-Tavoletti *et al.*, 2011, Brain). La tau podría identificarse en el líquido cefalorraquídeo y en la sangre así como usando kits de ELISA que reconozcan tau total o fosfo-tau.

De hecho, el deterioro neuroconductual en ratas transgénicas tiene similitudes con el deterioro motor en pacientes con enfermedad de Alzheimer, lo que tiene implicaciones para los ensayos clínicos y protocolos de tratamiento con cualquiera de los agentes terapéuticos proporcionados en la presente memoria (incluyendo, pero sin limitación, agentes para vacunación activa. En seres humanos, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza clínicamente por alteración de la memoria progresiva y deterioro cognitivo, cambios conductuales y síntomas psicológicos (alteraciones del estado de ánimo, emoción, apetito, ciclo de vigilia y sueño, confusión, agitación y depresión) y alteración de la función motora (apraxia, mioclonos, alteración del paso, reducción de la fuerza muscular, características extrapiramidales tales como bradicinesia, rigidez y temblor en reposo) (Goldman *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2009). Muchos estudios han indicado que se observan habitualmente señales motoras en enfermedad de Alzheimer (AD) y se hacen más prominentes a medida que progresa la enfermedad (Goldman *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2003; Louis *et al.*, 2004; Pettersson *et al.*, 2005; Scarmeas *et al.*, 2004; Scarmeas *et al.*, 2005; Waite *et al.*, 2005; Alfaro-Acha *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Buchman *et al.*, 2007a; Boyle *et al.*, 2009). Notablemente, las señales motoras pueden preceder al deterioro cognitivo y predecir el deterioro cognitivo y funcional, institucionalización y mortalidad en enfermedad de Alzheimer (Morris *et al.*, 1989; Soininen *et al.*, 1992; Kraemer *et al.*, 1994; Chui *et al.*, 1994; Scarmeas *et al.*, 2004; Scarmeas *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la reducción de la fuerza muscular precede al desarrollo del deterioro cognitivo (Buchman *et al.*, 2007b; Boyle *et al.*, 2009).

El desarrollo de señales motoras en AD se ha asociado con la degeneración neuronal y la pérdida neuronal en el tronco encefálico (Zarow *et al.* 2003; Burns *et al.* 2005; Grudzien *et al.* 2007; Simic *et al.*, 2009; Wai *et al.*, 2009; Braak y DelTredici, 2011). Además, varios estudios han sugerido que la degeneración neurofibrilar se origina en el tronco encefálico y precede a la neurodegeneración cortical (Hertz, 1989; Simic *et al.*, 2009; Braak y DelTredici, 2011).

Estos hallazgos muestran que el deterioro cognitivo representa una evidencia clave en la patogénesis de AD. Además, el deterioro funcional de algunos dominios motores puede preceder a la demencia y predecir el

deterioro cognitivo. La inmunoterapia activa con los péptidos (incluyendo epítomos terapéuticos) descritos en la presente memoria puede mejorar el deterioro motor de ratas transgénicas que expresan tau patológica humana. Por lo tanto, la dirección directa de la patología del tronco encefálico por inmunoterapia activa puede evitar, ralentizar o retardar el deterioro motor así como el cognitivo en pacientes con AD humanos. Por lo tanto, el ensayo de las funciones motoras puede incluirse en la batería de ensayos que pueden usarse para la evaluación de la eficacia clínica de los agentes (por ejemplo, agentes de eliminación de tau, vacunas activas y pasivas) descritos en la presente memoria.

Además, un experto ordinario en la materia es consciente de correlaciones bien establecidas entre los niveles y distribución de tau patológica, (por ejemplo, NFT en la corteza/hipocampo) y progresión de la enfermedad. La densidad de tau patológica (patología de NFT) se ha correlacionado con déficit cognitivo y la gravedad de la enfermedad de Alzheimer (Braak y Braak, 1991; Bierer *et al.*, 1995; Berg *et al.*, 1998; Duyckaerts *et al.*, 1998; Giannakopoulos *et al.*, 1998, 2003). La tau patológica (por ejemplo, NFT, hilos de neurófilos) en la corteza entorrinal y el hipocampo se asocia de forma inversa con cambios longitudinales en la memoria (Reitz *et al.*, 2009). De forma similar, en el tronco encefálico, aparece tau patológica (NFT) en el núcleo del rafe dorsal en un estadio muy temprano; los otros núcleos del rafe se ven afectados posteriormente. Estas lesiones explican el déficit serotoninérgico hallado en AD (Duyckaerts *et al.*, 2009). Los síntomas extrapiramidales se han correlacionado con la patología de tau en la sustancia negra (Liu *et al.*, 1997). En consecuencia, un agente de tratamiento que pueda afectar a uno o más de estos patrones de distribución de AD probablemente tenga un efecto beneficioso en AD.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de proteínas tau humanas recombinantes

Tau de longitud completa humana (2N4R, 2N3R) y mutantes de delección de tau: Se generaron proteínas recombinantes de tau (Figuras 1 y 6) del clon τ 40 (Goedert, 1989), que se subclonó en el plásmido de expresión pET-17b (Novagen) y se expresó en bacterias. Cada mutante de delección de tau se verificó por secuenciación de ADN. Todos los mutantes de delección de tau y péptidos de tau se enumeran de acuerdo con la isoforma de tau humana más larga 2N4R, que es de 441 aminoácidos de longitud y por lo tanto también se denomina tau₄₄₁ (D'Souza, 2005). Los mutantes de delección de tau y péptidos derivados de la isoforma 2N3R se marcan por "3R" para indicar que la segunda repetición de unión a microtúbulo (aminoácidos 275-305 de 2N4R) estaba ausente. La producción de proteínas tau implicó las siguientes etapas: a) expresión de tau en bacterias; b) purificación de tau por cromatografía de intercambio iónico; c) purificación de tau por filtración en gel; d) concentración y almacenamiento de tau aislada; y e) purificación por inmunoadfinidad (esta es una excepción adoptada solamente para tau Δ (1-150; 392-441)/4R, que se usó en los experimentos de captación de microglía, véase Ejemplo 10, figura 17).

- a) Expresión bacteriana de tau de longitud completa humana (bien 2N4R o 2N3R) y mutantes de delección de tau recombinantes: los plásmidos de expresión de tau humana (anteriormente) se transformaron en *Escherichia coli* (*E. coli*), cepa de producción BL21 (DE3). Las células bacterianas que contenían el plásmido de expresión apropiado se cultivaron e indujeron como se describe en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" por Sambrook y Russell (2001). Se cultivó una única colonia de bacterias BL21 (DE3), transformadas con el plásmido pET-17b que conduce la expresión de una proteína tau o su fragmento, a 37°C en 500 ml de medio de cultivo de Luria con 100 µg/ml de ampicilina a 300 rpm y se indujeron mediante la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,4 mM. Después de incubación adicional a 37°C durante 3 horas, las bacterias se recogieron por centrifugación a 3000 xg durante 15 minutos a 4°C.
- b) Las purificaciones de cromatografía de intercambio catiónico de las proteínas tau básicas y neutras (isoformas de tau de longitud completa, tau Δ 358-441, tau Δ 306-400, tau Δ 421-441, tau Δ 300-312, tau Δ 134-168, tau Δ 1-220, tau Δ 1-126, tau Δ (1-150, 392-441)/4R, tau Δ (1-150, 392-441)/3R y tau Δ (1-296, 392-441)/4R) se realizaron esencialmente como se ha descrito previamente (Krajciova *et al.*, 2008). Después de la expresión, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (ácido 1,4-piperazindietanosulfónico 50 mM (PIPES) pH 6,9, cloruro sódico 50 mM (NaCl), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM, glicerol 5% (v/v)), se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C hasta su uso para purificación de proteínas tau. Para la purificación de proteínas tau, las suspensiones bacterianas congeladas se descongelaron rápidamente y se colocaron en hielo. Las paredes celulares bacterianas se rompieron por sonicación en hielo usando Sonopuls HD 2200, punta TT-13 (Bandelin, Alemania) ajustado a 50% de coeficiente de utilización, 50 W de salida de potencia, 6 veces durante 30 segundos con pausas de 30 segundos. Los lisados se clarificaron por centrifugación (21000 xg durante 15 minutos a 4°C) y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,45 µm. Se realizó purificación a gran escala de las proteínas tau recombinantes a 6°C usando una estación de trabajo ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences, Suecia). Los lisados filtrados se cargaron a un caudal de 3 ml/minuto en una columna HiTrap SP HP de 5 ml (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con el tampón de lisis, y se lavaron exhaustivamente con 60 ml de tampón de lisis hasta que la línea basal se hizo estable a 280

nm. Las proteínas tau unidas se eluyeron por un gradiente (0-30% dentro de 15 ml) de tampón B (tampón de lisis complementado con NaCl 1 M). Se recogieron fracciones individuales de 1 ml y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Para retirar ácidos nucleicos que se purifican conjuntamente con proteínas tau cargadas positivamente, las fracciones que contienen proteína tau se agruparon y purificaron por una segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico, usando una columna HiTrap SP-HP de 5 ml (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) con un gradiente menos pronunciado de tampón B (0-30% en 45 ml).

- c) Se realizó purificación por cromatografía de intercambio aniónico de las proteínas tau ácidas (tau Δ 222-427, tau Δ 228-441, tau Δ 257-400, tau Δ 137-441, tau Δ 283-441) como se ha descrito anteriormente (Csokova *et. al* 2004). Después de la expresión, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis de histidina (histidina 20 mM, pH 6,0, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, PMSF 0,1 mM y glicerol 5% (v/v)). Las paredes celulares bacterianas se rompieron por sonicación en hielo usando Sonopuls HD 2200, punta TT-13 (Bandelin, Alemania) ajustado a un coeficiente de utilización del 50%, 50 W de salida de potencia, 6 veces durante 30 segundos con pausas de 30 segundos. Los lisados se clarificaron por centrifugación (21000 xg durante 15 minutos a 4°C). Los lisados bacterianos se precipitaron por sulfato de estreptomicina 1% (Medexport, Rusia), se incubaron en hielo durante 5 minutos, se clarificaron por centrifugación (21000xg durante 15 minutos a 4°C), y se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m. Los lisados purificados con estreptomicina filtrada se cargaron a un caudal de 3 ml/minuto en una columna HiTrap Q-Sepharose HP de 5 ml (Amersham Biosciences, Suecia) y se lavaron exhaustivamente con 30 - 50 ml de tampón de lisis de histidina hasta que la línea basal de A280 se hizo estable. Las proteínas tau se eluyeron con un gradiente salino de dos etapas (NaCl 0,05-0,5 M en 40 ml seguido de NaCl 0,5-1 M en 20 ml) en amortiguador de lisis de histidina.
- d) En la etapa de filtración en gel final de purificación (la misma para todas las proteínas tau), las fracciones de proteína tau agrupada obtenidas por cromatografía de intercambio iónico, se inyectaron en una columna de filtración en gel (columna de uso en preparación HiLoad 26/60 Superdex 200, GE Healthcare) a 3 ml/minuto en PIPES o tampón de lisis de histidina para proteínas tau básicas/neutras o ácidas, respectivamente, complementado con NaCl 100 mM. Las proteínas tau eluidas se agruparon.
- e) Para la concentración de proteína tau después de purificación de filtración en gel, las fracciones agrupadas se diluyeron con 1,5 volúmenes de glicerol al 2,5%, y se cargaron de nuevo en una columna HiTrap SP HP (proteínas tau básicas y neutras) o en una columna HiTrap Q HP (proteínas tau ácidas). La proteína tau recombinante concentrada se eluyó después de la columna con un gradiente por etapas de NaCl 1 M. Finalmente, el tampón se cambió a solución salina tamponada con fosfato (PBS, fosfato disódico 8,09 mM (Na₂HPO₄), fosfato dihidrógeno potásico 1,47 mM (KH₂PO₄), NaCl 136,89 mM, cloruro potásico 2,7 mM (KCl)), saturada con argón, usando una columna de desalación HiTrap de 5 ml (GE Healthcare). La cuantificación proteica de muestras purificadas se realizó usando kits de cuantificación de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Estados Unidos), con albúmina de suero bovino (BSA) como un patrón. Las proteínas tau se separaron en alícuotas de trabajo, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.
- f) Para retirar posibles contaminantes bacterianos de la tau Δ (1-150; 392-441)/4R recombinante usada para las mediciones de captación de tau por microglía (Ejemplo 10, figura 17), la proteína tau recombinante se purificó por un procedimiento modificado, como sigue. Después de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, las fracciones que contenían tau se agruparon y se añadió un volumen 1/20 de polietilenimina 5% helada en agitación. La agitación continuó durante otros 30 minutos, en hielo. La muestra se centrifugó a 20000 xg durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió y se inyectó en una columna de uso en preparaciones Superdex 200 HiLoad 26/60 (GE Healthcare) a 3 ml/minuto en el tampón de lisis PIPES complementado con NaCl 100 mM pero sin DTT o cualquier otro agente reductor. Después de filtración en gel, las fracciones con proteína tau se agruparon y se cargaron en una columna de inmunoafinidad (a un caudal de 0,5 ml/minuto) que contenía anticuerpo DC25 (epítipo 347-353 de tau 2N4R, Axon Neuroscience, Viena, Austria) inmovilizado en Sepharose activada con CNBr. La columna se preequilibró en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1% (TBS-Tween). Después de la unión, la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de TBS-Tween y las proteínas tau unidas se eluyeron con glicina 0,1 M, pH 2,7. Las fracciones recogidas se neutralizaron añadiendo un volumen 1/30 de Tris-HCl 1 M pH 8,8 y se agruparon. Finalmente, el tampón se intercambió a PBS (saturado con argón), usando una columna de desalación HiTrap, 5 ml (GE Healthcare). Se realizó cuantificación proteica de las muestras purificadas usando un kit de cuantificación de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Estados Unidos), con BSA como un patrón. La proteína se separó en alícuotas de trabajo, se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C.

El anticuerpo DC25 purificado (Axon Neuroscience, Viena, Austria) usado para la columna de afinidad DC25 (mencionado anteriormente) se preparó como sigue. Se ajustó el sobrenadante de cultivo de hibridoma DC25 sin suero a pH 7,5 añadiendo un volumen de 0,2 de PBS, preclasificado por centrifugación a 20000 xg durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 μ m. El sobrenadante de cultivo de hibridoma DC25 preclarificado se cargó en una columna HP de proteína G HiTrap equilibrada con PBS (5 ml, GE

Healthcare) a 1 ml/minuto. Después de completarse la carga, la columna se lavó con 4 volúmenes de columna de PBS, y el anticuerpo unido se eluyó con glicina 100 mM, pH 2,7. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris-HCl 1 M pH 9, se agruparon, y se cambió el tampón a PBS usando una columna de desalación HiTrap (5 ml, GE Healthcare). El anticuerpo DC25 purificado se almacenó en alícuotas pequeñas a -70°C.

Ejemplo 2: Preparación de estirpes celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales contra tauΔ (1-150;392-441)/4R humana, exploración de anticuerpos monoclonales por ELISA, y caracterización inicial del anticuerpo monoclonal DC8E8

Se sensibilizaron ratones Balb/c de seis semanas de edad por vía subcutánea con 50 µg de tauΔ (1-150; 392-441)/4R recombinante (preparado como se ha descrito en el Ejemplo 1) en adyuvante completo de Freund (SIGMA), y se reforzó cinco veces a intervalos de cinco semanas con 50 µg del mismo antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Tres días antes de la fusión, se inyectó a los ratones por vía intravenosa 50 µg del mismo antígeno en PBS. Se fusionaron células del bazo de ratones inmunizados con células de mieloma NS/0 de acuerdo con el procedimiento de Kontsekova *et al.* (1988). Se mezclaron esplenocitos (10^8) con 2×10^7 células de mieloma NS/0 (relación 5:1) y se fusionaron durante 1 minuto en 1 ml de polietilenglicol 50% (PEG) 1550 (Serva) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero complementado con dimetil sulfoxido al 10%. Las células fusionadas se resuspendieron en DMEM que contenía suero de caballo al 20%, L-glutamina (2 mM), hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,04 mM), timidina (0,016 mM) y gentamicina (40 U/ml), a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células del bazo por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células se incubaron durante 10 días a 37°C y se exploraron los hibridomas en crecimiento con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales específicos anti-tauΔ (1-150; 392-441)/4R por un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Se usó un ELISA para detectar anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de cultivo de hibridoma dirigidos contra tauΔ (1-150; 392-441)/4R (una forma desordenada erróneamente de tau). Las placas de microtitulación se recubrieron durante una noche con tauΔ (1-150; 392-441)/4R (5 µg/ml, 50 µl/pocillo) a 37°C en PBS. Después de bloquear con leche desnatada en polvo 1% para reducir la unión no específica, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 0,05% y se incubaron con 50 µl/pocillo de sobrenadante de cultivo de hibridoma durante 1 hora a 37°C. Se detectaron anticuerpos monoclonales unidos con inmunoglobulina (Ig) antirrator de oveja conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (HRP, DAKO). La reacción se desarrolló con solución de ortofenilendiamina como un sustrato de peroxidasa y se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2 M. Se midió la absorbancia a 492 nm usando un lector de ELISA Multiscan MCC/340 (Labsystems). Las lecturas con un valor de absorbancia de por lo menos el doble del valor de los controles negativos (PBS) se consideraron positivas. Se ensayaron adicionalmente cultivos de hibridoma positivo por inmunohistoquímica (de acuerdo con el procedimiento de Zilka *et al.*, 2003) y se subclonaron en agar blando de acuerdo con el procedimiento descrito en Kontsekova *et al.* (1991).

El anticuerpo monoclonal DC8E8 (producido por la estirpe celular de hibridoma de ratón depositada en la American Type Culture Collection Tipo el 13 de julio de 2011, con la designación de depósito de patente de ATCC PTA-11994) se identificó entre los cultivos de hibridoma positivos producidos y seleccionados de este modo. DC8E8 se caracterizó adicionalmente como se describe a continuación. Se determinó que el isotipo del anticuerpo era IgG1 murino por ELISA usando un kit de isotipación de Ig de ratón (ISO-2, SIGMA).

Ejemplo 3: secuenciación de regiones variables de DC8E8 y su humanización por injerto de CDR

- a) Determinación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de cadenas ligera y pesada de DC8E8 (Figura 3). La secuencia de nucleótidos de las regiones variables de DC8E8 (Figura 3A y 3D) se determinó por secuenciación de ADN del ADNc sintetizado usando ARN total extraído de la estirpe celular de hibridoma de ratón PTA-11994 (ATCC), que expresa el anticuerpo monoclonal DC8E8. El ARN total se extrajo usando reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Estados Unidos). Se llevó a cabo la síntesis del ADNc de primera cadena usando el kit de "transcripción inversa de ADNc de alta capacidad" de acuerdo con el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, Estados Unidos). La composición de los reactivos para la mezcla maestra de transcripción inversa 2x fue la siguiente (cantidades por cada 20 µl de reacción): 2 µl de tampón RT 1x; 0,8 µl de mezcla de dNTP 25x (100 mM); 2 µl de cebadores aleatorios RT 10x (50 µM); 1 µl de transcriptasa inversa MultiScribe™ (50 U/µl); 4,2 µl de H₂O sin nucleasa. Para la transcripción inversa, se mezclaron 10 µl de la mezcla maestra de transcripción inversa 2x con muestra de ARN (2 µg/10 µl) y se sintetizó ADNc en las condiciones siguientes: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y enfriamiento final a 4°C. La amplificación de los genes que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (Finnzymes, Finlandia). Los cebadores directos (8E8L con sentido 5'-ACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCC-3' (SEC ID n° 132) y 8E8H con sentido 5'-CTCCTCCAATTGCAGCAGTCTGG-3' (SEC ID n° 133)) se diseñaron de acuerdo con la secuencia proteica de los extremos N terminales de cadenas ligera (DIVMSQSPSS) (SEC ID n° 134) y pesada (QVQLQSGPE) (SEC ID n° 135) de DC8E8. Las secuencias proteicas N terminales se determinaron usando degradación de Edman (cadena ligera) y desintegración en la fuente de MALDI (cadena pesada). Usando esta información, se identificaron las proteínas más similares a las cadenas ligera y pesada en el Genbank junto con sus secuencias de nucleótidos correspondientes. Las

secuencias de nucleótidos más probables de los genes V de ratón (ligeros y pesados) se identificaron después en la base de datos IMGT/LIGM-DB (www.imgt.org). Estos genes se usaron para el diseño de los cebadores directos (se realizaron correcciones usando las secuencias proteicas N terminales de DC8E8). Los cebadores inversos para las cadenas ligera y pesada (antisentido kappa 5'-GGAATTCGTTGAAGCTCTTGACAATGGGTG-3'(SEC ID nº 136) y antisentido G1 5'-GGAATTCACATATGCAAGGCTTACAACCAC-3 (SEC ID nº 137)) se derivaron de regiones constantes de cadenas kappa e IgG1, respectivamente.

Los productos de PCR se secuenciaron y las secuencias de ADN resultantes de regiones variables de cadenas ligera y pesada de DC8E8 se muestran en las figuras 3A y 3D, respectivamente. El alineamiento de DC8E8 con la cadena ligera IGKV8-21*01 y la cadena pesada IGHV1-81 01 de línea germinal de ratón más cercana se muestran en las figuras 3C y 3F, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están subrayadas en las secuencias proteicas de cadenas ligera y pesada de DC8E8 (Figuras 3B y 3E, respectivamente). Se identificaron CDR y regiones marco conservadas (FR) de acuerdo con el sistema de numeración de ImMunoGeneTics (IMGT) (véase, por ejemplo, Lefranc M.P. The IMGT inique numbering for immunoglobulins, T-cell receptors, and Ig-like domains. The immunologist 7, 132-136, 1999 (1999)).

b) Humanización de DC8E8. Para identificar una inmunoglobulina humana candidata adecuada para la producción de un DC8E8 humanizado mediante injerto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de DC8E8 de ratón, se determinó el gen de línea germinal humana con la mayor identidad de secuencia con DC8E8 usando el alineamiento por pares ClustalX2 de la secuencia de nucleótidos de DC8E8 contra un conjunto seleccionado de genes de inmunoglobulinas humana extraídos del archivo de texto plano de IMGT/LIGM-DB publicación 201112-6 (www.imgt.org). IgKv4-1'01 se identificó como el gen de línea germinal humana más cercano para la cadena ligera de DC8E8 (Figura 4) e IgHV1-69 10 se identificó como el gen de línea germinal más cercano para la cadena pesada de DC8E8 (Figura 5). Se diseñó el siguiente enfoque (Método 1 y procedimiento 2) y puede usarse para preparar una o más versiones humanizadas del anticuerpo DC8E8. Después de la expresión en un sistema de expresión de anticuerpo apropiado (por ejemplo, vectores de expresión de mamíferos usados para expresión de anticuerpos *in vitro* (por ejemplo, células HEK293) o *in vivo* (animales transgénicos)), los anticuerpos humanizados, recombinantes resultantes, pueden ensayarse con respecto a actividad (por ejemplo, actividad bioquímica y terapéutica) de acuerdo con cualquiera de los procedimientos usados para la caracterización de la actividad de DC8E8.

Método 1: injertos de CDR y mutaciones en la región marco conservada (FR), si es necesario (las CDR están subrayadas en negrita, las mutaciones FR están en negrita):

Región variable de cadena pesada (SEC ID nº 138-140, respectivamente, en orden de aparición):

DC8E8_pesada	QVQLQQSGPELVKPGTSTVKMPCKASGYIFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEIFPRSGSTYY
Germinal_humana_pesada	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGTIPILGIANY
SEC ID nº 140	QVQLVQSGPEVKKPGSSVKVPCKASGYIFTDYVISWVRQATGQGLEWMGEIFPRSGSTNY
DC8E8_pesada	NEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSSEDSAVYFCARDYYGTSFAMDYWGQGTSTVTVSS
Germinal_humana_pesada	AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENHCYYGMDVWGQGTSTVTVSS
SEC ID nº 140	AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDYYGTSFAMDYWGQGTSTVTVSS

Región variable de cadena ligera (SEC ID nº 141-143, respectivamente, en orden de aparición):

DC8E8_ligera	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
Germinal_humana_ligera	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
SEC ID nº 143	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
DC8E8_ligera	ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTITSSVQAEDLAVYYCKQSFYLRFTFGGGTKLDIK
Germinal_humana_ligera	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSQLAEDVAVYYCQYYSTLTFTGGGTKVEIK
SEC ID nº 143	ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSQLAEDVAVYYCKQSFYLRFTFGGGTKVEIK

Método 2: Las inmunoglobulinas de línea germinal de ratón (Figura 3) y humana (Figuras 4 y 5) con la mayor identidad de secuencia con DC8E8 se encontraron y se alinearon con la secuencia proteica de DC8E8. Las regiones CDR se identificaron siguiendo el sistema de numeración IMGT. Los restos de contacto con el antígeno más probables dentro del sitio de combinación de DC8E8 se identificaron basándose en el trabajo de MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 1996.

Se identificaron diversos candidatos de aminoácidos para mutación en la versión humanizada de DC8E8 basándose en los siguientes criterios combinados:

- i. su presencia en la CDR y probabilidad de contacto con el antígeno
- ii. su presencia en la zona de Vernier
- iii. si estaban mutados o no en la línea germinal de ratón.

Se identificaron dos niveles de candidatos a mutación de acuerdo con los criterios anteriores:

Restos de tipo X (en negrita):

- Restos diferentes entre DC8E8 y la línea germinal de ratón más cercana, aminoácidos no similares
- Restos en la CDR y el antígeno de contacto. Las CDR están en minúscula **negrita cursiva** en la secuencia de DC8E8 posterior.

Restos de tipo Y (en negrita subrayados):

- Restos idénticos entre DC8E8 y la línea germinal de ratón más cercana, pero diferentes en la línea germinal humana más cercana y localizados en la zona de Vernier (aminoácidos no similares)
- Restos diferentes entre DC8E8 y la línea germinal de ratón más cercana (aminoácidos similares/conservados).

Se identificaron dos secuencias de aminoácidos para cada cadena con mutaciones que se predijo que afectarían a la actividad de DC8E8:

SEC ID nº 147, 152: solamente se mutarán el tipo de restos **X**.

SEC ID nº 148, 153: se mutarán los tipos de restos tanto **X** como **Y**

Región variable de cadena pesada (SEC ID nº 138, 145, 139, respectivamente, en orden de aparición):

DC8E8_pesada	QVQLQQSGPELVKPGTSTVKMPCKAS <i>gyiftdyvis</i> VWVKQRTGGGLEWIGE <i>ifprsgstYY</i>
Germinal_ratón_pesada	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWVKQRTGGGLEWIGETIYPRSGNTYY
Germinal_humana_pesada	QVQLVQSAGAEVKKPSSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIILGIANY **** *: :*:***::***** *: * *****: .*****:* * * * :
SEC ID nº 147	QVQLVQSGS <i>PEVV</i> KPGSSSVK MPC KASGYIFSDYAISWVR QT GQGLEWMGE IFFRS GSTNY
SEC ID nº 148	QVQLVQSGS <i>PEVV</i> KPGSSSVK MPC KASGYIFSDYAISWVR QT GQGLEWMGE IFFRS GSTYY
DC8E8_pesada	NEKFKGKATLTADKSNTAYMQLSSVTSEDSAVFYFC <i>Cardyygtsfamydy</i> WGQGSVTTVSS
Germinal_ratón_pesada	NEKFKGKATLTADKSSTAYMELRSLTSEDSAVFYFCARDYYGTYYYAMPDYWGQGSVTTVSS
Germinal_humana_pesada	AQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYCCARENHCYYYGMDEVWGQGTTVTIVSS *****.******.***.*.....*

SEC ID n° 147 A Q K F Q G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D Y Y G T S Y G M D V W G Q G T T V T V S S
SEC ID n° 148 N O K F O G R V T I T A D K S T N T A Y M O L S S L T S E D T A V Y Y C A R D Y Y G T S Y G M D V W G O G T T V T V S S

Región variable de cadena ligera (SEC ID nº 141, 150, 142, respectivamente, en orden de aparición):

DC8E8_ligera DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS*qsllnsrtrkny*LAWYQQKPGQSPKLLIY*was*TR
 Germinal_ratón_ligera DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR
 Germinal_humana_ligera DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTR

SEC ID n° 152 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQS**VLN**SRNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
SEC ID n° 153 DIVMTQSPDLSAVSLGERATI**S**CKSSQS**VLN**SRNNKNYLAWYQQKPGQ**SP**KLLIYWASTR

DC8E8_ligera ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVVQAEDLAVYYC***kqsfylr***tFGGGTKLDIK
 Germinal_ratón_ligera ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVVQAEDLAVYYCKQSYNLRTFGGGTKLEIK
 Germinal_humana_ligera ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVLQAEDVAVYYCQQYSLTFGGGTKEIK
 *****.*.....*..*****.*

SEC ID n° 152 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCK**KQSFYLR**TFGGGKTKVEIK
SEC ID n° 153 ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCK**KQSFYLR**TFGGGKTKVEIK

Ejemplo 4: mapeo del epítipo de DC8E8 usando mutantes de delección de tau recombinantes y péptidos derivados de tau

Se usaron mutantes de delección de proteína tau humana 2N4R, así como péptidos derivados de tau (Antagene,

Inc. (Sunnyvale, CA) y EZBiolab, (Estados Unidos)) para el mapeo de epítomos de DC8E8 usando ELISA (Figuras 6, 7 y 8). Se prepararon isoformas de tau humana recombinante (2N4R; 2N3R) y mutantes de delección de tau (Figuras 6A, 6B) como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se sintetizaron péptidos (Figura 7A, 7B) por EZBiolabs (Estados Unidos) con pureza mayor del 85%.

Se recubrieron las placas de microtitulación durante una noche a 37°C con proteínas tau recombinantes o con péptidos de tau (5 µg/ml en PBS, 50 µl/pocillo). Después de bloquear con leche en polvo desnatada 1% para reducir la unión no específica, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 0,05% y se incubaron con 50 µl/pocillo de sobrenadante de cultivo de hibridoma DC8E8, durante 1 hora a 37°C. Se detectó anticuerpo monoclonal unido con Ig de oveja antirratón conjugada con HRP (DAKO). La reacción se desarrolló con solución de ortofenilendiamina como sustrato de peroxidasa y se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2 M. La absorbancia se midió a 492 nm usando un lector de ELISA Multiscan MCC/340 (Labsystems). Las lecturas con un valor de absorbancia de por lo menos el doble del valor de los controles negativos (PBS) se consideraron positivas.

DC8E8 reconoció las siguientes proteínas tau humanas: Δ358-441, Δ421-441, Δ134-168, Δ1-220, Δ1-126, Δ (1-296; 392-441)/4R y Δ (1-150; 392-441)/4R, pero no consiguió reconocer las proteínas tau con delecciones Δ222-427, Δ306-400, Δ228-441, Δ300-312, Δ257-400, Δ137-441 y Δ283-441 (Figura 6B, 6C). DC8E8 reconoció las isoformas de tau fisiológicas 2N4R y 2N3R en un menor grado que lo que reconoció la tauΔ (1-296; 392-441)/4R, tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica/desordenada erróneamente y los mutantes de delección de tau (Δ358-441, Δ421-441, Δ134-168, Δ1-220, Δ1-126) de tau 2N4R (Figura 6C). Un mapeo de epítomos más detallado, usando péptidos de tau, reveló que DC8E8 no reconoció los péptidos de tau 240-270, 270-300 y 301-330 (Figura 7A, 7B, 7C). Juntos, estos hallazgos sugieren que DC8E8 tiene cuatro sitios de unión o epítomos en tau humana, cada uno de los cuales está localizado en la región de dominio de repetición de unión a microtúbulos de la proteína tau, y cada uno de dichos epítomos está localizado por separado dentro de una de las siguientes secuencias de tau: 267-KHQPGGG-273 (SEC ID nº 98) (1^{er} dominio repetido de proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID nº 99) (2^o dominio repetido de proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID nº 100) (3^{er} dominio repetido de proteína tau) y secuencia 361-THVPGGG- 367 (SEC ID nº 101) (4^o dominio repetido de proteína tau) (Figura 7D). Además, debido a que DC8E8 se une con las formas truncadas de tau mejor que con la tau de longitud completa de 3 repeticiones y 4 repeticiones, estos resultados también sugieren que DC8E8 se une mejor con formas enfermas de tau que con tau fisiológica (tau39 (2N3R) y tau40 (2N4R)). Además, debido a que se cree que tau cambia de conformación de tau fisiológica (intrínsecamente desordenada) a tau enferma (desordenada erróneamente y ordenada erróneamente, Kovacech *et al.*, 2010), estos resultados sugieren que uno o más de los sitios de unión para DC8E8 (los epítomos de DC8E8) tienen una conformación diferente en tau fisiológica que la que tiene en tau enferma y que DC8E8 puede detectar ese cambio conformacional.

Debido a que estos dominios repetidos de tau están conservados entre especies (Figura 8A), DC8E8 probablemente reaccione contra proteínas tau de diversas especies tales como rata, ratón, vaca, chimpancé, rana y otras. Se realizó un alineamiento de proteínas tau de diversas especies animales usando el software ClustalW2 (disponible, por ejemplo, en www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). La tau humana está representada por la isoforma de tau más larga expresada en neuronas cerebrales humanas (2N4R, 441 aminoácidos). Las proteínas tau de otras especies se seleccionaron de bases de datos públicas. Las secuencias dentro de las que cada uno de los cuatro epítomos reconocidos por el anticuerpo DC8E8 están localizados están encuadradas.

Se realizaron mutaciones y delecciones puntuales adicionales en ciertos péptidos derivados de tau (de 8 unidades, 9 unidades y 10 unidades) para definir adicionalmente los epítomos de DC8E8, como se evaluó por la capacidad de cada péptido para competir con tauΔ (1-150; 392-441/4R) por la unión con DC8E8. Se sintetizaron péptidos por EZBiolabs (Estados Unidos) con pureza mayor del 85%. El ELISA de competición se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo convencional. Se recubrieron placas de ELISA (placa de alta unión IWAKI, nº 3801-096, Bertoni GmbH, Austria) durante una noche a 4°C con 100 µl/pocillo de 5 µg/ml de tauΔ (1-150; 392-441/4R) purificada recombinante en PBS. Las placas de alta unión IWAKI se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 (0,05% v/v) y se bloquearon con PBS/Tween 20 durante 2 horas a 25°C. Cada uno de los péptidos se disolvió por separado en PBS a una concentración final de 5 mM. Se prepararon diluciones en serie (2 veces) de los péptidos en PBS/Tween 20 en placas de polipropileno con fondo de los pocillos cónico (Greiner, nº 651201) (intervalo de concentraciones 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, y 2,5 µM). Se añadieron 100 µl de cada dilución por pocillo. El anticuerpo monoclonal de DC8E8 purificado (se realizó la purificación como se describe posteriormente en el Ejemplo 5) se diluyó hasta una concentración de 2 µg/ml en PBS/Tween 20 y se mezclaron 100 µl de este anticuerpo diluido con cada dilución en serie de péptidos dando como resultado mezclas de 200 µl con 100 ng de anticuerpo/100 µl que contenían cada una péptido de ensayo respectivo a una concentración de 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM y 1,25 µM. Las mezclas de anticuerpo/péptido se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Se transfirieron cien microlitros (100 µl) de mezclas de anticuerpo/péptido de las placas de polipropileno a placas de alta unión IWAKI recubiertas con tauΔ (1-150; 392-441/4R) y bloqueadas con PBS/Tween 20, y se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20. Las muestras (en las placas) se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria (ajustada a 250 rpm) con 100 µl de inmunoglobulinas antirratón de cabra policlonales/HRP (Dako, nº P0447) diluidas 1:4000 en PBS/Tween 20. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween. Las muestras/placas se incubaron después con 100 µl de una solución de 1,5 mg/2 ml de o-PDA (o-fenilendiamina, Sigma, P1526) en Na acetato 0,1 M pH 6,0 (Roth, nº 6779)

complementada con 1,5 µl/2 ml de H₂O₂ 30% (SIGMA, H-0904) durante 10 minutos a 25°C, en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 2 M (Merck, 1.00731.1000). El alcance de la reacción se siguió leyendo la absorbancia de las muestras/placas a 490 nm (por ejemplo, usando el contador multimarca Victor (Wallac)).

La figura 8B muestra los resultados del ELISA de competición realizado con los siguientes seis péptidos: NIKAVPGGGS (SEQ ID nº 200), NIKHVPGGGS (SEQ ID nº 201), IKHVPGGGS (SEQ ID nº 202), KHVPGGGSV (SEQ ID nº 203), HVPGGGSVQ (SEQ ID nº 204) y VPGGGSVQ (SEQ ID nº 205). Los péptidos KHVPGGGSV (SEQ ID nº 203) y HVPGGGSVQ (SEQ ID nº 204), que comprenden el epítipo terapéutico de tau nº 2, compitieron con por lo menos uno de los epítipos terapéuticos originales presentes en tauΔ (1-150; 392-441/4R). La retirada de la histidina subrayada del epítipo de SEC ID nº 204 conduce a una pérdida de actividad competitiva (véase péptido VPGGGSVQ, SEC ID nº 205). Una mutación puntual que cambia una histidina a alanina (en la posición de tau correspondiente 299, en el “epítipo nº 2”) conduce a una pérdida de actividad competitiva (péptido NIKAVPGGGS, SEC ID nº 200). Los péptidos que contienen 2 o 3 aminoácidos antes de la “histidina 299” (hacia el extremo N terminal) también compitieron con el epítipo original (péptidos IKHVPGGGS (SEC ID nº 202) y NIKHVPGGGS (SEC ID nº 201), respectivamente). Estos resultados sugieren que el epítipo mínimo de DC8E8 que permanece dentro de la segunda repetición de tau (epítipo nº 2) está dentro de una secuencia de 6 unidades, concretamente HVPGGG (SEC ID nº 154).

Los experimentos de mapeo anteriormente mencionados sugirieron la presencia de la secuencia de aminoácidos PGGG dentro de uno o más de los epítipos del anticuerpo DC8E8. Además, esta secuencia de aminoácidos está presente en los cuatro epítipos en la proteína tau unida por DC8E8 (véase SEC ID nº 98, 99, 100, 101). Para determinar los restos en la región N terminal de los epítipos de DC8E8, se realizaron experimentos de exploración de alanina en el péptido de tau 295-DNIKHVPGGGS-305, que comprende el epítipo de DC8E8 (dentro de 298-KHVPGGG-304, SEC ID nº 99) que permanece dentro del 2º dominio repetido de tau.

La capacidad de unión de los péptidos mutantes con DC8E8 se evaluó por la capacidad de cada péptido para competir con tauΔ (1-150; 392-441/4R) por la unión con DC8E8. Se sintetizaron siete péptidos por EZBiolabs (Estados Unidos) con pureza mayor del 85%: ANIKHVPGGGS (SEC ID nº 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID nº 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID nº 149), DNIAHVPGGGS (SEC ID nº 151), DNIKAVPGGGS (SEC ID nº 159), DNIKHAPGGGS (SEC ID nº 161), y el péptido con la secuencia original DNIKHVPGGGS (SEC ID nº 171). El ELISA de competición se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo convencional. Se recubrieron placas de ELISA (placa de alta unión IWAKI, nº 3801-096, Bertoni GmbH, Austria) durante una noche a 4°C con 100 µl/pocillo de 5 µg/ml de tauΔ (1-150; 392-441/4R) purificada recombinante en PBS. Las placas de alta unión IWAKI se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 (0,05% v/v) y se bloquearon con PBS/Tween 20 durante 2 horas a 25°C. Cada uno de los péptidos se disolvió por separado en PBS a una concentración final de 5 mM. Se prepararon diluciones en serie (2 veces) de los péptidos en PBS/Tween 20 en placas de polipropileno con fondo de los pocillos cónico (Greiner, nº 651201) (intervalo de concentraciones 320 µM, 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM y 2,5 µM). Se añadieron 100 µl de cada dilución por pocillo. El anticuerpo monoclonal DC8E8 purificado (se realizó la purificación como se describe posteriormente en el Ejemplo 5) se diluyó hasta una concentración de 2 µg/ml en PBS/Tween 20 y se mezclaron 100 µl de este anticuerpo diluido con cada dilución en serie de péptidos dando como resultado mezclas de 200 µl con 100 ng de anticuerpo/100 µl que contienen cada péptido de ensayo respectivo a una concentración de 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM y 1,25 µM. Las mezclas de anticuerpo/péptido se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Se transfirieron cien microlitros (100 µl) de mezclas de anticuerpo/péptido de las placas de polipropileno a placas de alta unión IWAKI recubiertas con tauΔ (1-150; 392-441/4R) y bloqueadas con PBS/Tween 20, y se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20. Las muestras (en las placas) se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria (ajustada a 250 rpm) con 100 µl de inmunoglobulinas antirratón de cabra policlonales/HRP (Dako, nº P0447) diluidas 1:4000 en PBS/Tween 20. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween. Las muestras/placas se incubaron después con 100 µl de una solución de 1,5 mg/2 ml de o-PDA (o-fenilendiamina, Sigma, P1526) en Na acetato 0,1 M pH 6,0 (Roth, nº 6779) complementado con 1,5 µl/2 ml de H₂O₂ 30% (SIGMA, H-0904) durante 10 minutos a 25°C, en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 2 M (Merck, 1.00731.1000). El alcance de la reacción se siguió leyendo la absorbancia de las muestras/placas a 490 nm (por ejemplo, usando el contador multietiqueta Victor (Wallac)).

La figura 8C muestra los resultados del ELISA de competición realizado con los siguientes siete péptidos: ANIKHVPGGGS (SEC ID nº 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID nº 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID nº 149), DNIAHVPGGGS (SEC ID nº 151), DNIKAVPGGGS (SEC ID nº 159), DNIKHAPGGGS (SEC ID nº 161) y DNIKHVPGGGS (SEC ID nº 171). Una mutación puntual que cambia una histidina a alanina (en la posición de tau correspondiente 299, en el “epítipo nº 2”) conduce a una pérdida completa de actividad competitiva con tauΔ (1-150; 392-441/4R) por la unión con DC8E8 (péptido DNIKAVPGGGS, SEC ID nº 159). Las mutaciones que cambiaron los aminoácidos D, N, I, K y V a alanina no anularon la actividad competitiva de los péptidos mutantes respectivos (péptidos ANIKHVPGGGS (SEC ID nº 144), DAIKHVPGGGS (SEC ID nº 146), DNAKHVPGGGS (SEC ID nº 149), DNIAHVPGGGS (SEC ID nº 151), DNIKHAPGGGS (SEC ID nº 161)). Estos resultados sugieren que el epítipo mínimo de DC8E8 que permanece dentro de la segunda repetición de tau (epítipo nº 2) está dentro de una secuencia de 6 unidades, concretamente HVPGGG (SEC ID nº 154) y que

DC8E8 se une con HXPGGG (SEC ID nº 164).

Ejemplo 5: DC8E8 reconoce tauΔ (1-150, 151-391)/4R desordenada erróneamente, como se evalúa por resonancia de plasmón superficial

La resonancia de plasmón superficial (SPR) puede usarse para la detección de unión de proteínas y para determinar los parámetros termodinámicos de los complejos de proteínas (por ejemplo, complejos anticuerpo-antígeno) por control directo del acontecimiento de unión en tiempo real. Esta tecnología se usa habitualmente para caracterizar anticuerpos tanto de diagnóstico como terapéuticos (véase, por ejemplo, Karlsson y Larsson, Affinity Measurement Using Surface Plasmon Resonance, en Methods in Molecular Biology, Vol. 248: Antibody Engineering: Methods and Protocols. Editado por: B. K. C. Lo © Humana Press Inc., Totowa, NJ, (2008)).

Para experimentos de SPR, el anticuerpo monoclonal DC8E8 (mAb) se purificó a partir de sobrenadante de hibridoma sin suero en una columna de afinidad de proteína G, como sigue. El sobrenadante de hibridoma se ajustó a pH 7,5, la solución se preclarificó por centrifugación, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y se cargó en una columna de Sepharose de proteína G de 5 ml. Se eluyó el mAb DC8E8 de la columna con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7. Las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M pH 9,0. Las fracciones agrupadas se dializaron contra PBS, se concentraron por ultrafiltración y se almacenaron a -70°C. La concentración del anticuerpo se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm, usando la fórmula $c(\text{mg/ml}) = A_{280\text{nm}}/1,43$.

Se usó un instrumento BIACORE3000 con una microplaca sensora CM5 (Biacore AB, Uppsala) para los ensayos de SPR. Los reactivos de acoplamiento de amina (EDC, NHS, etanolamina pH 8,5), detergente P20 y acetato sódico 10 mM pH 5,0 se obtuvieron de Biacore AB. Estos experimentos se realizaron a 25°C en PBS a pH 7,4 con 0,005% de P20 (PBS-P) como el tampón de ejecución. Típicamente, se acoplaron 5000 UR (unidades de respuesta) de anticuerpo antirratón policlonal (nº Z 0420; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) a pH 5,0 mediante aminas primarias simultáneamente en dos células de flujo, una de las cuales se usó como una medición de referencia.

En cada ciclo de análisis, se capturó DC8E8 purificado en la celda de flujo analítica para alcanzar un nivel de inmovilización de 230-250 UR. Para determinaciones de K_A , así como para la determinación de constantes de velocidad cinética (K_{ON} y K_{OFF}), se inyectaron diluciones en serie dobles de proteínas tau (contra las que se ensayó la afinidad de DC8E8) o PBS-P como un control, a un caudal de 50 µl/minuto sobre la microplaca sensora. Los datos de unión cinética se referenciaron dos veces de acuerdo con Myszk, 1999 y se ajustaron por el software BIA evaluation 4.1 (Biacore AB) a un modelo de reacción de dos fases. Las constantes de velocidad cinética se aproximaron de forma global, se ajustaron las respuestas máximas localmente y la respuesta general se ajustó a cero.

Para cuantificar la afinidad de DC8E8 por cada una de las proteínas tau ensayadas, se determinaron las constantes de unión en equilibrio de asociación (K_A) para la unión de DC8E8 con la isoforma de proteína tau de cuatro repeticiones 2N4R, la isoforma de proteína tau de tres repeticiones 2N3R, así como con la tauΔ (1-150, 392-441)/4R desordenada erróneamente y tauΔ (1-150, 392-441)/3R desordenada erróneamente. Todas las proteínas tau usadas para SPR se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1. La afinidad de DC8E8 era mayor para tauΔ (1-150; 392- 441)/4R de cuatro repeticiones, seguido de la isoforma de tau 2N4R de cuatro repeticiones de longitud completa, después para tauΔ (1-150, 392-441)/3R de tres repeticiones y finalmente para la isoforma de tau de longitud completa 2N3R de tres repeticiones (Figura 9A, B). Estos resultados confirmaron: (1) la especificidad de DC8E8 por la forma desordenada erróneamente de tau y (2) la selectividad de DC8E8 para la tau desordenada erróneamente (es decir, tau patológica de enfermedad) sobre la tau de longitud completa (es decir, tau normal o fisiológica).

El control en tiempo real de los acontecimientos de unión usando SPR permitió la medición de la tasa cinética de asociación (k_{ON}) y disociación (k_{OFF}) entre DC8E8 y varias proteínas tau. La cinética de unión de DC8E8 reveló una conformación alterada para tauΔ (1-150; 392-441)/4R y tauΔ (1-150; 392-441)/3R desordenada erróneamente, en comparación con tau 2N4R fisiológica, que se indica por epítipo o epítipos de DC8E8 más fácilmente accesibles en las proteínas tau desordenadas erróneamente. Esto se refleja por la unión más rápida y k_{ON} mayor para las proteínas tau desordenadas erróneamente en comparación con sus homólogos de longitud completa. Además, la presencia de un sitio de unión extra para DC8E8 en la especie de proteína tau de cuatro repeticiones dio como resultado una disociación 10 veces más lenta de especies tau 4R del complejo con DC8E8 y una k_{OFF} 10 veces menor correspondiente (Figura 10A, B; las líneas discontinuas se interpolaron a partir de datos medidos por cálculos de parámetros cinéticos usando un programa informático BIAevaluation v4.1).

Ejemplo 6: DC8E8 reconoce todos los estadios del desarrollo de degeneración neurofibrilar en cerebro con enfermedad de Alzheimer humana

Se obtuvo tejido cerebral humano (en bloques de parafina) del Netherlands brain bank, Países Bajos. Los bloques se cortaron en un microtomo. Se trataron secciones de parafina (8 µm) de la corteza entorrinal-hipocampo de cerebro con enfermedad de Alzheimer (estadio de Braak VI) y control no demente (estadio I y III

de Braak) con ácido fórmico 99% frío (+ 4°C) durante 1 minuto a temperatura ambiente (25°C). Las secciones tisulares se incubaron en solución de bloqueo (BSA 5%, Triton X-100 0,3% en Tris-HCl 50 mM) y después durante una noche con anticuerpo primario purificado DC8E8 (7,8 mg/ml; preparado como se ha descrito en el Ejemplo 5), que se diluyó 1:2000 en solución de bloqueo. Posteriormente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (Kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante una hora y después se hicieron reaccionar con complejo de peroxidasa de biotina-avidina durante 60 minutos (Kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories), ambos a temperatura ambiente (25°C). La inmunorreacción se visualizó con kit de sustrato de peroxidasa (Vector VIP, Vector Laboratories, Ca, Estados Unidos) y se contratiñó con verde de metilo (Vector Laboratories). Las secciones se examinaron con un microscopio Olympus BX71.

El anticuerpo monoclonal de DC8E8 diferenció entre AD preclínica, AD clínicamente incipiente y estadio final completamente desarrollado de AD. El estudio inmunohistoquímico mostró que DC8E8 detectaba estadios tempranos (monómeros, dímeros de tau) de tau patológica en AD preclínica humana - estadio I de Braak (Figura 11A). El cerebro contiene solamente un número limitado de ovillos neurofibrilares (NFT) en la corteza entorrinal y ningún NFT en el hipocampo (estadio I de Braak). En el cerebro con AD clínicamente incipiente, donde se encontraron algunos NFT en el hipocampo (estadio III de Braak), el mAb DC8E8 reconoció tanto el estadio de los oligómeros de tau patológicos (flechas) como el estadio de los polímeros de tau patológica (ovillos) (Figura 11B). En cerebro con enfermedad de Alzheimer completamente desarrollada, en el que está presente degeneración neurofibrilar extensiva, DC8E8 reconoce principalmente polímeros de tau patológica en forma de ovillos neurofibrilares, placas neuríticas e hilos neuríticos (Figura 11C). Por lo tanto, el mAb DC8E8 reconoce todos los estadios del desarrollo de lesiones neurofibrilares en tejido de cerebro con enfermedad de Alzheimer humana, incluyendo estadio monomérico, dimérico, oligomérico temprano (Figura 11D1) y estadio preovillo oligomérico tardío (Figura 11D2), así como estadios del desarrollo tardíos de polímeros de tau patológica - ovillos neurofibrilares intracelulares (Figura 11D3) y extracelulares (Figura 11D4). Esta reactividad de mAb DC8E8 es por lo tanto útil para aplicaciones tanto de diagnóstico como terapéuticas de este anticuerpo.

Ejemplo 7: DC8E8 reconoce todos los estadios del desarrollo de la degeneración neurofibrilar en el cerebro de ratas transgénicas SHR72, como se aprecia en enfermedad de Alzheimer humana

La línea rata transgénica SHR24: esta línea expresa tau Δ (1-150, 392-441)/3R, una proteína descrita en la solicitud de patente internacional PCT WO 2004/007547. La generación y caracterización de esta línea transgénica se ha descrito en Filipcik *et al.*, 2010. Estas ratas transgénicas desarrollan degeneración neurofibrilar dependiente de la edad progresiva en las áreas cerebrales corticales. Los ovillos neurofibrilares (NFT) satisficieron varios criterios histológicos clave usados para identificar degeneración neurofibrilar en enfermedad de Alzheimer humana incluyendo argirofilia, birrefringencia de rojo congo y reactividad a tioflavina S. También se identificaron ovillos neurofibrilares con anticuerpos usados para detectar tau patológica en el cerebro humano, incluyendo DC11, que reconoce una conformación de tau de enfermedad (Vechterova *et al.* 2003.; Kovacech *et al.* 2010), y anticuerpos que son específicos para formas hiperfosforiladas de proteína tau. Además, la degeneración neurofibrilar se caracterizó por formación extensiva de complejos de proteína tau insoluble en sarcosilo consistentes en especies de tau truncadas endógenas y transgénicas de rata (Filipcik *et al.*, 2010). El elemento histopatológico más prominente de estas ratas transgénicas es patología neurofibrilar extensiva - ovillos neurofibrilares en la corteza. La mediana del tiempo de supervivencia de las ratas transgénicas es de 222,5 días (DT = 43,56) y el período de supervivencia más largo alcanza 475 días (Filipcik *et al.*, 2010).

La línea de rata transgénica SHR72: Estas ratas transgénicas expresan tau Δ (1-150, 392-441)/4R truncada humana de acuerdo con la solicitud de patente internacional PCT WO 2004/007547) en varias regiones del cerebro y la médula espinal. La generación de esta línea de ratas se describió en Zilka *et al.*, 2006, y se describió patología de tau en Koson *et al.*, 2008. El elemento histopatológico más prominente de estas ratas transgénicas es la patología neurofibrilar extensiva, por ejemplo, ovillos neurofibrilares. La apariencia de los NFT satisfizo varios criterios histológicos usados para identificar degeneración neurofibrilar en AD humana incluyendo argirofilia, birrefringencia del rojo congo y reactividad a tioflavina S. También se identificaron NFT con anticuerpos usados para detectar tau patológica en el cerebro humano, incluyendo DC11, que reconoce una conformación de tau anómala (véase patente US nº 7.446.180) y anticuerpos que son específicos para formas hiperfosforiladas de la proteína tau. Además, la degeneración neurofibrilar se caracterizó por formación extensiva de complejos de proteína tau insoluble en sarcosilo consistentes en especies de tau endógenas de rata y truncadas humanas. En una línea heterocigota de este modelo la patología neurofibrilar más extensiva se observó en el tronco encefálico y la médula espinal (Zilka *et al.*, 2006). Los niveles de expresión del transgén, la carga de NFT y la esperanza de vida de las ratas se han determinado previamente. La mediana del tiempo de supervivencia para las ratas transgénicas (línea SHR72) fue de 222,5 días (DT = 24,48) (Koson *et al.*, 2008).

Las líneas de rata transgénica SHR24 (que expresan tau Δ (1-150, 392-441)/3R) y SHR72 (que expresa tau Δ (1-150, 392-441)/4R) desarrollan degeneración neurofibrilar extensiva en el cerebro y la médula espinal. La línea de rata transgénica SHR24 presenta neurodegeneración grave en el isocórtex, el tronco encefálico y la médula espinal, mientras que las ratas transgénicas SHR72 desarrollan NFT principalmente en el tronco encefálico y la médula espinal pero no en la corteza. La progresión de la alteración sensomotora y neurológica es similar en ambas líneas transgénicas; sin embargo las ratas transgénicas SHR72 muestran una esperanza de vida más corta.

En los estudios de ratas transgénicas presentados en la presente solicitud, se usaron ratas transgénicas hemicigotas (SHR24 y SHR72). Todas las ratas se alojaron en condiciones convencionales de laboratorio con acceso libre a agua y alimento y se mantuvieron en condiciones de iluminación diurna (ciclos de luz/oscuridad de 12 horas comenzando la luz a las 7:00 de la mañana). Se realizaron intentos de minimizar el número de ratas utilizado y delimitar su incomodidad, dolor y sufrimiento.

Inmunohistoquímica del tejido cerebral de rata con DC8E8: Se perfundió a ratas transgénicas (de 7 meses de edad) por vía transcardiaca con PBS durante 1 minuto bajo anestesia profunda seguido de perfusión con 100 ml de paraformaldehído al 4% (pH 7,4). Después de la perfusión, se cortó la cabeza y se retiró rápidamente el cerebro. El cerebro se cortó en dirección sagital en dos hemisferios del mismo tamaño usando hojas de escalpelo desechables. Los tejidos cerebelares se fijaron a continuación en paraformaldehído 4%, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones en un microtomo. Se realizó la inmunohistoquímica e histopatología en secciones titulares incluidas en parafina de 8 µm. Se pretrataron secciones tisulares durante 20 minutos con una solución de desenmascaramiento de antígenos (Vector Laboratories, CA, Estados Unidos) y durante 1 minuto con ácido fórmico al 90% frío (+ 4°C) (Applichem, Alemania), a temperatura ambiente (25°C). Después del bloqueo, las secciones se incubaron durante una noche con anticuerpo monoclonal purificado DC8E8 (7,8 mg/ml) que se diluyó 1:2000 en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino 5%, Triton X 100 0,3% en Tris-HCl 50 mM). Después de lavar, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (Kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante una hora, y después se hizo reaccionar con una solución de complejo de peroxidasa de biotina-avidina durante 60 minutos (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories), a temperatura ambiente (25°C). La inmunorreacción se visualizó con un kit de sustrato de peroxidasa (Vector VIP, Vector Laboratories, Ca, Estados Unidos) y las secciones se contratiñeron con verde de metilo (Vector Laboratories). Las secciones se examinaron con un microscopio Olympus BX71.

En el cerebro de rata transgénica (SHR72), el mAb DC8E8 reconoció el estadio de enfermedad de oligómeros de tau patológica (flechas) y el estadio de enfermedad de polímeros de tau patológica (ovillos) (Figura 12A). Además, DC8E8 reaccionó con tau plegada erróneamente que se localiza en las fibras axonales. En cerebros de ratas de control de la misma edad el anticuerpo no tiñó el soma neuronal ni los procesos axonales (Figura 12B).

Como en el cerebro con enfermedad de Alzheimer humano (véase anteriormente), el mAb DC8E8 reconoció todos los estadios del desarrollo de lesiones neurofibrilares en el cerebro de ratas transgénicas SHR72, incluyendo estadio monomérico, dimérico y oligomérico temprano enfermo (Figura 12C) y tau de estadio preovillo oligomérico tardío (Figura 12D), así como estadios de desarrollo tardíos de polímeros de tau patológica - ovillos neurofibrilares intracelulares (Figura 12E) y ovillos extracelulares (Figura 12F).

DC8E8 también reconoció ovillos neurofibrilares en el cerebro de ratas transgénicas que expresaban tauΔ (1-150; 392-441/3R) (SHR24, figura 13A; SHR72, figura 13B).

Ejemplo 8: DC8E8 reconoce especies tanto de tau desordenada erróneamente soluble como de tau insoluble en enfermedad de Alzheimer humana y en cerebros de ratas transgénicas para tau

Se aislaron complejos de tau soluble y tau insoluble de cerebros con AD humana o de cerebros de ratas transgénicas para tau de enfermedad (líneas SHR24 y SHR72 descritas en el Ejemplo 7), usando el procedimiento de sarcosilo (Greenberg y Davies, 1990). Para la extracción de proteínas, se homogeneizaron tejidos cerebrales con AD humana congelados (alocórtex, muestras de estadios V y VI de Braak obtenidas del Netherlands brain bank, Países Bajos) y tejidos de ratas SHR24 transgénicas (isocórtex, 10, 12 y 14 meses de edad) y de ratas SHR72 transgénicas (tronco encefálico, 7,5 meses de edad) en 10 volúmenes de tampón de extracción frío (Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM y sacarosa al 10%). Los homogeneizados se centrifugaron durante 20 minutos a 20000 xg y se usaron 50 µl de los sobrenadantes para el análisis de tau soluble.

Para preparar tau insoluble en sarcosilo, los sobrenadantes restantes se complementaron con N-lauroilsarcosina (SIGMA) hasta una concentración final de 1% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Después de centrifugación a 100000 xg durante 1 hora, los sobrenadantes resultantes se descartaron, y los sedimentos comprenden la fracción de tau insoluble en sarcosilo.

Las fracciones de tau soluble y tau insoluble en sarcosilo se analizaron por inmunotransferencia. Se diluyeron fracciones de tau solubles con un volumen igual de tampón de carga de muestras-SDS 2x (con β-mercaptoetanol) (Laemmli, 1970) y se cargaron 15 µg de proteínas por carril. Para fracciones de tau insolubles en sarcosilo, los sedimentos se disolvieron en tampón de carga de muestra-SDS 1x, en un volumen de 1/50 de la fracción soluble usada para la preparación de la fracción de tau insoluble. Después, se usaron volúmenes iguales de fracciones de tau soluble y tau insoluble en sarcosilo para análisis de inmunotransferencia, que correspondían a 15 µg de proteína total en la fracción soluble (véase Filipcik *et al.* 2010). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos, se cargaron en geles de poli(acrilamida de SDS de gradiente 5-20%, y se sometieron a electroforesis en un sistema de tampón de Tris-glicina-SDS durante 40 minutos a 25 mA. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (1 hora a 150 mA en CAPS 10 mM, pH 12).

Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en leche desnatada en polvo al 5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS; NaCl 136,89 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,09 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente y después se incubaron durante 1 hora con sobrenadante de cultivo de hibridoma DC8E8, diluido 1:1 con TBST-leche (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, leche desnatada en polvo 5%), seguido por tres lavados con volúmenes grandes de PBS. Las membranas se incubaron (1 hora a temperatura ambiente) con IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (DAKO, Dinamarca), diluido 1:4000 con PBS, como un anticuerpo secundario. Esta incubación se siguió de lavado (tres veces) con Igepal CA-630 0,2% (SIGMA) en PBS. Las manchas de transferencia se desarrollaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Estados Unidos) y las señales de proteína se detectaron usando un sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón). Las intensidades de señal de quimioluminiscencia se cuantificaron usando software AIDA (Analizador de Datos de Imágenes Avanzado, Raytest, Straubenhardt, Alemania).

DC8E8 reconoció las isoformas tanto de tauΔ (1-150, 392-441)/3R humana soluble como de tau de rata fisiológica en ratas transgénicas SHR24 (Figura 14A). Además, DC8E8 reconoció proteínas tauΔ (1-150, 392-441)/3R y tau de rata patológica en las fracciones de tau insolubles en sarcosilo de cerebros de ratas SHR24 (Figura 14B). Resulta importante que DC8E8 reconoció fuertemente las proteínas tau humanas patológicas en la fracción de tau insoluble en sarcosilo en los cerebros con AD humana (estadios de Braak V y VI, figura 14B y 14C). DC8E8 reconoció las isoformas tanto de tauΔ (1-150, 392-441)/4R humana soluble como de tau de rata (fisiológica) de longitud completa en ratas transgénicas SHR72 (Figura 14D). Resulta significativo que DC8E8 reconoció específicamente tauΔ (1-150, 392-441)/4R patológica y formas patológicas de tau de rata en las fracciones de tau insoluble en sarcosilo de cerebros de ratas SHR72 (Figura 14D).

Ejemplo 9: DC8E8 inhibe las interacciones tau-tau patológicas

El ensayo de formación de fibrillas de tau. Se usó un ensayo de formación de fibrillas de tau *in vitro* para determinar si DC8E8 tenía un efecto inhibidor en las interacciones de tau-tau patológicas. El ensayo se basa en una propiedad intrínseca de las proteínas tau, concretamente su capacidad para experimentar un cambio conformacional tras su interacción con polianiones, tales como el glucosaminoglucano sulfatado heparina. Esta conformación alterada en una molécula de tau conduce adicionalmente a sus interacciones patológicas con otra molécula de tau, estabilización del complejo tau-tau mediante la formación de estructuras de lámina β cruzadas en las regiones de unión a microtúbulos de las moléculas de tau que interaccionan y, finalmente, la formación de filamentos helicoidales emparejados de tipo enfermedad de Alzheimer (PHF) (Skrabana *et al.*, 2006). La formación de estructuras ricas en láminas beta puede detectarse por colorantes fluorescentes, como tioflavina T.

El ensayo para medir el efecto de DC8E8 en las interacciones tau-tau patológicas se preparó en PBS (filtrado a través de un filtro de 0,2 μm) que contenía: 20 μM (concentración final) de una de las proteínas tau recombinantes ensayadas (tauΔ(1-150; 392-441)/4R o tauΔ (1-296; 392-441)/4R), purificadas como se ha descrito en el Ejemplo 1; heparina 5 μM (sal sódica de heparina de mucosa intestinal porcina, ≥ 150 UI/mg, en peso seco, de SIGMA), y tioflavina T 12,5 μM (concentración final). Cada reacción (volumen final de 80 μl) se incubó durante 20 horas a 37°C en placas de poliestireno sólidas negras selladas (384 pocillos, Greiner BioOne). La fluorescencia de tioflavina T se midió usando un lector de fluorescencia (Fluoroskan Ascent FL (Labsystems)), con una longitud de onda de excitación de 450 nm, emisión a 510 nm y tiempo de medición de 200 ms. Para determinar la actividad inhibidora del mAb DC8E8 en interacciones tau-tau patológicas, se añadió DC8E8 purificado (Ejemplo 5) a la mezcla de reacción a una concentración final 20 μM, antes de la incubación a 37°C. Se usaron dos anticuerpos como controles: DC51 (que reconoce una proteína de envoltura del virus de la rabia; Macikova *et al.*, 1992.) Y DC11 (que reconoce ciertas formas alteradas conformacionalmente truncadas de tau, patente US n° 7.446.180).

La cantidad de tau en fibrillas y alterada conformacionalmente se midió por fluorescencia de tioflavina T en ausencia ("Ctrl") y en presencia ("DC8E8") de DC8E8 (Figuras 15A y 15B). El mAb DC8E8, añadido a una concentración final de 20 μM, evitó el cambio conformacional patológico y la formación de fibrillas de ambas proteínas tau desordenadas erróneamente, reduciendo la cantidad de las formas de tau patológicas en fibrillas a menos del 5% y 16% para tauΔ (1-150; 392-441)/4R y tauΔ (1-296, 392-441)/4R, respectivamente. Esta actividad inhibidora de DC8E8 fue estadísticamente significativa cuando se analizó por un ensayo de t no paramétrico ("DC8E8", p < 0,001 y p < 0,01 en las figuras 15A y 15B, respectivamente). Un anticuerpo irrelevante, Rab50 (Macikova *et al.*, 1992), que no se une con tau, no evitó el cambio conformacional de tau, dando como resultado fluorescencia de tioflavina T no alterada ("Rab50"). El anticuerpo DC11, que reconoce ciertas conformaciones patológicamente alteradas de tau (Vechterova *et al.*, 2003 y patente US n° 7.446.180), promovió adicionalmente la formación de tau en fibrillas; este efecto puede reflejar una estabilización de la conformación patológica de tau requerida para interacción tau-tau anómala y la formación de fibrillas por DC11.

DC8E8 también inhibió la formación de dímeros, trímeros y oligómeros de tau por tauΔ (1-296; 392-441)/4R desordenada erróneamente (Figura 16). Se incubó tauΔ (1-296; 392-441)/4R recombinante durante 1, 4 y 20 horas bien en presencia o bien en ausencia de DC8E8 como se ha descrito anteriormente para el ensayo de formación de fibrillas. En los puntos temporales indicados, la reacción se detuvo mediante la adición de tampón de carga de muestra-SDS. Para el análisis de proteínas, se cargaron 10 μl de cada reacción de formación de

fibrillas en geles de poliacrilamida de SDS de gradiente 5-20% y se sometieron a electroforesis en sistema de tampón de Tris-glicina-SDS durante 40 minutos a 25 mA. Después de la transferencia de proteínas a membranas de PVDF (1 hora a 150 mA en CAPS 10 mM, pH 12), las membranas se bloquearon en leche desnatada en polvo 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se incubaron durante 1 hora con DC25 conjugado con HRP (Skrabana *et al* (2006)) diluido 1:1000 en PBS, seguido de tres lavados con volúmenes grandes de PBS. Las transferencias se desarrollaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Estados Unidos) y las señales de quimioluminiscencia se detectaron usando un sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón). Las intensidades de señal de quimioluminiscencia se cuantificaron usando software AIDA (Analizador de Datos de Imágenes Avanzado, Raytest, Straubenhardt, Alemania).

Estos resultados revelan que uno o más de los cuatro sitios de unión que reconoce/a los que se une DC8E8 en tau humana están implicados en cambios conformacionales de tau monomérica, formación de fibrillas de tau y en la formación de agregados de tau (dímeros, trímeros y otros oligómeros). En otras palabras, una o más de las cuatro regiones de tau abarcadas por los restos 267-KHQPGGG-273 (SEC ID nº 98) (1^{er} dominio repetido de la proteína tau), 298-KHVPGGG-304 (SEC ID nº 99) (2^o dominio repetido de la proteína tau), 329-HHKPGGG-335 (SEC ID nº 100) (3^{er} dominio repetido de la proteína tau), y 361-THVPGGG-367 (SEC ID nº 101) (4^o dominio repetido de la proteína tau) promueve y/o está implicado en la formación de fibrillas de tau y formación de agregados de tau (dímeros, trímeros y otros oligómeros).

Ejemplo 10: DC8E8 media en la captación y degradación de tau desordenada erróneamente

Se trataron células de la microglía de BV2 de ratón en placas de 6 pocillos durante diferentes períodos de tiempo con tauΔ (1-150, 392-441)/4R recombinante 1 μM solamente, o con una mezcla/complejo de tauΔ (1-150; 392-441)/4R y DC8E8. El medio se recogió y las células se lavaron en primer lugar con PBS, y después durante 1 minuto con solución de lavado ácida suave (NaCl 0,5 M, ácido acético 0,2 M, pH 3). Las células lavadas se lisaron después en tampón TTL (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 0,5%, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Roche- inhibidor de proteasa completo) y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Los extractos celulares resultantes se analizaron en gel de SDS-PAGE 12% y transferencia de Western como se ha descrito previamente (Koson *et al.*, 2008). Brevemente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) y se tiñeron con Ponceau S para confirmar la transferencia uniforme de proteínas, y después se exploraron las membranas con sobrenadante de cultivo de hibridoma DC25 que reconoce los restos de tau 347-353, y se denomina un anticuerpo pan-tau (Axon Neuroscience, Viena, Austria). Se usó transferencia de Western con un anticuerpo anti-GADPH (1:1000, Abcam) como un control de carga de proteínas. La incubación con anticuerpo primario DC25 se siguió de lavados e incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón de cabra policlonal, que se conjugó con HRP (1:3000; Dako, Glostrup, Dinamarca). Las transferencias se desarrollaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Estados Unidos) y las señales de quimioluminiscencia se detectaron usando un sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón).

Se añadió tauΔ (1-150, 392-441)/4R a cultivos de células BV2 de ratón a la concentración de 1 μM solamente o con mAb DC8E8 1 μM, como se ha descrito en el párrafo anterior. Después de incubación durante 2, 4, 6 y 12 horas, se extrajeron las proteínas celulares, y se analizaron los niveles de tau internalizada por transferencia de Western. El anticuerpo pan-tau DC25 mostró la presencia de tau desordenada erróneamente dentro de las células de la microglía. El perfil de transferencia de Western reveló que la degradación de tau desordenada erróneamente era más rápida en presencia de DC8E8 (Figura 17A).

El anticuerpo DC8E8 en sí mismo también se encontró presente dentro de las células BV2. figura 17A. Además, DC8E8 redujo la carga de tau desordenada erróneamente soluble en el medio celular, lo que puede reflejar la activación de la maquinaria proteolítica extracelular (Figura 17B).

Ejemplo 11: DC8E8 es estable a 37°C

DC8E8 (purificado como se ha descrito en el Ejemplo 5) se diluyó hasta una concentración de 2 mg/ml en PBS y se incubaron alícuotas (100 μl) a 37°C. A diversos intervalos de 1 mes, se congelaron alícuotas a -20°C. Una alícuota de DC8E8 (2 mg/ml) mantenida almacenada a -20°C durante la duración del experimento se usó como un "control". Después de 4 meses (cuando se recogieron todas las muestras) de análisis de la actividad de DC8E8 (unión con tauΔ (1-150; 392-441)/4R recombinante como una fase sólida), y por lo tanto la estabilidad en almacenamiento a 37°C, se realizó por ELISA, como se ha descrito en el Ejemplo 2. Cada alícuota de DC8E8 se diluyó 2000 veces (es decir, 2000 x o 1:2000), 4000 x, 8000 x, 16000 x, 32000 x, 64000 x, 128000 x, 256000 x y 512000 x. DC8E8 estaba activo (como se mide por su capacidad para unirse a tauΔ (1-150; 392-441)/4R) y por lo tanto estable incluso después de 4 meses de incubación a 37°C, en comparación con el "control" (Figura 18).

Ejemplo 12: DC8E8 puede unirse con e inmunoprecipitar tau tanto soluble como insoluble de cerebro con AD humana y del cerebro de ratas SHR72, en condiciones de tipo ex vivo nativas

Se aislaron de forma bioquímica proteínas tau plegadas erróneamente insolubles en sarcosilo de cerebros con

AD humana o de cerebros de ratas transgénicas para tau (línea SHR72 descrita en el Ejemplo 7) usando el procedimiento de sarcosilo (Greenberg y Davies, 1990). Para la extracción de proteínas, se homogeneizaron tejidos no fijados congelados de cerebro con AD humana (corteza transentorrinal, estadio V de Braak, obtenido del Netherlands brain bank, Países Bajos) y rata transgénica SHR72 (isocórtex, animales de 7,5 meses de edad) en 10 volúmenes de tampón de extracción helado [Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 0,8 M, EGTA 1 mM y sacarosa 10% (complementado con NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM y el cóctel de inhibidores de proteasa Complete® sin EDTA (de Roche)]. Los homogeneizados se centrifugaron durante 20 minutos a 20000 xg para retirar el material membranoso. Para preparar fracciones de tau insoluble en sarcosilo, los sobrenadantes se complementaron con N-lauroilsarcosina (SIGMA) hasta una concentración final de 1% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Después de centrifugación a 100000 xg durante 1 hora, los sobrenadantes resultantes se descartaron y los sedimentos se lavaron una vez en 3 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Na₂HPO₄ 8,09 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, NaCl 136,89 mM, (KCl) 2,7 mM). Los sedimentos, que representan la fracción de proteínas del cerebro enriquecida en especies de tau oligoméricas y poliméricas plegadas erróneamente (es decir, las proteínas tau de enfermedad), se resuspendieron después en 1 ml de PBS (complementado con NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM y el cóctel de inhibidores de proteasa Complete® sin EDTA (Roche)) por sonicación durante 2 minutos en hielo usando un Bandelin Sonopuls HD2200/UW2200 equipado con una sonda MS72, a un coeficiente de utilización del 20% con la salida ajustada al 20% (Bandelin Electronic, Alemania).

Las suspensiones resultantes (tanto de cerebro con AD humana como del cerebro del modelo de AD de rata), enriquecidas en las proteínas tau de enfermedad, se dividieron en dos partes de 500 µl y cada parte recibió 25 µg de uno de dos anticuerpos purificados: bien DC8E o bien anticuerpo de control Rab50 (que reconoce una proteína de envoltura del virus de la rabia; Macikova *et al.*, 1992). Las suspensiones se incubaron con los anticuerpos con rotación longitudinal a 6°C durante 2 horas. Para aislar los complejos de tau de enfermedad-anticuerpo, se añadieron 50 µl de suspensión de perlas de proteína G Mag Sepharose 50% (GE Healthcare) equilibradas en PBS a cada reacción de suspensión, que se incubaron después a 6°C durante 1 hora. Las perlas con complejos de anticuerpo unido-tau se recogieron y se lavaron tres veces con PBS (complementado con NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM, IGEPAL CA-630 0,02% (SIGMA) y el cóctel de inhibidores de proteasa Complete® sin EDTA (Roche)). Los complejos de anticuerpo unido se eluyeron de las perlas por tres incubaciones de 5 minutos separadas en 100 µl de ácido fórmico 200 mM pH 2,7. Los eluatos de 100 µl se agruparon, se liofilizaron, las proteínas se disolvieron en tampón de carga de muestra SDS-PAGE (Laemmli, 1970), se separaron en geles de SDS-PAGE 12%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas tau se detectaron por incubación con el anticuerpo pan-tau DC25 (epítipo 347-353 de tau 2N4R, Axon Neuroscience, Viena, Austria), se conjugó con HRP como anteriormente (Kementec, Dinamarca). La incubación (1 hora a temperatura ambiente) se siguió de lavado (tres veces) con Igepal CA-630 (SIGMA) 0,2% en PBS. Las transferencias se desarrollaron con un sistema de sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico (Pierce, Estados Unidos) y las señales se detectaron usando un sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón).

DC8E8 reconoce, se dirige a y se une con todas las formas de las proteínas tau de enfermedad: especies de tau plegada erróneamente oligomérica y polimérica presentes en el cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer (Figura 19A). El carril 1 en la figura 19A muestra especies de tau patológica extraídas bioquímicamente de cerebro con AD humana. El carril 3 muestra especies de tau reconocidas por, unidas con y aisladas por inmunoprecipitación con DC8E8. El patrón de especies de tau de enfermedad inmunoprecipitadas/unidas con DC8E8 fue el de las proteínas tau extraídas bioquímicamente. Estos resultados muestran reconocimiento *ex vivo* eficaz por DC8E8 de las especies de tau patológicas en el cerebro humano, es decir, en extractos en los que las proteínas son de tipo *in vivo*, forma no modificada, lo que muestra que DC8E8 tiene propiedades terapéuticas útiles, siendo capaz de dirigirse a la especie de tau enferma *in vivo*. El anticuerpo de control Rab50 ("anticuerpo de simulación", carril 2) no reconoce ninguna de las proteínas tau presentes en el extracto cerebral, lo que confirma que la unión de DC8E8 con proteínas tau es específica.

La figura 19B muestra la cantidad de anticuerpo de simulación (Rab50) y DC8E8 (carriles 2 y 3, respectivamente) usada para la inmunopurificación de proteínas tau. Las posiciones de las cadenas pesada y ligera de DC8E8 también están marcadas en el carril 3 de la figura 19A. La presencia de la mayor cantidad de cadenas de anticuerpo deforma el patrón de tau de enfermedad.

DC8E8 también reconoce y se dirige a todas las formas de tau plegada erróneamente (enferma) en el cerebro del modelo de rata SHR72 de enfermedad de Alzheimer. La figura 20A, carril 1 muestra especie de tau de enfermedad extraída bioquímicamente del cerebro de las ratas transgénicas. La incubación de anticuerpo DC8E8 con el extracto de cerebro de ratas transgénicas permitió la inmunopurificación de especies de tau de enfermedad presentes en el cerebro (Figura 20A, carril 3). La especie de tau purificada con DC8E8 mostró un patrón idéntico al de proteínas tau aisladas bioquímicamente (Figura 20A, carril 1), lo que confirma que DC8E8 reconoce y se une a todas las especies de tau patológicas presentes en el cerebro de rata transgénica. La ligera deformación del patrón de formación de bandas de proteínas tau está provocada por la presencia de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo DC8E8 (marcado en la figura 20A, carril 3). El anticuerpo de simulación Rab50 (Figura 20A, carril 2) no se unió con ninguna de las proteínas tau.

La figura 20B muestra la cantidad de anticuerpo de simulación (Rab50) y DC8E8 (carriles 2 y 3, respectivamente)

usada para la inmunopurificación de proteínas tau del extracto de cerebro de ratas del modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer. Las posiciones de las cadenas pesadas y ligeras de DC8E8 también están marcadas en el carril 3 de la figura 20A. La presencia de la cantidad mayor de las cadenas de anticuerpo deformó ligeramente el patrón de tau de enfermedad.

Ejemplo 13: El anticuerpo monoclonal DC8E8 retira tau patológica del cerebro de ratas transgénicas SHR72

Se cultivaron células de hibridoma que producían DC8E8 o Rab50 (un anticuerpo de control negativo, que reconoce el virus de la rabia) en DMEM que contenía NHS 10% y glutamina 1%. Las células se contaron en una cámara de recuento Bürker. Las suspensiones celulares que contenían 500000 células por mililitro se sedimentaron por centrifugación a 100 x g durante 5 minutos y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las suspensiones celulares se sedimentaron por centrifugación de nuevo a 100 x g durante 5 minutos, y los sedimentos se resuspendieron en 5 µl de PBS.

Se usaron ratas transgénicas SHR72 (6 meses de edad) para esos experimentos (3 ratas por grupo). Por lo menos una hora antes de la cirugía, se aplicó un fármaco inmunosupresor, Sandimmun (15 mg/kg), a las ratas por vía subcutánea. Las ratas transgénicas se anestesiaron por una mezcla de tiletamina-zolazepam (100 mg/ml)/xilazina (20 mg/ml) en una relación 3:5, inyectada por vía intraperitoneal. La dosificación de anestésicos fue la siguiente: Zoletil (30 mg/kg) y Xylarium (10 mg/kg). Las cabezas de las ratas anestesiadas se fijaron en un aparato estereotáctico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, Estados Unidos) colocando ramas de fijación en los canales auditivos de cada animal. Se taladraron orificios en la cabeza de cada animal, usando el taladrador quirúrgico, de acuerdo con las coordenadas estereotácticas seleccionadas (lateral 5 mm; anterior-posterior 4 mm; dorsoventral 5 mm, en relación con el bregma). Las suspensiones celulares de hibridoma, que producen DC8E8 (10^5 células) o Rab50 (10^5 células), se inyectaron de forma bilateral en la fimbria de los hipocampos de los cerebros de las ratas. Poco después de la operación, se administró por vía intramuscular Ketonal (5 mg/kg). Se aplicó Sandimmun (15 mg/kg) por vía subcutánea durante 8 días después de la aplicación. Se administró Enroxil (20 mg/kg/24 horas) en el agua para beber durante 10 días.

Dos semanas después del procedimiento quirúrgico, las ratas se anestesiaron por una mezcla de Zoletil (30 mg/kg) y Xylarium (10 mg/kg). Después de 2-5 minutos, las ratas se montaron en una plataforma de disección, y se abrió su cavidad abdominal. Antes de la perfusión la sangre se recogió para análisis de los niveles de tau y anticuerpo en el suero de la sangre. Se colocó una aguja de perfusión en el ventrículo cardiaco izquierdo, y se perfundió a las ratas PBS durante 2 minutos usando una bomba peristáltica (tipo pp1-05, Zalimp, velocidad 10 x, grado 7 -22 ml/1 minuto de líquido de perfusión). Se decapitó a cada rata, se abrió su cráneo por paean, y se retiró cuidadosamente el cerebro (con parte de la médula espinal). Los cerebros se cortaron sagitalmente en dos partes; el lado derecho se fijó en PFA 4% (4°C) durante una noche. El lado izquierdo se cortó y se congelaron rápidamente el tronco encefálico y dos áreas corticales en nitrógeno líquido.

La cantidad de anticuerpo de DC8E8 en el suero de los animales tratados se determinó por ELISA, como se describe a continuación en el Ejemplo 19 usando tau Δ (1-150; 392-441) 4R como una fase sólida. El suero de cada animal (A, B, C) se diluyó en serie de 100 x a 12800 x (Figura 21A). La concentración en suero del anticuerpo DC8E8 se determinó usando DC8E8 purificado como un patrón. DC8E8 alcanzó concentraciones de 466, 200 y 273 ng/ml en los animales tratados (A, B, C, del grupo de tratamiento de DC8E8, respectivamente).

También se determinó la concentración de tau en los sueros de cada animal tratado. Esto se realizó usando un kit de ELISA Innostest Htau (Innogenetics, Bélgica), de acuerdo con el protocolo del fabricante. El tratamiento con DC8E8 provocó el transporte de los complejos de anticuerpo-tau a la sangre, donde la tau alcanzó la concentración media de 350 µg/ml. Este efecto de DC8E8 ayuda a eliminar las proteínas tau patológicas del cerebro. Por otro lado, no se detectaron proteínas tau en los sueros de los animales tratados con anticuerpo de simulación (Rab50), que reconoce la proteína de la envoltura del virus de la rabia (Macikova *et al.*, 1992). La gráfica muestra la media con errores típicos de la media (SEM) (Figura 21B).

Los tejidos cerebrales fijados se incluyeron en parafina y se cortaron en un microtomo. Se realizó inmunohistoquímica en secciones incluidas en parafina de 8 µm. Las secciones titulares se pretrataron durante 20 minutos con solución de desmascaramiento de antígenos en ebullición (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos) y durante 1 minuto con ácido fórmico 85% (Applichem, Darmstadt, Alemania). Después de bloquear, las secciones tisulares se incubaron con mAb DC8E8 durante una noche, seguido de lavados e incubación (1 hora, a temperatura ambiente) con anticuerpo secundario biotinilado (Kit ABC Vectastain Elite, Vector Laboratories). Después de lavar, las secciones se hicieron reaccionar con un complejo de peroxidasa de biotina-avidina (kit ABC Vectastain Elite, Vector Laboratories) durante 60 minutos a temperatura ambiente. La inmunorreacción se visualizó con el kit de sustrato de peroxidasa VIP (Vector VIP, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos). El complejo olivar superior se usó para cuantificación de la señal intraneuronal de DC8E8. La señal total se cuantificó en neuronas motoras individuales, por lo menos 15 neuronas por sección. El análisis de imágenes se realizó usando software AIDA (Analizador de Datos de Imágenes Avanzado, Raytest, Straubenhardt, Alemania). El recuento se realizó en secciones de todos los animales tratados y después se evaluó estadísticamente usando el ensayo de Mann-Whitney no paramétrico.

La cuantificación (Figura 22B) de la cantidad de tau patológica en el complejo olivar superior de secciones de los animales tratados con simulación (Figura 22A, panel derecho) y tratados con DC8E8 (Figura 22A, panel izquierdo) mostró una reducción en la cantidad de tau patológica en el área del cerebro ensayada en los tres animales tratados con DC8E8 en comparación con animales tratados con simulación ($p < 0,0001$) (Figuras 22A y 22B).

Ejemplo 14: Mapeo de los restos dentro del sitio de combinación de DC8E8 que influye en el reconocimiento de DC8E8 de los epitopos terapéuticos de tau

a) *Clonación del anticuerpo DC8E8 monocatenario y mutagénesis del sitio de combinación de anticuerpo.* Se preparó una versión monocatenaria funcional (scDC8E8v) del mAb DC8E8 de longitud completa para ayudar a mapear los restos de aminoácidos del mAb DC8E8 esenciales para el reconocimiento de proteínas tau. Esto se realizó usando ADNc de las cadenas ligeras y pesadas de DC8E8 preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 3.

Las regiones variables de DC8E8 se amplificaron adicionalmente por PCR usando cebadores de clonación que portaban sitios de restricción para enzimas de restricción NcoI (cebador directo: 5'-ATATTACCATGGACATTGTGATGTCACAG-3' (SEC ID n° 155)) y XhoI (cebador inverso: 5'-ATATTATTCTCGAGGGAGACGGTGACTGAGGT-3' (SEC ID n° 156)) y secuencias enlazadoras oligonucleótidas (VH-ENLACE-F: 5'-GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCCATGCA GGTCCAATTGCAGCAG-3' (SEC ID n° 157); VL-ENLACE-R: 5'-GGAGCCGCCGCCGCGCCAGAACCA CCACCACCAGAACCACCACCACCCCGTTTGATGTCCAGCTTGGTGCC-3' (SEC ID n° 158)), que se usaron para unir regiones variables de cadena pesada y ligera (la secuencia enlazadora se diseñó de acuerdo con Krebber *et al.* 1997). Después de digestión de los productos de PCR aislados (usando enzimas NcoI y XhoI) y purificación mediante electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos se clonaron en un plásmido pET22b digerido con XhoI y NcoI, usando ADN ligasa T4 (Fermentas, Alemania). La cepa bacteriana DH5 α se usó para la amplificación del plásmido resultante y la posición de inserción correcta en los clones seleccionados se verificó por análisis de enzimas de restricción. La corrección de la secuencia de la construcción de DC8E8 monocatenaria resultante (scDC8E8v) se verificó por secuenciación de ADN usando un analizador genético 3130 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

b) *Identificación, por mutagénesis de exploración de alanina, de los restos en el sitio de combinación de DC8E8 que influyen en el reconocimiento de DC8E8 de tau patológica.* Para la identificación de restos que influyen en la unión de DC8E8 con tau, se realizó mutagénesis de exploración de Ala en sitios seleccionados (en negrita y subrayados, véase posteriormente) de scDC8E8v. Los aminoácidos seleccionados para sustitución de Ala se identificaron basándose en el trabajo de MacCallum *et al.* (J. Mol. Biol. 1996). La mutagénesis de scDC8E8v se realizó por el procedimiento de extensión solapante usando oligonucleótidos mutantes en PCR por procedimientos convencionales descritos en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" por Sambrook y Russell (2001).

Las cadenas individuales mutantes se enumeran a continuación, en relación con cada secuencia de DC8E8 original. Los restos mutados están en negrita y subrayados. Los nombres de las cadenas individuales mutantes consisten en el número de la construcción, acrónimo de cadena pesada o ligera variable (VH o VL), el código de una letra del aminoácido original en DC8E8 seguido de su posición en la secuencia de cadena ligera y pesada SEC ID n° 141 y n° 138, respectivamente, y después A para la alanina sustituyente. Por ejemplo, 1-VL-N31A mutante corresponde al mutante de cadena sencilla n° 1, en el que la cadena ligera variable se mutó en la posición 31 (en relación con DC8E8), reemplazando asparagina 31 (N31) con alanina (A)):

Región variable de cadena ligera de DC8E8 (las CDR están subrayadas): [SEC ID n° 141]:

```

1          10          20          30          40          50
DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLL

          60          70          80          90          100
IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAVYYCKQSFYLRITFGGG

110
TKLDIK
    
```

Mutaciones en CDR1 [SEC ID n° 117] (los restos mutados están en negrita y subrayados): QSLNLSRTRKNY (SEC ID n° 117) (secuencia de DC8E8 original de CDR1)

- 1 - VL-N31A [SEC ID n° 247]
- 2 - VL-R33A [SEC ID n° 248]
- 3 - VL-Y38A [SEC ID n° 249]

Mutación en la región marco conservada FR2 que precede a CDR2: LAWYQQKPGQSPKLLIY (SEC ID nº 160) (secuencia de DC8E8 original de la región marco conservada FR2)

5 4-VL-Y55A [SEC ID nº 252]

Mutación en CDR2 [SEC ID nº 118]: WAS (SEC ID nº 118) (secuencia de DC8E8 original de CDR2)

10 5 - VL-W56A [SEC ID nº 253]

Mutaciones en CDR3 [SEC ID N ° 119]: KQSFYLRT (SEC ID nº 119) (secuencia de DC8E8 original de CDR3)

15 6-VL-K95A [SEC ID nº 254]
7-VL-Q96A [SEC ID nº 255]
8-VL-S97A [SEC ID nº 256]
9-VL-F98A [SEC ID nº 257]
10-VL-Y99A [SEC ID nº 258]
11-VL-L100A [SEC ID nº 259]
20 12-VL-R101A [SEC ID nº 260]

Región variable de cadena pesada de DC8E8 (las CDR están subrayadas):

[SEC ID nº 138]:

25 1 10 20 30 40 50
QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEIFP
60 70 80 90 100
RSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSEDSAVYFCARDYYGTSFA
110
MDYWGQGTSVTVSS

Mutaciones en CDR1 [SEC ID nº 120] (los restos mutados están en negrita y subrayado): GYIFTD**YVIS** (SEC ID nº 120) (secuencia de DC8E8 original de CDR1)

30 14-VH-Y32A [SEC ID nº 261]
15-VH-V33A [SEC ID nº 262]

35 Mutación en la región marco conservada FR2 que precede a CDR2: WVKQRTGQGLEWIGE (SEC ID nº 162) (secuencia de DC8E8 original de la región marco conservada FR2)

16-VH-E50A [SEC ID nº 263]

40 Mutaciones en CDR2 [SEC ID nº 121]: IFPRSG**ST** (SEC ID nº 121) (secuencia de DC8E8 original de CDR2)

17- VH-F52A [SEC ID nº 264]
18-VH-S57A [SEC ID nº 265]

45 Mutaciones en CDR3 [SEC ID nº 122]: AR**DYYG**TSFAMDY (SEC ID nº 122) (secuencia de DC8E8 original de CDR3)

19-VH-D99A [SEC ID nº 266]
20-VH-Y100A [SEC ID nº 267]
21-VH-Y101A [SEC ID nº 268]
50 22-VH-G102A [SEC ID nº 269]

Expresión analítica y preparatoria de variantes de anticuerpo DC8E8 recombinantes: Las construcciones de ADN de pET22b-scDC8E8v de anticuerpos de tipo silvestre y sus mutantes (todos los cuales están marcados con His) se transformaron en células *E. coli* de la cepa de producción BL21 (DE3). Los clones resultantes se verificaron en primer lugar con respecto a la producción de scDC8E8v recombinante. Se inocularon colonias individuales obtenidas después de transformación en 2 ml de medio LB complementado con 100 µg/ml de ampicilina y se cultivaron a 37°C durante 5 horas con agitación constante (Sambrook y Russell 2001). Se retiró una alícuota de 100 µl de cada cultivo, se mezcló con 2/3 del volumen de glicerol 100% y se almacenó congelada a -80°C para su uso posterior. La expresión de la proteína recombinante se indujo por la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y la incubación continuó durante 3 horas adicionales. Las células se recogieron por centrifugación en una centrífuga de sobremesa a 4°C durante 1 minuto

a 10000 xg, el sobrenadante se descartó, el sedimento celular se resuspendió en tampón de muestra- SDS 1x (Laemmli 1970) y se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 x g y los sobrenadantes (lisados bacterianos) se analizaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se visualizaron tiñendo con azul brillante de Coomassie R250 (SIGMA).

Para la expresión preparatoria de cada anticuerpo scDC8E8v (nativo y mutante), se cultivaron células bacterianas que contenían los plásmidos de expresión respectivos y se indujeron como se describe en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" por Sambrook y Russell (2001). Se cultivaron células transformadas a 37°C en 100-500 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml a 230 rpm. Cuando la absorbancia del cultivo a 600 nm alcanzó 0,8-1,0, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de scDC8E8v. Después de incubación adicional a 37°C durante 3 horas, las células se recogieron por centrifugación a 3000 g durante 15 minutos a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis (PIPES 50 mM pH 6,9, NaCl 50 mM, PMSF 0,1 mM) y se sonicó en hielo 6 veces durante 30 segundos con pausas de 30 segundos usando una punta TT-13 (coeficiente de utilización del 50%, salida de potencia de 50 W, Sonopuls HD 2200, Bandelin, Alemania). El lisado se clarificó por centrifugación (21000 xg durante 15 minutos a 4°C). Los lisados se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,45 µm y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para el examen de la inducción exitosa y el nivel de expresión, se recogió 1 ml de cultivo inducido, las células se recogieron por centrifugación como anteriormente, se resuspendieron en 100 µl de tampón de muestra SDS 1 x, se hirvieron durante 5 minutos a 95°C y después se analizaron por SDS-PAGE (Figura 23A). El lisado citoplasmático se usó para la unión/detección de proteínas tau (por análisis de transferencia de Western) y para la determinación por SPR de la afinidad de los anticuerpos recombinantes por tau, ambas de las cuales son medidas de la actividad de los anticuerpos scDC8E8v nativos y mutantes.

Ejemplo 15: El fragmento SCFV recombinante del anticuerpo monoclonal DC8E8 (scDC8E8v) reconoce tau patológica (tauΔ (1-150, 392-441)/4R)

Para la determinación de las propiedades de unión de scDC8E8v con formas patológicas de tau, el lisado proteico de bacterias que expresaban scDC8E8v se diluyó 16 veces en tampón TBS-T (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) y se usó para superponer la membrana de nitrocelulosa que contenía 500, 250 y 125 ng de proteína tau truncada recombinante (tauΔ (1-150; 392-441)/4R) y proteína tau truncada en el extremo C terminal recombinante (tauΔ228-441) (tinción Ponceau S de las proteínas, figura 23B). Se detectó scDC8E8v unido por inmunotransferencia con un anticuerpo antimarcador his 6x (SEC ID nº 163) (nº A00174; GenScript, Piscataway, NJ, Estados Unidos) y se visualizó con anticuerpo conjugado con HRP anticonejo (DAKO Cytomation, Dinamarca) (Figura 23C). Las transferencias se desarrollaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Estados Unidos) detectado usando un sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón).

El análisis de transferencia de Western mostró que el anticuerpo monocatenario recombinante (scDC8E8v) detecta tau truncada [tauΔ (1-150, 392-441)/4R]. La unión es específica, puesto que scDC8E8v no reconoce la proteína tau truncada de control tauΔ228-441, que no contiene ninguno de los cuatro epítomos terapéuticos reconocidos por DC8E8 intacta (carril figura 23C carril 4). La exploración de la membrana de nitrocelulosa que contiene las proteínas tau (cargadas como se muestra en la figura 23B) con lisado de bacterias de control que no expresan scDC8E8v no produjo ninguna señal (Figura 23D).

Ejemplo 16: El fragmento SCFV recombinante del anticuerpo monoclonal DC8E8 (scDC8E8v) muestra propiedades de unión a tau similares al anticuerpo DC8E8, reconoce selectivamente tau patológica (tauΔ (1-150, 392-441)/4R) y la diferencia significativamente de tau nativa, fisiológica (tau2N4R).

Para cuantificar las propiedades de unión a tau del anticuerpo monocatenario recombinante scDC8E8v, se realizaron determinaciones de la afinidad cinética por SPR (Biacore 3000, Biacore, Suecia) para medir la unión de scDC8E8v con la tau truncada patológica (tauΔ (1-150; 392-441)/4R) (Figura 24A) y con la isoforma de tau de cuatro repeticiones humana 2N4R (Figura 24B). Para este fin, se inmovilizaron 11000 UR del anticuerpo antimarcador His policlonal de conejo (nº A00174; GenScript, Piscataway, NJ, Estados Unidos) en una microplaca sensora CM5. Todos los experimentos se realizaron a 25°C en PBS pH 7,4 con 0,005% de P20 (PBS-P) como el tampón de ejecución. Se capturó scDC8E8v marcado con His recombinante en la celda de flujo analítica para alcanzar un nivel de inmovilización de 60 UR, y se inyectaron concentraciones conocidas de cada proteína tau o de una muestra de control de PBS-P, a un caudal de 100 µl/minuto sobre la microplaca sensora. Los datos de unión cinética se refirieron dos veces y se ajustaron por un software BIA evaluation 4.1 (Biacore AB) a un modelo de interacción 1:1. Las constantes de velocidad cinética se aproximaron globalmente, las respuestas máximas se ajustaron localmente y la respuesta en bruto se ajustó a cero.

Las mediciones cinéticas mostraron una constante de velocidad de asociación mayor y una constante de velocidad de disociación menor de scDC8E8v hacia tauΔ (1-150; 392-441)/4R de AD patológica que hacia tau 2N4R normal (Figura 24C). En consecuencia, la afinidad de scDC8E8v por tau de AD truncada es mayor (valor mayor de la constante de asociación en equilibrio K_A) que para la isoforma 2N4R de tau de longitud completa. Estas mediciones confirmaron que la versión monocatenaria del anticuerpo de DC8E8 (scDC8E8v) muestra una preferencia de unión por proteínas tau patológicas, conformacionalmente alteradas, como el anticuerpo DC8E8

de longitud completa parental. El scDC8E8v recombinante es por lo tanto adecuado para la identificación de restos de aminoácidos dentro del sitio de combinación del anticuerpo DC8E8 responsable de sus propiedades de unión.

5 **Ejemplo 17: Identificación de restos en el sitio de combinación de scDC8E8v que influye en el reconocimiento de scDC8E8v/DC8E8 de epítomos de tau patológica**

Se han determinado varios restos de aminoácidos que influyen en la interacción de DC8E8-antígeno por mutagénesis de exploración de alanina de los restos del sitio de combinación de scDC8E8v. Los restos de contacto con el antígeno potenciales en las cadenas ligera y pesada se identificaron basándose en el trabajo de MacCallum *et al.* (J. Mol. Biol. 1996) y se mutaron a alanina, como se ha descrito en el Ejemplo 14. Las versiones mutantes de scDC8E8v se expresaron a continuación en la cepa de *E. coli* BL21 (Figura 25A, las proteínas monocatenarias están indicadas por asteriscos). Las propiedades de unión del scDC8E8v mutado se analizaron por transferencia de Western (Figura 25B-C). La figura 25B muestra tinción con Ponceau S de membranas de nitrocelulosa que contienen diversas cantidades de proteína tauΔ (1-150, 392-441)/4R troncada. Se usaron membranas idénticas para la detección de la tau troncada por los diversos anticuerpos monocatenarios mutantes (Figura 25C).

Basándose en estos resultados, los restos de aminoácidos en la región variable de DC8E8 se clasificaron en tres categorías principales, como sigue:

Categoría 1: Los restos enumerados en esta categoría (en negrita) contribuyeron más a la unión de scDC8E8v con tau AD troncada patológica (tauΔ (1-150, 392-441)/4R). La mutación de uno cualquiera de estos restos a alanina previno más el reconocimiento de epítomos de DC8E8 en la proteína tau.

Restos de categoría 1 en la cadena ligera de DC8E8:

Asparagina en la posición 31 en CDRL1 [SEC ID nº 117]
Tirosina en la posición 38 en CDRL1 [SEC ID nº 117]
Serina en la posición 97 en CDRL3 [SEC ID nº 119]

Restos de categoría 1 en la cadena pesada de DC8E8:

Ácido glutámico en la posición 50 en FRH2 que precede a CDRH2 [SEC ID nº 121]
Tirosina en la posición 101 en CDRH3 [SEC ID nº 122]

Categoría 2: Los restos enumerados en esta categoría contribuyen a la unión de scDC8E8v con tau patológica (tauΔ (1-150, 392-441)/4R). La mutación de uno cualquiera de estos restos a alanina reduce la reactividad de scDC8E8v hacia tau de AD troncada (tauΔ (1-150; 392-441)/4R), pero lo evita en un menor grado que las mutaciones de los restos de categoría 1:

Restos de categoría 2 en la cadena ligera de DC8E8:

Tirosina en la posición 55 en la región marco conservada FRL2 que precede a CDRL2 [SEC ID nº 118]
Lisina en la posición 95 en CDRL3 [SEC ID nº 119]

Restos de categoría 2 en la cadena pesada de DC8E8:

Serina en la posición 57 en CDRH2 [SEC ID nº 121]
Tirosina en la posición 100 en CDRH3 [SEC ID nº 122]
Glicina en la posición 102 en CDRH3 [SEC ID nº 122]

Categoría 3: Los restos enumerados en esta última categoría contribuyen menos a la unión de scDC8E8v con tau de AD patológica (tauΔ (1-150, 392-441)/4R). La mutación de estos restos a alanina no cambia la reactividad de scDC8E8v hacia tau troncada (tauΔ (1-150; 392-441)/4R):

Restos de categoría 3 en la cadena ligera:

Arginina en la posición 33 en CDRL1 [SEC ID nº 117]
Triptófano en la posición 56 en CDRL2 [SEC ID nº 118]
Glutamina en la posición 96 en CDRL3 [SEC ID nº 119]
Fenilalanina en la posición 98 en CDRL3 [SEC ID nº 119]
Tirosina en la posición 99 en CDRL3 [SEC ID nº 119]
Leucina en la posición 100 en CDRL3 [SEC ID nº 119]
Arginina en la posición 101 en CDRL3 [SEC ID nº 119]

Restos de categoría 3 en la cadena pesada:

Tirosina en la posición 32 en CDRH1 [SEC ID nº 120]
Valina en la posición 33 en CDRH1 [SEC ID nº 121]
Fenilalanina en la posición 52 en CDRH2 [SEC ID nº 121]
Ácido aspártico en la posición 99 en CDRH3 [SEC ID nº 122]

Ejemplo 18: Vacunación activa con epítomos de tau terapéuticos: preparación de inmunógenos para vacunas basadas en uno de los epítomos de unión a DC8E8 en tau y administración de vacuna

a. *Péptidos*: Se sintetizaron inmunógenos peptídicos consistentes en fragmentos sintéticos de proteína tau humana 2N4R por Antagene, Inc. (Sunnyvale, CA) y EZBiolab, Estados Unidos, con un pureza mayor del 95%. Cada secuencia peptídica se diseñó para comprender por lo menos una de las secuencias que se cree que están implicadas y/o promueven la formación de fibrillas/agregación de tau ("epítomos terapéuticos" diana nuevos), y cuyos epítomos se identificaron anteriormente como sitios de unión a DC8E8 y por los ensayos descritos en los Ejemplos 1-11. Véase figura 26A. Estas cuatro secuencias también se denominan en la presente memoria "epítomos terapéuticos" (ver a continuación). Estos epítomos representan motivos de interacción tau-tau (epítomos de agregación), que son importantes para la formación de fibrillas de tau/ensamblaje de PHF. Por lo tanto, la dirección a estos epítomos terapéuticos estratégicos puede conducir al tratamiento exitoso de AD y tauopatías relacionadas. Además, el uso de dicha terapia anti-tau específica resultaría más seguro que las terapias de dirección amplia que se basan en epítomos de tau seleccionados aleatoriamente, debido a que se cree que la dirección de algunos epítomos de tau provoca una respuesta autoinmunitaria y potencialmente agrava la enfermedad (Furlan *et al.*, 2003; Gruden *et al.*, 2004).

En consecuencia, para determinar adicionalmente el potencial terapéutico de la inmunoterapia basada en tau, se designaron varios conjuntos de péptidos de tau para su uso como inmunógenos. Todos los restos se refieren a los de tau de longitud completa 2N4R, que tiene 441 restos de aminoácidos. Un primer conjunto de inmunógenos se compuso de SEC ID nº 1 tau 251-PDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINK-280; SEC ID nº 2 tau 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285; SEC ID nº 3 tau 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQ-288; SEC ID nº 4 tau 275-VQIINKLDLSNVQSKGSKDNKIHVPGGG-304; SEC ID nº 5 tau 201-GSPGTPGSRSTPSPPTREPCKVAVVR-230; SEC ID nº 6 tau 379-RENAKAKTDHGAIEIVYKSPVVGDTSPRHL-408; SEC ID nº 7 tau 181-TPSSGEPPKSGDRSGYSSPGTSGSR-210; SEC ID nº 8 tau 300-VPGGGSVQIVYKPVDSL-317 y SEC ID nº 108 tau 294-KDNKIHVPGGGS-305. Algunas de estas secuencias portan epítomos fosforilados previamente hallados en patología de tau de AD. Por lo tanto, el péptido de tau SEC ID nº 5 contiene treonina fosforilada en la posición 217, el péptido tau SEC ID nº 6 contiene restos de serina fosforilada en la posición 396 y 404, y el péptido de tau SEC ID nº 7 contiene serina fosforilada en la posición 202 y treonina en la posición 205. El péptido de tau SEC ID nº 2 se sintetizó en forma no fosforilada y fosforilada. La forma fosforilada contiene un resto de serina fosforilada en la posición 262.

Dentro de este conjunto, un subconjunto de inmunógenos (péptidos de tau SEC ID nº 1-4 y 108) comprende uno de los epítomos terapéuticos representados por SEC ID nº 98, (tau-267 KHQPGGG-273) o SEC ID nº 99 (tau 298-KHVPGGG-304). El otro subconjunto de péptidos de tau (SEC ID nº 5-7) comprende sitios fosforilados, hallados en enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías. El péptido de tau SEC ID nº 8 no porta ninguno de los epítomos mencionados y se usó como un control. (Figura 26).

El segundo conjunto de péptidos se compuso de SEC ID nº 9 a 97, que representa secuencias solapantes que comprende los restos 244-390 de tau humana 2N4R. Cada uno de estos péptidos comprende una de las secuencias de epítomos terapéuticos de tau en un ambiente basado en tau diferente. En otras palabras, en cada subconjunto, cada uno de los epítomos nº 1 a nº 4 está rodeado de diferentes restos de tau en su extremo tanto N como C (Figura 26).

b. *Conjugación para uso como una vacuna*: Se conjugaron los péptidos de tau SEC ID nº 2, 4, 7 y 108 con hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante un enlace de cisteína.

Para este fin, se sintetizaron los péptidos de tau SEC ID nº 2, 4, 7 y 108 como péptidos cisteinados con un resto de cisteína extra localizado en el extremo N terminal con el objetivo de obtener unión orientada del péptido en la superficie de la proteína KLH. Los péptidos se acoplaron con el vehículo KLH mediante el agente de entrecruzamiento bifuncional N-[γ-maleimidobutirilo] succinimida éster (GMBS). Para preparar la reacción de conjugación, se disolvieron 20 mg de KLH (Calbiochem) en tampón de conjugación (PBS con NaCl 0,9 M, EDTA 10 mM) a una concentración de 10 mg/ml por mezcla suave durante 10 minutos. Para la preparación de KLH activada por maleimida, se disolvieron 2 mg de agente de entrecruzamiento bifuncional activo GMBS en 50 µl de dimetilformamida anhidra y se mezclaron con 2 ml de solución de KLH durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró GMBS no reaccionado en una columna de desalación HiTrap de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada en tampón de conjugación. Las conjugaciones se llevaron a cabo a una relación de 1:1 de péptido y KLH activada con maleimida (p/p, 20 mg de péptido) durante 2 horas a temperatura ambiente (25°C). Los

conjugados resultantes se dializaron contra un exceso de 100 veces de PBS, con cuatro cambios de tampón de diálisis para retirar el péptido no conjugado. Después de la diálisis, los conjugados se centrifugaron a 21000 xg durante 15 minutos a 2°C. La compleción de la conjugación se confirmó por la ausencia de péptido libre en el tampón de diálisis, medido usando LC-MS/MS. Los conjugados se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

c. *Preparación de vacuna*: Para preparar dosis de inmunización con aluminio/adyuvante de alumbre AdjuPhos (Brenntag Biosector, Dinamarca), se emulsionaron 200 µg de cada conjugado de péptido de tau respectivo (disuelto en 150 µl de PBS) a una relación 1:1 (v/v) con adyuvante AdjuPhos, en un volumen de dosis final de 300 µl. Cada suspensión/emulsión se incubó con rotación a 4°C durante una noche para permitir que el péptido se adsorba en las partículas de fosfato de aluminio.

Para preparar dosis de inmunización con adyuvante completo de Freund, se emulsionaron 200 µg de cada conjugado de péptido de tau respectivo (disuelto en 150 µl de PBS) 1:1 (v/v) con adyuvante completo de Freund, en un volumen de dosis final de 300 µl. Para las dosis de refuerzo posteriores, el inmunógeno se preparó de forma similar, pero se emulsionó con adyuvante incompleto de Freund.

d. *Administración de vacuna*: Se inyectaron dosis de vacuna preparadas en ratas transgénicas de tau que portaban un transgén de tau truncado humano (línea SHR72 descrito anteriormente en el Ejemplo 7, que expresa tauΔ (1-150, 392-441)/4R (Zilka *et al.*, 2006). Las ratas recibieron la primera inyección subcutánea de 200 µg de inmunógeno en un volumen final de 300 µl a los 2 meses de edad, seguido de la segunda inyección tres semanas después, y a continuación en un programa mensual. Las ratas transgénicas de control recibieron el adyuvante mezclado 1:1 con PBS. La evaluación de la eficacia de la inmunoterapia se describe en el Ejemplo 19.

Aislamiento y purificación de tau de rata fetal, para su uso como un patrón interno en el análisis cuantitativo de tau insoluble en ratas tratadas con vacuna: se realizó purificación de tau de rata fetal esencialmente como se describe en Ivanovova *et al.*, 2008, usando ácido perclórico 1%. Se homogeneizó tejido cerebral obtenido de crías de rata de 1-7 días de edad en ácido perclórico 1% helado (1,5 g de tejido por 5 ml de ácido perclórico, PCA) y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. El homogeneizado se centrifugó a 15000 xg durante 20 minutos, y el sobrenadante transparente se concentró y simultáneamente se cambió el tampón a tampón de lavado (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) usando un dispositivo de filtro de centrifuga Amicon Ultra (Millipore). Los extractos cerebrales de PCA filtrados, que contenían aproximadamente 10 mg de proteínas totales, se cargaron a un caudal de 0,2 ml/min en una columna Poly-Prep C10/10 (GE Healthcare) empaquetada con Sepharose que portaba mAb pan-tau DC25 inmovilizado (véase anteriormente). Las proteínas no unidas se retiraron por lavado con 10-15 ml de tampón de lavado hasta que la absorbancia de las fracciones eluidas (a 280 nm) se hicieron estables. Se eluyó tau fetal, unido a mAb DC25, con glicina 0,1 M, pH 2,6. Las fracciones eluidas de 0,5 ml se neutralizaron inmediatamente con 50 µl de Tris-HCl 1 M, pH 9, y se ensayaron por SDS-PAGE. Las fracciones que contenían tau fetal se concentraron usando dispositivos de filtro de centrifuga Amicon Ultra (Millipore) con intercambio de tampón simultáneo a PBS. Se precipitó tau fetal purificada por cromatografía de afinidad de acuerdo con Chen *et al.*, (2005) mediante adición de cuatro volúmenes de acetona helada que contenía ácido tricloroacético al 10%. La mezcla se incubó a -20°C durante 2 horas y se centrifugó a 15000 xg durante 20 minutos a 2°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de acetona helada, se dejó reposar en hielo durante 20 minutos y se centrifugó de nuevo como anteriormente. El sedimento resultante se secó a temperatura ambiente y se disolvió en un volumen de PBS igual a ese volumen antes de la precipitación.

Ejemplo 19: procedimientos generales de evaluación de vacunas de péptidos de tau en modelos de rata transgénica de enfermedad de Alzheimer

Se evaluaron vacunas activas mediante los siguientes enfoques: (a) bioquímicamente, evaluando el efecto de su administración en los niveles de formas fosforiladas de tau insoluble usando análisis de inmunotransferencia de muestras de cerebro de rata con anticuerpos monoclonales específicos de fosforilación AT270, DC209, DC217 y AT8, y la cantidad total de tau insoluble usando el anticuerpo monoclonal pan-tau DC25; (b) neuroconductualmente, usando una evaluación de Neuroescala; (c) inmunohistoquímicamente, incluyendo cuantificación de NFT; y (d) por análisis de la respuesta de anticuerpo inducida. Las vacunas pasivas también pueden evaluarse de forma preclínica por uno o más de estos enfoques, entre otros.

(a). *Análisis bioquímico*: Se prepararon fracciones de tau insoluble usando el procedimiento de sarcosilo (Greenberg y Davies, 1990), de los troncos encefálicos de ratas transgénicas (SHR72) inmunizadas con péptidos de ensayo, así como de ratas SHR72 tratadas con simulación (inyectadas solamente con adyuvante (control)), como se ha descrito en el Ejemplo 8. Las muestras de tau insolubles en sarcosilo se analizaron por inmunotransferencia usando diversos anticuerpos monoclonales, como se describe a continuación. Los resultados de este análisis para péptidos inmunógenos SEC ID n° 1-8 y 108 se resumen en la figura 26B. Se ha mostrado que los niveles de tau insoluble se correlacionan con la progresión de patología de tau en ratas transgénicas SHR72. Koson *et al.*, 2008.

Análisis de inmunotransferencia: Se disolvieron muestras de fracciones de tau insolubles en sarcosilo en tampón

de carga de muestra de dodecil sulfato sódico (SDS) 1x (Laemmli, 1970) en volumen 1/50 de la fracción soluble (véase Filipcik *et al.* 2010) y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Después se cargaron 6 µl de cada uno en geles de poliacrilamida de SDS de gradiente 5-20% y se sometieron a electroforesis en el sistema de tampón de tris-glicina-SDS durante 40 minutos a 25 mA. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (1 hora a 150 mA en CAPS 10 mM, pH 12). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en leche en polvo desnatada 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y después se incubaron durante 1 hora con anticuerpos monoclonales primarios (específicos de tau) (véase posteriormente para descripciones más detalladas de cada anticuerpo), seguido de tres lavados con un gran volumen de PBS. Después de los lavados, se usó Ig antirratón de cabra conjugado con HRP (DAKO, Dinamarca) diluido 1:4000 con PBS como un anticuerpo secundario. La incubación (1 hora a temperatura ambiente) se siguió de lavado (tres veces) con Igepal 0,2% en PBS. Las transferencias se desarrollaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Estados Unidos) y la señal se detectó usando un sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón). Las intensidades de señal se cuantificaron usando software AIDA (Analizador de Datos de Imágenes Avanzado, Raytest, Straubenhardt, Alemania). Se usó tau fetal (0,6 µg/carril) como un patrón interno para análisis de cuantificación.

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales AT8 y AT270 de Innogenetics (Bélgica) y ambos se usaron para análisis de inmunotransferencia. También se usó AT8 para inmunohistoquímica. AT8 reconoce serina 202 fosforilada y treonina 205 localizada en el dominio rico en prolina de tau, que contribuye a una parte importante de la afinidad de unión a microtúbulos de tau. AT270 reconoce treonina fosforilada 181 localizada también en el dominio rico en prolina. Ambos anticuerpos se unen a tau soluble e insoluble. Los anticuerpos monoclonales específicos de fosforilación DC209 (que reconoce pT231), DC217 (que reconoce pT217) usados en este estudio se prepararon por Axon Neuroscience, GmbH (Viena, Austria). El anticuerpo pan-tau DC25 (Axon Neuroscience, GmbH) reconoce un epítipo en la cuarta repetición de unión a microtúbulo en el extremo C terminal de proteína tau (347-353) en todas las formas de tau soluble e insoluble. El anticuerpo DC25 reconoce proteínas tau independientemente de su nivel de fosforilación.

(b). *Evaluación neuroconductual*: Se evaluaron las respuestas neuroconductuales en las ratas 10 días después de la dosis de vacuna final usando la Neuroescala, que es una batería de ensayos conductuales originalmente diseñada para ratas transgénicas que expresan proteína tau truncada humana (Korenova *et al.*, 2009). La Neuroescala está compuesta de tareas sensomotoras (ensayo de caminar por una viga), neuromusculares (ensayo de tracción prensil) y neurológicas (colocación, corrección, postural, pabellón auricular, sobresalto y reflejo de extensión de escape de las extremidades posteriores), enriquecidas con evaluaciones observacionales básicas.

La observación general implicó la evaluación de la postura y las funciones de las extremidades; el examen neurológico incluyó la respuesta refleja básica, todas puntuadas en una escala de 1 punto (respuesta normal 0; respuesta retardada o incompleta 1 punto). La evaluación del reflejo de extensión de escape de las extremidades posteriores se valoró en una escala de 3 puntos (respuesta normal 0-1; déficit 2-3 puntos).

Para el ensayo de caminar por una viga, se usaron tres tipos de segmentos transversales (3x3 cm, 4x2 cm y una viga redonda de 3,5 cm de diámetro). El número máximo de puntos fue de 10 (5 puntos para tiempo de espera + 5 puntos para deslizamientos de extremidades posteriores en un tipo de viga). Cuanto menor sea la puntuación obtenida del ensayo de caminar por una viga, mejor será la capacidad de coordinación sensomotora del animal ensayado. La suma de puntos que es posible conseguir es de 30.

Para el ensayo de tracción prensil, se permitió que una rata sujetara, con sus patas delanteras, un alambre de acero horizontal (3 mm de diámetro) suspendido 76 cm sobre una superficie acolchada. Se midió el tiempo de espera hasta caer del alambre. El número máximo de puntos que podían concederse era de 5, que refleja alteración grave de la funcionalidad neuromuscular y debilidad muscular. Cuanto más largo sea el tiempo de espera hasta la caída, menor será la puntuación obtenida en la tarea, reflejando la fuerza muscular de las extremidades anteriores y la agilidad del animal ensayado.

La puntuación de la Neuroescala se calculó a partir de las puntuaciones obtenidas en los ensayos individuales. Era posible una puntuación total máxima de 49 puntos sumando la contribución de la evaluación observacional, la examinación neurológica, las tres series de ensayo de caminar por una viga y el ensayo de tracción prensil. Cuanto más grave sea la alteración neuroconductual, mayor será la puntuación de Neuroescala.

(c). *Inmunohistoquímica*: Para la recogida de muestras cerebrales, se perfundió a las ratas por vía transcardiaca PBS durante 2 minutos bajo anestesia profunda. Después de la perfusión, se retiraron los cerebros de las ratas y se cortaron en dirección sagital en dos hemisferios del mismo tamaño. Se recogieron el tronco encefálico y el cerebelo del hemisferio derecho para análisis bioquímicos. El hemisferio izquierdo se fijó con paraformaldehído 4% durante una noche a 4°C, seguido de un tratamiento con sacarosa 25% durante 48 horas para proporcionar crioprotección. El material se congeló después en 2-metilbutano frío (-42°C) durante 30 segundos y se seccionó en un criomicrotomo. Se cortaron secciones sagitales (40 µm) en un criostato a -18°C. Se usaron secciones que flotaban libremente para estudios inmunohistoquímicos.

Se realizó tinción inmunohistoquímica en secciones de cerebro congeladas de ratas tratadas y de control. Koson *et al.*, 2008, han demostrado que el número de NFT en el cerebro de ratas transgénicas SHR72 correlaciona con el momento de fallecimiento de los animales (es decir, cuantos más NFT, más temprano es el fallecimiento del animal). Para analizar cambios neurofibrilares en los cerebros de ratas, se prepararon secciones sagitales del cerebro. Se trataron secciones titulares de flotación libre con ácido fórmico al 80% frío (+4°C) durante 30 segundos a temperatura ambiente (25°C). Las secciones cerebrales se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en PBS que contenía Triton X-100 0,3% en H₂O₂ 1%, seguido de una incubación de 30 minutos en solución de bloqueo (PBS que contenía Triton X-100 0,3%, suero de caballo 1%), seguido de incubación durante una noche a 4°C con anticuerpo AT8 purificado (0,2 µg/ml en tampón de bloqueo) o sobrenadante de cultivo de hibridoma DC217 (1:100 en tampón de bloqueo). Ambos anticuerpos mostraron un patrón de inmunotinción similar en el tronco encefálico de ratas transgénicas. Después de lavar, las secciones se inmunotñieron usando el procedimiento de peroxidasa de biotina de avidina convencional (ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA). El producto de reacción se visualizó usando un sistema de biotina-avidina y vector VIP como un cromógeno (Vector Laboratories). Las secciones se examinaron después con un microscopio Olympus BX 51.

(d). *Respuesta de anticuerpos*: Se tomaron muestras sanguíneas de las ratas transgénicas antes del comienzo del estudio (es decir, antes de la primera inyección) y dos semanas después de la última inyección. La respuesta de anticuerpos al inmunógeno/vacuna administrado se determinó por ELISA usando muestras de plasma diluidas en serie. Se recubrieron placas de 96 pocillos (IWAKI, Japón) por separado con inmunógenos peptídicos, proteína tau recombinante tauΔ (1-150; 392-441)/4R y la isoforma de tau de longitud completa recombinante 2N4R, a una concentración de 10 µg/ml en PBS durante una noche a 37°C. Después de bloquear con leche desnatada en polvo 1% en PBS, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 0,05% y se incubaron con 50 µl/pocillo de diluciones de plasma en serie (1:200-1:128000 en tampón de bloqueo) durante 1 hora a 37°C. Después de incubación y lavado, se diluyó anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Ig antirrata de conejo, DAKO, Dinamarca) 1:1000 y se aplicó a los pocillos (50 µl/pocillo) durante 1 hora a 37°C. La reacción se desarrolló con o-fenilendiamina en una solución de sustrato de peroxidasa (tampón fosfato 0,1 M) y se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2 M. Se midió la absorbancia a 492 nm usando un lector de ELISA Multiscan MCC/340 (LabSystems). Las lecturas de absorbancia de por lo menos dos veces el valor de los controles negativos se consideraron positivas.

Se realizaron mediciones de afinidad usando SPR, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Brevemente, se realizaron experimentos a 25°C en solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 con 0,005% de P20 (PBS-P) como el tampón de ejecución. Se acoplaron 3000 UR (unidades de respuesta) de anticuerpo policlonal antirratas (n° Z 0420; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) a una concentración de 5 µg/ml (preparada por dilución 40 veces de 200 µg/ml de reserva de PBS 0,5 x en tampón de acetato sódico 10 mM pH 4,5) mediante aminos primarias, simultáneamente en dos celdas de flujo, una de las cuales se usó como una referencia en la medición. En cada ciclo de análisis, se capturaron sueros diluidos 1000 veces en la celda de flujo analítica para alcanzar un nivel de inmovilización de ~ 850 UR, que se acercaba a la saturación. Para las determinaciones de K_A, así como para la determinación de constantes de tasas cinéticas, se inyectaron soluciones de 100 nM de péptidos inmunógenos de tau o proteínas tau a un caudal de 100 µl/minuto sobre la microplaca sensora. Se usó inyección de PBS-P para restar señal de fondo en el procedimiento de doble referencia (Myszka J Mol Rec 1999). Los datos cinéticos se ajustaron por un software BIA evaluation 4.1 (Biacore AB) a un modelo de reacción 1:1. Las constantes de tasas cinéticas se aproximaron globalmente, las respuestas máximas se ajustaron localmente, y la respuesta global se ajustó a cero.

Ejemplo 20: Las vacunas peptídicas de tau que comprenden por lo menos una de cuatro secuencias epitópicas terapéuticas son beneficiosas en ratas transgénicas modelo de enfermedad de Alzheimer humana

a. *SEC ID n° 1 tau 251-PDLKNVKSIGSTENLKHQPGGKQVIINK-280*. Se inmunizaron ratas transgénicas (SHR72) con el péptido de tau SEC ID n° 1 formulado con adyuvante Adju-phos.

La conversión de tau de forma soluble a patológica insoluble en sarcosilo se ha visto como una etapa importante en el desarrollo de la patología de tau y parece depender de varios factores, tales como la concentración de tau, el truncamiento de tau, y el alcance de la fosforilación de tau (Alonso *et al* 2001; Koson *et al* 2008; Kovacech y Novak 2010). Los resultados del análisis cuantitativo de inmunotransferencia de tau insoluble en las fracciones cerebrales insolubles en sarcosilo recogidas del grupo de ratas inmunizadas con el péptido de tau SEC ID n° 1 y del grupo de control se muestran en la figura 26C. La vacunación redujo la cantidad de tau insoluble en ratas inmunizadas con tau251-280 (SEC ID n° 1) en comparación con ratas de control, que recibieron adyuvante solamente (Figura 26C). Esta reducción se observó tanto para niveles globales de tau insoluble (como se evalúa por el anticuerpo pan-tau DC25, que reconoce los restos 347-353) así como para todos los otros epítomos de tau relevantes para AD ensayada (marcadores sustitutos de AD) descritos en las figuras 26B y 26C que es conocido que están presentes en fracciones insolubles en sarcosilo. De hecho, la inmunización con el péptido de tau SEC ID n° 1 indujo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en tau insoluble, que se observó al nivel de tau insoluble total (71%) usando anticuerpo monoclonal pan-tau DC25 (Figura 26 B, C). El análisis con DC217 (pThr217), AT270 (pThr181), reveló una tendencia hacia una reducción en los niveles de fosforilación en Thr217 (42%) y pThr181 (58%) de tau insoluble en las ratas inmunizadas en comparación con las ratas de control. Se

observó un efecto de tratamiento más débil (11%) en el fosfoepítipo de proteína tau insoluble pThr231 (Figura 26B). Estos resultados sugieren que la vacuna activó un mecanismo responsable de la inhibición de la agregación de tau y/o un mecanismo implicado en reducir los niveles de proteínas tau propensas a interacción tau-tau.

Las ratas tratadas con el inmunógeno peptídico de tau SEC ID nº 1 mostraron tiempos de espera de escape reducidos estadísticamente significativos en el ensayo de caminar por una viga ($p = 0,045$) en comparación con ratas de control (Figura 27A). De forma similar, el número de deslizamientos de extremidades posteriores se redujo en el grupo vacunado en comparación con los controles; sin embargo, esta diferencia fue marginalmente estadísticamente significativa ($p = 0,059$, figura 27B). La puntuación de Neuroescala (descrita en el Ejemplo 19, anterior) se calculó a partir de los valores obtenidos en los ensayos de caminar por una viga, ensayos de tracción prensil y exámenes neurológicos (reflejos básicos, reflejo de extensión de escape de extremidades posteriores). La inmunización mejoró la puntuación de Neuroescala de las ratas tratadas con el péptido SEC ID nº 1 en comparación con el grupo de control, pero esta mejora no fue estadísticamente significativa ($p = 0,065$, figura 27C). La puntuación de Neuroescala total confirmó la mejora neuroconductual de ratas tratadas en comparación con ratas no tratadas. Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico.

Los parámetros neuroconductuales se correlacionaron con los niveles de tau insoluble en el tronco encefálico. Las ratas tratadas con niveles bajos de tau insoluble mostraron tiempos de espera de escape y deslizamientos de extremidades posteriores menores en comparación con los controles. Estos hallazgos indican que la reducción de tau plegada erróneamente, altamente insoluble conduce a mejoras funcionales en ratas inmunizadas, lo que podría tener valor terapéutico. La inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 1 dio como resultado mejora de los parámetros neuroconductuales de ratas tratadas. Este efecto siguió a la reducción en niveles de tau insoluble en los cerebros de las ratas inmunizadas. Estos hallazgos indican que la reducción de los niveles de tau insoluble tiene beneficio terapéutico.

La eficacia de la inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 1 se ensayó adicionalmente al nivel inmunohistoquímico (Figura 28). Se analizaron los ovillos neurofibrilares (NFT) usando anticuerpos anti-tau AT8, DC217, que reconocen los epítipos fosforilados en tau patológica, en los troncos encefálicos de ratas transgénicas tratadas y de control tratadas con simulación SHR 72, que recibieron adyuvante/PBS solamente. El número de NFT se determinó usando un procedimiento semicuantitativo. Se asignaron tres niveles cuantitativos: 1) ninguno o pocos ovillos neurofibrilares (hasta 3 en el tronco encefálico); 2) moderado (muchos NFT principalmente en la formación reticular del tronco encefálico); y 3) grave (muchos NFT en todas las áreas del tronco encefálico). "Extensivo" significa estadio de moderado a grave de la neurodegeneración neurofibrilar. El análisis inmunohistoquímico mostró una reducción del 50% de la carga de ovillos neurofibrilares en el grupo tratado con vacuna de animales transgénicos.

La reducción de los niveles de tau insoluble medidos de forma bioquímica se correlacionó con los resultados del análisis inmunohistoquímico. Los datos de inmunización con SEC ID nº 1 muestran la capacidad de tratamiento de este péptido, que contiene el epítipo de DC8E8 nº 1.

b. SEC ID nº 2. tau 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKLDLS-285. Se inmunizaron ratas transgénicas (SHR72) con el péptido de tau SEC ID nº 2 conjugado con el vehículo KLH (como se ha descrito anteriormente).

El análisis de inmunotransferencia reveló que la vacuna reducía la cantidad de tau insoluble en ratas inmunizadas en comparación con ratas de control que recibieron solamente adyuvante. La figura 29 muestra una reducción de todos los epítipos controlados presentes en tau insoluble/agregada. El análisis cuantitativo de la inmunorreactividad del pan-tau DC25 reveló 41% de reducción de tau insoluble (estadísticamente significativa, $p < 0,001$) en ratas inmunizadas en comparación con ratas de control que recibieron solamente adyuvante (Figura 26B). De forma similar, la inmunorreactividad de otros anticuerpos que reconocían epítipos específicos de AD fosforilados en tau insoluble se redujo (Figura 26B y figura 29). Adicionalmente, el tratamiento tuvo un impacto en el nivel de otro fosfoepítipo de tau, que se crea por dos restos fosforilados Ser202/Thr205 y que se sabe que es un marcador de patología de AD. La vacuna indujo una reducción del 80% de este epítipo en ratas transgénicas inmunizadas, en comparación con animales no tratados. De forma similar, los niveles de los epítipos de tau fosforilados Thr217, Thr231 y Thr181, se redujo en 72% ($p < 0,001$), 64% y 74% ($p < 0,01$), respectivamente. Estos resultados sugieren que la vacuna indujo un mecanismo responsable de la inhibición de la agregación de tau y/o un mecanismo que reduce las especies de tau propensas a interacción tau-tau patológica.

Las ratas se sometieron a análisis conductuales, y la figura 30 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de caminar por una viga (Figura 30A), ensayo de deslizamientos de extremidades posteriores (Figura 30B) y análisis de Neuroescala (Figura 30C, $p = 0,05$). Se observó una tendencia positiva en el tiempo de espera de escape de caminar por una viga ($p = 0,096$) en el grupo de ratas tratadas con el péptido de tau SEC ID nº 2. La inmunización redujo el número de deslizamientos de extremidades posteriores en el ensayo de viga transversal; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,25$) en comparación con el grupo de control. Los ensayos de alteración motora junto con el ensayo de tracción prensil y el examen neurológico se resumieron en la puntuación de Neuroescala. La figura 30 muestra la mejora estadísticamente significativa en la

puntuación de Neuroescala de las ratas tratadas con el péptido de tau SEC ID nº 2 en comparación con el grupo de control ($p = 0,036$). En general, la inmunización con el péptido de tau SEC ID nº 2 mejoró el rendimiento motor global. La mejora del nivel neuroconductual correlacionó con la reducción de la cantidad de tau insoluble (tau de molde-AD) en animales inmunizados en comparación con controles. Estos hallazgos indican que la

La eficacia de la inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 2 se ensayó adicionalmente en el nivel inmunohistoquímico (Figura 31). Para este fin, se usaron dos anticuerpos anti-tau diferentes (AT8, DC217), que reconocen tau fosforilada tanto soluble como insoluble. La patología neurofibrilar, en estas ratas (SHR72), se localiza principalmente en el tronco encefálico y la médula espinal y parcialmente en el cerebelo (datos no representados). El número de NFT se determinó usando un procedimiento semicuantitativo. Se asignaron tres niveles cuantitativos: 1) ninguno o pocos ovillos neurofibrilares (hasta 3 en el tronco encefálico); 2) moderado (muchos NFT principalmente en la formación reticular del tronco encefálico); y 3) grave (muchos NFT en todas las áreas del tronco encefálico). "Extensivo" significa estadio de moderado a grave de la neurodegeneración neurofibrilar. La inmunoterapia con el péptido SEC ID nº 2 redujo el número de ratas transgénicas con NFT extensivos en el tronco encefálico en casi el 60% (Figura 31).

Estos resultados demuestran que la vacunación con el péptido de tau SEC ID nº 2 muestra varios resultados de vacuna deseables: 1) reducción de tau insoluble en los cerebros de ratas transgénicas inmunizadas al nivel bioquímico; 2) alivio de déficits sensomotores en las ratas transgénicas inmunizadas al nivel conductual; y 3) reducción de los números de lesiones neurofibrilares al nivel inmunohistoquímico.

SEC ID nº 2 tau 256-VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS-285 con Ser262 fosforilada. La SEC ID nº 2 que contiene serina fosforilada en la posición 262 se conjugó con KLH.

La inmunotransferencia de fracciones de tau insolubles en sarcosilo de cerebro de rata con el anticuerpo DC25 reveló que la vacuna reducía de forma estadísticamente significativa la cantidad total de tau insoluble en el 46% ($p < 0,01$) en los animales inmunizados en comparación con ratas transgénicas de control que recibieron solamente adyuvante (Figura 32 y figura 26B, medidas basadas en DC25 (datos "347-353"). De forma similar, la cuantificación de las señales de DC209 (pThr231), DC217 (pThr217), AT8 (pSer202, pThr205) y AT270 (pT181) mostró niveles menores de tau fosforilada insoluble en el grupo inmunizado de animales en comparación con los controles (Figura 26B). Sin embargo, la reducción de los niveles de tau insoluble fosforilada en pThr217 ($p < 0,001$; 73%), pThr231 (84%), pSer202/pThr205 (82%) y pThr181 ($p < 0,01$; 82%) fue más pronunciada que la reducción observada en tau insoluble total. Estos cambios en los niveles de fosfoepítomos implicados en la cascada de plegamiento erróneo de tau de AD son un indicador útil del efecto del tratamiento. La reducción de los epítomos de tau relevantes para AD muestra que la vacuna activaba un mecanismo responsable de la inhibición de la agregación de tau y/o un mecanismo que reducía los niveles de tau propensa a interacciones patológicas con tau endógena.

El perfil inmunohistoquímico (Figura 33) muestra que la inmunoterapia con el fosfopéptido SEC ID nº 2 conducía a una reducción del número de ratas transgénicas con NFT extensivos en el tronco encefálico. Se observó una reducción del 78% en el número de ratas transgénicas con NFT extensivos en el grupo inmunizado, en comparación con el grupo no inmunizado de control. La inmunización detuvo el desarrollo de la patología de tau del cerebro en animales inmunizados. Se obtuvo un efecto similar al nivel bioquímico, con una reducción de tau insoluble en dos epítomos relevantes para AD analizados (Figura 26B y 32).

Estos resultados demuestran que la vacunación con el fosfopéptido de tau SEC ID nº 2/pSer262 provocaba: 1) una reducción en tau insoluble en los cerebros de ratas transgénicas inmunizadas al nivel bioquímico; y 2) un efecto del tratamiento positivo en el número de lesiones neurofibrilares al nivel inmunohistoquímico.

d. *SEC ID nº 3 tau 259-KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ-288.* Se inmunizaron ratas transgénicas (línea SHR72) con el péptido de tau SEC ID nº 3 formulado con adyuvante de alumbre (AdjuPhos).

La figura 34 demuestra que la inmunoterapia reduce la tau insoluble en las ratas inmunizadas en comparación con las ratas de control que recibieron solamente adyuvante. Se detectó una reducción del nivel de tau insoluble para todos los epítomos de tau analizados (es decir, para 347-353/anticuerpo DC25, pT217/anticuerpo DC217, pT231/anticuerpo DC209, pS202/pT205/anticuerpo AT8 y pT181/anticuerpo AT270). El nivel de tau insoluble total se redujo en 40%, como se reveló por inmunodetección con el anticuerpo pan-tau DC25. De forma similar, la vacuna indujo una reducción del 30% en la proteína tau fosforilada en pT217, como se muestra en la figura 26B y figura 34. El tratamiento tuvo un efecto mayor en los niveles de formas de tau insolubles fosforiladas en Thr231 (63%), Thr181 (74%) y Ser202/Thr205 (61%) en ratas inmunizadas, en comparación con las ratas no inmunizadas (Figura 26B y figura 34). Estos hallazgos muestran que una reducción de tau insoluble puede conducir a alteraciones adicionales en los niveles de proteínas tau que conducen a patología y, por lo tanto, puede tener significación terapéutica. La reducción de epítomos de tau relevantes para AD muestra que la vacuna activaba un mecanismo responsable de la inhibición de la agregación de tau y/o un mecanismo que reducía los niveles de tau propensa a interacciones patológicas con tau endógena.

La figura 35A-C muestra los resultados obtenidos por evaluación neuroconductual. En el grupo de ratas tratadas con el péptido SEC ID nº 3, se observó una tendencia positiva en el tiempo de espera de escape de caminar por una viga; sin embargo, sin una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas tratadas con péptido y no tratadas/de control (Figura 35A; $p = 0,21$). De forma similar, el tratamiento condujo a una reducción en el número de deslizamientos de las extremidades posteriores en el grupo de ratas inmunizadas en comparación con ratas no tratadas, pero este efecto no fue estadísticamente significativo (Figura 35B, $p = 0,15$). La puntuación de Neuroescala total confirmó la mejora neuroconductual en ratas tratadas con péptido de tau SEC ID nº 3 en comparación con ratas no tratadas ($p = 0,11$ en ambos casos). Sin embargo, la diferencia en la puntuación de Neuroescala no fue estadísticamente significativa ($p = 0,19$). La inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 3 dio como resultado mejor coordinación sensomotora de las ratas tratadas en comparación con ratas de control en el ensayo de caminar por una viga, así como en el ensayo de deslizamientos de extremidades posteriores; estos resultados se confirmaron por la puntuación de Neuroescala.

Además, el perfil inmunohistoquímico reveló que la inmunoterapia con el fosfopéptido SEC ID nº 3 conducía a una reducción del 58% de los NFT en el tronco encefálico de animales tratados con vacuna (Figura 36). Estos resultados muestran que la inmunización con SEC ID nº 3, que contiene el epítipo de DC8E8 nº 1, redujo significativamente la tau polimérica patológica ensamblada en NFT. Además, este efecto de tratamiento positivo también se mostró al nivel bioquímico, representado por una reducción estadísticamente significativa de tau patológica insoluble.

e. SEC ID nº 4 tau 275-VQIINKKLDLSNVQSKGSKDNIKHVPGGG-304. El péptido de tau SEC ID nº 4 se conjugó con KLH y se usó para inmunización con adyuvante de alumbre (AdjuPhos).

La figura 37 y figura 26B muestran que la inmunoterapia con SEC ID nº 4 conduce a una reducción de la cantidad de tau insoluble en las ratas inmunizadas, en comparación con ratas de control que recibieron adyuvante solamente. Los datos muestran que se detectó una reducción del nivel de tau insoluble para todos los epítipos de tau analizados. Los niveles de tau insoluble totales se redujeron en 63%, como se reveló por la inmunorreactividad con el anticuerpo pan-tau DC25. De forma similar, la vacuna indujo reducciones de la proteína tau fosforilada a pThr217 (92%), Thr231 (95%), Thr181 (87%) y Ser202/Thr205 (95%), como se muestra en la figura 26B. Se ha mostrado previamente que el nivel de tau insoluble correlaciona con el progreso de la patología de tau (Zilka *et al.*, 2006). Los presentes resultados muestran que la inmunoterapia dirigida al epítipo de tau terapéutico comprendido dentro de SEC ID nº 99 puede reducir los niveles de tau insoluble y retarda el progreso de la patología de tau.

Se midió la alteración motora compleja por el conjunto de ensayos motores convencionales combinado con el examen neurológico en la puntuación compuesta-Neuroescala. A los 6,5 meses de edad, las ratas transgénicas SHR72 tratadas con el péptido de tau SEC ID nº 4 se sometieron a ensayos conductuales con el objetivo de determinar el efecto de esta inmunoterapia. Las ratas tratadas con el inmunógeno peptídico de tau SEC ID nº 4 mostraron tiempos de espera de escape reducidos en el ensayo de caminar por una viga, en comparación con las ratas transgénicas que recibieron solamente adyuvante (controles) (Figura 38A). De forma similar, se observaron resultados positivos en el número de deslizamientos de extremidades posteriores en el grupo vacunado en comparación con los controles de tratamiento transgénicos (Figura 38B). La puntuación de Neuroescala total se calculó a partir de los datos obtenidos en los ensayos de caminar por una viga, ensayos de tracción prensil y exámenes neurológicos (reflejos básicos, reflejo de extensión de escape de extremidades posteriores). La inmunización mejoró la puntuación de Neuroescala de las ratas tratadas con el péptido SEC ID nº 4, en comparación con el grupo de tratamiento de control (Figura 38C). La puntuación de Neuroescala total confirmó la mejora neuroconductual de ratas transgénicas tratadas en comparación con ratas transgénicas no tratadas.

La eficacia de la inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 4 se ensayó adicionalmente al nivel inmunohistoquímico (Figura 39). Se analizaron ovillos neurofibrilares (NFT) usando anticuerpos anti-tau AT8 y DC217, que reconocen epítipos fosforilados en tau patológica, en los troncos encefálicos de ratas SHR72 tratadas con vacuna y tratadas con adyuvante (control). El tejido cerebral de animales que recibieron solamente adyuvante contenía NFT positivos para AT8 y DC217 en todas las áreas del tronco encefálico, y principalmente en la formación reticular del tronco encefálico. El análisis inmunohistoquímico mostró una reducción del 66% de la patología neurofibrilar en las ratas transgénicas tratadas con vacuna SHR72 (Figura 39).

Los cambios de los niveles de tau insoluble en el tronco encefálico de la línea de rata transgénica SHR72 son un indicador sensible del efecto del tratamiento. La tau total insoluble, así como los niveles de tau fosforilada (monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros patológicos), se redujeron ambos eficazmente en el tronco encefálico mediante tratamiento con el péptido de tau SEC ID nº 4 (reducción del 63-95%; figura 26B). La reducción de los niveles de tau insoluble medidos bioquímicamente correlacionó con los resultados obtenidos de análisis inmunohistoquímico. Este análisis mostró más del 60% de reducción de la patología neurofibrilar en el tronco encefálico de ratas transgénicas a las que se inyectó vacuna (Figura 38). Los datos de la inmunización con SEC ID nº 4, muestran la capacidad de tratamiento de este péptido, que contiene el epítipo de DC8E8 nº 2.

f. SEC ID nº 5 tau 201-GSPGTPGSRSRTPSLPTPTREPKKVAVVR-230 que porta treonina fosforilada en la

posición 217. El péptido de tau SEC ID nº 5, fosforilado en la posición de treonina 217, se administró a ratas transgénicas SHR72 usando adyuvante de alumbre (AdjuPhos).

El análisis de inmunotransferencia mostró que la inmunización con el fosfopéptido SEC ID nº 5 no afectaba a la cantidad de tau insoluble total (detectada con el anticuerpo DC25) en comparación con ratas Tg de control que recibieron solamente adyuvante (Figura 40 y figura 26B). Sin embargo, el análisis con los anticuerpos DC209 y AT270 reveló una reducción de aproximadamente el 30% en los niveles de fosfo-tau pThr231 y pThr181 en la fracción de tau insoluble (Figura 26B). Por otro lado, el tratamiento indujo un aumento moderado de tau insoluble fosforilada en la treonina 217 (aumento del 11%) y tau que porta sitios fosforilados Ser202/Thr205 (aumento del 31%) en comparación con ratas transgénicas de control. Este hallazgo sugeriría un efecto de vacuna ambiguo o neutro de la inmunización con el fosfopéptido SEC ID nº 5 en los marcadores relevantes para AD evaluados, no comprendiendo dicho péptido ninguno de los epítomos de agregación de tau nº 1 a nº 4, identificados anteriormente (Ejemplos 1 a 11) como epítomos terapéuticos.

El análisis neuroconductual de ratas tratadas con péptido de tau fosforilado SEC ID nº 5 mostró que no existen mejoras significativas en las funciones neuroconductuales en el grupo tratado en el ensayo de caminar por una viga (Figura 41A, $p = 0,19$) o en el número de deslizamientos de extremidades posteriores en comparación con el grupo control (Figura 41B). La puntuación de Neuroescala total (Figura 41C), confirmó que no había mejora neuroconductual de ratas tratadas en comparación con ratas inmunizadas con simulación ($p = 0,28$).

La inmunoterapia con el fosfopéptido de tau SEC ID nº 5 no redujo el número de ratas transgénicas (SHR72) con NFT extensivos en el tronco encefálico en comparación con ratas transgénicas de control por inmunohistoquímica (Figura 42).

Estos resultados muestran que la vacunación con el péptido de tau SEC ID nº 5 pT217, que carece de todos los epítomos terapéuticos (SEC ID nº 98-101), no da como resultado una mejora estadísticamente significativa de la función neuroconductual y solamente una reducción de aproximadamente el 11% en el número de lesiones neurofibrilares al nivel inmunohistoquímico. No se observó ningún efecto en el nivel bioquímico con respecto a una reducción de tau insoluble, como se evaluó por el anticuerpo DC25.

g. SEC ID nº 6 tau 379-RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHL-408 que porta restos de serina fosforilados en la posición 396 y 404. Se administró péptido de tau fosforilado en la posición 396 y 404 a SHR72 usando adyuvante de alumbre (AdjuPhos). SEC ID nº 6/pS396/pS404 carece de cualquiera de los epítomos terapéuticos representados por la SEC ID nº 98-101, pero contiene un fosfoepítomo sobrerrepresentado en proteínas tau de cerebro con AD (Greenberg *et al* 1992; Otvos *et al* 1994).

A diferencia de la reducción de la cantidad de tau insoluble en sarcosilo observada con los péptidos SEC ID nº 1-4, la inmunización con el péptido fosforilado SEC ID nº 6 condujo a un aumento en la cantidad de tau insoluble en ratas inmunizadas en comparación con ratas de control, que recibieron solamente adyuvante. El análisis de inmunotransferencia reveló una tendencia a un aumento global de los niveles de fosfo-tau insoluble (Figura 43 y figura 26B). La inmunización condujo a un aumento de los niveles de tau totales en la fracción de tau insoluble, como se reveló por el mAb pan-tau DC25. También se observó un aumento en los epítomos de tau pT217 (aumento del 33%), Thr231 (aumento del 44%) y Thr181 (incremento del 7%). Sin embargo, el epítomo relevante para AD pS202/pT205 fue una excepción (Figura 26B). El nivel de proteína tau que portaba este fosfoepítomo se redujo en el 19% en comparación con ratas de control. El aumento de los niveles de proteína tau insoluble patológica relevante para enfermedad múltiple indica un efecto negativo indeseable de esta vacuna en las ratas.

Se evaluó la respuesta neuroconductual de ratas tratadas con el péptido de tau SEC ID nº 6/pS396/pS404 y los controles (Figuras 44A, B y C). La inmunoterapia no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las ratas tratadas y de control en el tiempo de espera de escape de caminar por una viga ($p = 0,82$) o en el número de deslizamientos de extremidades posteriores ($p = 0,75$). Estos resultados se confirmaron por la puntuación de Neuroescala ($p = 0,96$), en la que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento neuroconductual global entre ratas inmunizadas y de control. Por lo tanto, el tratamiento con el péptido SEC ID nº 6/pS396/pS404 no tuvo influencia estadísticamente significativa en el tiempo de espera de escape del ensayo de caminar por una viga, número de deslizamientos de extremidades posteriores o rendimiento motor global de las ratas ensayadas.

La figura 45 muestra el porcentaje de ratas transgénicas con patología de tau extensiva, como se evalúa por inmunohistoquímica con AT8. La inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 6/pS396/pS404 aumentó la carga de ovillos en 9% en relación con el grupo de control. Por lo tanto, el efecto negativo de la SEC ID nº 6/pS396/pS404 al nivel inmunohistoquímico se confirmó a los niveles bioquímico y neuroconductual.

Estos resultados demuestran que la vacunación con el fosfopéptido de tau SEC ID nº 6/pS396/pS404, que carece de cualquiera de los epítomos de tau terapéuticos representados en la SEC ID nº 98-101, no muestra: 1) efectos terapéuticos en tau insoluble en los cerebros de ratas inmunizadas; 2) efectos al nivel conductual; y 3) reducción, sino en su lugar un aumento del 9% en la carga de ovillos. Por lo tanto, este fosfoepítomo, que se ha indicado que es específico de AD (Greenberg *et al* 1992; Otvos *et al* 1994), no indujo un efecto terapéutico.

h. SEC ID nº 7 tau 181-TPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRS-210 que porta un resto de serina fosforilada en la posición 202 y un resto de treonina fosforilada en la posición 205. El péptido de tau resultante SEC ID nº 7/pS202/pT205, carece de cualquiera de los epítomos terapéuticos presentados en la SEC ID nº 98-101. El fosfopéptido se conjugó con KLH y se administró a ratas transgénicas (línea SHR72) en adyuvante de Freund.

El análisis cuantitativo de la inmunorreactividad de tau en el tronco encefálico por inmunotransferencia no mostró ningún efecto terapéutico. (Figura 46). Los niveles de tau total (epítomo de DC25, aumento del 6%) y proteínas tau fosforiladas en epítomos de tau relevantes para enfermedad pT217 (aumento del 3%), Thr231 (aumento del 11%), y Thr181 (aumento del 7%), aumentaron ligeramente en ratas inmunizadas en comparación con controles (Figura 46 y 26B). La inmunización indujo un aumento mayor de proteína tau insoluble fosforilada en Ser202/Thr205 (aumento del 41%).

La inmunoterapia con el péptido fosforilado SEC ID nº 7 no influyó significativamente en la función sensomotora de las ratas (Figura 47). Las ratas inmunizadas mostraron una mejora aparente en los parámetros neuroconductuales en comparación con los controles. Sin embargo, los grupos no fueron estadísticamente significativos, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratas tratadas y controles en los tiempos de espera de escape de caminar por una viga ($p = 0,47$, figura 47A), así como en el número de deslizamientos de extremidades posteriores ($p = 0,54$, figura 47B) y puntuación de Neuroescala ($p = 0,3$, figura 47C).

El péptido SEC ID nº 7 porta un epítomo de tau fosforilado que no contienen ninguno de los epítomos de DC8E8. El examen de los troncos encefálicos de las ratas SHR72 tratadas reveló que la inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 7 no era capaz de reducir la carga de ovillos neurofibrilares (Figura 48). El tejido cerebral de animales vacunados y de control contenía números casi idénticos de NFT positivos para AT8 y DC217 en todas las áreas del tronco encefálico, principalmente en la formación reticular. La vacuna que contenía SEC ID nº 7, que carecía de epítomos de DC8E8, no mostró ningún efecto beneficioso en los animales tratados.

Estos resultados demuestran que la vacunación con el fosfopéptido de tau SEC ID nº 7/pS202/pT205 no produce: 1) ningún cambio en los niveles de tau insoluble en los cerebros de ratas inmunizadas al nivel bioquímico; y 2) ningún efecto al nivel conductual. Este fosfopéptido proporciona pruebas adicionales de que los fosfo-sitos representados por pS202/pThr205 no son suficientes para inducir una reacción inmunitaria que elimine proteínas tau patológicas y/o influya positivamente en el estado neuroconductual de las ratas. Por el contrario, los epítomos de tau terapéuticos (SEC ID nº 98-101) consiguen este efecto.

i. SEC ID nº 8 tau 300-VPGGGSVQIVYKPVDSLK-317. La inmunoterapia con un péptido de tau más corto, que se usó como un control debido a que no porta un péptido de 6 unidades de tau completo dentro del que podría residir uno de los cuatro epítomos "terapéuticos" de tau, ni un epítomo fosforilado, se llevó a cabo para determinar su capacidad para afectar a los niveles de tau insoluble patológica y depósitos neurofibrilares en el cerebro. El nivel de tau insoluble total detectado por el mAb pan-tau DC25 aumentó significativamente (82%) en ratas inmunizadas en comparación con los controles que recibieron adyuvante solamente (Figura 49 y figura 26B). De forma similar, la inmunoterapia indujo un aumento en los niveles de tau insoluble fosforilada en T231 (60%) y un aumento menor en tau insoluble fosforilada en la posición de T181 (10%). El análisis cuantitativo con un conjunto diferente de anticuerpos, DC217 (pT217) y AT8 (pS202/pT205) no reveló ningún efecto en estos epítomos en tau insoluble (Figura 26B).

Los animales se sometieron a análisis conductual (Figuras 50A, B, C). Las ratas tratadas con el péptido SEC ID nº 8 no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de espera de escape en el ensayo de caminar por una viga ($p = 0,6$) en comparación con los controles. La diferencia en el número de deslizamientos de extremidades posteriores tampoco fue estadísticamente significativa ($p = 0,49$) en comparación con los controles. De forma similar, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la puntuación de Neuroescala ($p = 0,9$). Por lo tanto, la administración del péptido SEC ID nº 8 no influyó de forma estadísticamente significativa en el rendimiento motor de las ratas.

Estos resultados demuestran que la vacunación con el péptido de tau SEC ID nº 8, que carece de todos los epítomos terapéuticos (dentro de las SEC ID nº 98-101), no produjo: 1) ningún cambio en tau insoluble en los cerebros de ratas inmunizadas al nivel bioquímico; y 2) ningún efecto al nivel neuroconductual.

El efecto de la vacuna peptídica en la carga de NFT en el tronco encefálico de animales tratados y de control-simulación (que recibieron solamente adyuvante) se evaluó por inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que la inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 8 no redujo la cantidad de ovillos neurofibrilares (Figura 51). Los animales tratados y de control-simulación desarrollaron un número casi idéntico de cambios neurodegenerativos en todas las áreas del tronco encefálico, principalmente en la formación reticular del tronco encefálico como se reveló por tinción de AT8 y DC217.

La vacunación con SEC ID nº 8, que no comprende ningún epítomo terapéutico completo (SEC ID nº 98-101), no

mostró ningún efecto beneficioso en los animales tratados. Por lo tanto, los resultados de las inmunizaciones con los péptidos SEC ID nº 5-8 muestran que la presencia de por lo menos un epítipo terapéutico completo (localizado dentro de SEC ID nº 98-101) es necesaria para el efecto positivo deseado de la vacuna-reducción de patología de tau y mejora en por lo menos un parámetro neuroconductual.

j. *SEC ID nº 108 tau 294-KDNIKHVPGGGS-305*. Las ratas SHR72 se inmunizaron con el péptido de tau SEC ID nº 108 conjugado con el vehículo KLH, formulado con adyuvante de alumbre y administrado en una dosis de 100 µg por animal.

La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 redujo de forma estadísticamente significativa la tau patológica insoluble ($p < 0,001$). Puesto que la patología de enfermedad de Alzheimer en SHR72 está provocada por formas de tau insoluble patológica (representada por monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros de tau patológica), se analizó el impacto del tratamiento con la vacuna pasiva de 12 unidades SEC ID nº 108 en los niveles de tau insoluble. El tronco encefálico de los animales transgénicos inmunizados con el inmunógeno respectivo y el grupo de control inmunizado con adyuvante solamente se usaron para la extracción de tau patológica insoluble en sarcosilo (como se ha descrito anteriormente). Los resultados de los análisis de inmunotransferencia cuantitativos del grupo de ratas transgénicas inmunizadas con el péptido de tau SEC ID nº 108 y el grupo de control se muestran en las figuras 52 y 26B. La vacunación redujo de forma estadísticamente significativa la tau insoluble patológica en animales inmunizados en comparación con las ratas de control transgénicas que recibieron solamente adyuvante (Figura 52). Esta reducción se observó en todos los epítopos de tau relevantes para AD analizados. La inmunización con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo una reducción significativa de tau patológica insoluble ($p < 0,001$; 70%) revelada por la medición con el anticuerpo monoclonal pan-tau DC25 (Figura 52). Además, el análisis con los mAb dependientes de fosfo DC217 (pThr217) y AT8 (PSer202/pThr205) reveló una reducción significativa de los niveles de las especies de tau patológicas fosforiladas en Thr217 ($p < 0,001$; 96%) y en Ser202/pThr205 ($p < 0,05$; 98%) en tau insoluble de ratas inmunizadas en comparación con los controles (Figura 52). También se observó una reducción estadísticamente significativa en los niveles de tau patológica insoluble que porta pThr231 ($p < 0,05$; 97%) y pThr181 ($p < 0,05$; 94%). Estos resultados muestran que la respuesta inmunitaria inducida por vacuna da como resultado una reducción estadísticamente significativa de las formas tempranas de tau patológica (representada por monómeros, dímeros, oligómeros) y formas tardías de polímeros de tau patológica (representados por PHF).

La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 mejoró de forma estadísticamente significativamente los parámetros neuroconductuales ($p < 0,05$). Se midió la alteración motora por el conjunto de ensayos motores convencionales combinados con el examen neurológico en la puntuación compuesta - Neuroescala. A los 6,5 meses de edad, se sometió a ratas transgénicas SHR72 tratadas con el péptido de tau SEC ID nº 108 a ensayos conductuales con el objetivo de determinar el efecto de la inmunoterapia. Las ratas tratadas con el inmunógeno peptídico de tau SEC ID nº 108 mostraron tiempos de espera de escape significativamente reducidos en el ensayo de caminar por una viga ($p = 0,04$) en comparación con las ratas transgénicas que recibieron solamente adyuvante (controles) (Figura 53). De forma similar, se observó una tendencia positiva en el número de deslizamientos de extremidades posteriores en el grupo vacunado en comparación con controles de tratamiento transgénicos, esta diferencia fue significativa ($p = 0,045$, figura 53). La puntuación de Neuroescala total se calculó a partir de los datos obtenidos en los ensayos de caminar por una viga, ensayos de tracción prensil y exámenes neurológicos (reflejos básicos, reflejo de extensión de escape de extremidades posteriores). La inmunización mejoró significativamente la puntuación de Neuroescala de las ratas tratadas con el péptido SEC ID nº 108 en comparación con el grupo de tratamiento de control ($p = 0,047$) (Figura 53C). La puntuación de Neuroescala total confirmó la mejora neuroconductual de ratas transgénicas tratadas en comparación con ratas transgénicas no tratadas. Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney no paramétrico.

Los parámetros neuroconductuales correlacionaron con los niveles de tau patológica insoluble en el tronco encefálico de los animales transgénicos tratados. Los animales tratados con el péptido de vacuna SEC ID nº 108 mostraron niveles bajos de tau patológica insoluble, que se asoció con tiempo de espera de escape menor y menor número de deslizamientos de extremidades posteriores en comparación con animales de tratamiento de control. Estos hallazgos muestran que la reducción de la tau patológica insoluble conduce a las mejoras estadísticamente significativas de déficits neuroconductuales en el grupo de animales transgénicos inmunizados con la vacuna del péptido de 12 unidades (SEC ID nº 108), mostrando su valor terapéutico.

La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 dio como resultado una reducción del 60% de la carga de ovillos neurofibrilares (NFT). El análisis inmunohistoquímico de la patología de tau neurofibrilar (ovillos neurofibrilares, NFT) en el tronco encefálico mostró la reducción de NFT conseguida en las ratas SHR72 tratadas con vacuna (Figura 54). El número de ratas transgénicas inmunizadas con NFT extensivos en el tronco encefálico en comparación con los animales tratados con adyuvante se redujo en más del 60%. La inmunización redujo la patología de tau (polímeros de tau patológica, PHF) en el cerebro de los animales transgénicos inmunizados con vacuna peptídica de SEC ID nº 108.

Los resultados muestran que la inmunoterapia con el péptido de tau SEC ID nº 108 redujo eficazmente la patología de tau en ratas SHR72. La vacunación condujo a una reducción estadísticamente significativa de los

niveles de tau patológica insoluble en los cerebros de los animales inmunizados así como en la reducción de la carga de ovillos neurofibrilares (PHF). La reducción de la cantidad de proteínas tau patológicas dio como resultado una mejora estadísticamente significativa de los parámetros neuroconductuales de las ratas transgénicas tratadas. Por lo tanto, la administración del péptido de tau SEC ID nº 108 tiene capacidad para el tratamiento de AD.

Ejemplo 21: La inmunoterapia con péptidos terapéuticos de AD es inmunogénica e induce la producción de anticuerpos específicos de tau de enfermedad en ratas transgénicas

a. Después de cinco dosis de vacuna peptídica de tau, se llevó a cabo análisis de la inmunogenicidad del péptido en las ratas tratadas. Se usaron sueros de ratas inmunizadas para la determinación del título de anticuerpos. Se usó como un control suero de ratas inmunizadas solamente con adyuvante. Los títulos de los anticuerpos anti-tau específicos se determinaron mediante ELISA, como se describe en el Ejemplo 19. Se ensayaron diluciones en serie de cada suero frente a tauΔ (1-150; 392-441)/4R de AD y tau de longitud completa recombinante 2N4R, previamente usada para recubrir placas de pocillos de microtitulación. Los inmunógenos ensayados indujeron la producción de anticuerpos anti-tau específicos.

Por ejemplo, se generaron anticuerpos específicos anti-tau después de la inmunización con 275-VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEC ID nº 4). Los anticuerpos inducidos por el péptido de tau SEC ID nº 4 mostraron una actividad de unión aproximadamente 3 veces mayor para tauΔ (1-150; 392-441)/4R desordenada erróneamente que para tau 2N4R (Figura 55; dilución 1:3200). Estos resultados sugieren adicionalmente que esta vacuna indujo anticuerpos que poseían potencial terapéutico para reconocer y eliminar/neutralizar proteínas tau patológicas en enfermedad de Alzheimer.

Además, la vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo la formación de anticuerpos que se unían preferentemente con proteína tau patológica, frente a tau fisiológica. Después de cinco dosis de vacuna, se realizó análisis de la inmunogenicidad en cada una de las ratas vacunadas. Se extrajeron muestras sanguíneas de animales dos semanas después de la última dosis de refuerzo y se usaron sueros recogidos para determinación de la media geométrica del título de anticuerpo (GMT). Los títulos de los anticuerpos anti-tau específicos se determinaron por ELISA, como se ha descrito en el Ejemplo 19. Se ensayaron diluciones en serie (1:100 a 1:51200) de cada suero frente a tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica, usada como una fase sólida. Los títulos se definieron como el recíproco de la dilución de suero que proporciona la mitad de la máxima densidad óptica (absorbancia). Para calcular la media geométrica de los títulos de anticuerpo, se asignó a las lecturas de título menores de 100 el valor 10. Como se muestra en la figura 56, el título de anticuerpo para tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica (GMT 12800) fue tres veces mayor que para tau 2N4R de longitud completa (GMT 4200). También se midieron los títulos de anticuerpo frente al péptido no conjugado SEC ID nº 108 usando la misma metodología descrita en el Ejemplo 19. La figura 56 muestra que los mayores títulos de anticuerpo se generaron contra el péptido de tau SEC ID nº 108 (GMT 20800). No se observaron respuestas de anticuerpo en las ratas transgénicas inmunizadas solamente con adyuvante (GMT 10; datos no mostrados). La vacunación con el péptido de SEC ID nº 108, que portaba el epítipo de DC8E8 nº 2 (dentro de SEC ID nº 99), indujo anticuerpos que preferentemente reconocían proteína tau patológica, diferenciando de este modo entre tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica. Además, los resultados mostraron que SEC ID nº 108 es inmunógeno y por lo tanto posee potencial terapéutico para eliminar las proteínas tau patológicas en enfermedad de Alzheimer.

Además, la vacunación de ratas transgénicas de SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo preferentemente la formación de isotipos de anticuerpo de IgG específicos para tau patológica. Para determinar los isotipos específicos de los anticuerpos producidos en respuesta al péptido SEC ID nº 108, se diluyeron en serie sueros de ratas de los grupos inmunizados y de control de 1:100 1:12800, y se ensayaron por duplicado por ELISA (como se ha descrito en el Ejemplo 19) contra tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica. Para detectar los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgM de rata, se diluyeron anticuerpos secundarios conjugados con HRP específicos de subclase anti-rata 1:5000 en PBS (Pierce, anti IgG1 - PA1-84708, anti IgG2a - PA1-84709, anti IgG2b-PA1 -84710, anti-IgG2c - PA1 -84711 y anti-IgM - PA1 -84.712). La figura 57 muestra resultados para la dilución 1:800 representativa. Los datos demuestran que el péptido SEC ID nº 108 conjugado con KLH indujo un amplio espectro de isotipos de anticuerpo anti-tau. La vacuna generó altos niveles de isotipos de anticuerpo (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c), que se considera que son los anticuerpos de alta afinidad. Por el contrario, el perfil isotípico mostró niveles muy bajos de anticuerpos IgM. Se considera que estos tienen baja afinidad por el antígeno. La presencia de altos títulos de anticuerpos IgG con afinidad preferente por tau patológica indicó que la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna se dirige contra especies de tau patológica. Los sueros de control obtenidos de ratas inmunizadas con simulación (que recibieron solamente adyuvante) fueron negativos.

Estos datos se usaron adicionalmente para la determinación de la polarización (fenotipo Th1/Th2) de la respuesta inmunitaria. Los niveles de los isotipos IgG1 e IgG2a inducidos por inmunización sugieren indirectamente las contribuciones de citocinas Th1 frente a citocinas Th2 a la respuesta inmunitaria. En general, la producción de anticuerpos IgG1 se induce por citocinas Th2 y la producción de anticuerpos IgG2a se induce por citocinas Th1. Por lo tanto, la relación de isotipos IgG1 e IgG2a se calculó dividiendo los valores de DO para IgG1 por los valores de DO para IgG2a. Estos datos sugieren (la relación = 0,625) que la respuesta inmunitaria

está ligeramente desplazada hacia el fenotipo de Th1.

b. *El control en tiempo real* de los acontecimientos de unión usando resonancia de plasmón superficial permitió la medición de la velocidad cinética de asociación (k_{ON}) y disociación (k_{OFF}) de anticuerpos de los sueros agrupados de ratas inmunizadas con el péptido de tau 275- VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG-304 (SEC ID nº 4). El análisis mostró una distinción entre el reconocimiento de tau Δ (1-150; 392-441)/4R y la isoforma de tau fisiológica 2N4R (Figura 58). Los anticuerpos inducidos por inmunización mostraron una afinidad preferente por tau Δ (1-150; 392-441)/4R, uniéndose a esta proteína tau con afinidad tres veces mayor por tau de AD truncada en comparación con su afinidad por la isoforma de longitud completa correspondiente 2N4R. Se determinó que esta diferencia de unión se debía, en parte, a la velocidad K_{ON} aproximadamente cinco veces mayor para tau Δ (1-150; 392-441)/4R (datos no representados).

c. Para determinar adicionalmente la especificidad de anticuerpos inducidos en ratas inmunizadas con péptidos de tau terapéuticos, los antisueros pueden usarse para tinción inmunohistoquímica de secciones congeladas del hipocampo de cerebro con AD humana. Por ejemplo, se evaluaron anticuerpos inducidos después de la inmunización con SEC ID nº 4 por este ensayo. El hipocampo de cerebro con AD humana se fijó con paraformaldehído al 4% a 4°C durante 2 días, seguido de un tratamiento con sacarosa 25% durante 72 horas para proporcionar crioprotección. El material se congeló después en 2-metilbutano frío (-42°C) durante 30 segundos y se seccionó en el criomicrotomo. Se cortaron secciones coronales (40 μ m) en un criostato a -18°C. Se usaron secciones de flotación libre para estudios inmunohistoquímicos. Las secciones tisulares de flotación libre se trataron con ácido fórmico al 99% frío (+4°C) durante 1 minuto a temperatura ambiente (25°C). Se incubaron secciones cerebrales durante 20 minutos a temperatura ambiente en PBS 0,01 M, pH 7,4, que contenía Triton X-100 0,3% y H₂O₂ 1%, seguido de una incubación de 30 minutos en la solución de bloqueo (PBS 0,01 M, que contenía Triton X-100 0,3%, suero de caballo 1%), seguido de incubación durante una noche con sueros de ratas transgénicas inmunizadas con vacuna que contenía el péptido SEC ID nº 4 (diluido 1:1000) a 4°C. Después de lavar, las secciones se inmunotifieron con el procedimiento de peroxidasa de biotina de avidina convencional (ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA). El producto de reacción se visualizó usando avidina-biotina y vector VIP como un cromógeno (Vector Laboratories). Después se examinaron las secciones con un microscopio Olympus BX 51. La tinción inmunohistoquímica mostró que los anticuerpos inducidos por inmunización con el péptido SEC ID nº 4 reconocían específicamente estructuras de tau patológica, es decir, lesiones neurofibrilares en el hipocampo del cerebro con enfermedad de Alzheimer (Figuras 59A, B). Se usaron como un control negativo sueros de ratas de control que recibieron solamente adyuvante, y no reconoció ninguna patología neuronal (datos no representados).

La vacunación de ratas transgénicas SHR72 con el péptido de tau SEC ID nº 108 indujo anticuerpos que reconocían proteínas tau patológicas en las secciones de los tejidos cerebrales con enfermedad de Alzheimer humana. Para determinar adicionalmente la especificidad de anticuerpos inducidos en ratas inmunizadas con el péptido de tau terapéutico SEC ID nº 108, sus sueros se usaron para tinción inmunohistoquímica de la corteza entorrinal usando secciones congeladas del cerebro con AD humana (estadio VI de Braak). Se incubaron secciones tisulares de flotación libre con sueros (diluidos 1:1000) de ratas transgénicas inmunizadas a 4°C. Los sueros individuales de los animales vacunados con SEC ID nº 108 se usaron por separado, mientras que los sueros de animales vacunados solamente con adyuvante se agruparon. Después de la inmunotinción usando el procedimiento de peroxidasa de biotina-avidina convencional (ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA) las secciones se examinaron con un microscopio Olympus BX 51. La tinción inmunohistoquímica mostró que los anticuerpos inducidos por inmunización con el péptido SEC ID nº 108 reconocían específicamente estructuras de tau patológica, es decir, lesiones neurofibrilares en la corteza entorrinal del cerebro con enfermedad de Alzheimer. La figura 60 (A-E) muestra inmunotinción representativa con los sueros de ratas recogidos de cinco ratas transgénicas vacunadas SHR72. Los sueros de los animales vacunados con SEC ID nº 108 tiñeron la patología neurofibrilar de forma muy intensa, confirmando que los anticuerpos se dirigían eficazmente a proteínas tau patológicas. Se usaron sueros de ratas de control, que recibieron solamente adyuvante como controles negativos. No reconocieron ninguna patología neurofibrilar (Figura 60F).

Los anticuerpos inducidos por la vacuna de SEC ID nº 108 reconocen proteínas tau patológicas extraídas de cerebros de SHR72 y de cerebros con AD humano. La especificidad de los sueros de ratas inmunizadas con el péptido de tau SEC ID nº 108 se examinó adicionalmente en formas patológicas de tau patológica soluble e insoluble usando el procedimiento de inmunotransferencia (como se ha descrito en el Ejemplo 19). Los troncos encefálicos de ratas SHR72 en el estadio tardío de la patología se usaron para la extracción de proteínas tau patológicas insolubles y solubles. Se usó la corteza temporal del cerebro con AD humana (estadio VI de Braak; obtenido del Netherlands brain bank, Países Bajos) para la extracción de tau de AD patológica humana. Las proteínas tau patológicas solubles e insolubles se prepararon usando el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 8. Para fracciones de tau soluble se cargaron 15 μ g de proteínas totales por carril. Para fracciones de tau insoluble los sedimentos se disolvieron en tampón de carga de muestra de dodecil sulfato sódico (SDS) 1 x (Laemmli, 1970) en un volumen 1/50 de la fracción soluble usada para la preparación de la fracción de tau insoluble y se cargó un volumen igual en SDS-PAGE. Se diluyeron sueros agrupados de animales inmunizados 1:1000 en PBS y se usaron como un anticuerpo primario. La incubación con el anticuerpo primario se siguió de inmunoglobulinas de conejo policlonales antirrata conjugadas con peroxidasa de rábano rusticano (1:3000; Dako, Glostrup, Dinamarca). La señal de transferencia de Western se digitalizó con el sistema de formación de

imágenes LAS3000 CCD (Fujifilm, Japón). Los resultados de este análisis de inmunotransferencia se muestran en la figura 61.

Los resultados (Figura 61) muestran que los anticuerpos generados contra el péptido que porta el epítipo 2 DC8E8 (SEC ID nº 99) reconocen las proteínas tau patológicas extraídas de SHR72 y de tejidos de cerebros con AD. Los anticuerpos inducidos reconocieron formas monoméricas de tau patológica (carril nº 1, 2 y nº 3) así como formas oligoméricas de tau patológica (carril nº 2 y nº 3) incluyendo el triplete de tau A68 característico para AD. Estos hallazgos tienen un impacto clave en la inmunoterapia usando este modelo de rata de enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos de alta afinidad generados por vacuna se dirigen a todas las formas de proteínas tau patológicas. Se dirigen a formas monoméricas de proteínas tau patológicas y de este modo evitan la interacción tau-tau patológica (oligomerización) que conduce a la reducción de los niveles de tau insoluble en ratas vacunadas y en consecuencia a mejora de los parámetros neuroconductuales. Los anticuerpos generados también se unen a formas oligoméricas de tau patológica y se dirigen a ellas para degradación, por ejemplo por microglía, como se ha descrito en el Ejemplo 10 para el mAb DC8E8.

Ejemplo 22: La inmunoterapia con péptidos terapéuticos de AD induce la producción de anticuerpos específicos de tau de enfermedad en ratones

Los péptidos SEC ID nº 109, SEC ID nº 110 (SEC ID nº 88 corresponde a SEC ID nº 110 más una Cys N-terminal adicional para conjugación), SEC ID nº 111 y SEC ID nº 112, que portan uno de los epítipos terapéuticos dentro de SEC ID nº 100 o 101, indujeron la producción de anticuerpos en ratones inmunizados. Los anticuerpos resultantes muestran actividad de unión estadísticamente significativamente mayor por tau Δ (1-150, 392-441)/4R patológica que por tau 2N4R fisiológica.

SEC ID nº 109 Tau 314-DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSE-342
SEC ID nº 110 Tau 352-SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRN-381
SEC ID nº 111 Tau 325-LGNIHHKPGGGQ-336
SEC ID nº 112 Tau 357-LDNITHVPGGGN-368
SEC ID nº 100 Tau 329-HHKPGGG-335
SEC ID nº 101 Tau 361-THVPGGG-367

De hecho, con el objetivo de determinar adicionalmente el potencial inmunógeno de los péptidos que portan uno o más epítipos terapéuticos de DC8E8 (por ejemplo, dentro del de 7 unidades: SEC ID nº 100 y SEC ID nº 101), se diseñaron péptidos de doce y treinta aminoácidos de longitud (SEC ID nº 109, SEC ID nº 110, SEC ID nº 111 y SEC ID nº 112) que portaban uno de los epítipos terapéuticos de DC8E8. Los péptidos de tau SEC ID nº 109 (30 aminoácidos) y SEC ID nº 111 (12 aminoácidos) contienen dentro de ellos el epítipo terapéutico en SEC ID nº 100. Los péptidos de tau SEC ID nº 110 (30 aminoácidos) y SEC ID nº 112 (12 aminoácidos) contienen dentro de ellos el epítipo terapéutico en SEC ID nº 101. Los péptidos se conjugaron con KLH mediante su resto Cys N terminal como se ha descrito en los ejemplos 18-19. Se prepararon vacunas para inmunizaciones con conjugados de péptido-KLH, que contenían 100 μ g del péptido conjugado, en 100 μ l de PBS y se emulsionaron 1:1 (v/v) con adyuvante de Freund en un volumen de dosis final de 200 μ l. Se usaron cinco ratones Balb/c por grupo de tratamiento. La primera inmunización se realizó usando el conjugado peptídico en PBS formulado con adyuvante completo de Freund. Las dos siguientes inmunizaciones, en intervalos de dos semanas, se realizaron usando el conjugado peptídico en PBS formulado con adyuvante incompleto de Freund. Como control, se usó vacuna que contenía solamente adyuvante. Los sueros se recogieron 10 días después de la última inmunización y se midió la respuesta de anticuerpo por ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 19. Los sueros de ratones individuales se diluyeron en serie de 1:100 a 1:12800 y se ensayaron por duplicado. Para determinar la especificidad de los sueros, se usó la tau Δ (1-150; 392-441/4R) patológica y la tau 2N4R fisiológica como la fase sólida. Las figuras 62 a 65 muestran un sumario de los resultados para sueros a una dilución 1:800. Los resultados de ELISA se evaluaron estadísticamente usando el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney.

Todos los péptidos ensayados generaron anticuerpos específicos de tau en ratones inmunizados. Los anticuerpos inducidos por vacunaciones con los péptidos de tau SEC ID nº 109, SEC ID nº 110, SEC ID nº 111 y SEC ID nº 112 mostraron actividad de unión estadísticamente significativamente mayor para tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica que para tau 2N4R fisiológica (Figura 62-65). Además, el acortamiento de los péptidos de 30 aminoácidos (SEC ID nº 109, SEC ID nº 110) a 12 aminoácidos (SEC ID nº 111 y SEC ID nº 112) condujo a una producción significativamente mayor de anticuerpos específicos, que preferentemente reconocían tau patológica (SEC ID nº 109, $p = 0,0115$; SEC ID nº 110, $p = 0,0029$; SEC ID nº 111, $p = 0,0007$; SEC ID nº 112, $p < 0,001$). En su conjunto, estos resultados mostraron que los péptidos SEC ID nº 109 y SEC ID nº 111 (que portaban el epítipo terapéutico dentro de SEC ID nº 100) y los péptidos SEC ID nº 110 y SEC ID nº 112 (que portaban el epítipo terapéutico dentro de SEC ID nº 101) son inmunógenos y poseen actividad terapéutica que se dirige a proteínas tau patológicas presentes en los cerebros de pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 23: identificación de péptidos de diseño (epítipos terapéuticos de diseño) que pueden competir con tau patológica por la unión con por lo menos un epítipo de DC8E8.

Se diseñaron dos péptidos adicionales (de 11 unidades) basándose en los restos de aminoácidos conservados

entre el epítipo nº 1 (dentro de KHQPGGG, SEC ID nº 98), nº 2 (dentro de KHVPGGG SEC ID nº 99), nº 3 (dentro de HHKPGGG SEC ID nº 100) y nº 4 (dentro de THVPGGG, SEC ID nº 101). En su diseño, se mantuvieron fijos cinco restos que contribuían a la unión de DC8E8 con estos epítipos: histidina, prolina y tres restos de glicina en la secuencia HxPGGG (SEC ID nº 164). Los péptidos se sintetizaron por EZBiolabs (Estados Unidos) con pureza mayor del 85%. Los dos epítipos terapéuticos de diseño son GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251).

Estos péptidos se analizaron con respecto a su capacidad para competir con tau patológica por ELISA de competición. Se recubrieron placas de ELISA (placa de alta unión IWAKI, nº 3801-096, Bertoni GmbH, Austria) con 100 µl/pocillo de tauΔ (1-150; 392-441)4R purificada recombinante 5 µg/ml en PBS durante una noche a 4°C. Las placas de ELISA recubiertas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 (solución salina tamponada con fosfato complementada con Tween 20 0,05% v/v), y se bloquearon con PBS/Tween 20 durante 2 horas a 25°C. Cada uno de los péptidos se disolvió por separado en PBS a la concentración final de 5 mM. Se prepararon diluciones dobles en serie de los péptidos en PBS/Tween 20 en placas de polipropileno (Greiner, nº 651201) (intervalo de concentraciones, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM y 2,5 µM). Se mezclaron 100 µl de cada dilución de péptido con 100 µl de anticuerpo monoclonal DC8E8 purificado 2 µg/ml (la purificación se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 5). Los 200 µl de mezcla resultantes contenían entonces 1 µg/ml de anticuerpo DC8E8 y péptidos 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM y 1,25 µM. Se incluyó tauΔ (1-150; 392-441) 4R como un control positivo. Las mezclas de anticuerpo/péptido se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Se transfirieron después cien microlitros de las mezclas de anticuerpo/péptido a las placas de ELISA preparadas y se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Las placas de ELISA se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20. Las placas de ELISA se incubaron después con 100 µl de inmunoglobulinas de cabras policlonales anti-ratón/HRP (Dako, nº P0447) diluidas 1:4000 en PBS/Tween 20 y se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 250 rpm. Las placas de ELISA se lavaron 4 veces con PBS/Tween20. Las placas de ELISA se incubaron después con 100 µl de 1,5 mg/2 ml de o-PDA (o-fenilendiamina, SIGMA, P1526) en Na acetato 0,1 M pH = 6,0 (Roth, nº 6779) complementado con 1,5 µl/2 ml de H₂O₂ 30% (SIGMA, H-0904) durante 10 minutos a 25°C en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 2 M (Merck, 1.00731.1000). La señal desarrollada se midió leyendo a 490 nm (por ejemplo, usando el Contador Multimarcador Victor (Wallac)).

Los dos péptidos de diseño, concretamente GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251), eran ambos capaces de competir con tauΔ (1-150; 392-44) 4R por la unión con DC8E8 (Figura 66). El péptido GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250), denominado epítipo terapéutico de diseño 1, mostró la afinidad más similar por DC8E8 en comparación con tauΔ (1-150; 392-441) 4R. La afinidad del péptido SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251), denominado epítipo terapéutico de diseño 2, por DC8E8 era de más de un orden de magnitud mayor que la afinidad de tau de enfermedad (tauΔ (1-150; 392-441) 4R por este anticuerpo).

Ejemplo 24: Ensayo *in vivo* de los epítipos terapéuticos de diseño 1 y 2 con respecto a inmunogenicidad y especificidad de la respuesta inmunitaria.

El epítipo terapéutico de diseño 1 (GWSIHSPGGGSC, SEC ID nº 250) y el epítipo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) se conjugaron con KLH mediante su resto de Cys C terminal (como se ha descrito en el Ejemplo 18) y se usó para inmunizar ratones Balb/c. Se usaron tres ratones para cada epítipo terapéutico de diseño. Las inmunizaciones se realizaron como se expone a continuación. Se prepararon vacunas para inmunizaciones con conjugados de epítipo terapéutico de diseño-KLH, que contenían 100 µg del péptido conjugado en 100 µl de PBS y se emulsionaron 1:1 (v/v) con adyuvante de Freund en un volumen de dosis final de 200 µl. La primera inmunización se realizó usando el conjugado de epítipo terapéutico de diseño-KLH en PBS formulado con adyuvante completo de Freund. Las cuatro inmunizaciones siguientes, en intervalos de cuatro semanas, se realizaron usando los conjugados de epítipo terapéutico de diseño-KLH en PBS formulado con adyuvante incompleto de Freund. Para inmunización de control, se usó PBS en lugar de conjugados de epítipo terapéutico de diseño. Se prepararon sueros 14 días después de la última inmunización.

1. Los anticuerpos diferencian la tau patológica. Para determinar la especificidad de los sueros, se usaron dos proteínas tau: tauΔ (1-150; 392-441) 4R patológica y tau 2N4R fisiológica. Los sueros de cada ratón se diluyeron en serie de 1:100 a 1:12800 y se ensayaron por triplicado. Se determinaron los títulos de anticuerpo usando inmunoglobulinas de cabra policlonales anti-ratón/HRP (Dako, nº P0447) diluidas 1:4000. La figura 67 muestra resultados representativos para la dilución 1:3200.

Ambos epítipos terapéuticos de diseño generaron una respuesta inmunitaria alta en ratones inmunizados. Además, ambos epítipos terapéuticos de diseño ensayados indujeron anticuerpos que reconocían tauΔ (1-150; 392-441) 4R patológica con mayor afinidad en comparación con tauΔ 2N4R fisiológica (Figura 67). Esta diferenciación es estadísticamente significativa para sueros de todos los animales inmunizados. En su conjunto, y en combinación con los resultados obtenidos con la actividad observada con DC8E8, estos resultados muestran que ambos epítipos terapéuticos de diseño 1 y 2 son inmunógenos e inducen respuesta de anticuerpo con potencial terapéutico para dirigirse a proteínas tau patológicas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

2. *Isotipo del anticuerpo*: Para determinar los isotipos específicos de los anticuerpos producidos en respuesta a estos epítomos terapéuticos de diseño 1 y 2, se agruparon sueros de ratones del mismo grupo, se diluyeron en serie de 1:100 a 1:12800 y se ensayaron por triplicado por ELISA de isotipo de anticuerpo. Para detectar los isotipos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 de ratón, se usaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP específicos de subclase antirratón (anticuerpos obtenidos de Lifespan Biosciences, anti IgG1 - n° LS-C59107, anti IgG2a - n° LS-C59112, anti IgG2b - n° LS-C59117, anti-IgG3 - n° LS-C59125 y anti-IgM-n° LS-C55875). Los antisueros obtenidos de ratones de control eran negativos. La figura 68 muestra resultados representativos para la dilución 1:800. Los datos obtenidos con sueros agrupados demostraron que la inmunización con ambos epítomos terapéuticos de diseño ensayados indujo un espectro amplio de isotipos de anticuerpos anti-tau y el perfil del isotipo era muy similar en todos los ensayos. Ambos epítomos terapéuticos de diseño generaron principalmente anticuerpos IgG1 en comparación con respuestas de IgG2a, IgG2b e IgG3. (Figura 68).

3. *Los epítomos terapéuticos de diseño inducen respuesta de anticuerpos que diferencia de forma estadísticamente altamente significativa entre tau patológica y fisiológica*. Se realizó un análisis de las afinidades de los anticuerpos generados contra los epítomos terapéuticos de diseño por resonancia de plasmón superficial en BIACORE3000 usando una microplaca sensora CM5 (Biacore AB, Uppsala), como se ha descrito en los Ejemplos 5 y 19. En cada ciclo de análisis, se capturó antisuero de ratón contra GWSIHSPGGGSC (SEC ID n° 250), epítomo terapéutico de diseño 1 (diluido 100 veces) o SVFQHLPGGGSC (SEC ID n° 251), epítomo terapéutico de diseño 2 (diluido 100 veces), (antisueros agrupados de 3 ratones), en la celda de flujo analítica para alcanzar el nivel de inmovilización de ~ 950 UR, que se aproximaba a la saturación. Como referencia, se capturó un anticuerpo irrelevante Rab50 (Macikova *et al.*, 1992), que no se une con tau, en la celda de flujo de referencia. Para la determinación de K_A así como para la determinación de las constantes de velocidad cinética K_{ON} y K_{OFF} , se inyectaron soluciones 100 nM de tau Δ (1-150; 392-441) 4R patológica o tau 2N4R fisiológica, a un caudal de 100 μ l/minuto sobre la microplaca sensora.

Los anticuerpos inducidos por la vacunación con epítomos terapéuticos de diseño 1 y 2 diferenciaron entre tau Δ (1-150, 392-441) 4R patológica y tau 2N4R fisiológica (Figura 69A y 69B). La afinidad de los anticuerpos presentes en antisuero contra el epítomo terapéutico de diseño 1 (GWSIHSPGGGSC, SEC ID n° 250) medida por resonancia de plasmón superficial, mostró una afinidad casi 50 veces mayor por tau patológica, en comparación con tau fisiológica, lo que es altamente estadísticamente significativo ($p < 0,001$). La afinidad de los anticuerpos presentes en el antisuero contra el epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC (SEC ID n° 251)) medida por resonancia de plasmón superficial, mostró casi 15 veces mayor afinidad por tau patológica, en comparación con tau fisiológica, que es altamente estadísticamente significativo ($p < 0,01$).

4. *Los epítomos terapéuticos de diseño inducen respuestas de anticuerpos que reconocen especies de tau patológica en cerebros con AD humana*. Para determinar la especificidad de los anticuerpos generados en ratones inmunizados con epítomos terapéuticos de diseño, se realizó tinción inmunohistoquímica en secciones congeladas de cerebros con AD humana.

Las muestras tisulares de cerebro con AD humana (corteza entorrinal, Braak VI de AD, proporcionada por el Netherlands brain bank, Países Bajos) se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 2 días a 4°C y después se crioprotegió (sacarosa al 25%), se congeló en 2-metilbutano frío (-42°C) y se seccionó en un criotomo. Se trataron secciones tisulares de flotación libre (40 μ m) con ácido fórmico al 99% frío (4°C) durante 1 minuto a temperatura ambiente (25°C). Las secciones se inmunotifñeron usando el procedimiento de peroxidasa de biotina- avidina convencional (ABC Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Se diluyeron antisueros de ratón contra el epítomo terapéutico de diseño 1 (SEC ID n° 250) y el epítomo terapéutico de diseño 2 (SEC ID n° 251), cada uno agrupado de 3 ratones inmunizados, 1:2000 en la solución de bloqueo (albúmina de suero bovino 5%, Triton X-100 al 0,3% en PBS). Las secciones se examinaron después con un microscopio Olympus BX 51.

La tinción inmunohistoquímica mostró que los inmunosueros de ratón generados contra ambos epítomos terapéuticos de diseño GWSIHSPGGGSC (SEC ID n° 250) y SVFQHLPGGGSC (SEC ID n° 251) reconocían específicamente estructuras de tau patológica, es decir ovillos neurofibrilares e hilos de neurópilos, en la corteza entorrinal de cerebro con enfermedad de Alzheimer (Figura 70A-D). Los antisueros contra el epítomo terapéutico de diseño 1 y el epítomo terapéutico de diseño 2 no reconocieron tau normal en el cerebro humano de control. (Figura 70E, F).

5. *El epítomo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID n° 251) induce una respuesta de anticuerpos que reconoce la especie de tau patológica en los cerebros de modelo de rata transgénica de enfermedad de Alzheimer*. Para determinar la especificidad de los anticuerpos generados en ratones inmunizados con epítomos terapéuticos de diseño, se realizó tinción inmunohistoquímica en secciones incluidas en parafina de los cerebros de ratas transgénicas SHR72.

Se perfundió por vía transcardiaca a ratas transgénicas de la cepa SHR72 (de 7 meses de edad) PBS durante 1 minuto con anestesia profunda seguido de perfusión con 100 ml de paraformaldehído al 4% (pH 7,4). Después de la perfusión, la cabeza se cortó y el cerebro se retiró rápidamente. El cerebro se cortó en sentido sagital en dos hemisferios del mismo tamaño usando hojas de escalpelo desechables. Los tejidos cerebrales se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4%, se incluyeron en parafina, y se cortaron en secciones en un

micrótopo. Se realizó inmunohistoquímica e histopatología en secciones tisulares incluidas en parafina de 8 µm. Las secciones tisulares se pretrataron durante 20 minutos con una solución de desmascaramiento de antígenos (Vector Laboratories, CA, Estados Unidos) y durante 1 minuto con ácido fórmico al 90% frío (+ 4°C) (Applichem, Alemania) a temperatura ambiente (25°C). Después de bloquear, las secciones se incubaron durante una noche con suero generado contra el epítipo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) que se diluyó 1:1000 en solución de bloqueo (albúmina de suero bovino 5%, Triton X-100 0,3% en Tris- HCl 50 nM). Después de lavar, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante una hora, y después se hicieron reaccionar con una solución de complejo de peroxidasa de biotina-avidina durante 60 minutos (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories), a temperatura ambiente (25°C). La inmunorreacción se visualizó con un kit de sustrato de peroxidasa (Vector VIP, Vector Laboratories, Ca, Estados Unidos). Las secciones se examinaron con un microscopio Olympus BX71.

En el cerebro de rata transgénica (SHR72), el suero generado contra el epítipo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) reconoció ovillos neurofibrilares (Figura 70G). En cerebros de ratas de control de la misma edad el anticuerpo no tiñó células neuronales (Figura 70H).

El suero generado contra el epítipo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) reconoció tau de estadio pre-ovillo oligomérica (Figura 70I), así como ovillos neurofibrilares intracelulares (Figura 70J).

6. Los anticuerpos inducidos por los epítipos terapéuticos de diseño 1 y 2 reconocen tau patológica soluble e insoluble en cerebro con AD humana: se aisló tau patológica soluble en sarcosilo e insoluble de la corteza temporal de enfermedad de Alzheimer humana (obtenida del Netherlands brain bank, Países Bajos) y se analizó por inmunotransferencia, como se ha descrito en el Ejemplo 8.

La membrana que contenía fracciones de proteína tau patológica soluble e insoluble se incubó con sobrenadante del hibridoma de DC8E8 diluido 1:1 con leche desnatada en polvo al 5% en PBST o con antisueros de ratón agrupados generados contra el epítipo terapéutico de diseño 1 (SEC ID nº 250, GWSIHSPGGGSC) o con antisueros de ratón agrupados generados contra el epítipo terapéutico de diseño 2 (SVFQHLPGGGSC, SEC ID nº 251) por lo que ambos antisueros agrupados se diluyeron 1:100 en leche desnatada en polvo al 5% en PBST. Las membranas se lavaron y después se incubaron con IgG de cabra antirratón conjugado con peroxidasa (DAKO, Dinamarca) diluido 1:4000. Las transferencias se desarrollaron con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, Estados Unidos) detectado usando el sistema de formación de imágenes LAS3000 (FUJI Photo Film Co., Japón). Las intensidades de señal se cuantificaron usando software AIDA (Analizador de datos de imágenes avanzado, Raytest, Straubenhardt, Alemania).

Los resultados de este análisis de inmunotransferencia se muestran en la figura 71. Estos resultados muestran que los anticuerpos generados contra los epítipos terapéuticos de diseño tanto 1 (es decir, GWSIHSPGGGSC) (SEC ID nº 250) como 2 (es decir SVFQHLPGGGSC) (SEC ID nº 251) reconocen las mismas proteínas tau patológicas que DC8E8. Todos los antisueros de GWSIHSPGGGSC (SEC ID nº 250), antisueros de SVFQHLPGGGSC (SEC ID nº 251) y anticuerpo DC8E8 reconocieron específicamente proteínas tau patológicas presentes en la fracción de tau soluble en sarcosilo e insoluble aislada de tejidos de cerebro con AD (Figura 71).

7. Los anticuerpos inducidos por los epítipos terapéuticos de diseño 1 y 2 reconocen tau patológica soluble e insoluble en cerebros de ratas transgénicas para tau. Se aisló tau patológica soluble en sarcosilo e insoluble de los cerebros de ratas transgénicas para tau (línea SHR72 descrita en el Ejemplo 7) como se ha descrito en el Ejemplo 8.

Los resultados del análisis de inmunotransferencia (descrito en el Ejemplo 8) se muestran en la figura 72. Estos resultados muestran que los anticuerpos inducidos por epítipos terapéuticos de diseño 1 (es decir, GWSIHSPGGGSC) (SEC ID nº 250) y 2 (es decir SVFQHLPGGGSC) (SEC ID nº 251) reconocen las mismas proteínas tau patológicas que DC8E8 (figura 72). La dirección de proteína tau patológica monomérica y oligomérica evita la generación de agregados de tau patológicos que dan como resultado patología de tau reducida que conduce al efecto terapéutico y tratamiento de AD en seres humanos.

Ejemplo 25: Eficacia *in vivo* de los epítipos terapéuticos de diseño en ratas transgénicas modelo de AD

La inmunoterapia con epítipos terapéuticos de diseño mostró mejora en los parámetros neuroconductuales de ratas tratadas. Se seleccionó el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) para la inmunoterapia en ratas transgénicas SHR 72. Las ratas se inmunizaron por vía subcutánea con dosis de vacuna que contenían el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) conjugado con KLH combinado con adyuvante Adju-phos. Las vacunas se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 18. Una dosis contenía 100 µg del epítipo terapéutico de diseño conjugado 2. Se midió el deterioro motor complejo por el conjunto de ensayos motores convencionales combinados con el examen neurológico en la puntuación compuesta - Neuroescala. A los 6,5 meses de edad, se sometió a ratas transgénicas SHR72 tratadas con vacuna que contenía el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) a ensayos conductuales con el objetivo de determinar el efecto de la inmunoterapia.

Las ratas tratadas con el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) mostraron tiempos de espera de escape reducidos en 27% en el ensayo de caminar por una viga en comparación con las ratas de control transgénicas que recibieron solamente adyuvante (Figura 73A). El número de los deslizamientos de extremidades posteriores se redujo de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en 44% en el grupo vacinado en comparación con controles transgénicos (Figura 73B). La puntuación de Neuroescala se calculó a partir de los valores obtenidos en los ensayos de caminar por una viga, ensayos de tracción prensil y exámenes neurológicos (reflejos básicos, reflejo de extensión de escape de extremidades posteriores). La inmunización mejoró significativamente la puntuación de Neuroescala de las ratas tratadas con el péptido SEC ID nº 251 en 26% en comparación con el grupo de control (Figura 73C). La puntuación de Neuroescala total confirmó la mejora neuroconductual de ratas transgénicas tratadas en comparación con ratas transgénicas no tratadas. Todos los datos estadísticos se obtuvieron usando el ensayo de U de Mann-Whitney.

La inmunoterapia con el epítipo terapéutico de diseño 2 mostró reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de tau patológica en los cerebros de ratas transgénicas con Alzheimer tratadas. Para confirmar el efecto de la inmunización con el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) en los niveles de tau patológica insoluble, los inventores usaron análisis de inmunotransferencia de las muestras de cerebro de rata. El tejido de cerebro (el tronco encefálico) de los animales transgénicos inmunizados con el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) y el grupo de control de animales transgénicos inmunizados con adyuvante solamente se usaron para la preparación de la fracción de tau insoluble en sarcosilo como se ha descrito en el Ejemplo 8. El análisis de inmunotransferencia se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 19. El análisis estadístico se realizó por ensayo de T. Se usaron anticuerpos monoclonales dependientes de fosforilación AT8, DC209, DC217 y el anticuerpo monoclonal pan-tau DC25 en el estudio.

Los resultados del análisis cuantitativo de inmunotransferencia de los niveles de tau insoluble del grupo de ratas transgénicas inmunizadas con el epítipo terapéutico de diseño 2 (SEC ID nº 251) y grupo de control se muestran en la figura 74. La inmunoterapia redujo de forma estadísticamente significativa la cantidad de tau insoluble en animales inmunizados en comparación con las ratas transgénicas de control que recibieron solamente adyuvante. La reducción de tau insoluble se observó en todos los epítipos de tau analizados. Las reducciones en el epítipo 347-353 y epítipos de fosfo-tau fueron estadísticamente significativas ($P < 0,05$). La reducción observada fue la siguiente: en el epítipo de tau 347-353 en 46% ($P < 0,05$), en el epítipo de tau pT217 en 57% ($P < 0,05$), en el epítipo de tau p231 en 55% ($P < 0,05$), en el epítipo de tau pS202/pT205 en 47% ($P < 0,05$).

Estos resultados muestran que la vacuna indujo anticuerpos específicos de tau patológica lo que condujo a la reducción de tau patológica. La reducción de los niveles de tau patológica en el cerebro de rata de enfermedad de Alzheimer tratada se correlacionó con los parámetros neuroconductuales. Los animales tratados con niveles bajos de tau insoluble mostraron tiempo de espera de escape más corto y redujeron de forma estadísticamente significativa el número de deslizamientos de extremidades posteriores ($p < 0,05$), en comparación con animales de control. Estos hallazgos muestran que la inmunización con el epítipo terapéutico de diseño conduce a la reducción de tau patológica insoluble y a la mejora neuroconductual en animales tratados, lo que subraya el potencial terapéutico de la vacuna para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas.

Ejemplo 26: Caracterización adicional de epítipos mínimos de DC8E8 (para unidades centrales terapéuticas)

Para caracterizar adicionalmente los epítipos mínimos de DC8E8, se diseñó un panel de péptidos de tau con diferentes longitudes (de 42 unidades, 19 unidades, 12 unidades, 7 unidades, 6 unidades y 5 unidades), derivados de las regiones de repetición de unión de microtúbulos (MTBR1, MTBR2, MTBR3, MTBR4) de la proteína tau humana 2N4R (figura 75 A, B). Los péptidos se sintetizaron por EZBiolabs (Estados Unidos) con una pureza mayor del 95%. Todos los péptidos se analizaron con respecto a su capacidad para competir con tau Δ (1-150; 392-441)/4R patológica con respecto a la unión con DC8E8 por ELISA de competición. Se recubrieron placas de ELISA (Sarstedt, nº 821581001) con 50 μ l/pocillo de 5 μ g/ml de tau Δ (1-150; 392-441)/4R purificada recombinante en PBS durante una noche a 37°C. Las placas recubiertas se lavaron 5 veces con PBS/Tween 20 (0,05% v/v), y se bloquearon con PBS/Tween 20 (0,05% v/v) durante 1 hora a 25°C. Cada uno de los péptidos se disolvió por separado en PBS a una concentración final de 1 mM. Se prepararon diluciones en serie (2,5 x) de péptidos en PBS/Tween 20 en placas de microtitulación de polipropileno con fondo de los pocillos cónico (Greiner, nº 651201) dentro del intervalo de concentración de 200 μ M; 80 μ M; 32 μ M; 12,8 μ M; 5,12 μ M; 2,048 μ M; 0,8192 μ M; 0,32768 μ M. El anticuerpo monoclonal de validación DC8E8 se diluyó a una concentración de 0,6 μ g/ml en PBS y se añadieron 60 μ l de este anticuerpo diluido a cada pocillo para dilución en serie de los péptidos dando como resultado 120 μ l/pocillo de la mezcla. Las mezclas de anticuerpo/péptido se incubaron durante 1 hora a 25°C en una plataforma rotatoria ajustada a 230 rpm. Se transfirieron mezclas de anticuerpo/péptido de 50 μ l/pocillo de placas de polipropileno en placas de ELISA recubiertas con tau Δ (1-150; 392-441)/4R y bloqueadas con PBS/Tween 20 (por duplicado) y se incubaron durante 1 hora a 25°C. Las placas se lavaron 5 veces con PBS/Tween 20 y se incubaron con 50 μ l/pocillo de inmunoglobulinas de cabra policlonales anti-ratón/HRP (Dako, nº P0447) diluidas 1:1000 en PBS/Tween 20 durante 1 hora a 25°C. Después de lavar, las placas se incubaron después con 50 μ l/pocillo de 1 mg/2 ml de o-PDA (o-fenilendiamina, Sigma, P1526) en Na-acetato 0,1 M pH = 6,0 (Roth, nº 6779) complementado con 1,5 μ l/2 ml de H₂O₂ al 30% (Sigma, H-

0904) durante 20 minutos a 25°C en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 M (Merck, 1.00731.1000), seguido de la lectura de las placas a 492 nm (por ejemplo, Powerwave HT, Bio-Tek).

La figura 76 muestra los resultados del ELISA de competición realizado con los siguientes péptidos: TENLKHQPGGGK (SEC ID nº 270), KHQPGGG (SEC ID nº 271), HQPGGG (SEC ID nº 272), HQPGG (SEC ID nº 273), QPGGG (SEC ID nº 274), ENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGS (SEC ID nº 275), KHVPGGG (SEC ID nº 276), HVPGGG (SEC ID nº 277), HVPGG (SEC ID nº 278), VPGGG (SEC ID nº 279), DNIKHVPGGGSVQIVYKPV (SEC ID nº 280), HHKPGGG (SEC ID nº 281), HKPGGG (SEC ID nº 282) y THVPGGG (SEC ID nº 283). Todos los péptidos analizados que incluían epítomos terapéuticos de tau compitieron con tauΔ (1-150; 392-441/4R) patológica. Como se muestra en la figura 76, incluso los péptidos de 6 unidades (SEC ID nº 272, SEC ID nº 277 y SEC ID nº 282) pudieron competir con tauΔ (1-150; 392-441)/4R por la unión con DC8E8. Sin embargo, la retirada de histidina (péptidos de 5 unidades SEC ID nº 274, 279) o la última glicina (péptidos de 5 unidades SEC ID nº 273, 278) condujo a una pérdida de actividad competidora con tauΔ (1-150; 392-441/4R) por la unión con DC8E8 (los péptidos de 5 unidades derivaron de SEC ID nº 272 y SEC ID nº 277 con aminoácidos retirados His y Gly subrayados, ver anteriormente). Estos resultados sugieren que los péptidos de 5 unidades no generaron la estructura tridimensional terapéutica que se reconoce por DC8E8 en tau patológica. Por otro lado, los péptidos que comprendían seis restos de aminoácidos crean una estructura tridimensional terapéutica responsable de la actividad biológica medida por ELISA de competición y forman epítomos mínimos (unidades centrales terapéuticas) de DC8E8. En su diseño, cinco restos de aminoácidos son importantes para el reconocimiento de DC8E8, que están conservados (histidina, prolina y los tres restos de glicina en la secuencia HxPGGG).

Conclusión: Los datos sugieren que el epítomo de DC8E8 mínimo en tau humana consiste en 6 aminoácidos, que comprenden los restos HQPGGG (localizado dentro de MTBR1), HVPGGG (dentro de MTBR2), HKPGGG (dentro de MTBR3) y HVPGGG (dentro de MTBR4). Por lo tanto, el sitio de unión a DC8E8 (= epítomo) está presente cuatro veces en tau 2N4R y tres veces en tau 2N3R. Esto sugiere que los aminoácidos requeridos dentro de la secuencia de 6 unidades son la histidina y las tres glicinas.

Ejemplo 27: Determinación de la inmunogenicidad de péptidos que portan epítomos mínimos de DC8E8

a) *Los péptidos que portan epítomos mínimos de DC8E8 son inmunógenos:* Con el objetivo de determinar el potencial inmunógeno de péptidos de tau individuales, se conjugaron péptidos con KLH mediante su resto de Cys N terminal.

Para este fin, se sintetizaron péptidos de tau como péptidos cisteinados con un resto de cisteína localizado en el extremo N terminal extra con el objetivo de obtener unión orientada del péptido en la superficie de la proteína KLH. Los péptidos se acoplaron con el vehículo de KLH mediante el reticulador bifuncional N-[γ-maleimidobutirilo] succinimida éster (GMBS). Para preparar la reacción de conjugación, se disolvieron 20 mg de KLH (Calbiochem) en tampón de conjugación (PBS con NaCl 0,9 M, EDTA 10 mM) hasta una concentración de 10 mg/ml mediante agitación suave durante 10 minutos. Para la preparación de KLH activada por maleimida, se disolvieron 2 mg de reticulador bifuncional activo GMBS en 50 µl de dimetilformamida anhidra y se mezclaron con 2 ml de solución de KLH durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró GMBS que no había reaccionado en una columna de desalación HiTrap de 5 ml (GE Healthcare) equilibrada en tampón de conjugación. Las conjugaciones se llevaron a cabo a una relación 1:1 de péptido y KLH activada por maleimida (p/p, 20 mg de péptido) durante 2 horas a temperatura ambiente (25°C). Los conjugados resultantes se dializaron contra un exceso de 100 veces de PBS, con cuatro cambios de tampón de diálisis para retirar el péptido no conjugado. Después de la diálisis, los conjugados se centrifugaron a 21000 xg durante 15 minutos a 2°C. Los conjugados se separaron en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Se prepararon vacunas para inmunizaciones con conjugados de péptido-KLH, que contenían 100 µg de péptido conjugado, en 100 µl de PBS y se emulsionaron 1:1 (v/v) con adyuvante de Freund en un volumen de dosis final de 200 µl. Se usaron cinco ratones C57/BL por cada grupo de tratamiento. La primera inmunización se realizó usando el conjugado de péptido en PBS formulado con adyuvante completo de Freund. Las dos siguientes inmunizaciones, en intervalos de una semana, se realizaron usando el conjugado de péptido en PBS formulado con adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras de sangre de los animales una semana después de la última dosis de refuerzo y los sueros recogidos se usaron para determinación del título de los anticuerpos. Los títulos de los anticuerpos anti-tau específicos se determinaron por ELISA, como se ha descrito en el ejemplo 19. Se ensayaron diluciones en serie (1:100 a 1:102400) de cada suero contra tauΔ (1-150, 392-441)/4R patológica y tau 2N4R fisiológica, usada como una fase sólida. La figura 77A-C muestra un sumario de los resultados para sueros a dilución 1:800. Los resultados de ELISA se evaluaron estadísticamente usando el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney. Los títulos se definieron como los recíprocos de la dilución de suero que proporcionan la mitad de la DO máxima y se resumen en la figura 78.

La inmunización de ratones con péptidos de tau TENLKHQPGGGK (SEC ID nº 270), KHQPGGG (SEC ID nº 271), ENLKHQPGGGKVQIINKLDLSNVQSKCGS KDNIKHVPGGGS (SEC ID nº 275), KHVPGGG (SEC ID nº 276), HVPGGG (SEC ID nº 277), DNIKHVPGGGSVQIVYKPV (SEC ID nº 280), HHKPGGG (SEC ID nº 281) y THVPGGG (SEC ID nº 283) indujo altos niveles de anticuerpos específicos de tau en ratones inmunizados.

Además, los anticuerpos inducidos mostraron mayor afinidad por tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica que por tau 2N4R fisiológica (figura 77A-C). Esta diferenciación fue estadísticamente significativa para sueros de todos los animales inmunizados (SEC ID nº 270, $p < 0,0079$; SEC ID nº 271, $p < 0,0052$; SEC ID nº 275, $p < 0,0079$; SEC ID nº 276, $p < 0,0079$; SEC ID nº 277, $p < 0,0379$; SEC ID nº 280, $p < 0,0159$; SEC ID nº 281, $p < 0,0379$ y SEC ID nº 283, $p < 0,0286$). En general, la media geométrica de los títulos de anticuerpo para tauΔ (1-150, 392-441)/4R patológica fue de tres a cinco veces mayor que la de tau 2N4R fisiológica (figura 78). Como se muestra en la figura 78, los títulos de anticuerpo mayores para tau patológica se indujeron por el péptido de tau SEC ID nº 275 (GMT 51200), SEC ID nº 280 (GMT 51200), SEC ID nº 270 (GMT 22286) y SEC ID nº 276 (GMT 22286). Los péptidos de 5 unidades (SEC ID nº 273, 274, 278, 279), que parece que carecen de la estructura tridimensional terapéutica, no pudieron inducir anticuerpos específicos de tau en animales inmunizados. En su conjunto, estos resultados mostraron que los péptidos (SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283) que portaban los epítomos terapéuticos mínimos (unidades centrales terapéuticas) son inmunógenos e inducen anticuerpos con potencial terapéutico para dirigirse a proteínas tau patológicas en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Los experimentos de mapeo de epítomos anteriormente mencionados mostraron que el péptido SEC ID nº 282 crea una estructura tridimensional terapéutica (por ejemplo, imita por lo menos parcialmente el epítomo de DC8E8 mínimo), no obstante, no indujo una respuesta de anticuerpos específica en ratones inmunizados (la GMT para tau patológica fue 174, figura 78).

b) *Perfil isotípico*: La vacunación de ratones C57/BL con los péptidos de tau SEC ID nº 270, 271, 275, 276, 277, 280, 281 y 283 indujo preferentemente la formación de isotipos de anticuerpo IgG1 e IgG2b específicos de tau patológica. Para determinar los isotipos específicos de los anticuerpos producidos en respuesta a péptidos se agruparon los sueros de ratones y se diluyeron de 1:100 a 1:12800, y se ensayaron por duplicado por ELISA (como se ha descrito en el Ejemplo 19) contra tauΔ (1-150; 392-441)/4R patológica. Para detectar los isotipos IgG1, IgG2b, IgG2c, IgG3 e IgM de ratones, se diluyeron anticuerpos secundarios conjugados con HRP específicos de subclase antirratón 1:5000 en PBS (anticuerpos obtenidos de Lifespan Biosciences). La figura 79 muestra los resultados para la dilución 1:800 representativa. Los datos sugieren que los péptidos conjugados con KLH indujeron un amplio espectro de isotipos de anticuerpos anti-tau. En general, la vacunación con péptidos generó los mayores niveles de isotipos de anticuerpo (IgG1, IgG2b), que se considera que son los anticuerpos de alta afinidad. La presencia de altos títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2b con afinidad preferente por tau patológica indicó que la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna se dirige contra especies de tau patológica. Los sueros de control obtenidos de ratones inmunizados con simulación (que recibieron solamente adyuvante) fueron negativos (datos no representados).

c) *Los péptidos que portan epítomos terapéuticos inducen anticuerpos que diferencian entre tau patológica y fisiológica*: el control en tiempo real de los acontecimientos de unión usando resonancia de plasmón superficial permitió la medición de la velocidad cinética de asociación (k_{ON}) y disociación (k_{OFF}) de anticuerpos de los sueros agrupados de ratones C57/BL inmunizados con los péptidos de tau individuales TENLKHQPGGGK (SEC ID nº 270), KHQPGGG (SEC ID nº 271), HQPGGG (SEC ID nº 272), HQPGG (SEC ID nº 273), QPGGG (SEC ID nº 274), ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGG (SEC ID nº 275), KHVPGGG (SEC ID nº 276), HVPGGG (SEC ID nº 277), HVPGG (SEC ID nº 278), VPGGG (SEC ID nº 279), DNIKHVPGGGSVQIVYKPV (SEC ID nº 280), HHKPGGG (SEC ID nº 281), HKPGGG (SEC ID nº 282) y THVPGGG (SEC ID nº 283). El análisis se realizó por resonancia de plasmón superficial en BIACORE3000 usando una microplaca sensora CM5 (Biacore AB, Uppsala), como se ha descrito en los Ejemplos 5 y 19. El análisis mostró que los anticuerpos inducidos por inmunización con los péptidos podían diferenciar entre el reconocimiento de tauΔ (1-150; 392-441)/4R y la isoforma de tau fisiológica 2N4R (Figura 80). Los anticuerpos inducidos por inmunización con los péptidos SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283, que portaban los epítomos terapéuticos mínimos, mostraron una afinidad preferencial por tauΔ (1-150; 392-441)/4R, en comparación con su afinidad por la tau 2N4R fisiológica correspondiente. Esta diferenciación fue estadísticamente significativa para sueros de los péptidos: SEC ID nº 270 ($p = 0,0392$), SEC ID nº 271 ($p = 0,0363$), SEC ID nº 272 ($p = 0,0022$), SEC ID nº 276 ($p = 0,0013$), SEC ID nº 277 ($p = 0,0023$), SEC ID nº 280 ($p = 0,0104$), SEC ID nº 281 ($p = 0,0123$) y SEC ID nº 283 ($p = 0,0011$). Los resultados obtenidos están de acuerdo con experimentos de inmunogenicidad previos resumidos en la figura 77A-C y la figura 78.

d) *Los anticuerpos inducidos por los péptidos reconocen formas patológicas de tau por transferencia de Western*: se examinaron anticuerpos inducidos por inmunización de ratones C57/BL con péptidos de tau individuales con respecto a formas patológicas de tau usando el procedimiento de inmunotransferencia (como se ha descrito en el ejemplo 19). Se usaron los troncos encefálicos de ratas SHR72 en el estadio tardío de patología neurofibrilar para la extracción de proteínas tau patológicas insolubles. Se usó la corteza temporal de cerebro con AD humana (estadio VI de Braak; obtenido del Netherlands brain bank, Países Bajos) para la extracción de tau de AD patológica humana. Se prepararon proteínas tau extraídas de acuerdo con el procedimiento de sarcosilo (Greenberg y Davies 1990). Se diluyeron sueros agrupados de animales inmunizados 1:1000 en PBS y se usaron como un anticuerpo primario. La incubación con anticuerpo primario se siguió de inmunoglobulinas de conejo policlonales antirrata conjugadas con peroxidasa de rábano rusticano (1:3000; Dako, Glostrup, Dinamarca). Después se visualizaron los anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano rusticano por quimioluminiscencia usando el sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, Bélgica). La señal se digitalizó con el sistema de formación de imágenes CCD LAS3000 (Fujifilm, Japón). Se proporcionan resultados resumidos en la figura 81. Los anticuerpos inducidos por vacunación con péptidos que

probablemente creaban estructuras tridimensionales terapéuticas del epítipo o los epítipos de DC8E8 (SEC ID nº 270, 271, 272, 275, 276, 277, 280, 281 y 283) reconocieron todas las formas patológicas de proteína tau extraída de SHR72 y de tejidos de cerebro con AD, incluyendo el triplete tau A68 característico de AD. No obstante, el péptido SEC ID nº 282 que parece crear una estructura tridimensional terapéutica (compite con tauΔ (1-150; 392-441)/4R por la unión con DC8E8), no indujo una respuesta de anticuerpos específica en estos ratones inmunizados, por lo tanto la reactividad fue negativa. De forma similar, los péptidos de 5 unidades que no podían inducir respuesta de anticuerpos específica de tau eran negativos en este análisis.

e) *Los anticuerpos inducidos por péptidos reconocen proteínas tau patológicas en las secciones de los tejidos de cerebro con enfermedad de Alzheimer humana:* se ensayaron anticuerpos específicos de tau inducidos por vacunación de C57/BL de ratones con péptidos individuales en tejido cerebral humano (bloques de parafina) obtenidos del Netherlands brain bank, Países Bajos. Los bloques se cortaron en un microtomo. Las secciones de parafina (8 µm) del sector CA1 del hipocampo de cerebro con enfermedad de Alzheimer (estadio V de Braak) se trataron con ácido fórmico al 99% frío (+4°C) durante 1 minuto a temperatura ambiente (25°C). Las secciones tisulares se incubaron en solución de bloqueo (BSA 5%, Triton X-100 0,3% en Tris-HCl 50 mM) y después durante una noche con suero diluido 1:1000 en solución de bloqueo. A continuación, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante una hora y después se hizo reaccionar con complejo de peroxidasa de biotina-avidina durante otra hora (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories), ambos a 25°C. La inmunorreacción se visualizó con el kit de sustrato de peroxidasa (Vector VIP, Vector Laboratories, Ca, Estados Unidos) y se contratiñó con verde de metilo (Vector Laboratories). Las secciones se examinaron con un microscopio Olympus BX71. La tinción inmunohistoquímica (figura 82A-C, figura 83) sugiere que los anticuerpos inducidos por inmunización con el péptido SEC ID nº 270, 271, 275, 276, 280, 281 y 283 reconocían específicamente las estructuras de tau patológica, es decir ovillos neurofibrilares en el hipocampo del tejido de cerebro con enfermedad de Alzheimer. Los sueros de los animales vacunados con péptidos anteriormente mencionados tiñeron la patología neurofibrilar de forma intensiva, confirmando que los anticuerpos se dirigían a proteínas tau patológicas. Los anticuerpos inducidos por vacunación con los péptidos SEC ID nº 272 y 277 muestran intensidad más débil de la tinción de estructuras de tau patológica en tejidos cerebrales. Los péptidos que indujeron niveles menores de respuesta de anticuerpos específica de tau o no indujeron respuesta de anticuerpos específica de tau (SEC ID nº 273, 274, 278, 279 y 282) fueron negativos en este análisis. Se usaron sueros de ratones, que recibieron solamente adyuvante, como controles negativos. No reconocieron patologías neurofibrilares (Figura 82C).

Alfaro-Acha *et al.* Handgrip Strength and Cognitive Decline in Older Mexican Americans. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. (2006); 61(8): 859-865.

Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. Proc Natl Acad Sci USA 98: 6923-6928.

Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. Journal of molecular biology 273, 927-948.

Andreasen N, Blennow K, Zetterberg H. 2010. Neuroinflammation Screening in Immunotherapy Trials against Alzheimer's disease. Int J Alzheimers Dis. 2010:638379.

Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. J Neurosci 27:9115-9129 (2007).

Balin BJ, Little CS, Hammond CJ, Appelt DM, Whittum-Hudson JA, Gerard HC, Hudson AP. 2008. Chlamydia Pneumoniae and the Etiology of Late-Onset Alzheimer's disease. J Alzheimer's Dis 13:371-380.

Berg, L., *et al.* Clinicopathologic Studies in Cognitively Healthy Aging and Alzheimer disease. ARCH NEUROL/VOL 55, MAR 1998.

Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. Nat Rev Neurosci 9:768-778 (2008).

Bierer, L.M., *et al.* Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's disease. Arch Neuro/Vol. 52, Ene 1995.

Boyle, P., *et al.* Association of Muscle Strength With the Risk of Alzheimer disease and the Rate of Cognitive Decline in Community-Dwelling Older Persons. (REPRINTED) ARCH NEUROL/VOL 66 (nº 11), NOV 2009.

Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of the cerebral cortex, vol. 14 (Peters, A. and Morrison, J. H., eds), pp 475-512 New York: Kluwer Academic/Plenum Publications.

- Braak, H., *et al.* Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239 - 259 (1991).
- Braak, H., *et al.* The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol* (2011) 121:171-181.
- 5 Buchman, A., *et al.*, Frailty is Associated With Incident Alzheimer's disease and Cognitive Decline in the Elderly. *Psychosomatic Medicine* 69:483-489 (2007).
- 10 Buchman, A., *et al.*, Grip Strength and the Risk of Incident Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*; 29:66-73 (2007)
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews.* 33, 95-130.
- 15 Burns, A., Zaudig, M. 2002. Mild cognitive impairment in older people. *Lancet.* 360(9349),1963-5.
- Burns, J.M., *et al.* The pathology of the substantia nigra in Alzheimer disease with extrapyramidal signs. *Neurology* 2005;64;1397.
- 20 Carter J, Lippa CF. Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1:733-737 (2001).
- Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein A, Blume G (1998) Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochem. Biophys. Acta* 1368, 201-15.
- 25 Chui, H.C., *et al.* Extrapyramidal Signs and Psychiatric Symptoms Predict Faster Cognitive Decline in Alzheimer's disease. *Arch Neurol/Vol* 51, Julio 1994.
- Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nature Rev Drug Discovery* 9, 387-398.
- 30 Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11 (7), 909-13.
- 35 Csokova N, Skrabana R, Liebig HD, Mederlyova A, Kontsek P, Novak M. Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases. *Protein Expr Purif* 35:366-372 (2004). *Current Protocols in Protein Science* Mayo 2001; Capítulo 5
- 40 Dickey CA, Ash P, Klosak N, Lee WC, Petrucelli L, Hutton M, Eckman CB (Pharmacologic reductions of total tau levels; implications for the role of microtubule dynamics in regulating tau expression. *Mol Neurodegener* 1:6.2006).
- 45 Dickey CA, Eriksen J, Kamal A, Burrows F, Kasibhatla S, Eckman CB, Hutton M, Petrucelli L (Development of a high throughput drug screening assay for the detection of changes in tau levels -- proof of concept with HSP90 inhibitors. *Curr Alzheimer Res* 2:231-238.2005).
- 50 Dickey CA, Petrucelli L. Current strategies for the treatment of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Expert Opin Ther Targets* 10:665-676 (2006).
- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM (Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5:452-457 (2002).
- 55 Duyckaerts, C., *et al.* Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* (2009) 118:5-36.
- Duyckaerts, C., *et al.* Diagnosis and Staging of Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, Vol. 18, No. S4, pp. S33-S42 (1997)
- 60 Duyckaerts, C., *et al.* The progression of the lesions in Alzheimer disease: insights from a prospective clinicopathological study. *J. Neural Transm* (1998) [Supl] 53:119-126.
- 65 D'Souza, I., and Schellenberg, G.D. (2005). Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochimica et biophysica acta* 1739, 104-115.

- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117(2005).
- 5 Filipcik P, Zilka N, Bugos O, Kucerak J, Koson P, Novak P, Novak M. (2010) First transgenic rat model developing progressive cortical neurofibrillary tangles. *Neurobiol Aging*. Dic 2010 31. [Epub ahead of print]
- Fodero-Tavoietti, M.T., *et al.* F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 134; 1089-1100 (2011)
- 10 Frenkel D, Dewachter I, Van Leuven F, Solomon B (Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine* 21:1060-1065 (2003).
- 15 Frost, B., Diamond, M.I. (2009). The expanding realm of prion phenomena in neurodegenerative disease. *Prion* 3(2):74-7.
- Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284(19),12845-52
- 20 Furlan R, Brambilla E, Sanvito F, Roccatagliata L, Olivieri S, Bergami A, Pluchino S, Uccelli A, Comi G, Martino G (Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain* 126:285-291 (2003).
- 25 Gelinas DS, DaSilva K, Fenili D, St George-Hyslop P, McLaurin J (Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Supl 2:14657-14662 (2004).
- Giannakopoulos, P., *et al.* Pathologic Correlates of Apraxia in Alzheimer disease. *ARCH NEUROL/VOL* 55, MAYO 1998.
- 30 Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60,1495-500.
- 35 Glenn GM, Rao M, Matyas GR, Alving CR. (1998). Skin immunization made possible by cholera toxin. *Nature* 391:851.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3, 519-526.
- 40 Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A. (1989b.) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*. 8,393-399.
- 45 Goldman, W.P., *et al.*, Motor dysfunction in mildly demented AD individuals without extrapyramidal signs. *Neurology* (1999);53;956.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24 (1997).
- 50 Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel Jr, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16(14),4491-500.
- 55 Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Cuadros, R., Hernández, F., and Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* 580(20), 4842-50.
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Díaz-Hernández, J.I., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol* 19(10):708-17.
- 60 Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T., Avila, J. (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 37(4), 673-81.
- 65 Goode, B.L., Chau, M., Denis, P.E., Feinstein, S.C. 2000. Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem* 275, 38182-38189.

- Goode, B.L., Feinstein, S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 124, 769-782.
- 5 Greenberg SG, Davies P. A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5827-5831 (1990).
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 564-569.
- 10 Gruden MA, Davudova TB, Malisauskas M, Zamotin VV, Sewell RD, Voskresenskaya NI, Kostanyan IA, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18:165-171 (2004).
- 15 Grudzien, A., *et al.* Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 28 (2007) 327-335.
- 20 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917 (1986).
- Hampel, H., Blennow, K., Shaw, L.M., Hoessler, Y.C., Zetterberg, H., Trojanowski, J.Q. (2010). Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 45(1), 30-40.
- 25 Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388 (1991).
- Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1:355-358 (1998).
- 30 Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356 (2002).
- 35 Haynes JR, McCabe DE, Swain WF, Wiedera G, Fuller JT. Particle-mediated nucleic acid immunization. *J Biotechnol* 44:37-42.1996).
- Hertz, L. Is Alzheimer's disease an anterograde degeneration, originating in the brainstem, and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glial cells? *Brain Research Reviews*, 14 (1989) 335-353.
- 40 Hunter RL. Overview of vaccine adjuvants: present and future. *Vaccine* 2002;20 Supl. 3:S7-12.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Developing pharmacological therapies for Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* 64:2234-2244 (2007).
- 45 Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Inhibition of neurofibrillary degeneration: a promising approach to Alzheimer's disease and other tauopathies. *Curr Drug Targets* 5:495-502 (2004).
- 50 Ivanovova N, Handzusova M, Hanes J, Kontsekova E, Novak M. High-yield purification of fetal tau preserving its structure and phosphorylation pattern. *J Immunol Methods* 339:17-22 (2008).
- Itzhaki RF, Wozniak MA. 2008. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's disease: The Enemy Within. *J Alzheimers Dis.* 13:393-405.
- 55 Jacobsen JS, Reinhart P, Pangalos MN. Current concepts in therapeutic strategies targeting cognitive decline and disease modification in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 2:612-626 (2005).
- Jakes, R., Novak, M., Davison, M., Wischik, C.M. (1991). Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO J* 10, 2725-2729.
- 60 Jansen FK, Blythman HE, Carrière D, Casellas P, Gros O, Gros P, Laurent JC, Paolucci F, Pau B, Poncelet P, Richer G, Vidal H, Voisin GA. (1982). Immunotoxins: hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity. *Immun. Rev.* 62, 185-216
- 65 Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (A beta peptide

- immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.2000).
- 5 Jensen FC, Savary JR, Diveley JP, Chang JC (1998). Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:173-186.
- Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Plückthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods*. Feb 1997 14;201(1): 35-55
- 10 Kawasaki G (1991). International Patent Application Publication No. WO91/05058.
- Kontsekova, E. (2002) International Patent Application Publication No. WO/2004/007547.
- 15 Korenova M, Zilka N, Stozicka Z, Bugos O, Vanicky I, Novak M (NeuroScale, the battery of behavioural tests with novel scoring system for phenotyping of transgenic rat model of tauopathy. *J Neurosci Methods* 177:108-114.2009).
- 20 Kosik, K.S., Kowall, N.W., McKee, A. (1989a). Along the way to a neurofibrillary tangle: a look at the structure of tau. *Ann Med*. 21,109-112.
- Koson P, Zilka N, Kovac A, Kovacech B, Korenova M, Filipcik P, Novak M. Truncated tau expression levels determine life span of a rat model of tauopathy without causing neuronal loss or correlating with terminal neurofibrillary tangle load. *Eur J Neurosci* 28:239-246 (2008).
- 25 Kovac, A., Zilkova, M., Deli, M.A., Zilka, N., Novak, M. (2009). Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis* 18(4), 897-906.
- Kovacech B, Novak M. (2010). Tau truncation is a productive posttranslational modification of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 7: en imprenta.
- 30 Kovacech B, Skrabana R, Novak M. (2010). Transition of tau protein from disordered to misordered in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 7: 24-27.
- 35 Kraemer, H.C., *et al.* 'How Far' vs 'How Fast' in Alzheimer's disease. *Arch Neurol/Vol* 51, Mar (1994).
- Krajciova, G., Skrabana, R., Filipcik, P., and Novak, M. (2008). Preserving free thiols of intrinsically disordered tau protein without the use of a reducing agent. *Anal Biochem* 383, 343-345.
- 40 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
- Langer R, Cleland JL, Hanes J. (1997). New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, 97-119.
- 45 Langer R. New methods of drug delivery. (1990) *Science* 249:1527-33.
- Larbig G, Pickhardt M, Lloyd DG, Schmidt B, Mandelkow E. Screening for inhibitors of tau protein aggregation into Alzheimer paired helical filaments: a ligand based approach results in successful scaffold hopping. *Curr Alzheimer Res* 4:315-323(2007).
- 50 Lee HG, Perry G, Moreira PI, Garrett MR, Liu Q, Zhu X, Takeda A, Nunomura A, Smith MA Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol Med* 11:164-169 (2005).
- 55 Liu, Y., *et al.* Pathological Correlates of Extrapyrimal Signs in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* (1997);4 1:368 - 374.
- Livingston, B.D., Crimi, C., Grey, H., Ishioka, G., Chisari, F.V., Fikes, J., Grey, H., Chesnut, R.W., and Sette, A. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159:1383-1392 (1997).
- 60 Louis, E.D., *et al.* Parkinsonian Signs in Older People in a Community-Based Study. (REPRINTED) *ARCH NEUROL/VOL* 61, (AGO 2004).
- 65 MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol.* (1996) Oct 11;262(5):732-45.

- Macikova I., Dedek L., Kontsekova E., Kontsek P., Ciampor F., Novak M., Vrzal V. (1992) Common and different antigenic properties of the rabies virus glycoprotein between strains SAD-Vnukovo and Pitman-Moore. *Acta virol.* 36, 541-55.
- 5 März W, Scharnagl H, Kirça M, Bohl J, Gross W, Ohm TG. 1996. Apolipoprotein E polymorphism is associated with both senile plaque load and Alzheimer-type neurofibrillary tangle formation. *Ann N Y Acad Sci.* 777:276-80.
- Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13:989-1002 (1994).
- 10 Miklosy J. 2008. Chronic Inflammation and Amyloidogenesis in Alzheimer's disease - Role of Spirochetes. *J Alzheimer's Dis* 13:381-391 381
- 15 Moe, J.G., Chatterjee, I., Davidowitz, E.J., Arancio, O. (2009). Modulation of synaptic function by extracellular tau enriched in oligomers. *Alzheimer Dem* 5 (4), P499
- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985 (2000).
- 20 Morgan D. 2011. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med.* 269(1):54-63.
- Morris, J.C., *et al.* Clinical and Pathological Aspects of Parkinsonism in Alzheimer's disease. *Arch Neurol-Vol* 46 (Junio 1989).
- 25 Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J* 21:2135-2148 (2007).
- 30 Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* 12, 279-84.
- Necula M, Chirita CN, Kuret J Cyanine dye N744 inhibits tau fibrillization by blocking filament extension: implications for the treatment of tauopathic neurodegenerative diseases. *Biochemistry* 44:10227-10237 (2005).
- 35 Nicolau C, Greferath R, Balaban TS, Lazarte JE, Hopkins RJ A liposome-based therapeutic vaccine against beta-amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2332-2337 (2002).
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6990-6995 (2005).
- 40 Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M. (1993). Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J* 12, 365-70.
- 45 Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 43:321-332 (2004).
- 50 Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421 (2003).
- O'Hagan DT, Valiante NM (Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 2:727-735 (2003).
- 55 O'Mahony, DJ. (1995) Publicación de solicitud de patente internacional No. WO 9717613
- Otvos L, Jr., Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. (1994). Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *Journal of neuroscience research* 39: 669-673.
- 60 Paul A, Cevc G, Bachhawat BK. (1995). Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers. *Eur J Immunol.* Dec;25(12):3521-4.
- Pettersson, A.F., *et al.* Motor Function in Subjects with Mild Cognitive Impairment and Early Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* (2005);19:299-304.
- 65

- Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Hascher A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E Screening for inhibitors of tau polymerization. *Curr Alzheimer Res* 2:219-226 (2005).
- 5 Price JL, Morris JC Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368 (1999).
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369 (2002).
- 10 Reichert, J.M. (2011). Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs* 3(1),76-99.
- Reitz, C., *et al.* Memory performance is related to amyloid and tau pathology in the hippocampus. (Mar 2009); *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2009;80;715-721; publicado originalmente online.
- 15 Roberson ED, Searce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754 (2007).
- 20 Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481 (2005).
- 25 Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Bock G, Schönitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstien B. 2002. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol.* 168(11):5893-9.
- 30 Scarmeas, N., *et al.* Motor signs during the course of Alzheimer disease. *Neurology.* (2004); 63(6): 975-982.
- Scarmeas, N., *et al.* Motor signs predict poor outcomes in Alzheimer disease. *Neurology.* (2005); 64(10): 1696-1703. doi:10.1212/01.WNL.0000162054.15428.E9.
- 35 Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-177 (1999).
- 40 Schenk D, Hagen M, Seubert P Current progress in beta-amyloid immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 16:599-606 (2004).
- 45 Schneider, A., Mandelkow, E., (2008). Tau-based treatment strategies in neurodegenerative diseases. *Neurotherapeutics* 5(3), 443-57.
- Seabrook GR, Ray WJ, Shearman M, Hutton M Beyond amyloid: the next generation of Alzheimer's disease therapeutics. *Mol Interv* 7:261-270 (2007).
- 50 Selkoe DJ Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:438-447 (1994).
- Shipton OA, Leitz JR, Dworzak J, Acton CE, Tunbridge EM, Denk F, Dawson HN, Vitek MP, Wade-Martins R, Paulsen O, Vargas-Caballero M (Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *J Neurosci* 31:1688-1692 (2011).
- 55 Siegrist CA, Aspinall R. (2009). B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol.* 9(3):185-94
- 60 Sigurdsson EM, Knudsen E, Asuni A, Fitzer-Attas C, Sage D, Quartermain D, Goni F, Frangione B, Wisniewski T (An attenuated immune response is sufficient to enhance cognition in an Alzheimer's disease mouse model immunized with amyloid-beta derivatives. *J Neurosci* 24:6277-6282 (2004).
- 65 Sigurdsson EM, Scholtzova H, Mehta PD, Frangione B, Wisniewski T Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. *Am J Pathol* 159:439-447 (2001).

Simic, G., *et al.* Annotation - Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009 December; 35(6): 532-554. doi:10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x.

Skrabana, R., Sevcik, I., Novak, M. (2006). Intrinsically disordered proteins in the neurodegenerative processes: formation of tau protein paired helical filaments and their analysis. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1085-1097.

Skrabana, R., M. Skrabanova-Khuebachova, *et al.* (2006). "Alzheimer's-disease-associated conformation of intrinsically disordered tau protein studied by intrinsically disordered protein liquid-phase competitive enzyme-linked immunosorbent assay." *Anal Biochem* 359(2): 230-7.

Sloane PD, Zimmerman S, Suchindran C, Reed P, Wang L, Boustani M, Sudha S The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances. *Annu Rev Public Health* 23:213-231 (2002).

Soininen, H., *et al.* Extrapyramidal signs in Alzheimer's disease: a 3-year follow-up study. *J Neural Transm [P-D Sect]* (1992) 4:107-119.

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell* 18:5060-5068 (2007a).

Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Mulkearns EE, Shulman JM, Biernat J, Mandelkow EM, Feany MB. S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* 85:1271-1278 (2007b).

Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* 280:7614-7623 (2005a).

Taniguchi T, Sumida M, Hiraoka S, Tomoo K, Kakehi T, Minoura K, Sugiyama S, Inaka K, Ishida T, Saito N, Tanaka C (Effects of different anti-tau antibodies on tau fibrillogenesis: RTA-1 and RTA-2 counteract tau aggregation. *FEBS Lett* 579:1399-1404 (2005b).

Trollet C, Scherman D, Bigey P Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. *Methods Mol Biol* 423:199-214 (2008).

van den Berg JH, Nuijen B, Beijnen JH, Vincent A, van Tinteren H, Kluge J, Woerdeman LA, Hennink WE, Storm G, Schumacher TN, Haanen JB. Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum Gene Ther* 20:181-189 (2009).

Van Nest G., Ott G., Barchweld G. (1990) Publicación de solicitud de patente nº WO 9014837

Vechterova L, Kontseikova E, Zilka N, Ferencik M, Ravid R, Novak M. (2003). DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope. *Neuroreport* 14: 87-91.

Wai, M., *et al.* Co-localization of hyperphosphorylated tau and caspases in the brainstem of Alzheimer's disease patients. *Biogerontology* (2009) 10:457-469.

Waite, L.M., *et al.* Gait slowing as a predictor of incident dementia: 6-year longitudinal data from the Sydney Older Persons Study. *Journal of the Neurological Sciences* 229- 230 (2005) 89-93

Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193 (2004).

Wang, Li, *et al.* Performance-Based Physical Function and Future Dementia in Older People. (REPRINTED) *ARCH INTERN MED/VOL* 166 (22 MAYO, 2006).

Weiner HL, Lemere CA, Maron R, Spooner ET, Grenfell TJ, Mori C, Issazadeh S, Hancock WW, Selkoe DJ (Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48:567-579 (2000).

Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. 2009. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 30(7):306-12.

West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., Troncoso, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344,769-72.

Wilson, R.S., *et al.* Parkinsonian-like Signs and Risk of Incident Alzheimer disease in Older Persons. (RE-IMPRESO) *ARCH NEUROL/VOL* 60 (ABR 2003).

- Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. J Pharm Sci 98:1278-1316 (2009).
- 5 Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11213-11218 (1996).
- 10 Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85,4884-8.
- 15 Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85, 4506-10.
- Xing Z, Santosuosso M, McCormick S, Yang TC, Millar J, Hitt M, Wan Y, Bramson J, Vordermeier HM. Recent advances in the development of adenovirus- and poxvirus-vectored tuberculosis vaccines. Curr Gene Ther 5:485-492 (2005).
- 20 Zarow, C., *et al.* Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. (RE-IMPRESO) ARCH NEUROL/VOL 60, MAR 2003.
- 25 Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. Proc Natl Acad Sci U S A 102:227-231 (2005).
- 30 Zhang J, Wu X, Qin C, Qi J, Ma S, Zhang H, Kong Q, Chen D, Ba D, He W (A novel recombinant adeno-associated virus vaccine reduces behavioural impairment and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol Dis 14:365-379 (2003).
- 35 Zielinski C, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H, Pehamberger H. (2003). Publicación de solicitud de patente nº WO 03/020750
- Zilka N, Vechterová L, Kontseková E, Novák M. (2003) A rapid immunohistochemical primary screening assay for hybridomas. J Immunol Methods. 272(1-2):49-53.
- 40 Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseкова E, Novak M. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. FEBS Lett 580:3582-3588 (2006).
- 45 Zilka, N., *et al.* Chaperone-like Antibodies Targeting Misfolded Tau Protein: New Vistas in the Immunotherapy of Neurodegenerative Foldopathies. Journal of Alzheimer's disease 15 (2008) 169-179.
- Zilkova, M., Koson, P., Zilka, N. 2006. The hunt for dying neurons: insight into the neuronal loss in Alzheimer's disease. Bratisl Lek Listy 107(9-10), 366-73.
- 50 Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11213-11218 (1996).
- 55 Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85,4884-8.
- 60 Wischik, C.M., Novak, M., Thogersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad Sci USA 85, 4506-10.
- Xing Z, Santosuosso M, McCormick S, Yang TC, Millar J, Hitt M, Wan Y, Bramson J, Vordermeier HM. Recent advances in the development of adenovirus- and poxvirus-vectored tuberculosis vaccines. Curr Gene Ther 5:485-492 (2005).
- 65 Zarow, C., *et al.* Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. (RE-IMPRESO) ARCH NEUROL/VOL 60, MAR 2003.
- Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. Proc Natl Acad Sci U S A 102:227-231 (2005).

Zhang J, Wu X, Qin C, Qi J, Ma S, Zhang H, Kong Q, Chen D, Ba D, He W (A novel recombinant adeno-associated virus vaccine reduces behavioural impairment and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 14:365-379 (2003).

Zielinski C, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H, Pehamberger H. (2003). Publicación de solicitud de patente WO 03/020750

Zilka N, Vechterová L, Kontseková E, Novák M. (2003) A rapid immunohistochemical primary screening assay for hybridomas. *J Immunol Methods*. 272(1-2):49-53.

Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseкова E, Novak M. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett* 580:3582-3588 (2006).

Zilka, N., *et al.* Chaperone-like Antibodies Targeting Misfolded Tau Protein: New Vistas in the Immunotherapy of Neurodegenerative Foldopathies. *Journal of Alzheimer's disease* 15 (2008) 169-179.

Zilkova, M., Koson, P., Zilka, N. 2006. The hunt for dying neurons: insight into the neuronal loss in Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 107(9-10), 366-73.

Listado de secuencias

<110> NOVAK, MICHAL

KONTSEKOVA, EVA

KOVACECH, BRANISLAV

ZILKA, NORBERT

<120> TERAPIA BASADA EN PROTEÍNAS Y DIAGNÓSTICO DE UNA PATOLOGÍA MEDIADA POR TAU EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

<130> 1163400010000

<150> US 61/536.339

<151> 2011-09-19

<150> US 61/653.115

<151> 2012-05-30

<160> 283

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu

1 5 10 15

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

20 25 30

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 656 442 T3

<400> 2
Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
5 20 25 30
<210> 3
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 3
Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15
Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
20 25 30
15 <210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
20 Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys
1 5 10 15
Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
20 25 30
<210> 5
25 <211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5
Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro
30 1 5 10 15
Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
20 25 30
<210> 6
<211> 30
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
1 5 10 15
40 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
20 25 30

ES 2 656 442 T3

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 7
 Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser
 20 25 30
 10 <210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 15 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
 1 5 10 15
 Ser Lys
 <210> 9
 20 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys
 25 1 5 10 15
 Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
 20 25 30
 <210> 10
 <211> 30
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile
 1 5 10 15
 35 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 20 25 30
 <210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 11

ES 2 656 442 T3

Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly
1 5 10 15
Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
20 25 30

5 <210> 12
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

10 Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
1 5 10 15
Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
20 25 30
<210> 13

15 <211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr
20 1 5 10 15
Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
20 25 30
<210> 14
<211> 30

25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu
1 5 10 15

30 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile
20 25 30
<210> 15
<211> 30
<212> PRT

35 <213> Homo sapiens
<400> 15

Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn
1 5 10 15
Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
40 20 25 30
<210> 16

ES 2 656 442 T3

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 5 Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
 20 25 30
 <210> 17
 10 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His
 15 1 5 10 15
 Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
 20 25 30
 <210> 18
 <211> 30
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 1 5 10 15
 25 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
 20 25 30
 <210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu
 35 20 25 30
 <210> 20
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 20
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly

ES 2 656 442 T3

1 5 10 15
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn
 20 25 30
 <210> 21
 5 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
 10 1 5 10 15
 Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val
 20 25 30
 <210> 22
 <211> 30
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val
 1 5 10 15
 20 Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
 20 25 30
 <210> 23
 <211> 30
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
 1 5 10 15
 Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys
 30 20 25 30
 <210> 24
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 24
 Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
 1 5 10 15
 Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
 20 25 30
 40 <210> 25
 <211> 30

ES 2 656 442 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile
 5 1 5 10 15
 Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
 20 25 30
 <210> 26
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
 1 5 10 15
 15 Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
 20 25 30
 <210> 27
 <211> 30
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
 25 20 25 30
 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 28
 Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
 1 5 10 15
 Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
 20 25 30
 35 <210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 40 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
 1 5 10 15

ES 2 656 442 T3

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 <210> 30
 <211> 30
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys
 1 5 10 15
 10 Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 20 25 30
 <210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
 1 5 10 15
 Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
 20 20 25 30
 <210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 32
 Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
 1 5 10 15
 Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 20 25 30
 30 <210> 33
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 35 Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys
 1 5 10 15
 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
 20 25 30
 <210> 34
 40 <211> 30
 <212> PRT

ES 2 656 442 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 34
 Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
 1 5 10 15
 5 Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
 20 25 30
 <210> 35
 <211> 30
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 1 5 10 15
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
 15 20 25 30
 <210> 36
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 36
 Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile
 1 5 10 15
 Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
 20 25 30
 25 <210> 37
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 30 Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
 1 5 10 15
 His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 20 25 30
 <210> 38
 35 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 40 1 5 10 15
 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val

ES 2 656 442 T3

```

                20                25                30
<210> 39
<211> 30
<212> PRT
5  <213> Homo sapiens
    <400> 39
    Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val
    1                5                10                15
    Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
10                20                25                30
    <210> 40
    <211> 30
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
15  <400> 40
    Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
    1                5                10                15
    Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
                20                25                30
20  <210> 41
    <211> 30
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 41
25  Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
    1                5                10                15
    Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
                20                25                30
    <210> 42
30  <211> 30
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 42
    Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly
35  1                5                10                15
    Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
                20                25                30
    <210> 43
    <211> 30
40  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

```


ES 2 656 442 T3

<400> 43
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
 5 20 25 30
 <210> 44
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 44
 Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 20 25 30
 15 <210> 45
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45
 20 Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 1 5 10 15
 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys
 20 25 30
 <210> 46
 25 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
 30 1 5 10 15
 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys
 20 25 30
 <210> 47
 <211> 30
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
 1 5 10 15
 40 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
 20 25 30

ES 2 656 442 T3

<210> 48
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 48
 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
 1 5 10 15
 Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
 20 25 30
 10 <210> 49
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 15 Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
 1 5 10 15
 Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 20 25 30
 <210> 50
 20 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 50
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 25 1 5 10 15
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
 20 25 30
 <210> 51
 <211> 30
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
 1 5 10 15
 35 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
 20 25 30
 <210> 52
 <211> 30
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 52

ES 2 656 442 T3

Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys
1 5 10 15
Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
20 25 30

5 <210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 53

10 Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly
1 5 10 15
Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val
20 25 30
<210> 54

15 <211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 54

Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
20 1 5 10 15
Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu
20 25 30
<210> 55
<211> 30

25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55

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

30 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
20 25 30
<210> 56
<211> 30
<212> PRT

35 <213> Homo sapiens
<400> 56

Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
40 20 25 30
<210> 57

ES 2 656 442 T3

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 5 Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
 1 5 10 15
 Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 20 25 30
 <210> 58
 10 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 15 1 5 10 15
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
 20 25 30
 <210> 59
 <211> 30
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 1 5 10 15
 25 His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
 20 25 30
 <210> 60
 <211> 30
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 1 5 10 15
 Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 35 20 25 30
 <210> 61
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 61
 Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys

ES 2 656 442 T3

1 5 10 15
 Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
 20 25 30
 <210> 62
 5 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
 10 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
 20 25 30
 <210> 63
 <211> 30
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 63
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 20 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
 20 25 30
 <210> 64
 <211> 30
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 64
 Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
 30 20 25 30
 <210> 65
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 65
 Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 20 25 30
 40 <210> 66
 <211> 30

ES 2 656 442 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 66
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 5 1 5 10 15
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val
 20 25 30
 <210> 67
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 67
 Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 15 Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
 20 25 30
 <210> 68
 <211> 30
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 68
 Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 25 20 25 30
 <210> 69
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 69
 Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys
 20 25 30
 35 <210> 70
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 70
 40 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys
 1 5 10 15

ES 2 656 442 T3

Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile
20 25 30

<210> 71
<211> 30

5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 71

Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
1 5 10 15

10 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
20 25 30

<210> 72
<211> 30
<212> PRT

15 <213> Homo sapiens
<400> 72

Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
1 5 10 15

Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
20 25 30

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 73

Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
1 5 10 15

Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
20 25 30

30 <210> 74
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 74

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

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
20 25 30

<210> 75

40 <211> 30
<212> PRT

ES 2 656 442 T3

```

<213> Homo sapiens
<400> 75
Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile
1           5           10           15
5 Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
      20           25           30
<210> 76
<211> 30
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
    <400> 76
Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly
1           5           10           15
Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
15           20           25           30
<210> 77
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 77
Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser
1           5           10           15
Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys
      20           25           30
25 <210> 78
    <211> 30
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 78
30 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
    1           5           10           15
    Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
      20           25           30
    <210> 79
35 <211> 30
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 79
Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp
40 1           5           10           15
    Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu

```


ES 2 656 442 T3

20 25 30
 <210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 80
 Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
 1 5 10 15
 Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 10 20 25 30
 <210> 81
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 81
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 1 5 10 15
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
 20 25 30
 20 <210> 82
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 82
 25 Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 1 5 10 15
 His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
 20 25 30
 <210> 83
 30 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 83
 Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
 35 1 5 10 15
 Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
 20 25 30
 <210> 84
 <211> 30
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 656 442 T3

<400> 84
 Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 5 20 25 30
 <210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 85
 Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 20 25 30
 15 <210> 86
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 86
 20 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 20 25 30
 <210> 87
 25 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 30 1 5 10 15
 Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
 20 25 30
 <210> 88
 <211> 31
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 Cys Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 20 25 30

ES 2 656 442 T3

<210> 89
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 89
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 1 5 10 15
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala
 20 25 30
 10 <210> 90
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 15 Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
 20 25 30
 <210> 91
 20 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys
 25 1 5 10 15
 Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 20 25 30
 <210> 92
 <211> 30
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92
 Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile
 1 5 10 15
 35 Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys
 20 25 30
 <210> 93
 <211> 30
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 93

ES 2 656 442 T3

Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu
 1 5 10 15
 Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr
 20 25 30
 5 <210> 94
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 94
 10 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 1 5 10 15
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp
 20 25 30
 <210> 95
 15 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 95
 Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His
 20 1 5 10 15
 Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His
 20 25 30
 <210> 96
 <211> 30
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 96
 Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
 1 5 10 15
 30 Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 20 25 30
 <210> 97
 <211> 30
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 97
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
 1 5 10 15
 Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala
 40 20 25 30
 <210> 98

ES 2 656 442 T3

```

<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 98
5   Lys His Gln Pro Gly Gly Gly
    1             5
    <210> 99
    <211> 7
    <212> PRT
10  <213> Homo sapiens
    <400> 99
    Lys His Val Pro Gly Gly Gly
    1             5
    <210> 100
15  <211> 7
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 100
    His His Lys Pro Gly Gly Gly
20  1             5
    <210> 101
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
25  <400> 101
    Thr His Val Pro Gly Gly Gly
    1             5
    <210> 102
    <211> 441
30  <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 102
    Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
    1             5             10             15
35  Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
    20             25             30
    Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
    35             40             45
    Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
40  50             55             60
    Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

```

ES 2 656 442 T3

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

ES 2 656 442 T3

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 5 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440
 <210> 103
 <211> 412
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 103
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 15 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 20 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95
 Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 25 100 105 110
 Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 115 120 125
 Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140
 30 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 35 180 185 190
 Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 210 215 220
 40 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240

ES 2 656 442 T3

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 260 265 270
 5 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 10 305 310 315 320
 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 325 330 335
 Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 340 345 350
 15 Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 355 360 365
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 370 375 380
 Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
 20 385 390 395 400
 Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410
 <210> 104
 <211> 410
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 104
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 30 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 35 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 40 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

ES 2 656 442 T3

	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val	
					115				120					125			
	Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	
		130					135					140					
5	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	
	145						150				155					160	
	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	
					165					170					175		
	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	
10				180					185					190			
	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	
		195						200					205				
	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	
		210					215					220					
15	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	
	225					230				235					240		
	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	
				245					250				255				
	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	
20				260					265				270				
	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	
		275					280					285					
	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	
		290					295					300					
25	Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	
	305					310				315					320		
	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	
				325					330				335				
	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	
30				340					345				350				
	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly	Ala	Glu	Ile	Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	
		355					360					365					
	Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro	Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	
		370					375					380					
35	Ser	Ile	Asp	Met	Val	Asp	Ser	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	Leu	Ala	Asp	Glu	
	385					390				395					400		
	Val	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu							
				405					410								
	<210>	105															
40	<211>	383															
	<212>	PRT															

ES 2 656 442 T3

<213> Homo sapiens

<400> 105

	Met	Ala	Glu	Pro	Arg	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Met	Glu	Asp	His	Ala	Gly
	1				5					10					15	
5	Thr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Asp	Arg	Lys	Asp	Gln	Gly	Gly	Tyr	Thr	Met	His
				20					25					30		
	Gln	Asp	Gln	Glu	Gly	Asp	Thr	Asp	Ala	Gly	Leu	Lys	Ala	Glu	Glu	Ala
				35				40					45			
	Gly	Ile	Gly	Asp	Thr	Pro	Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val
10		50					55					60				
	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp
	65					70				75					80	
	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro
					85					90					95	
15	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg
					100					105					110	
	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly
					115					120					125	
	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser
20		130						135					140			
	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro
	145					150					155				160	
	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys
					165					170					175	
25	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met
					180					185					190	
	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu
					195					200					205	
	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu
30		210						215					220			
	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys
	225					230					235				240	
	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp
					245					250					255	
35	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His
					260					265					270	
	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe
					275					280					285	
	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	His
40		290						295					300			
	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr	His	Lys	Leu	Thr	Phe

ES 2 656 442 T3

305 310 315 320
 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
 325 330 335
 Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
 5 340 345 350
 Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
 355 360 365
 Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380
 10 <210> 106
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 106
 15 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 20 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 25 Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95
 Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 100 105 110
 Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 30 115 120 125
 Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140
 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 35 Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190
 Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 40 195 200 205
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu

ES 2 656 442 T3

210 215 220
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
 5 245 250 255
 Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
 275 280 285
 10 Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
 290 295 300
 Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
 305 310 315 320
 Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
 15 325 330 335
 Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
 340 345 350
 Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
 355 360 365
 20 Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380
 <210> 107
 <211> 352
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 107
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 30 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60
 35 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95
 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 40 100 105 110
 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly

ES 2 656 442 T3

	115	120	125
	Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser		
	130	135	140
	Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro		
5	145	150	155
	Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys		
	165	170	175
	Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met		
	180	185	190
10	Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu		
	195	200	205
	Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val		
	210	215	220
	Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His		
15	225	230	235
	His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp		
	245	250	255
	Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr		
	260	265	270
20	His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr		
	275	280	285
	Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val		
	290	295	300
	Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser		
25	305	310	315
	Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu		
	325	330	335
	Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu		
	340	345	350
30	<210> 108		
	<211> 12		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético		
	<400> 108		
	Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser		
	1	5	10
	<210> 109		
40	<211> 29		
	<212> PRT		

ES 2 656 442 T3

<213> Homo sapiens
 <400> 109
 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 1 5 10 15
 5 His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu
 20 25
 <210> 110
 <211> 30
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 15 20 25 30
 <210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 111
 Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 1 5 10
 <210> 112
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112
 Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 1 5 10
 30 <210> 113
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113
 35 Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys
 1 5
 <210> 114
 <211> 29
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 114

ES 2 656 442 T3

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
1 5 10 15

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
20 25

- 5 <210> 115
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 115
- 10 Val Gln Ile Val Tyr Lys
1 5
<210> 116
<211> 6
<212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens
<400> 116
Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5
<210> 117
- 20 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
- 25 <400> 117
Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10
<210> 118
<211> 3
- 30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 118
- 35 Trp Ala Ser
1
<210> 119
<211> 8
<212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 119
 Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 5 <210> 120
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 120
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Val Ile Ser
 1 5 10
 <210> 121
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 20 <400> 121
 Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 122
 <211> 13
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 122
 30 Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 123
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> Virus de la gripe A
 <400> 123
 Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10
 40 <210> 124
 <211> 13

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 124

10 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10
 <210> 125
 <211> 16
 <212> PRT

15 <213> Plasmodium falciparum
 <400> 125
 Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val
 1 5 10 15
 <210> 126

20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus de la Hepatitis B
 <400> 126
 Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

25 1 5 10
 <210> 127
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> Descripción de desconocido: proteína de choque térmico 65
 <400> 127
 Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Leu Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly

35 1 5 10 15
 Asn Glu Gly
 <210> 128
 <211> 14

40 <212> PRT
 <213> Mycobacterium bovis

ES 2 656 442 T3

<400> 128
 Gln Val His Phe Gln Pro Leu Pro Pro Ala Val Val Lys Leu
 1 5 10
 <210> 129
 5 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

 <400> 129
 10 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15
 <210> 130
 <211> 21
 <212> PRT
 15 <213> Clostridium tetani
 <400> 130
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser His Leu Glu
 20 20
 <210> 131
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 25 <400> 131
 Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala
 1 5 10 15
 <210> 132
 <211> 29
 30 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 132
 35 acattgtgat gtcacagtct ccatactcc 29
 <210> 133
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 133
ctcctccaat tgcagcagtc tgg 23
<210> 134
<211> 10
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 134
10 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser
1 5 10
<210> 135
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
<400> 135
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu
20 1 5 10
<210> 136
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
<400> 136
ggaattcggtt gaagctcttg acaatgggtg 30
<210> 137
30 <211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
35 <400> 137
ggaattcaca tatgcaaggc ttacaaccac 30
<210> 138
<211> 120
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 656 442 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 138

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

<210> 139

20 <211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

40 <210> 140

<211> 120

ES 2 656 442 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <400> 140

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

10 Val Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

15 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

20 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 141

<211> 112

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 141

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly

30 1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

40 85 90 95

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys

ES 2 656 442 T3

	100	105	110
	<210> 142		
	<211> 112		
	<212> PRT		
5	<213> Homo sapiens		
	<400> 142		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
	1	5	10
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser		
10	20	25	30
	Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35	40	45
	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
	50	55	60
15	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65	70	75
	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln		
	85	90	95
	Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
20	100	105	110
	<210> 143		
	<211> 112		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético		
	<400> 143		
	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
	1	5	10
30	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
	20	25	30
	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35	40	45
	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
35	50	55	60
	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65	70	75
	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln		
	85	90	95
40	Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100	105	110

- <210> 144
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 144
 Ala Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
- 10 <210> 145
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 145
- 15 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
- 25 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
- 30 <210> 146
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 146
 Asp Ala Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
- 40 <210> 147
 <211> 120

ES 2 656 442 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <400> 147

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

10 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

15 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

20 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 148

<211> 120

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 148

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

30 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

35 Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

40 85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

ES 2 656 442 T3

	100	105	110
	Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	115	120	
	<210> 149		
5	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético		
10	<400> 149		
	Asp Asn Ala Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser		
	1	5	10
	<210> 150		
	<211> 112		
15	<212> PRT		
	<213> Mus sp.		
	<400> 150		
	Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly		
	1	5	10
20	Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser		
	20	25	30
	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
	35	40	45
	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
25	50	55	60
	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
	65	70	75
	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln		
	85	90	95
30	Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
	100	105	110
	<210> 151		
	<211> 11		
	<212> PRT		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético		
	<400> 151		
	Asp Asn Ile Ala His Val Pro Gly Gly Gly Ser		
40	1	5	10
	<210> 152		

ES 2 656 442 T3

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 152

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

10 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

20 100 105 110

<210> 153

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 153

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

1 5 10 15

30 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

35 50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

40 Ser Phe Tyr Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 154
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 154
 His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 155
 <211> 29
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 155
 15 atattaccat ggacattgtg atgtcacag 29
 <210> 156
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 156
 atattattct cgagggagac ggtgactgag gt 32
 <210> 157
 25 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 30 <400> 157
 ggcggcggcg gctccggtgg tgggtggttcc atgcagggtcc aattgcagca g 51
 <210> 158
 <211> 69
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 158
 ggagccgccg ccgccagaac caccaccacc agaaccacca ccaccccggtt tgatgtccag 60
 40 cttggtgcc 69
 <210> 159

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 159
 Asp Asn Ile Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 160
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 15 <400> 160
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 20 <210> 161
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 161
 Asp Asn Ile Lys His Ala Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 162
 30 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 35 <400> 162
 Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu
 1 5 10 15
 <210> 163
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: 6xHis tag sintética
 <400> 163
 His His His His His His
 5 1 5
 <210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)

15 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 164
 His Xaa Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 165

20 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

25 <400> 165
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacctggct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 30 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatcct 300
 cggacgttcg gtggaggcac caagctggac atcaaa 336
 <210> 166
 <211> 301
 <212> DNA

35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 166
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
 40 atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacctggct 120
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

ES 2 656 442 T3

	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc tttttatctt	300
	c	301
	<210> 167	
5	<211> 301	
	<212> DNA	
	<213> Mus sp.	
	<400> 167	
	gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact	60
10	atgagctgca aatccagtc gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct	120
	tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
	gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt	300
	c	301
15	<210> 168	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 168	
	ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaca tcaaac	36
	<210> 169	
	<211> 36	
25	<212> DNA	
	<213> Mus sp.	
	<400> 169	
	ggacgttcgg tggaggcacc aagctggaaa tcaaac	36
	<210> 170	
30	<211> 360	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
35	<400> 170	
	caggtccaat tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg	60
	ccctgtaagg cttctggata catattcact gactatgtca taagctgggt gaagcagaga	120
	actggacagg gccttgagtg gattggagag atttttccta gaagtggtag tacttactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac	240
40	atgcagctca gcagcgtgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagagattac	300
	tacggtactt catttgctat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca	360

ES 2 656 442 T3

<210> 171
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 171
 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 10 <210> 172
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 172
 cagggtccaat tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg 60
 ccctgtaagg cttctggata catattcact gactatgtca taagctgggt gaagcagaga 120
 actggacagg gccttgagtg gattggagag atttttccta gaagtggtag tacttactac 180
 20 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcgtgac atctgaggac tctgcgggtct atttctgtgc aaga 294
 <210> 173
 <211> 294
 <212> DNA
 25 <213> Mus sp.
 <400> 173
 cagggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggccttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agctatggta taagctgggt gaagcagaga 120
 actggacagg gccttgagtg gattggagag atttataccta gaagtggtaa tacttactac 180
 30 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcgggtct atttctgtgc aaga 294
 <210> 174
 <211> 14
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 174
 gattactacg gtac 14
 40 <210> 175
 <211> 15

ES 2 656 442 T3

	<212> ADN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 175	
	gactactata ggtac	15
5	<210> 176	
	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 176	
	ttcatttgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct cag	53
	<210> 177	
	<211> 53	
15	<212> ADN	
	<213> Mus sp.	
	<400> 177	
	ttactatgct atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct cag	53
	<210> 178	
20	<211> 267	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
25	<400> 178	
	gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg	60
	gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaggt	120
	ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca	180
	gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcacgtt gaccaaggac gagtatgaac	240
30	gacataacag ctatacctgt gaggcca	267
	<210> 179	
	<211> 276	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
	<400> 179	
	ccaaaacgac acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc caaactaact	60
	ccatggtgac cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgcacct	120
40	ggaactctgg atccctgtcc agcgggtgtgc acaccttccc agctgtcctg cagtctgacc	180
	tctacactct gagcagctca gtgactgtcc cctccagcac ctggcccagc gagaccgtca	240

ES 2 656 442 T3

	cctgcaacgt tgcccacccg gccagcagca ccaagg	276
	<210> 180	
	<211> 305	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 180	
	gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
	atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct	120
	tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg	180
10	gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc	240
	atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact	300
	cctcc	305
	<210> 181	
	<211> 38	
15	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 181	
	gtggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaac	38
	<210> 182	
20	<211> 296	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 182	
	caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc	60
25	tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tccttggtat agcaaactac	180
	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaaca aatccacgag cacagcctac	240
	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaga	296
	<210> 183	
30	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 183	
	ctgagctgag aaccactgtg ctaactgggg acacagtgat tggcagctct a	51
35	<210> 184	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 184	
40	Cys Thr His Val Pro Gly Gly Gly	
	1 5	

ES 2 656 442 T3

<210> 185
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 185
 tgatgctttt gatgtctggg gccaaaggac aatggtcacc gtctcttcag 50
 <210> 186
 <211> 357
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 186
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 15 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 20 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 25 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 30 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 35 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 40 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

ES 2 656 442 T3

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 5 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 10 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 15 Lys Ile Gly Ser Leu
 355
 <210> 187
 <211> 235
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 187
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 25 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 30 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 35 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 40 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

ES 2 656 442 T3

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 5 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Thr Arg Leu Ala Asp
 210 215 220
 Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 10 225 230 235
 <210> 188
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 188
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 25 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 30 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 35 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 40 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

ES 2 656 442 T3

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 5 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 10 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
 305 310 315 320
 15 Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
 325 330 335
 Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 340 345
 <210> 189
 20 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 189
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 25 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 30 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 35 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 40 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

ES 2 656 442 T3

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 5 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 10 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 15 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 20 290 295 300
 Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
 325 330 335
 25 Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
 340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 30 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 35 Ile Asp Met Val
 420
 <210> 190
 <211> 227
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 190

ES 2 656 442 T3

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
5 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
10 65 70 75 80
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110
15 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
20 145 150 155 160
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190
25 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220
Lys Val Ala
30 225
<210> 191
<211> 428
<212> PRT
<213> Homo sapiens
35 <400> 191
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30
40 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

ES 2 656 442 T3

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

ES 2 656 442 T3

370 375 380
 Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 385 390 395 400
 Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
 5 405 410 415
 Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 420 425
 <210> 192
 <211> 297
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 192
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 15 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 20 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 25 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 30 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 35 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 40 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys

ES 2 656 442 T3

225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 5 260 265 270
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 275 280 285
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 290 295
 10 <210> 193
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 193
 15 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 20 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 25 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 30 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly
 130 135
 <210> 194
 <211> 282
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 194
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 40 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

ES 2 656 442 T3

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 5 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 10 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 15 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 20 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 25 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 30 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
 275 280
 <210> 195
 <211> 406
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 195
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 40 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30

ES 2 656 442 T3

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

ES 2 656 442 T3

355 360 365
 Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met
 370 375 380
 Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser
 5 385 390 395 400
 Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405
 <210> 196
 <211> 222
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 196
 Met Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser
 1 5 10 15
 15 Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro
 20 25 30
 Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
 35 40 45
 His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
 20 50 55 60
 Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 65 70 75 80
 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
 85 90 95
 25 Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
 100 105 110
 Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
 115 120 125
 Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
 30 130 135 140
 Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 145 150 155 160
 Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
 165 170 175
 35 Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val
 180 185 190
 Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
 195 200 205
 Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 40 210 215 220
 <210> 197

ES 2 656 442 T3

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 197

```

5  Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala
   1              5              10              15
   Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala
               20              25              30
   Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys
10              35              40              45
   Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys
       50              55              60
   Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro
   65              70              75              80
15  Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
               85              90              95
   Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser
               100             105             110
   Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys
20              115             120             125
   Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
       130             135             140
   Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn
   145             150             155             160
25  Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly
               165             170             175
   Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val
               180             185             190
   Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly
30              195             200             205
   Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val
       210             215             220
   Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly
   225             230             235             240
35  Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala
               245             250             255
   Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val
               260             265             270
   Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr
40              275             280             285
   Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp

```

ES 2 656 442 T3

290 295 300
 Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 305 310 315
 <210> 198
 5 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 198
 Met Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys
 10 1 5 10 15
 Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn
 20 25 30
 Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys
 35 40 45
 15 Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
 50 55 60
 Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys
 65 70 75 80
 Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
 20 85 90 95
 <210> 199
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 199
 Met Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln
 1 5 10 15
 Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr
 20 25 30
 30 Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr
 35 40 45
 Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro
 50 55 60
 Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val
 35 65 70 75 80
 Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr
 85 90 95
 Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly
 100 105 110
 40 Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile
 115 120 125

ES 2 656 442 T3

```

Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser
    130                      135                      140
Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val
145                      150                      155                      160
5  Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
    165                      170                      175
Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
    180                      185                      190
Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
10                      195                      200                      205
Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
    210                      215                      220
His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
225                      230                      235                      240
15  Ala Glu

<210> 200
<211> 10
<212> PRT
20  <213> Homo sapiens
    <400> 200
    Asn Ile Lys Ala Val Pro Gly Gly Gly Ser
    1                      5                      10
    <210> 201
25  <211> 10
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 201
    Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
30  1                      5                      10
    <210> 202
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
35  <400> 202
    Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
    1                      5
    <210> 203
    <211> 9
40  <212> PRT
    <213> Homo sapiens

```


<400> 203
 Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
 1 5
 <210> 204
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 204
 His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 10 1 5
 <210> 205
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 205
 Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln
 1 5
 <210> 206
 <211> 31
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 206
 25 Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn
 1 5 10 15
 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro
 20 25 30
 <210> 207
 30 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 35 <400> 207
 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
 20 25 30
 40 <210> 208
 <211> 30

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Fosfo-Ser
 <400> 208

10 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
 20 25 30
 <210> 209

15 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 209
 Cys Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro

20 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 20 25 30
 <210> 210
 <211> 30

25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <220>

30 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> fosfo-Ser
 <400> 210
 Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly

35 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 20 25 30
 <210> 211
 <211> 30

40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 442 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 211
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 5 1 5 10 15
 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 20 25 30
 <210> 212
 <211> 30
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> fosfo-Ser
 <400> 212
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 20 1 5 10 15
 Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 20 25 30
 <210> 213
 <211> 31
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 213
 30 Cys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser
 1 5 10 15
 Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 20 25 30
 <210> 214
 35 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 40 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 656 442 T3

<222> (4)..(4)
 <223> fosfo-Ser
 <400> 214
 Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 5 1 5 10 15
 Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
 20 25 30
 <210> 215
 <211> 31
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 215
 15 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 1 5 10 15
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val
 20 25 30
 <210> 216
 20 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 25 <400> 216
 Cys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser
 1 5 10 15
 Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser
 20 25 30
 30 <210> 217
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 217
 Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr
 1 5 10 15
 Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
 40 20 25 30
 <210> 218

ES 2 656 442 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 218
 Cys Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 219
 10 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 15 <400> 219
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 1 5 10 15
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 20 25
 20 <210> 220
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 220
 25 Cys His His Lys Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 221
 <211> 30
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 221
 Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val
 35 1 5 10 15
 Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
 20 25 30
 <210> 222
 <211> 30
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 656 442 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 222

Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser

5 1 5 10 15

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His

20 25 30

<210> 223

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 223

His Gln Pro Gly Gly Gly

1 5

15 <210> 224

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 224

20 His Lys Pro Gly Gly Gly

1 5

<210> 225

<211> 104

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 225

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys

1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn

30 20 25 30

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

35 40 45

Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile

50 55 60

35 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu

65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile

85 90 95

Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn

40 100

<210> 226

ES 2 656 442 T3

<211> 104

<212> PRT

<213> Pan sp.

<400> 226

```

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

```

<210> 227

20 <211> 104

<212> PRT

<213> Macaca sp.

<400> 227

```

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

```

<210> 228

<211> 104

40 <212> PRT

<213> Desconocido

ES 2 656 442 T3

<220>

<223> Descripción de desconocido: Polipéptido tau de gibón

<400> 228

```

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

```

<210> 229

<211> 104

20 <212> PRT

<213> Pongo sp.

<400> 229

```

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

```

<210> 230

<211> 104

<212> PRT

40 <213> Ailuropoda melanoleuca

<400> 230

ES 2 656 442 T3

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 5 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 10 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 15 <210> 231
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Sus sp.
 <400> 231
 20 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45
 25 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 30 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 <210> 232
 35 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Equus sp.
 <400> 232
 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 40 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn

ES 2 656 442 T3

20 25 30
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 5 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 10 Thr His Val Pro Gly Gly Gly His
 100
 <210> 233
 <211> 104
 <212> PRT
 15 <213> Canis lupus
 <400> 233
 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 20 25 30
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 25 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 30 100
 <210> 234
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 35 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido tau de conejo
 <400> 234
 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 40 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30

ES 2 656 442 T3

```

Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
      35                      40                      45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
      50                      55                      60
5  His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
   65                      70                      75                      80
Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
      85                      90                      95
Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
10
    100
<210> 235
<211> 104
<212> PRT
<213> Rattus sp.
15
<400> 235
Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1      5      10      15
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
      20      25      30
20 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
    35                      40                      45
Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
    50                      55                      60
His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
25  65                      70                      75                      80
Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
      85                      90                      95
Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
    100
30
<210> 236
<211> 104
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
35
<223> Descripción de desconocido: Polipéptido tau de campañol
<400> 236
Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1      5      10      15
Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
40  20      25      30
Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

```

ES 2 656 442 T3

35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 5 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 10 <210> 237
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 237
 15 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 20 35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 25 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 <210> 238
 30 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Descripción de desconocido: polipéptido tau de ardilla de tierra
 35
 <400> 238
 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 40 20 25 30
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro

ES 2 656 442 T3

35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 5 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 10 <210> 239
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Bos sp.
 <400> 239
 15 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 20 35 40 45
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 25 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 85 90 95
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 <210> 240
 30 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Polipéptido tau de ave de corral
 35 <400> 240
 Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
 1 5 10 15
 Lys Leu Asp Phe Ser Ser Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 40 Ile Lys His Ile Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 35 40 45

ES 2 656 442 T3

Val Asp Leu Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
65 70 75 80

5 Asp Phe Lys Asp Lys Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Ser His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

<210> 241

10 <211> 104
<212> PRT
<213> Desconocido
<220>
<223> Descripción de desconocido: Polipéptido tau de pinzón

15 <400> 241

Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys
1 5 10 15

Lys Leu Asp Phe Ser Ser Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

20 Ile Lys His Ile Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
35 40 45

Val Asp Leu Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
50 55 60

His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
25 65 70 75 80

Asp Phe Lys Asp Lys Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
85 90 95

Ser His Val Pro Gly Gly Gly Asn
100

30 <210> 242
<211> 102
<212> PRT
<213> Danio rerio
<400> 242

35 Asn Ile Lys His Ala Pro Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Leu Asp Gln
1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Thr Asn Val Gln Ala Arg Cys Gly Ser Lys Asp Asn
20 25 30

Leu Lys His Val Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Leu His Lys Lys
40 35 40 45

Ile Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Leu

ES 2 656 442 T3

50 55 60
 Arg His Lys Pro Gly Gly Gly Asn Ile Glu Ile Arg Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 Asp Phe Lys Ala Gln Ser Lys Ile Gly Ser Met Asp Asn Ile Lys His
 5 85 90 95
 Thr Pro Gly Gly Gly Asn
 100
 <210> 243
 <211> 103
 10 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*
 <400> 243
 Asn Ile Arg His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val His Lys
 1 5 10 15
 15 Lys Val Asp Leu Gly Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn
 20 25 30
 Leu Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ala Ile Gln Ile Thr His Lys Pro
 35 40 45
 Ile Asp Leu Thr Arg Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Phe Val Asn Ile
 20 50 55 60
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Asn Val Glu Leu Lys Ser Glu Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Phe Asp Lys Ile Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Val Thr
 85 90 95
 25 His Val Pro Gly Gly Gly Ala
 100
 <210> 244
 <211> 101
 <212> PRT
 30 <213> *Drosophila sp.*
 <400> 244
 Asn Ala Thr Tyr Lys Pro Gly Gly Gly His Val Lys Ile Glu Ser Lys
 1 5 10 15
 Lys Ile Asp Ile Lys Ala Ala Pro Arg Ile Glu Ala Lys Asn Asp Lys
 35 20 25 30
 Tyr Met Pro Lys Gly Gly Glu Lys Lys Ile Val Thr Thr Lys Leu Gln
 35 40 45
 Trp Asn Ala Lys Ser Lys Ile Gly Ser Leu Glu Asn Ala Ala His Lys
 50 55 60
 40 Pro Gly Gly Gly Asp Lys Lys Ile Glu Thr Leu Lys Met Asp Phe Lys
 65 70 75 80

ES 2 656 442 T3

Asp Lys Ala Lys Pro Lys Val Gly Ser Thr Ala Asn Val Lys His Gln
 85 90 95
 Pro Gly Gly Gly Asp
 100

5 <210> 245
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>

10 <223> Descripción de desconocido: polipéptido tau de lombriz intestinal
 <400> 245
 Asn His Lys Ala Gly Gly Gly Asn Val Glu Ile Phe Ser Glu Lys Arg
 1 5 10 15
 Leu Tyr Asn Ala Gln Ser Lys Val Gly Ser Leu Lys Asn Ala Thr His
 15 20 25 30
 Val Ala Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Glu Asn Arg Lys Leu Asp Phe
 35 40 45
 Ser Ala Ala Ser Pro Lys Val Gly Ser Lys Thr Asn Tyr Gln Pro Ala
 50 55 60

20 Lys Ser Asp Val Lys Ile Val Ser Glu Lys Leu Thr Trp Gln Ala Lys
 65 70 75 80
 Ser Lys Val Gly Ser Met Asp Asn Ala Ala His Lys Pro Ala Gly Gly
 85 90 95
 Asn

25 <210> 246
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 246
 Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln
 1 5 10 15

35 Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly
 20 25 30
 Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile
 35 40 45
 Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser
 40 50 55 60
 Leu Gly Asn Ile His His Val Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys

ES 2 656 442 T3

	65	70	75	80
	Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser			
	85	90	95	
	Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu			
5	100	105	110	
	Thr			
	<210> 247			
	<211> 12			
10	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
	<400> 247			
15	Gln Ser Leu Leu Ala Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr			
	1	5	10	
	<210> 248			
	<211> 12			
	<212> PRT			
20	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
	<400> 248			
	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ala Thr Arg Lys Asn Tyr			
25	1	5	10	
	<210> 249			
	<211> 12			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
30	<220>			
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
	<400> 249			
	Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Ala			
	1	5	10	
35	<210> 250			
	<211> 12			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético			
	<400> 250			

ES 2 656 442 T3

Gly Trp Ser Ile His Ser Pro Gly Gly Gly Ser Cys
 1 5 10
 <210> 251
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 251

10 Ser Val Phe Gln His Leu Pro Gly Gly Gly Ser Cys
 1 5 10
 <210> 252
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 252

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 20 1 5 10 15
 Ala
 <210> 253
 <211> 3
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 253

30 Ala Ala Ser
 1
 <210> 254
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 254

Ala Gln Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
 40 1 5
 <210> 255

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 255
 Lys Ala Ser Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 256
 10 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 15 <400> 256
 Lys Gln Ala Phe Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 257
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 257
 25 Lys Gln Ser Ala Tyr Leu Arg Thr
 1 5
 <210> 258
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 258
 Lys Gln Ser Phe Ala Leu Arg Thr
 35 1 5
 <210> 259
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 259
 Lys Gln Ser Phe Tyr Ala Arg Thr
 1 5
 <210> 260
 5 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 10 <400> 260
 Lys Gln Ser Phe Tyr Leu Ala Thr
 1 5
 <210> 261
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 261
 20 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Ala Val Ile Ser
 1 5 10
 <210> 262
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 262
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser
 30 1 5 10
 <210> 263
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 263
 Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala
 1 5 10 15
 40 <210> 264
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 5 <400> 264
 Ile Ala Pro Arg Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 265
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 265
 15 Ile Phe Pro Arg Ser Gly Ala Thr
 1 5
 <210> 266
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 266
 Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 25 1 5 10
 <210> 267
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 267
 Ala Arg Asp Ala Tyr Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 35 <210> 268
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 268

ES 2 656 442 T3

Ala Arg Asp Tyr Ala Gly Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 269
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 269

10 Ala Arg Asp Tyr Tyr Ala Thr Ser Phe Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 270
 <211> 12
 <212> PRT

15 <213> Homo sapiens
 <400> 270
 Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys
 1 5 10
 <210> 271

20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 271
 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly

25 1 5
 <210> 272
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 272
 His Gln Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 273
 <211> 5

35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 273
 His Gln Pro Gly Gly
 1 5

40 <210> 274
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 274
 Gln Pro Gly Gly Gly
 5 1 5
 <210> 275
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 275
 Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn
 1 5 10 15
 Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp
 20 25 30
 15 Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser
 35 40
 <210> 276
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 276
 Lys His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 277
 25 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 277
 His Val Pro Gly Gly Gly
 30 1 5
 <210> 278
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 278
 His Val Pro Gly Gly
 1 5
 <210> 279
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 656 442 T3

<400> 279
 Val Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 280
 5 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 280
 Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr
 10 1 5 10 15
 Lys Pro Val
 <210> 281
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 281
 His His Lys Pro Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 282
 20 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 282
 His Lys Pro Gly Gly Gly
 25 1 5
 <210> 283
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 283
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a uno o más epítomos de tau, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
 - i. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 117 y SEC ID nº: 248 para la CDR1 de cadena ligera;
 - ii. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 118 y SEC ID nº: 253 para la CDR2 de cadena ligera;
 - iii. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 119, SEC ID nº: 254, SEC ID nº: 255, SEC ID nº: 257, SEC ID nº: 258, SEC ID nº: 259 y SEC ID nº: 260 para la CDR3 de cadena ligera; y
 - iv. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 120, SEC ID nº: 261 y SEC ID nº: 262 para la CDR1 de cadena pesada;
 - v. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 121, SEC ID nº: 264 y SEC ID nº: 265 para la CDR2 de cadena pesada; y
 - vi. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 122, SEC ID nº: 266, SEC ID nº: 267 y SEC ID nº: 269 para la CDR3 de cadena pesada.
2. Anticuerpo aislado según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Facb, pFc', Fd, Fv o scFv.
3. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho anticuerpo comprende:
 - a) una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende:
 - i. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 117 y SEC ID nº: 248 para la CDR1;
 - ii. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 118 y SEC ID nº: 253 para la CDR2;
 - iii. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 119, SEC ID nº: 254, SEC ID nº: 255, SEC ID nº: 257, SEC ID nº: 258, SEC ID nº: 259 y SEC ID nº: 260 para la CDR3; y
 - b) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende:
 - i. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 120, SEC ID nº: 261 y SEC ID nº: 262 para la CDR1;
 - ii. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 121, SEC ID nº: 264 y SEC ID nº: 265 para la CDR2; y
 - iii. una secuencia seleccionada de entre SEC ID nº: 122, SEC ID nº: 266, SEC ID nº: 267 y SEC ID nº: 269 para la CDR3.
4. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende:
 - a) una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende:
 - i. la secuencia SEC ID nº: 117 para la CDR1;
 - ii. la secuencia SEC ID nº: 118 para la CDR2;
 - iii. la secuencia SEC ID nº: 119 para la CDR3; y
 - b) una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende:
 - iv. la secuencia SEC ID nº: 120 para la CDR1;
 - v. la secuencia SEC ID nº: 121 para la CDR2; y
 - vi. la secuencia SEC ID nº: 122 para la CDR3.
5. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 141 y una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº: 138.
6. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho anticuerpo es seleccionado de entre:

- a) un anticuerpo monoclonal;
 - b) un anticuerpo recombinante;
 - c) un anticuerpo quimérico;
 - d) un anticuerpo humanizado; y
 - 5 e) un fragmento de unión a antígeno o una parte de unión a antígeno de cualquiera de (a) a (d).
7. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal DC8E8, en el que el DC8E8 es un anticuerpo producido por el hibridoma depositado bajo el número de depósito de patente de la American Type Culture Collection PTA-11994.
- 10 8. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho anticuerpo es una versión humanizada del DC8E8, en el que el DC8E8 es un anticuerpo producido por el hibridoma depositado bajo el número de depósito de patente de la American Type Culture Collection PTA-11994.
- 15 9. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho anticuerpo está marcado de manera detectable con uno o más agentes de marcado.
10. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que está ligado a un agente no anticuerpo.
- 20 11. Anticuerpo aislado según la reivindicación 10, en el que dicho anticuerpo ligado a un agente no anticuerpo es un conjugado fármaco anticuerpo (ADC).
- 25 12. Ácido nucleico aislado o ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Vector aislado que comprende el ácido nucleico aislado o los ácidos nucleicos aislados según la reivindicación 12.
- 30 14. Célula hospedadora aislada que comprende el ácido nucleico aislado o los ácidos nucleicos aislados según la reivindicación 12 y/o un vector según la reivindicación 13.
15. Estirpe celular aislada según la reivindicación 14 que expresa el anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 16. Estirpe celular aislada según la reivindicación 15, en la que dicha estirpe celular es el hibridoma depositado bajo el número de depósito de patente de la American Type Culture Collection PTA-11994.
- 40 17. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, ácido nucleico aislado según la reivindicación 12 o célula hospedadora aislada según la reivindicación 14, para su utilización como un fármaco.
18. Anticuerpo aislado según la reivindicación 17, para la utilización en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas.
- 45 19. Composición que comprende por lo menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
20. Composición según la reivindicación 19, que comprende además por lo menos un compuesto o agente seleccionado de entre marcador detectable, hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico o un toxoide derivado de otras bacterias patógenas, albúminas de suero, albúmina de suero bovino, una molécula de inmunoglobulina o fragmento de la misma, tiroglobulina, ovoglobulina, un epítipo de linfocitos T universal, una citocina, una quimiocina, IL-1 a, IL-, IL-2, IL-10, IFN- γ , GM-CSF, MIP1 a, MIP1 B y RANTES.
- 50 21. Composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su utilización como un fármaco para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas.
- 55 22. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 60 23. Artículo de fabricación para una utilización farmacéutica o diagnóstica, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende una disolución o una forma liofilizada del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 65 24. Artículo de fabricación según la reivindicación 23, en el que el recipiente es un componente de un dispositivo o sistema para el suministro del anticuerpo a un sujeto.
25. Dispositivo médico que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el

dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar el anticuerpo mediante por lo menos un modo seleccionado de entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intrarticular, intrabronquial, intrabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebeloso, intracerebroventricular, intratecal, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniano, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, embolada, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

26. Anticuerpo aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su utilización para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas.

27. Anticuerpo aislado para la utilización según la reivindicación 26, en el que dicho anticuerpo es administrado por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, intracerebroventricular, intratecal o como un aerosol.

28. Anticuerpo aislado para la utilización según la reivindicación 26 o 27, en el que dicho anticuerpo es administrado periféricamente a un sujeto humano.

29. Anticuerpo aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que la cantidad de dicho anticuerpo administrado es por lo menos 1 mg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

30. Anticuerpo aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que la cantidad de dicho anticuerpo administrado es por lo menos 10 mg/kg de peso corporal del sujeto, por dosis.

31. Anticuerpo aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en el que dicho anticuerpo es administrado en dosis múltiples, iguales o diferentes, durante un periodo de por lo menos tres meses, preferentemente por lo menos seis meses.

32. Anticuerpo aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, en el que dicho anticuerpo aislado es administrado en combinación con por lo menos un agente de combinación seleccionado de entre: inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas de receptor de NMDA, quelantes de metales de transición, factores de crecimiento, hormonas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), antioxidantes, agentes reductores de lípidos, inhibidores de fosfodiesterasa selectivos, inhibidores de la agregación de tau, inhibidores de proteína cinasas, inhibidores de proteínas de choque térmico, inmunización pasiva y activa antiamiloides, inhibidores de agregación antiamiloides e inhibidores de secretasa.

33. Procedimiento de diagnóstico o cribado *in vitro* de un sujeto respecto a la presencia de la enfermedad de Alzheimer o de una tauopatía relacionada, o para determinar un riesgo del sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada, comprendiendo el procedimiento las etapas siguientes:

a) poner en contacto una célula, un tejido, órgano, fluido, o cualquier otra muestra del sujeto, con una cantidad eficaz de por lo menos un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y

b) determinar la presencia de un complejo que comprende tau patológica y el anticuerpo, en el que la presencia del complejo resulta indicativa de la presencia de la enfermedad de Alzheimer o de una tauopatía relacionada asociada a la presencia de tau patológica.

34. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que la determinación de la presencia de un complejo que comprende tau patológica y el anticuerpo se realiza en un ensayo seleccionado de entre: inmunoensayo competitivo y no competitivo, inmunoprecipitación, ELISA, ensayo de transferencia Western, y ensayo de inmunohistoquímica.

35. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la utilización en un procedimiento para el diagnóstico o el cribado de un sujeto respecto a la presencia de la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada, o para determinar un riesgo del sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o una tauopatía relacionada, mediante formación de imágenes *in vivo*.

FIGURA 1

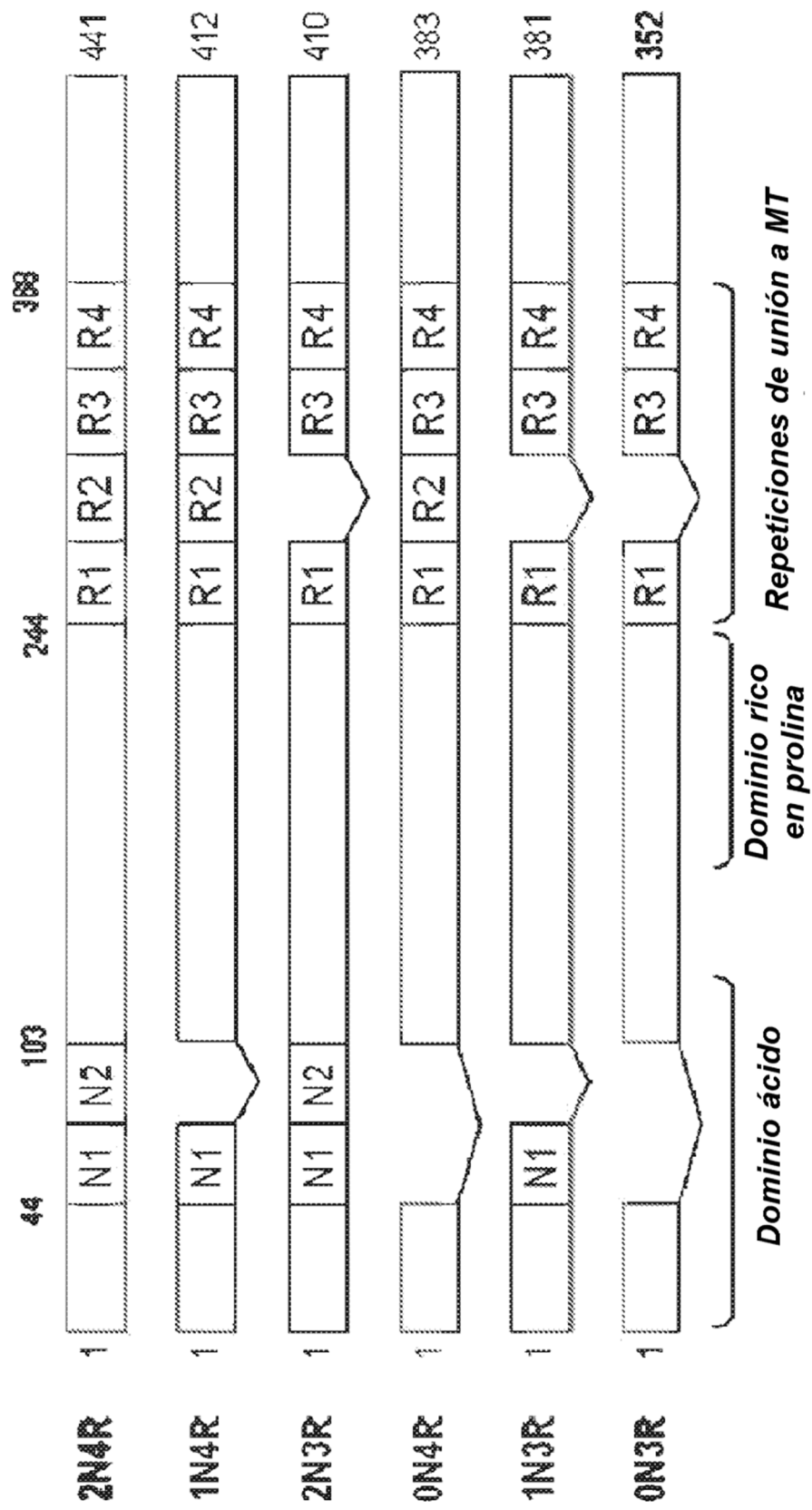


FIGURA 2

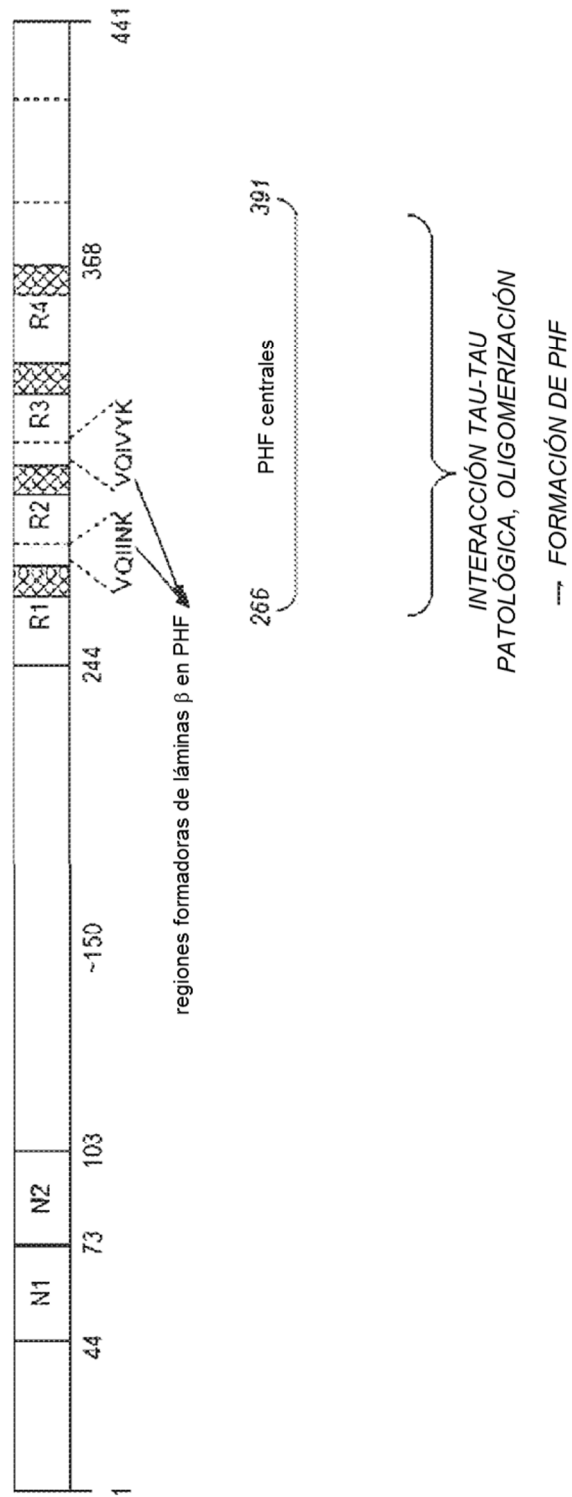


FIGURA 3

A. Secuencia de nucleótidos de cadena ligera variable (VL) de DC8E8:

GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTACAGCAGGAGAGAGGTCACATATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTC
AACAGTAGAACCCGAAAGAACTACCTGGCTTGGTACAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCTAACTGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGG
GAATCTGGGTCCTGATCGCTTACAGGCAGTGATCTGGACAGATTTCACCTCCTCAGCAGTGTGAGGCTGAAGACCTGGCA
CTTTATTACTGCAAGCAATCTTTTATCTTCGGACGTTCTGGTGGAGCACCAAGCTGGACATCAAA

B. Secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable (VL) de DC8E8:

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLA~~WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV~~PD~~RFTGSGSGTDFTLT~~ISSVQAE~~DLA~~
VYYCKQSFYLR~~T~~FGG~~TKLDIK~~

CDR1 : QSLNSRTRKNY

CDR2 : WAS

CDR3 : KQSFYLR~~T~~

C. Alineamiento de la secuencia de (VL) DC8E8 con la secuencia de línea germinal de ratón más cercana IGV8-21*01:

gen V (298/301; identidad de secuencia del 99,0 %):

DC8E8 ligera GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTACAGCAGGAGA

IGKV8 - 21*01 GACATTGTGATGTACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTACAGCAGGAGA

DC8E8 ligera GAAGGTCACTATGAGCTGCAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAA

IGKV8 - 21*01 GAAGGTCACTATGAGCTGCAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAA

DC8E8 ligera CCCGAAAGAACTACCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCT

IGKV8 - 21*01 CCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGGCAGTCTCCT

DC8E8 ligera AAACGTGTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG

IGKV8 - 21*01 AAACGTGTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG

DC8E8 ligera CTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGTG

IGKV8 - 21*01 CTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGTG

DC8E8 ligera TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTTTATCTT
IGKV8-21*01 TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTT

DC8E8 ligera C
IGKV8-21*01 C
*

Gen J (35/36; identidad de secuencia del 97,2 %):

DC8E8 ligera GGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAAGCTGGACATCAAAC
IGKJ1*01 GGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATCAAAC

D. Secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada (VH) de DC8E8:

CAGGTCCAATTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGATGCCCTCTGGATACATATTCACT
GACTATGTCATAAGCTGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGCCCTTGAGTGGATGGAGAGATTTTCTAGAAAGTGGTAGTACTTACTAC
AATGAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACACTGACTGACAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCGTGACATCTGAGGAC
TCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGAGATTACTACGGTACTTCATTGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

E. Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada (VH) de DC8E8:

QVQLQQSGPELVKPGTSVKMPCKASGYIFTDYVISWVKQRTGQGLEWIGEIPFRSGSYINEKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSVTSED
SAVYFCARDYYGTSFAMDYWGQGTSTVTVSS

CDR1: GYIFTDYVIS
CDR2: IFPRSGST
CDR3: ARDYYGTSFAMDY

F. Alineamiento de la secuencia de (VH) de DC8E8 con la secuencia de línea germinal de ratón más cercana IGKV8-81*01:

Gen V (269/294; identidad de secuencia del 91,5 %):

DC8E8 pesada CAGGTCCAATTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTC
IGHV1-81*01 CAGGTTCAAGTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGCGAGGCCCTGGGGCTTC

DC8E8 pesada
IGHV1-81*01
AGTGAAGATGCCCTGTAAAGGCTTCTGGATACATATTCAGTACTATGTCA
AGTGAAGCTGTCTGTCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGCTATGGTA
***** ** ***** ***** ***** ***** *

DC8E8 pesada
IGHV1-81*01
TAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAG
TAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAG
***** ***** ***** ***** ***** *****

DC8E8 pesada
IGHV1-81*01
ATTTTTCCTAGAAAGTGGTAGTACTTACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA
ATTATCCTAGAAAGTGGTAGTACTTACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAA
***** ***** ***** ***** ***** *****

DC8E8 pesada
IGHV1-81*01
GGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCA
GGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCGTACATGGAGCTCC
***** ***** ***** ***** ***** *****

DC8E8 pesada
IGHV1-81*01
GCAGCGTGCACATCTGAGGACTCTGGGCTATTCTGTGCAAGA
GCAGCGTGCACATCTGAGGACTCTGGGCTATTCTGTGCAAGA
***** ***** ***** ***** ***** *****

Gen D (12/15; identidad de secuencia del 80,0 %)

DC8E8 pesada
IGHD2-14*01
GATTACTAC-GGTAC
GACTACTATAGGTAC
** ***** *****

Gen J (50/53; identidad de secuencia del 94,3 %)

DC8E8 pesada
IGHJ4*01
TTCATTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
TTCATTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCC
** * ***** ***** ***** ***** *****

DC8E8 pesada
IGHJ4*01
TCAG
TCAG

G. Secuencia de nucleótidos de la región constante de cadena ligera kappa de DC8E8:

gggctgatgtgcacccaactgtatccatcttccaccatccagtgagcagttaaacatctggaggtgcoctcagtcgtgtgtcttgaaca
acttctaccccaagacatcaatgtcaggtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaaatggcgtcctgaaacagttggactgatacaggaca
gcaagacagcaccctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggagcagtatgaacgacataaacagtatacctgtgaggcca

H. Secuencia de nucleótidos de la región constante de la cadena pesada de DC8E8 CH1:

ccaaaacgacaccccccatctgtctatccactggccccctggatctgtgccccaaactaaactccatgggtgacccctgggatgcctggtcaaagg
gctatttccctgagccagtgacagtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtcctgacc
tctacactctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgttgccccccggccagcagca
ccaagg

FIGURA 4

Gen V (242/301; identidad de secuencia del 80,4 %):

```

DC8E8      GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCCTCGGCTGTGTCTCAGCAGGAGA
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  GACATCGTGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTTGGGCGA
      ***** * ***** ***** ***** ** **
DC8E8      GAAGTCACTATGAGCTGCAAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAA
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  GAGGGCCACCACCACTCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCA
      ** ** *** ** * ***** ***** * * ***** *
DC8E8      CCCGAAAGAACTAGCTGGCTTGGTACCAAGCAGAAACCCAGGGCAGTCTCCT
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  ACAATAAGAACTACTAGCTTGGTACCAAGCAGAAACCCAGGACAGCTCCT
      * ***** * ***** ***** ***** *****
DC8E8      AAAGTGTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  AAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCG
      ** ***** ** ***** ***** ***** *****
DC8E8      CTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGTG
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  ATTCAGTGGCAGCGGCTCTGGACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGCC
      **** ***** ** ***** ***** ***** *****
DC8E8      TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTTTATCTT
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  TGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT
      ***** ***** ***** ***** ***** ** * *
DC8E8      C----
IGKV4-1*01_Homo+sapiens  CCTCC
      *
```

Gen J (30/36; identidad de secuencia del 83,3 %):

```

DC8E8      --GGACCTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGACATCAAAC
IGKV1*01_Homo+sapiens_J-REGION  GTGGACGTTCGGCCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAAC
      ***** ***** ***** ***** *****
```

FIGURA 5

Gen V (219/294; identidad de secuencia del 74,5 %):

```

DC8E8_pesada_V      CAGGTCCAATTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTC
IGHV1-69*10_Homo+sapiens CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGCCTGGGTCCCTC
***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** **
DC8E8_pesada_V      AGTGAAGATGCCCTGTAAAGGCTTCTGGATACATATTCACTGACTATGTCA
IGHV1-69*10_Homo+sapiens AGTGAAGGTCTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGACCTTCAGCAGCTATGCTA
***** * **** ***** ** ***** ** ***** ** ***** *
DC8E8_pesada_V      TAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTCAGTGGATTGGAGAG
IGHV1-69*10_Homo+sapiens TCAGCTGGGTCCGACAGGCCCTGGACAGGGCTTCAGTGGATTGGAGAG
* ***** *** ***** ** ***** ** ***** ** ***** *
DC8E8_pesada_V      ATTTTCTCTAGAAGTGCTAGTACTTACTACATGAGAGTTCAAGGGCAA
IGHV1-69*10_Homo+sapiens ATCATCCCTATCCCTTGGTATAGCAAACTACCCACAGAGTTCCAGGGCAG
** * **** ***** * ***** ***** ***** *****
DC8E8_pesada_V      GGCCACACTGACTGCACACAAATCCGCCACACAGCCTACATGCAGCTCA
IGHV1-69*10_Homo+sapiens AGTCACGATTACCGCGACAAATCCACAGCAGCAGCTACATGGAGCTGA
* *** * ** ** ***** ** * ***** ***** ***** *
DC8E8_pesada_V      GCAGCGTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGA --
IGHV1-69*10_Homo+sapiens GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCGCTGTATTACTGTGCGGAGAGA
***** *** ***** * ** ** ***** ***** *****

```

Gen D (9/14; identidad de secuencia del 64,3 %):

DC8E8 -----GATTACTACGGTAC-----
IGHD7-27*01__Homo+sapiens CTGAGCTGAGAACCACTGTGCTAACTGCGGGACACAGTGATGGCAGCTCT
** ** * * *

DC8E8 -
IGHD7-27*01__Homo+sapiens A

Gen J (35/53; identidad de secuencia del 66,0 %):

DC8E8 TTCATTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCT
IGHJ3*01__Homo+sapiens - - -TGATGCTTTTGATGTCTGGGGCCAGGGACAATGGTCACCGTCTCTT
***** * * * * ***** * * *

DC8E8 CAG
IGHJ3*01__Homo+sapiens CAG

FIGURA 6A

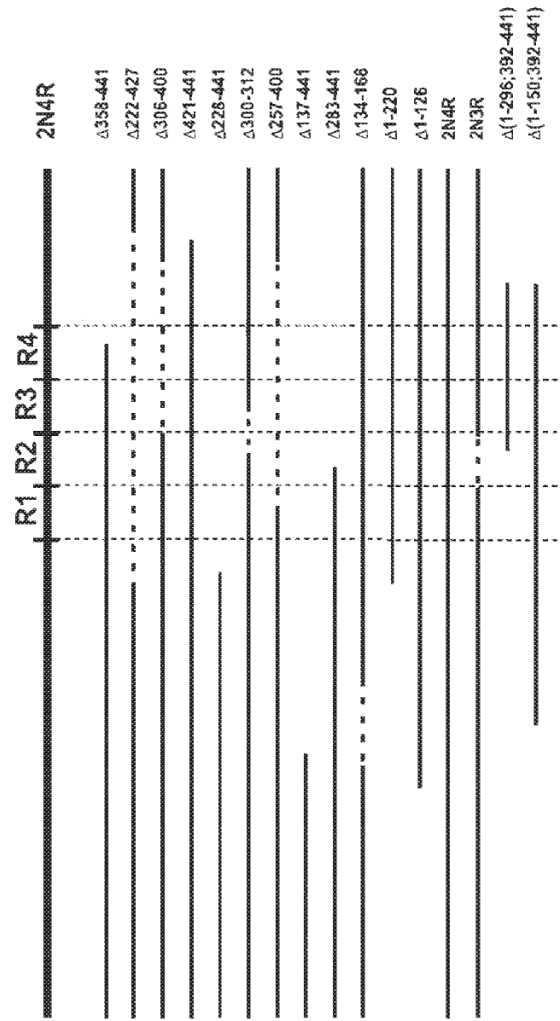


FIGURA 6B

 $\Delta 358-441$

```

1   MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKFDKV QSKIGSL

```

 $\Delta 222-427$

```

1   MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT RLADSVSASL AKQGL

```

 $\Delta 306-400$

```

1   MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGSGDTSR RHLNVSSSTG SIDMVDSPQL ATLADEVSSAS LAKQGL

```

 $\Delta 421-441$

```

1   MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDKFDKV QSKIGSLDNI
361 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKARTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV

```

 $\Delta 228-441$

```

1   MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRs RTPSLPTPPT REPKKVA

```

A300-312

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
 181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNKIHV
 301 DLSKVTSKCG SLGNIHHKPG GGQVEVKSEK LDFKDRVQSK IGSLDNITHV PGGGNKKIET
 361 HKLTTFRENAK AKTDHGAEIV YKSPVVGSDT SPRHLSNVSS TGSIDMVDSP QLATLADEV S
 421 ASLAKQGL

A257-400

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
 181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM PDLKNVGDTS PRHLSNVSS TGSIDMVDSPQ LATLADEVSA SLAKQGL

A137-441

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTG

A283-441

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
 181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR S RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
 241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKSI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KL

A134-168

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGD TD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 61 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
 121 HVTQARMVSK SKDTRIPAKT PPAPKTPPSS GEPPKSGDRS GYSSPGSPGT PGSRSRTPSL
 181 PTPPTREP KK VAVVRTPPKS PSSAKSRLQT APVPM PDLKN VKSKIGSTEN LKHQPGGGKV
 241 QIINKKLDLS NVQSKCGSKD NIKHVPGGGS VQIVYKPV DL SKVTSKCGSL GNIHNKPGGG
 301 QVEVKSEKLD FKDRVQSKIG SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKAK TDHGAEIVYK
 361 SPVVSGDTSP RHLSNVSS TG SIDMVDSPQL ATLADEV SAS LAKQGL

A1-220

1 MREP KK VAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ PGGKVQIIN
 61 KKLDLSNVQS KCGSKDNKIH VPGGGSVQIV YKPV DLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGQVEV
 121 KSEKLD FKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV
 181 SGDTSPRHLS NVSS TGSIDM VDSPQLATLA DEV SAS LAKQ GL

Δ 1-126

```

1  MVSKSKDGTG SDDKRAKAGD GKTKIATPRG AAPPGQKGQA NATRIPAKTP PAPKTPPSSG
61  EPPKSGDRSG YSSPGSPGTP GSRRTPSLP TPPTREPCKV AVVRTPPKSP SSAKSRLQTA
121 PVPMPDLKNV KSKIGSTENL KHQPGGGKVQ IINKKLDLSN VQSKCGSKDN IKHVPGGGSV
181 QIVYKPVDLK KVTSCGSLG NIHHKPGGGQ VEVKSEKLDK KDRVQSKIGS LDNITHVPGG
241 GNKKIETHKL TFRENAKAKT DHGAEIVYKS PVVSGDTSR HLNVSSSTGS IDMVDSPLA
301 TLADEVASL AKQGL

```

4R2N

```

1  MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR RTPSLPTPPT REPCKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQ GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
301 PGGGSVQIVY KPVDSLKVTS KCGSLGNIH KPGGGQVEVK SEKLDKDRV QSKIGSLDNI
361 THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
421 DSPQLATLAD EVASLAKQ L

```

3R2N

```

1  MAEPRQEFV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
61  SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTIPEG TTAEAGIGD TPSLEDEAAG
121 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK
181 TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR RTPSLPTPPT REPCKVAVVR TPPKSPSSAK
241 SRLQTAPVPM PDLKNVSKI GSTENLKHQ GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGLGNIHKK
301 PGGGQVEVKS EKLDKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFRE NAKAKTDHGA
361 IVYKSPVVSG DTSPRHLSN SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

```

Δ (1-296;392-441)

```

1  MIKHVPGGGS VQIVYKPVDL SKVTSKCGSL GNIHHKPGGG QVEVRSEKLD FKDRVQSKIG
61  SLDNITHVPG GGNKKIETHK LTFRENAKAK TDHGA

```

Δ (1-150;392-441)

```

1  MIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
61  SRTPSLPTPP TREPKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVSK IGSTENLKHQ
121 PGGGVQIIN KLDLSNVQS KCGSKDNIH VPGGGSVQIV YKPVDSLKVTSK CGLGNIH
181 HKPGGGQVEV KSEKLDKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGNK KIETHKLTFRE NAKAKTDHG
241 AE

```

Nota

La metionina (M) en la posición 1 en las construcciones de delección de tau Δ 1-220, Δ (1-298;392-441) y Δ (1-150;392-441) no es parte de la secuencia de tau humana natural. Se añadió para proporcionar un codón de partida para la maquinaria de traducción bacteriana.

FIGURA 6C

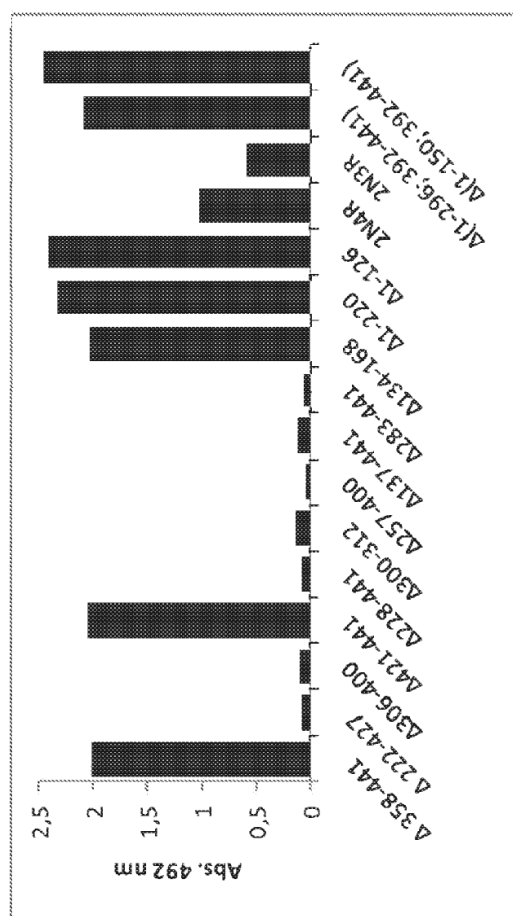


FIGURA 7A

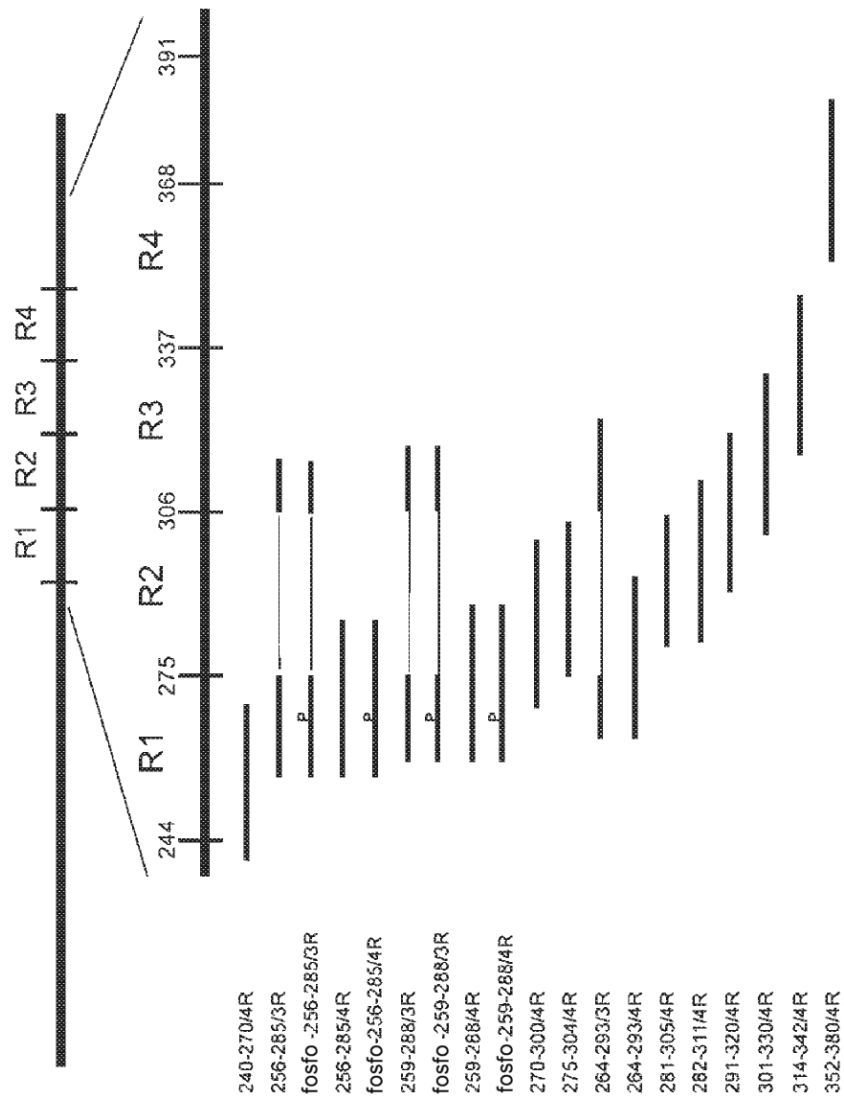


FIGURA 7B

Péptido sintético	Secuencia
240-270/4R	KSRLQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQP
256-285/3R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLS
fosfo 256-285/3R (pSer262)	VKSKIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLS
256-285/4R	VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS
fosfo 256-285/4R (pSer262)	VKSKIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLS
259-288/3R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT
fosfo 259-288/3R (pSer262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVT
259-288/4R	KIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ
fosfo 259-288/4R (pSer262)	KIGpSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQ
270-300/4R	PGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
275-304/4R	VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG
264-293/3R	ENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTSCGGS
264-293/4R	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGS
281-305/4R	KLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG
282-311/4R	LDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK
291-320/4R	CGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVT
301-330/4R	PGGGSVQIVYKPV DLSKVTSCGSLGNIH
314-342/4R	DLSKVTSCGSLGNIHHPGGGQVEVKSE
352-380/4R	SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FREN

FIGURA 7C

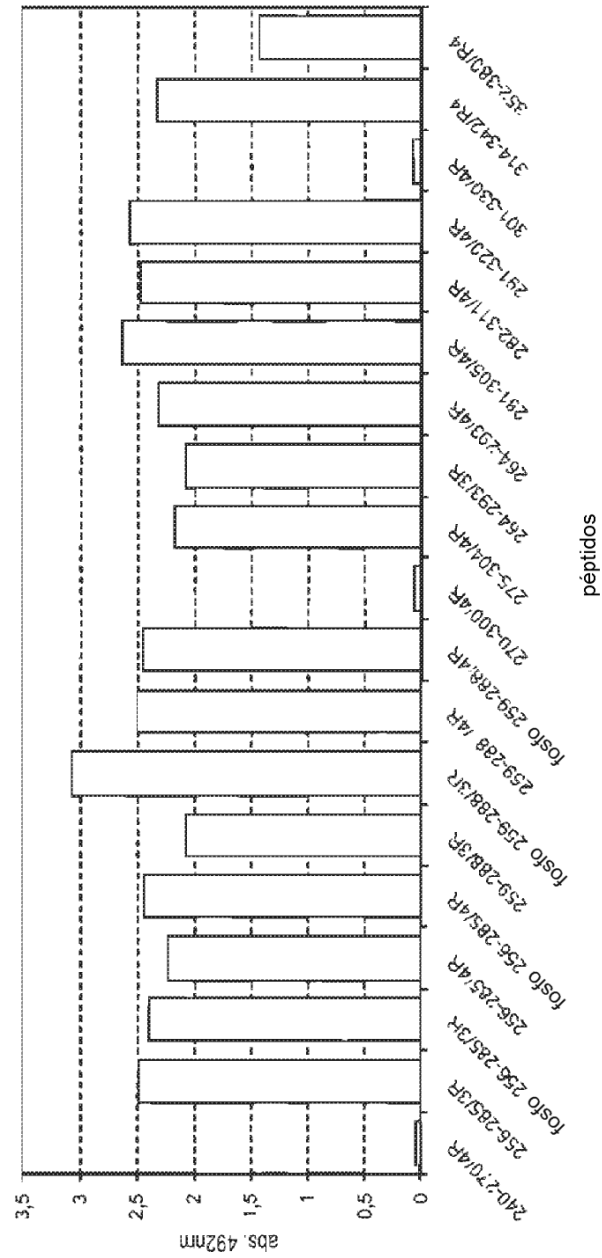


FIGURA 7D

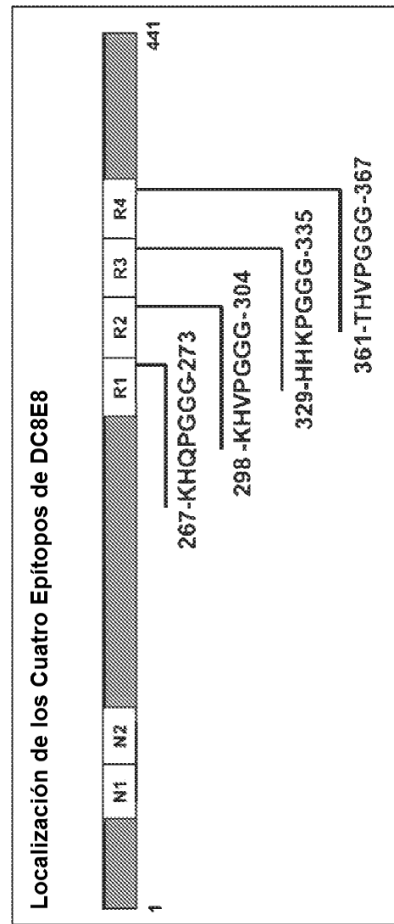


FIGURA 8A

Humano	65-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Chimpancés	72-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Macaco	72-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Gibón	72-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Orangután	54-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Panda_gigante	96-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Cerdo	41-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Caballo	41-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Perro	37-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Conejo	28-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Rata	28-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Campañol	26-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Ratón	26-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Ardilla_terrestre	26-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Vacas	44-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Aves	41-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Pinzón	02-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Pez_cebra	06-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Rana_africana_de_uñas	68-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Mosca_de_la_fruta	57-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Nematodo	69-NLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Humano	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Chimpancés	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Macaco	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Gibón	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Orangután	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Panda_gigante	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Cerdo	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Caballo	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Perro	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Conejo	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Rata	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Campañol	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Ratón	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Ardilla_terrestre	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Vacas	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Aves	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Pinzón	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Pez_cebra	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Rana_africana_de_uñas	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Mosca_de_la_fruta	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD
Nematodo	LSKVTSCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNIKHVPGGGSVQIVYKPVD

FIGURA 8B

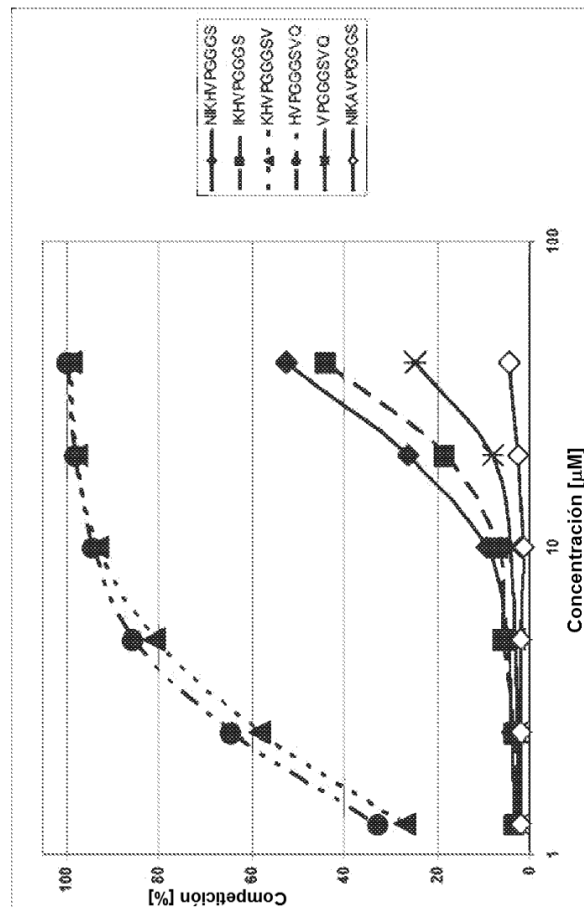


FIGURA 8C

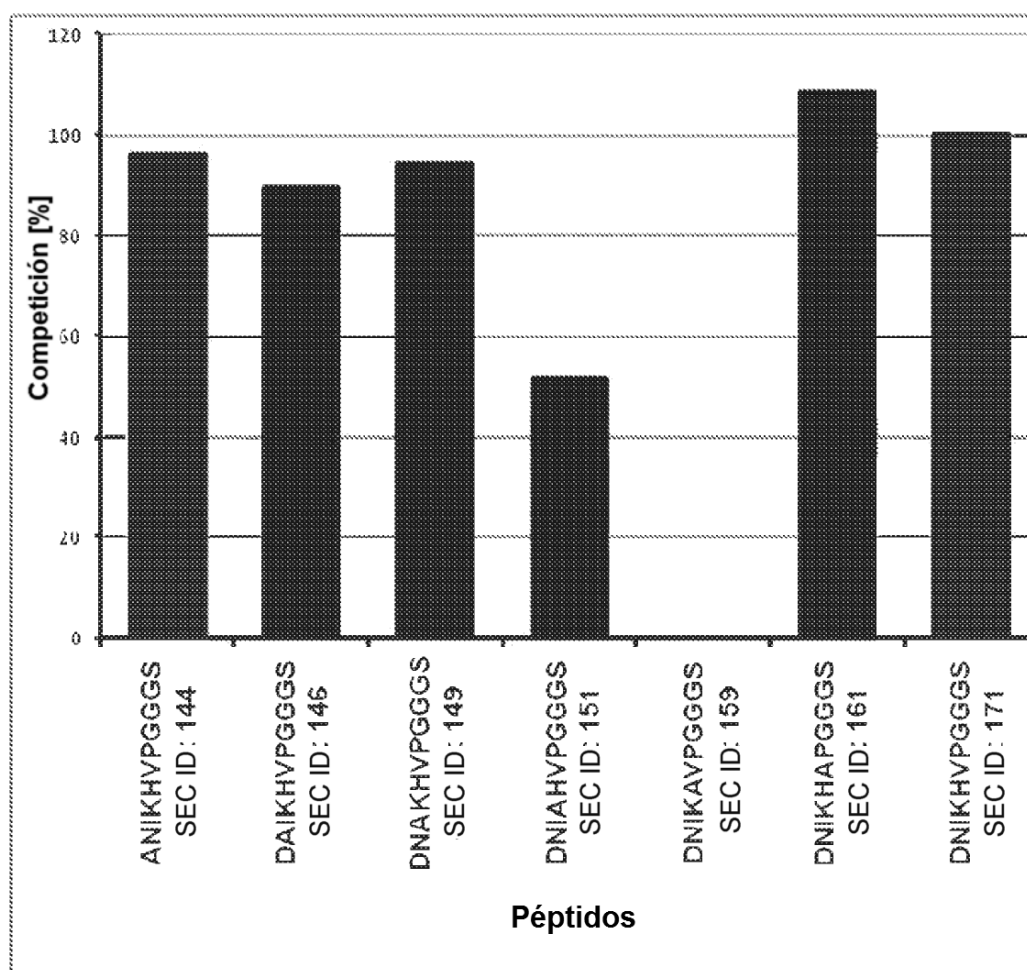


FIGURA 9A

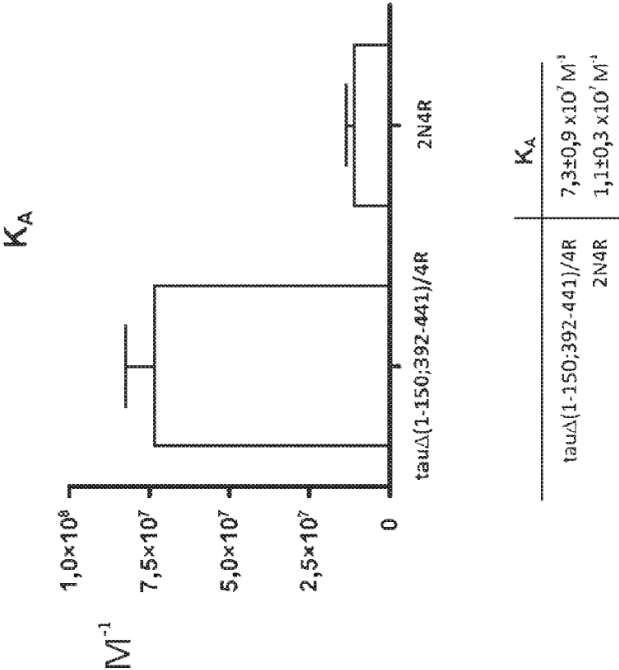


FIGURA 9B

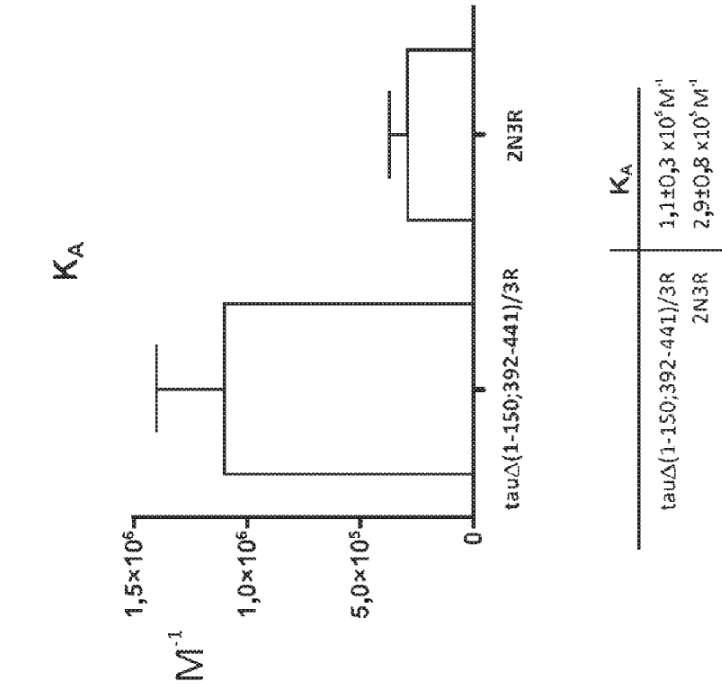


FIGURA 10A

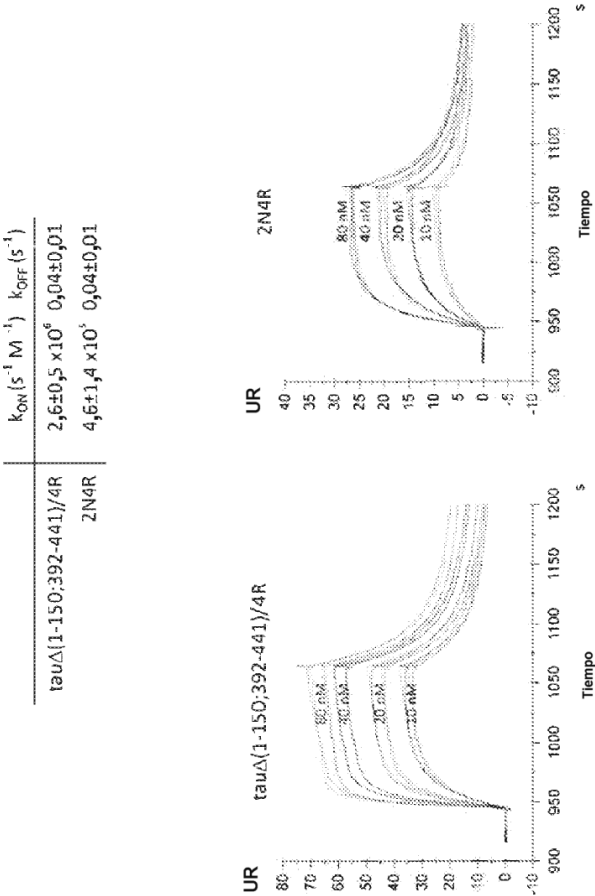


FIGURA 10B

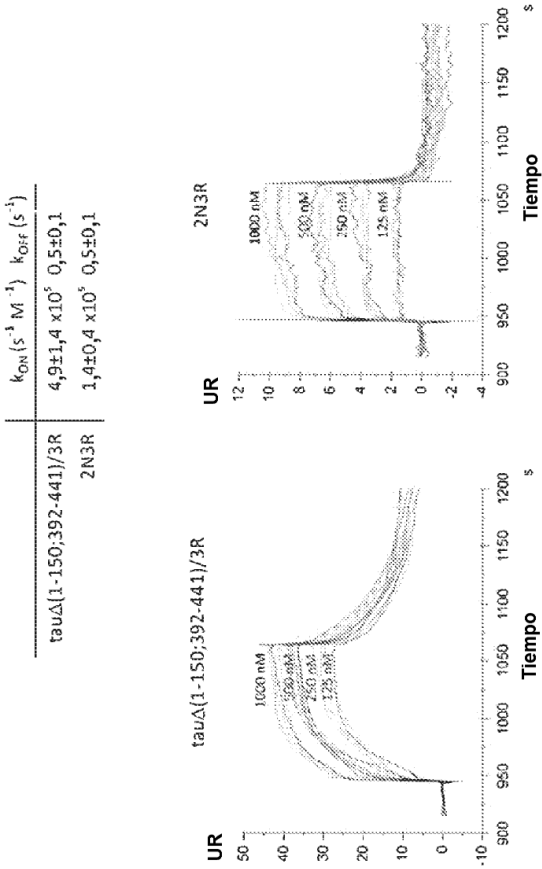


FIGURA 11

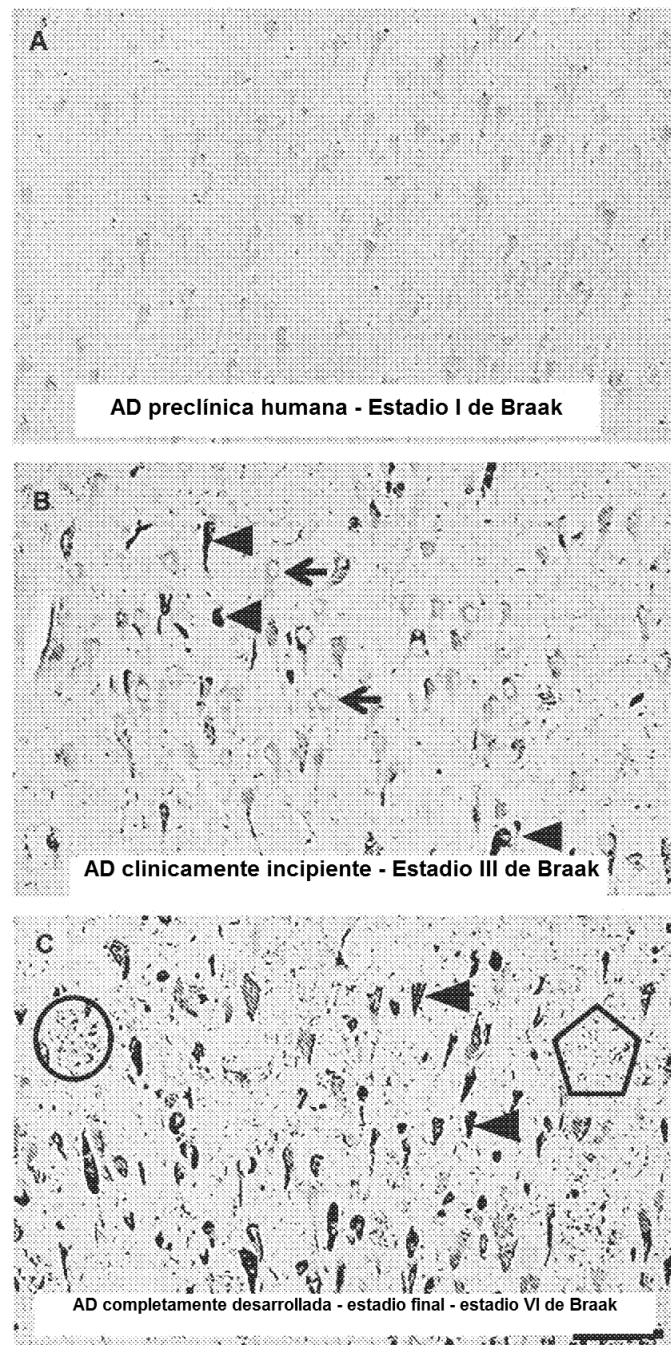


FIGURA 11D

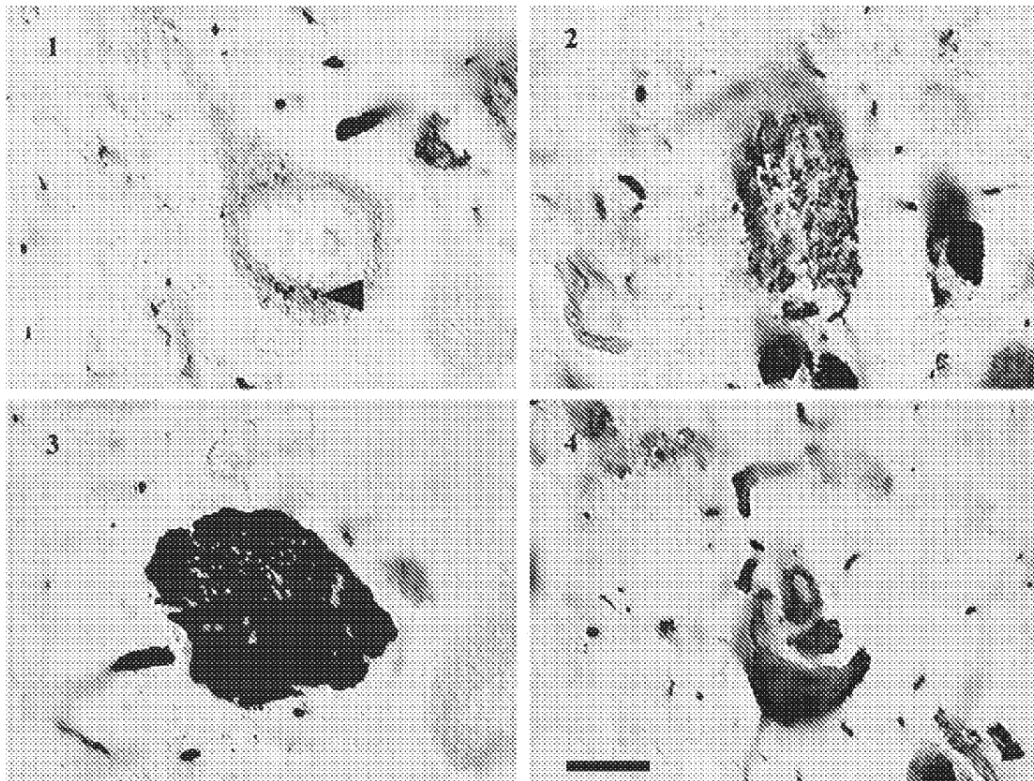


FIGURA 12A Y FIGURA 12B

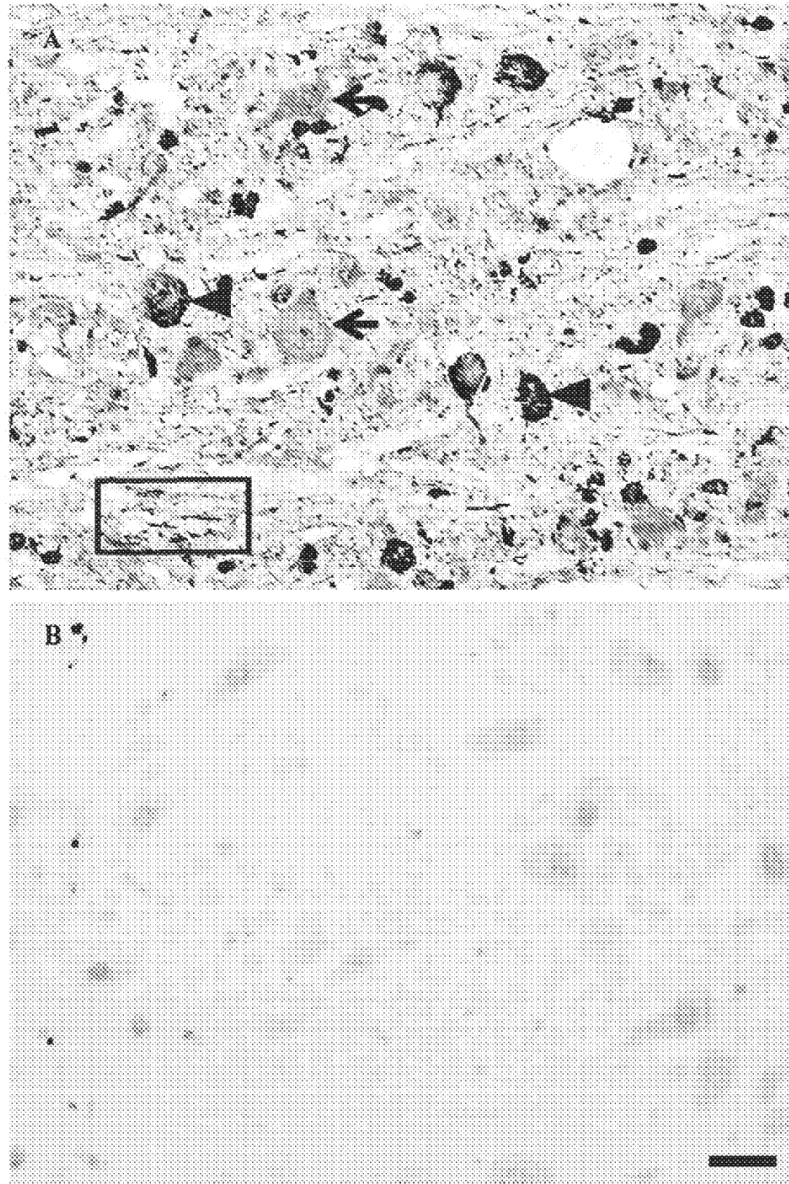


FIGURA 12C A FIGURA 12F

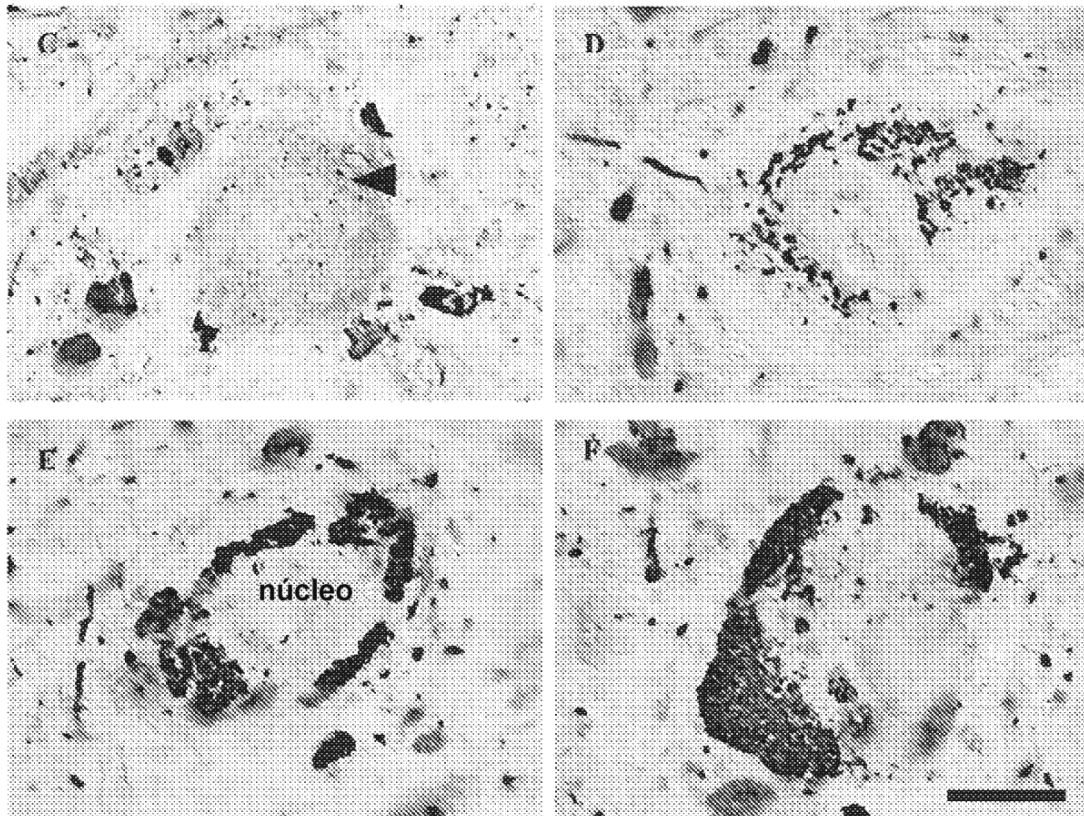


FIGURA 13

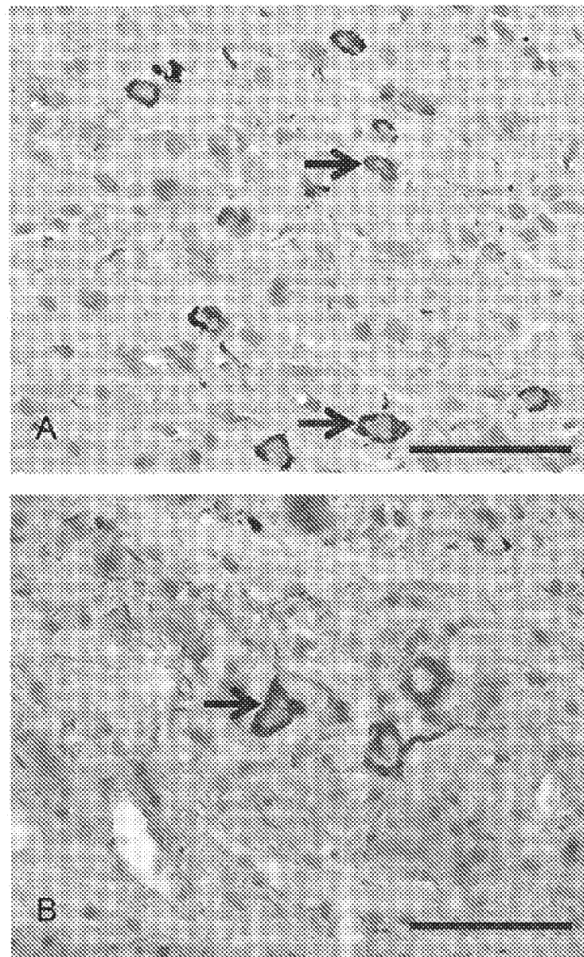


FIGURA 14A Y 14B

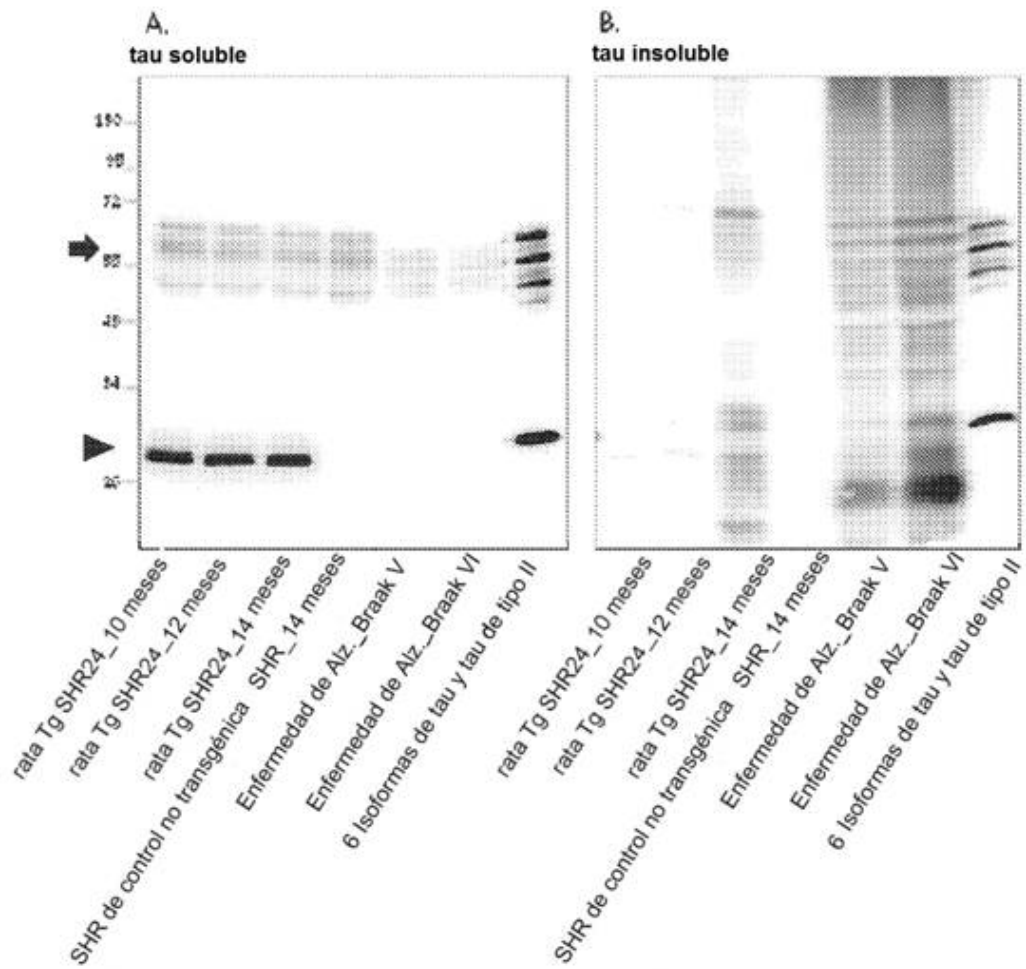


FIGURA 14C Y 14D

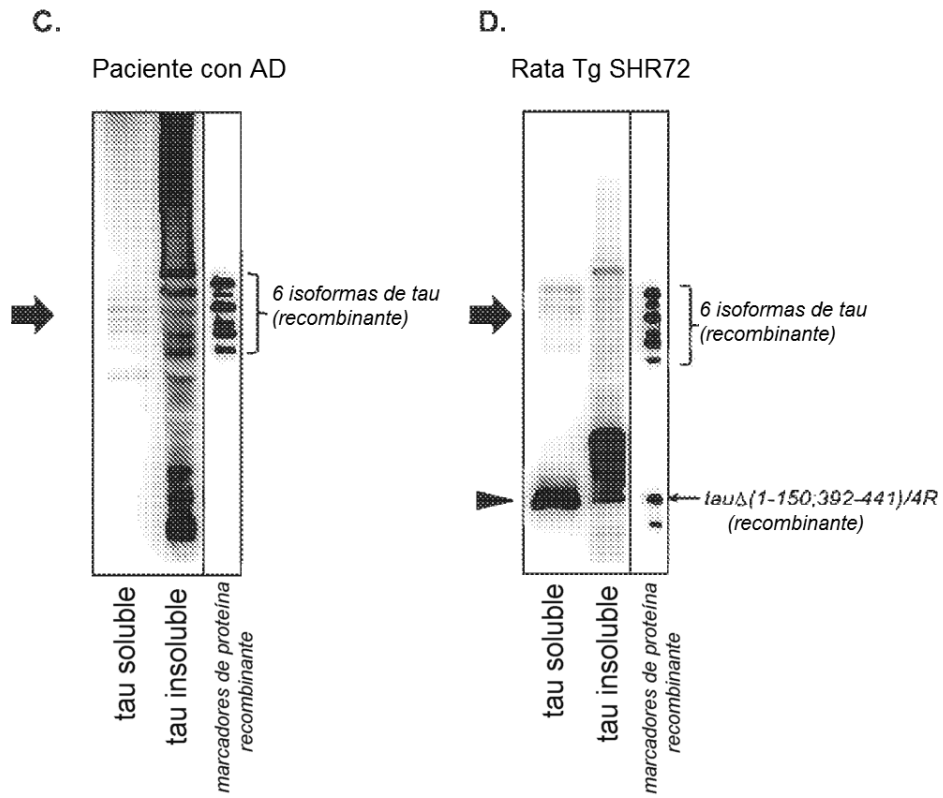


FIGURA 15A

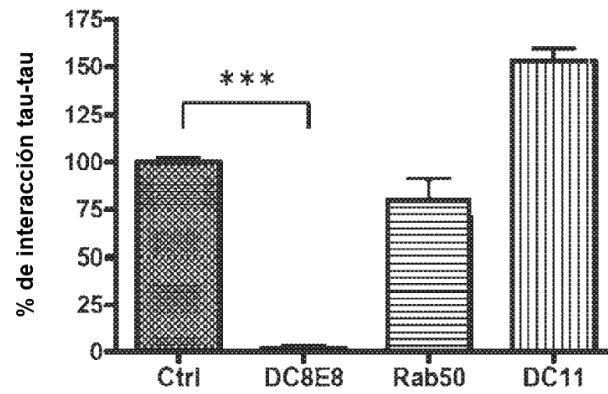


FIGURA 15B

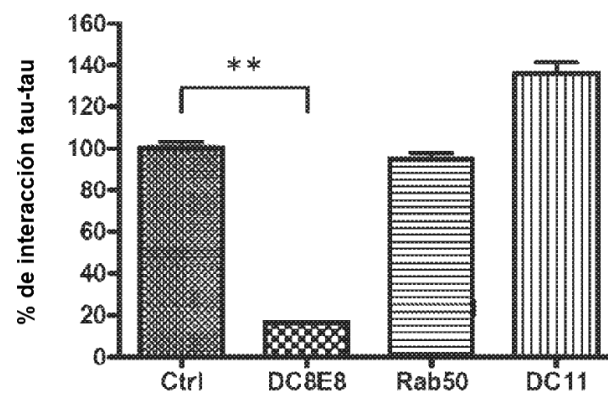


FIGURA 16

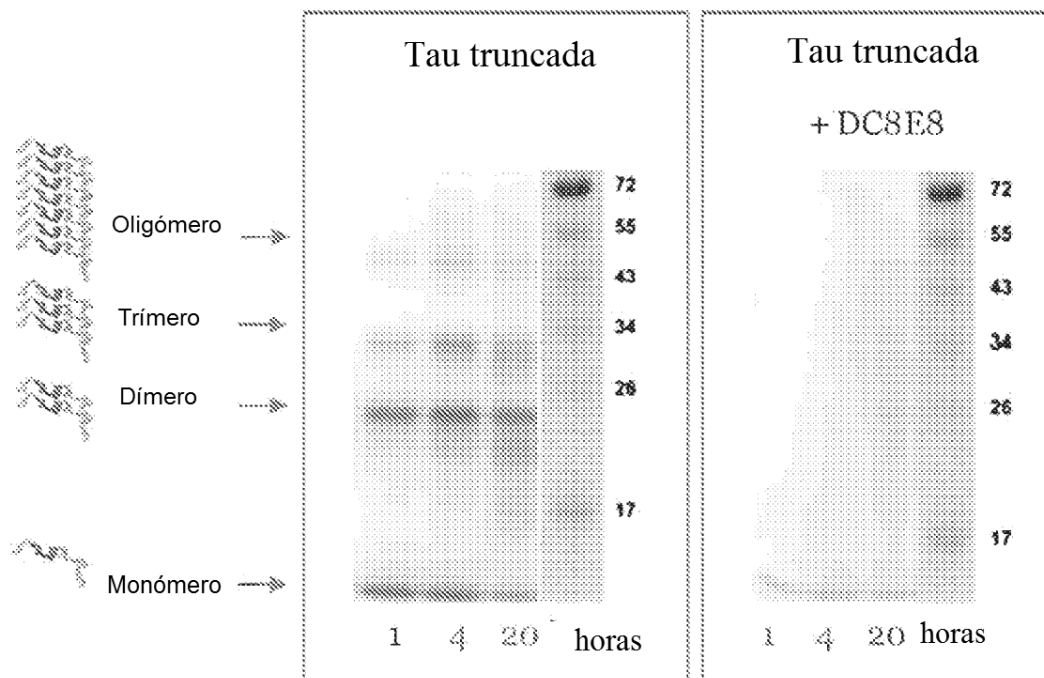


FIGURA 17A

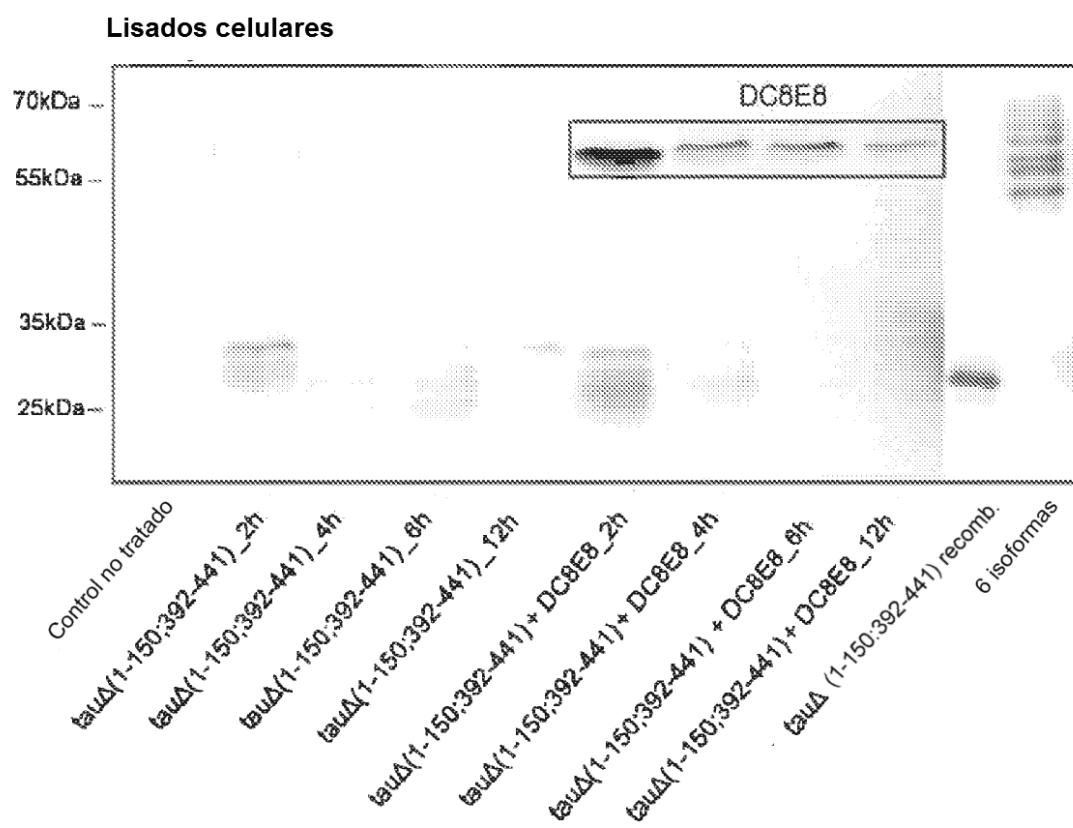


FIGURA 17B

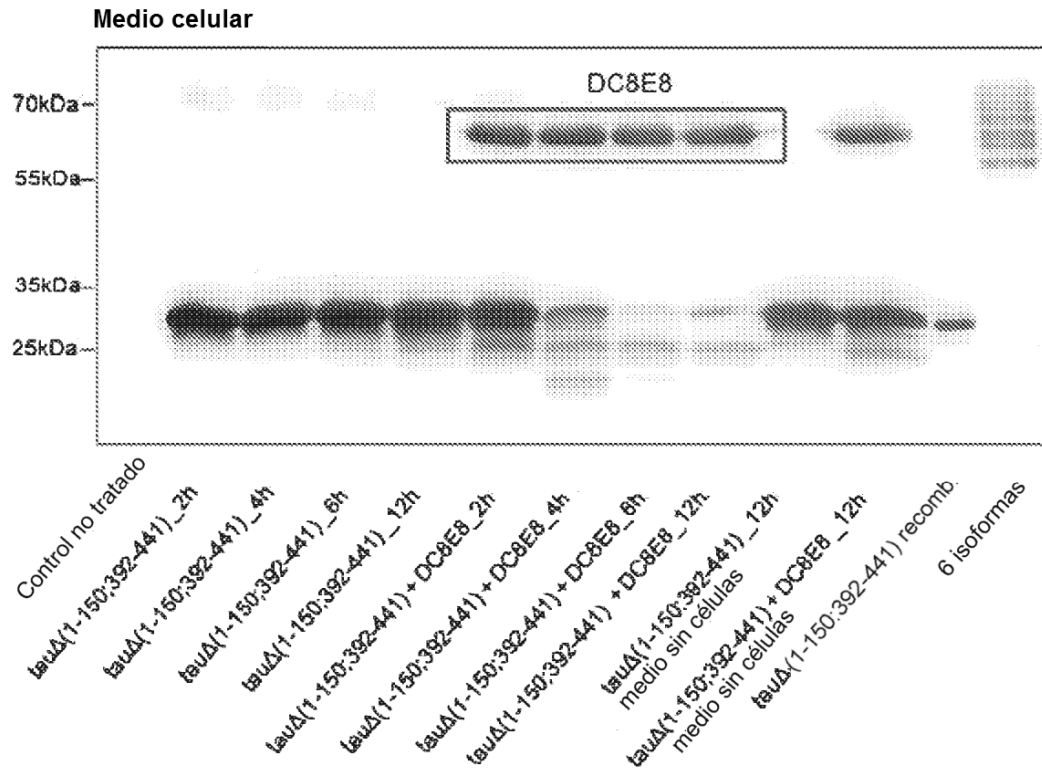


FIGURA 18

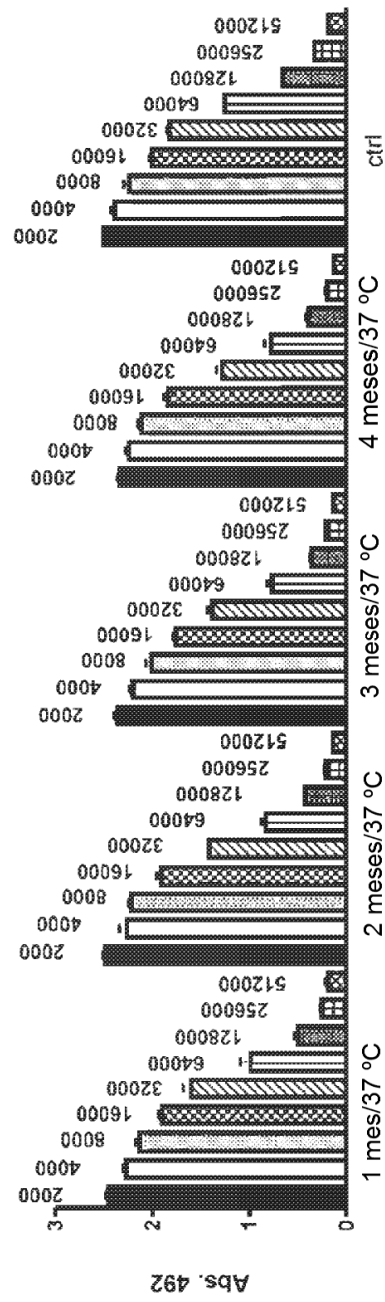
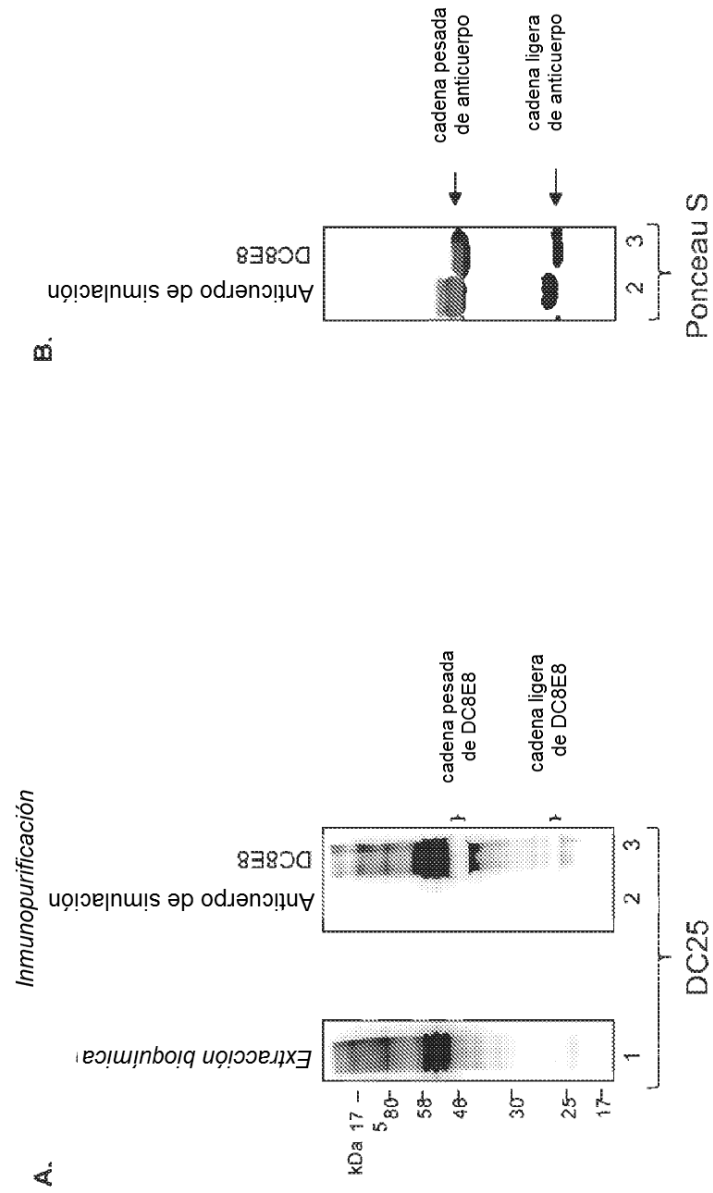


FIGURA 19



B.

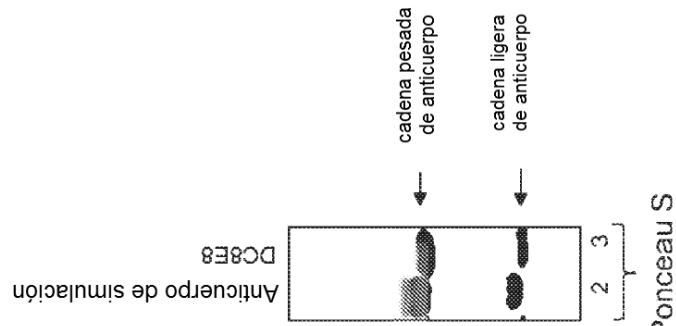


FIGURA 20

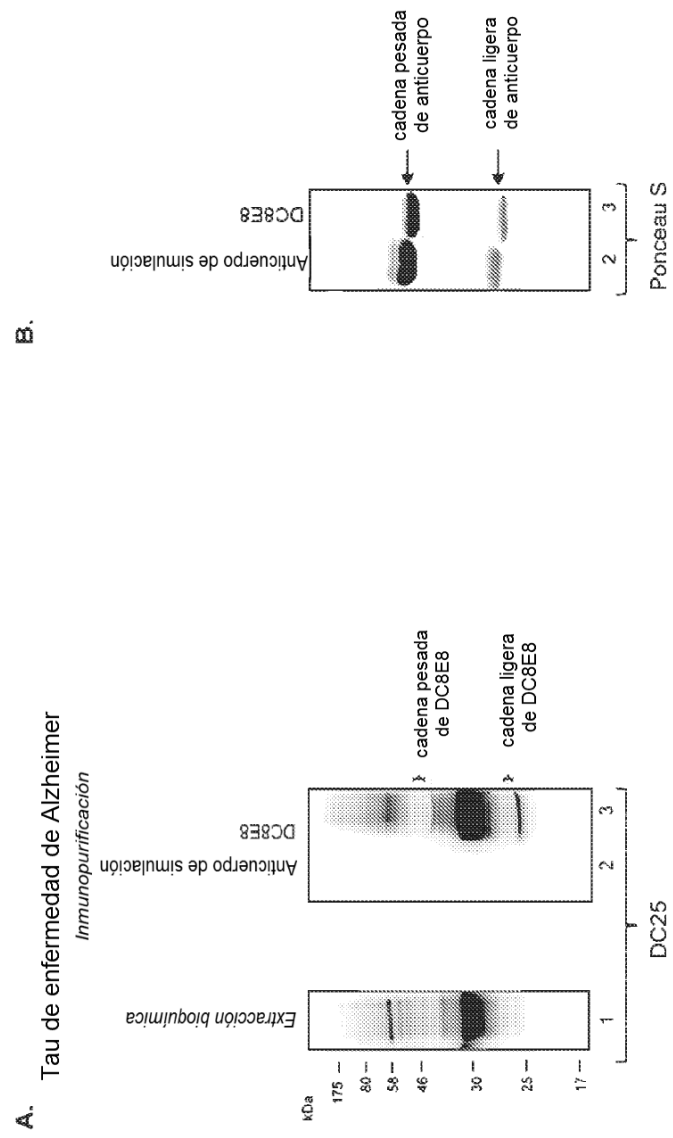


FIGURA 21A

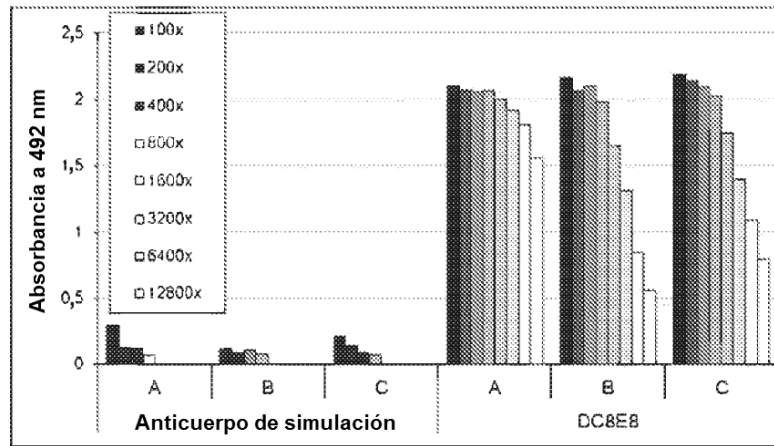


FIGURA 21B

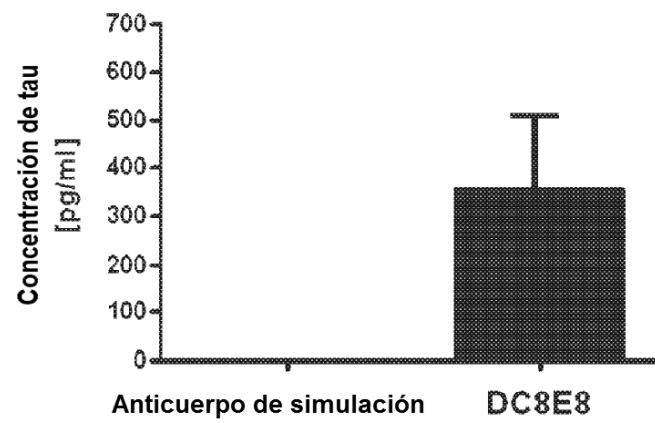


FIGURA 22A

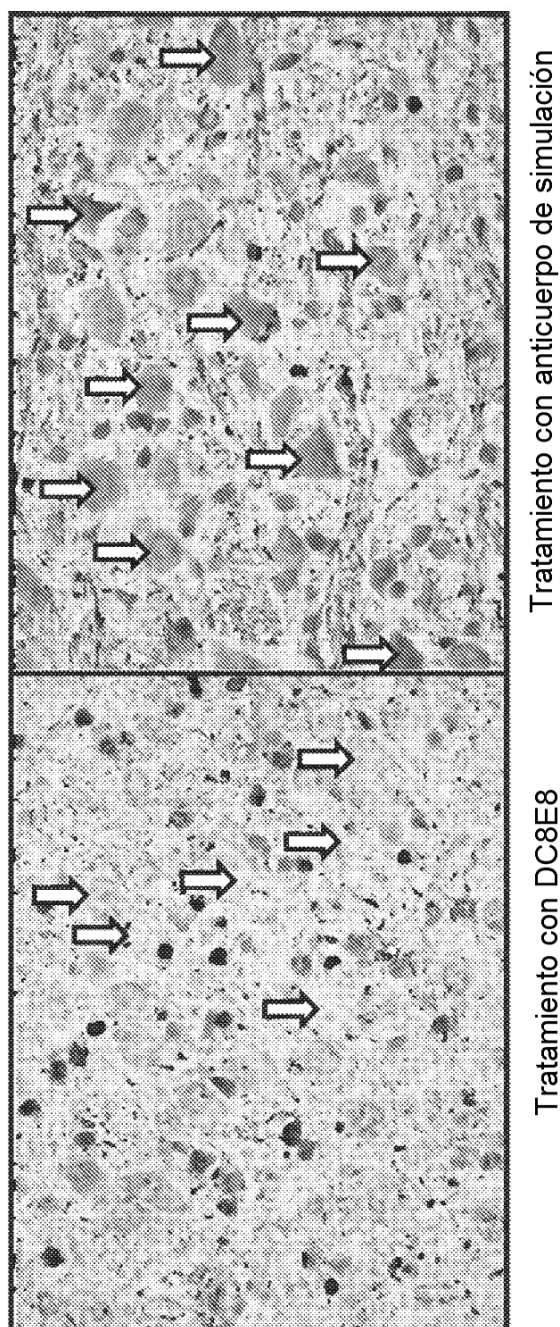


FIGURA 22B

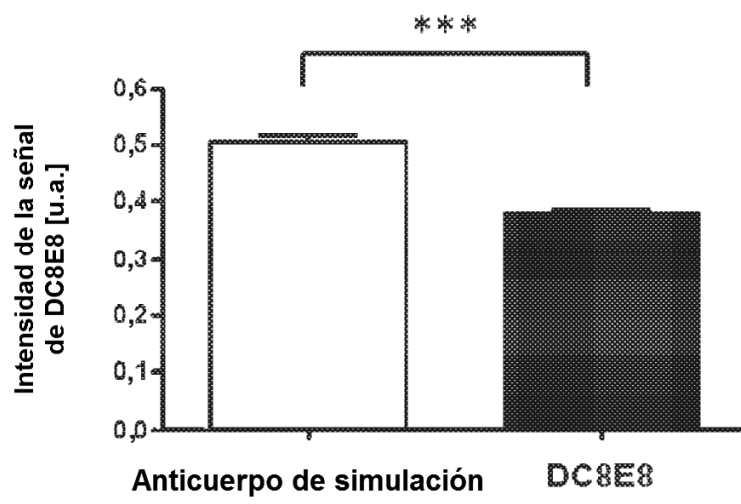


FIGURA 23

FIGURA 23A.

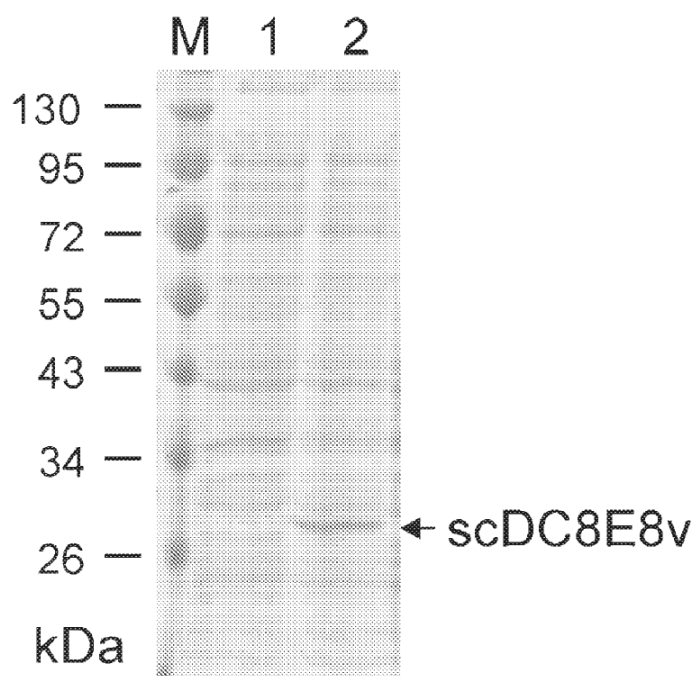
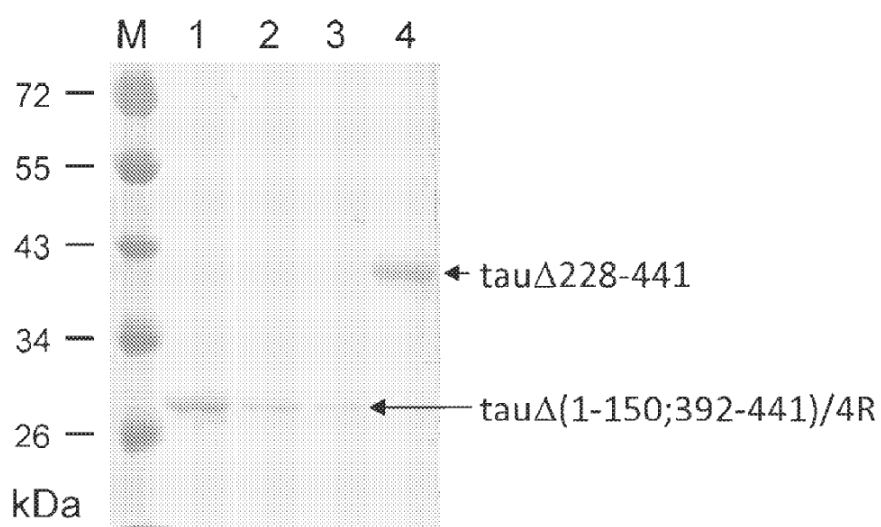


FIGURA 23B.



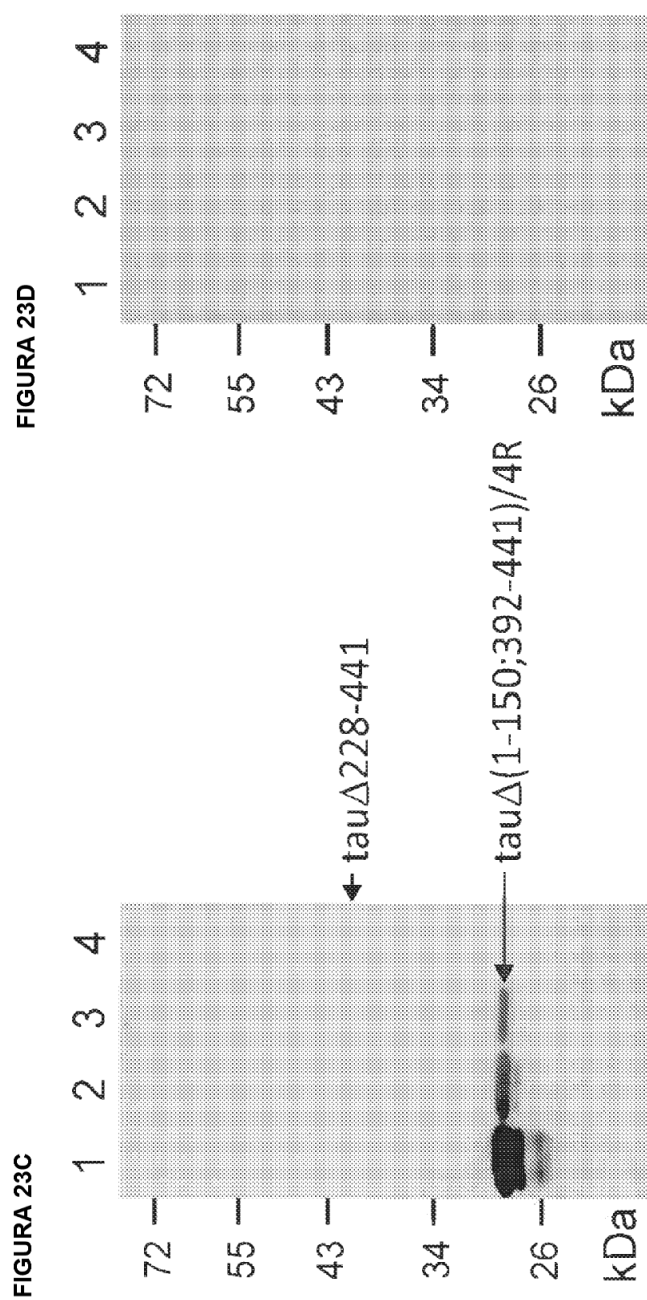


FIGURA 24A

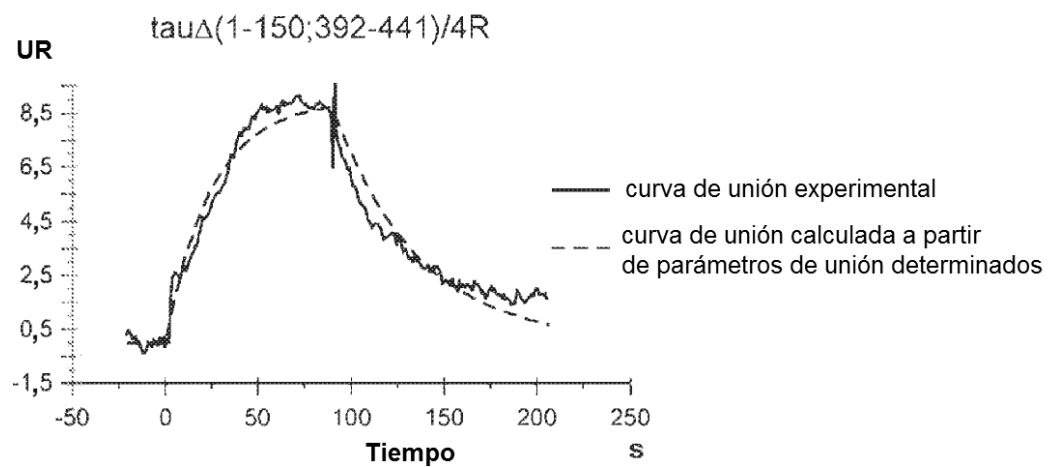


FIGURA 24B

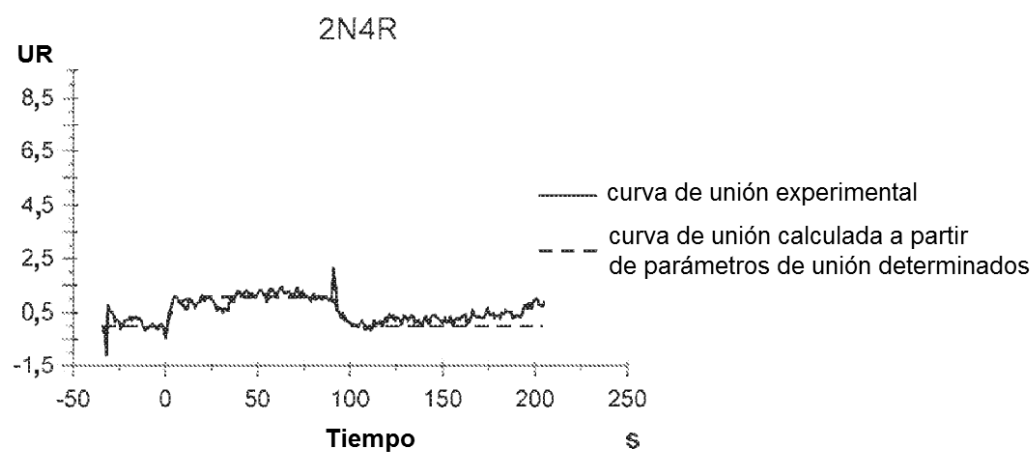


FIGURA 24C

	$k_{ON}(s^{-1} M^{-1})$	$k_{OFF}(s^{-1})$	$K_A(M^{-1})$
$\text{tau}\Delta(1-150;392-441)/4R$	$1,8 \times 10^5$	0,02	$8,1 \times 10^6$
2N4R	$5,7 \times 10^4$	0,2	$2,7 \times 10^5$

FIGURA 25A

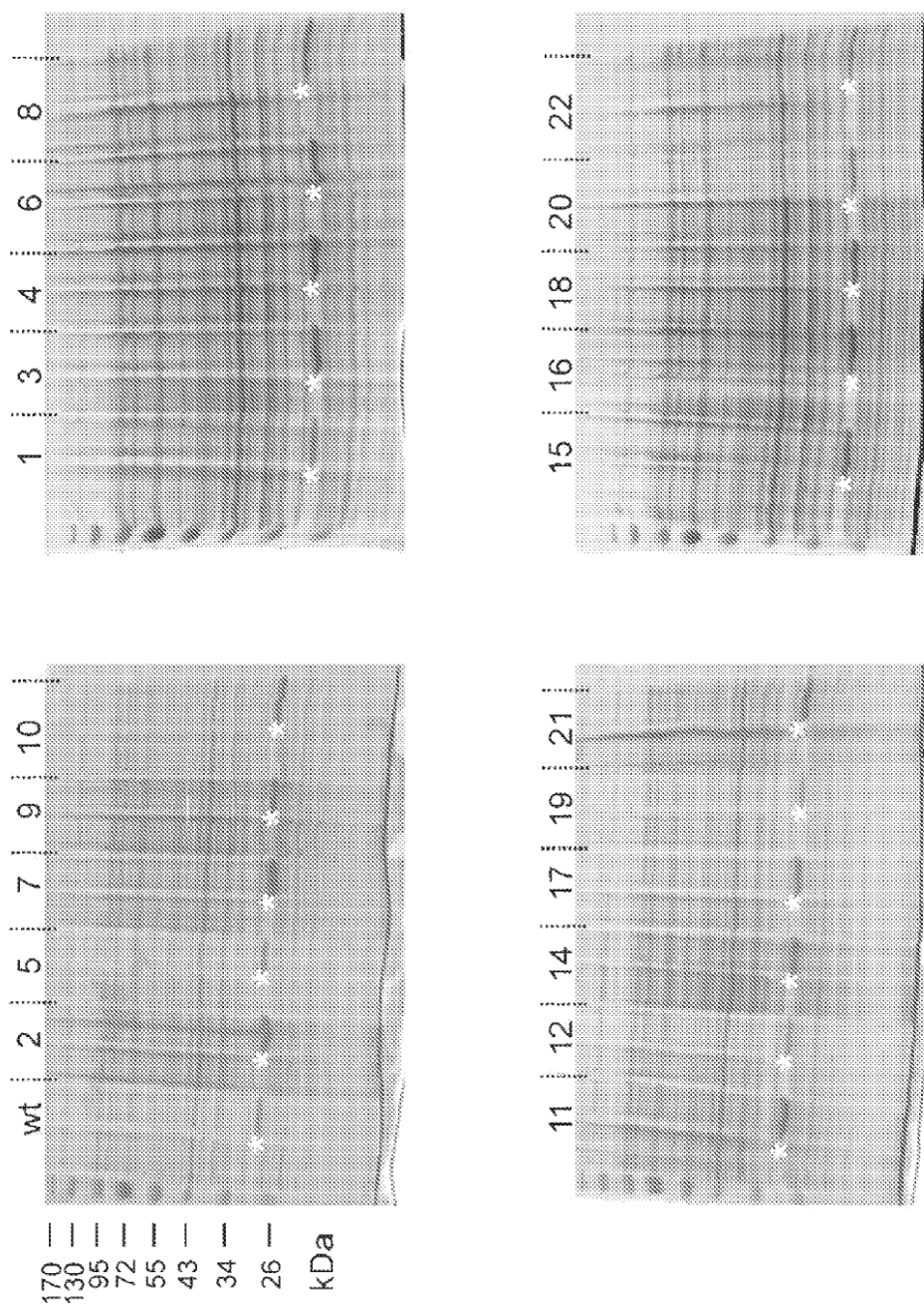


FIGURA 25B

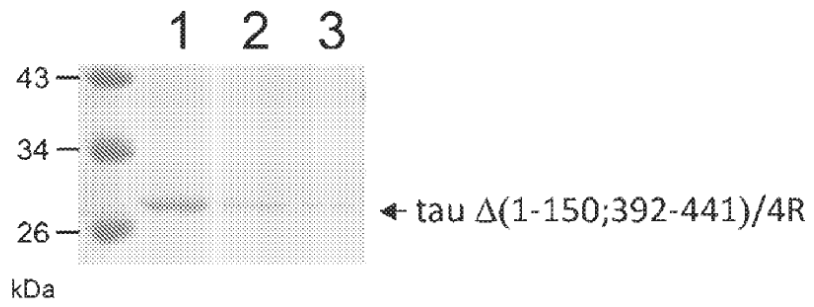


FIGURA 25C

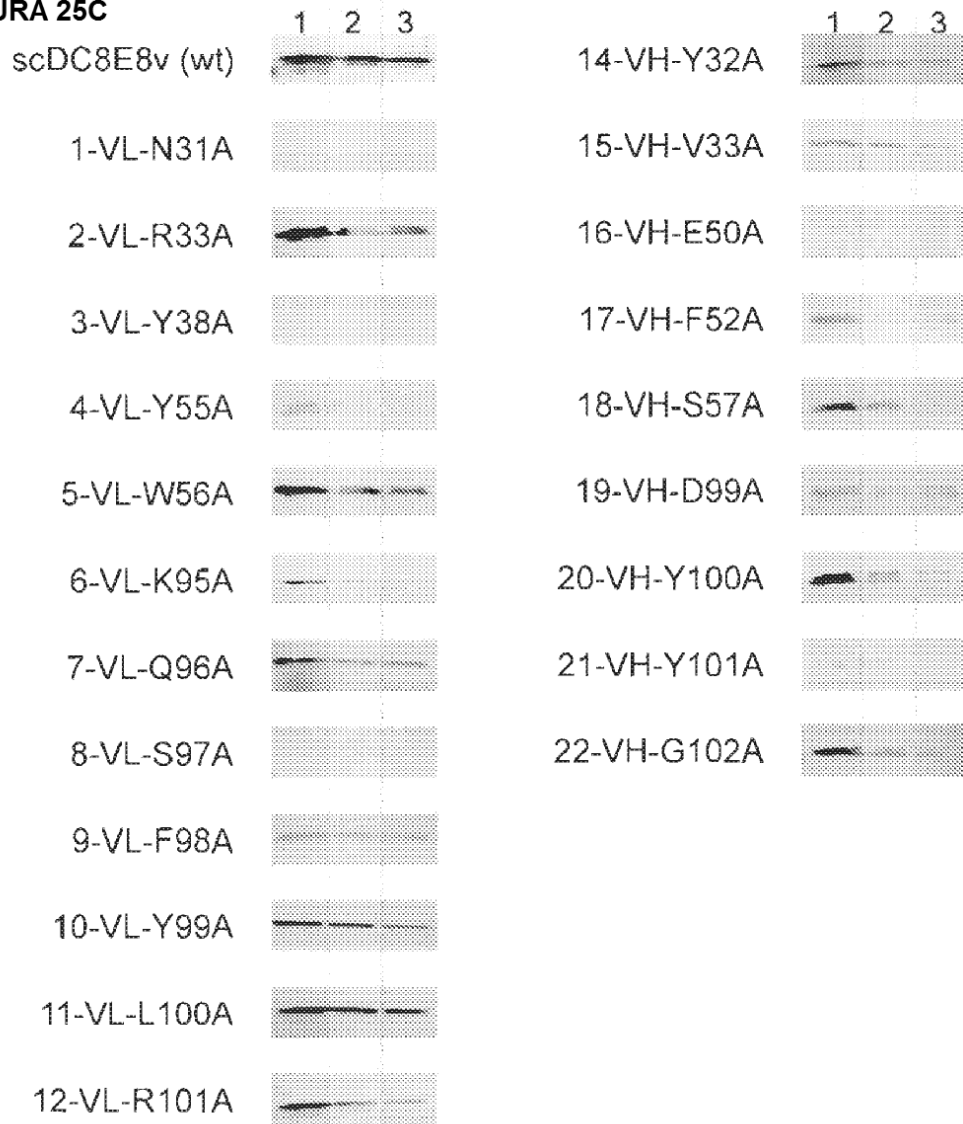


FIGURA 26A

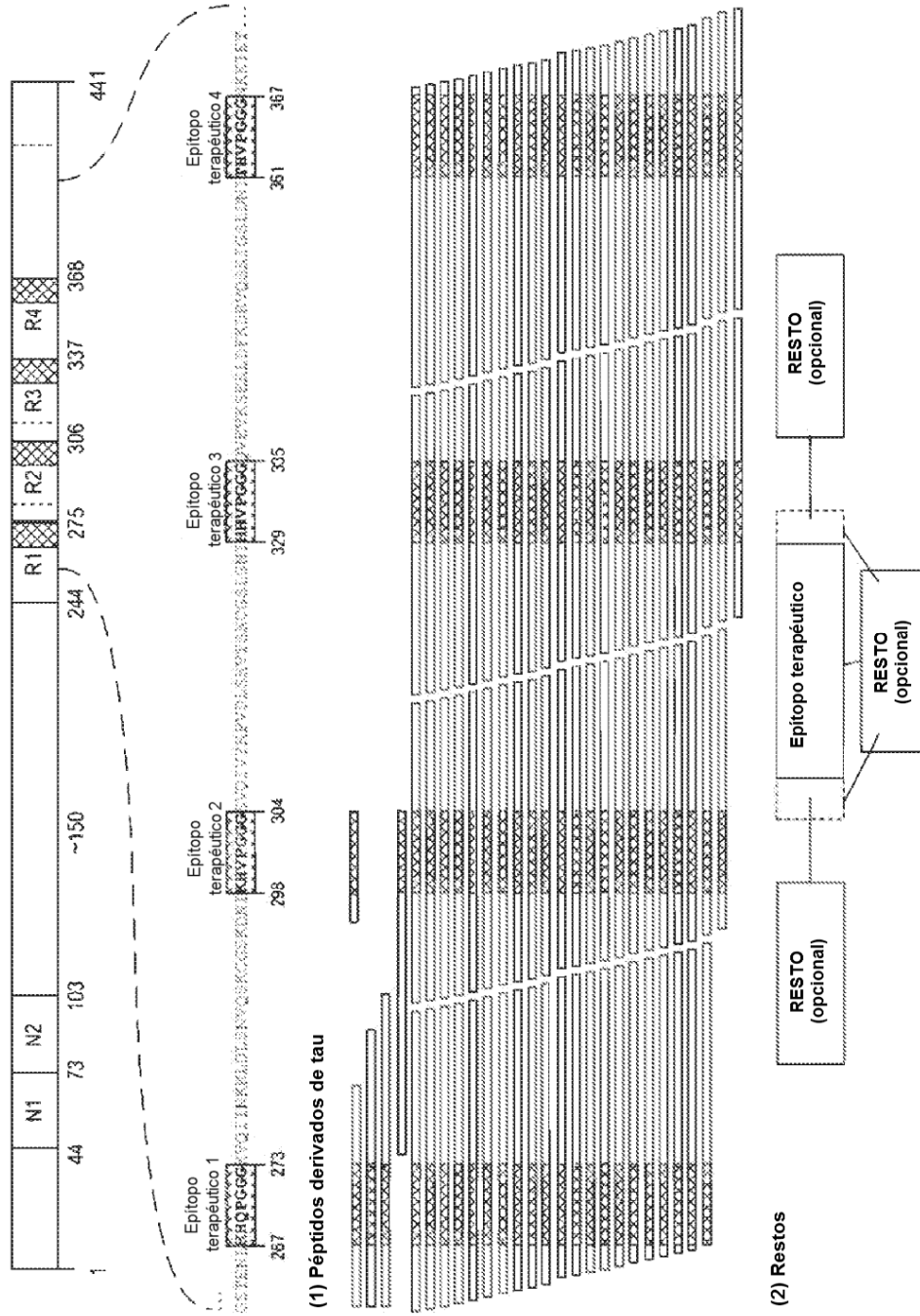


FIGURA 26B

SEC ID N°:	Inmunógeno	Reducción de epítomos relevantes para AD de tau insoluble (%)					
		347-353	pT217	pT231	pS202/pT205	pT181	
SEC ID N°:1	Tau 251-280	71	42	11	ND	58	
SEC ID N°:2	Tau 256-285	41	72	64	80	74	
SEC ID N°:2	Tau 256-285/pS262	46	73	85	82	82	
SEC ID N°:3	Tau 259-288	40	30	63	61	74	
SEC ID N°:4	Tau 275-304	63	92	95	95	87	
SEC ID N°:108	Tau 294-305	70	96	97	98	94	
SEC ID N°:5	Tau 201-230/pT217	1	-11	33	-31	30	
SEC ID N°:6	Tau 379-408/pS396/pS404	-87	-33	-44	19	-7	
SEC ID N°:7	Tau 181-210/pS202/pT205	-6	-3	-11	-41	-7	
SEC ID N°:8	Tau 300-317	-82	9	-60	17	-10	

FIGURA 26C

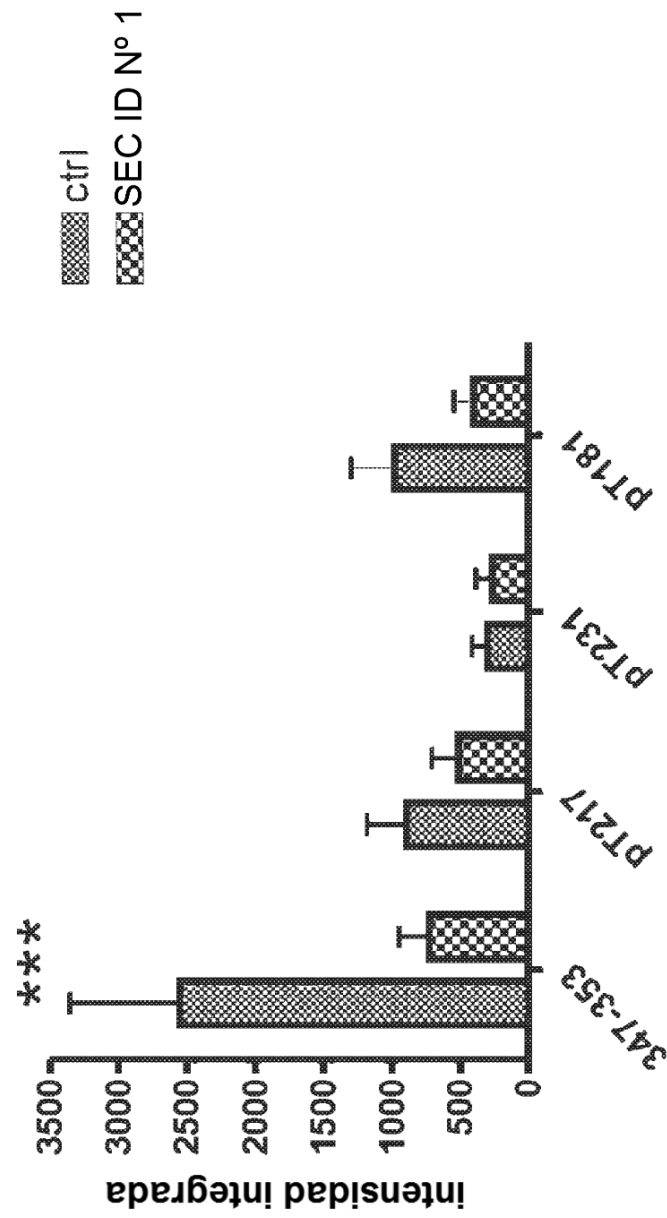
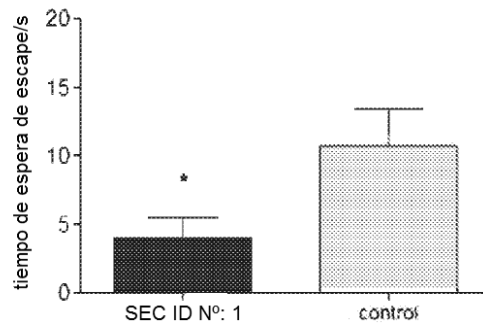


FIGURA 27

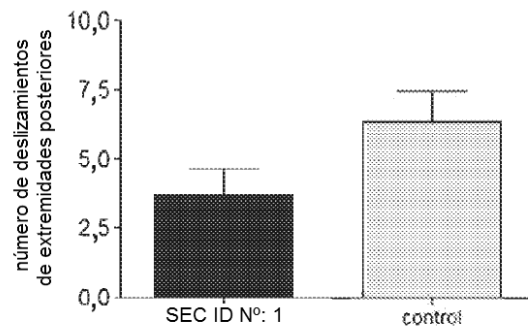
A

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C

Neuroescala

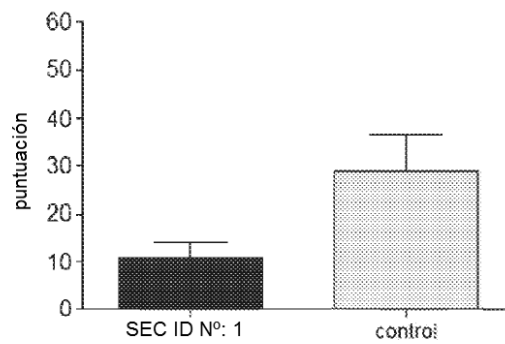


FIGURA 28

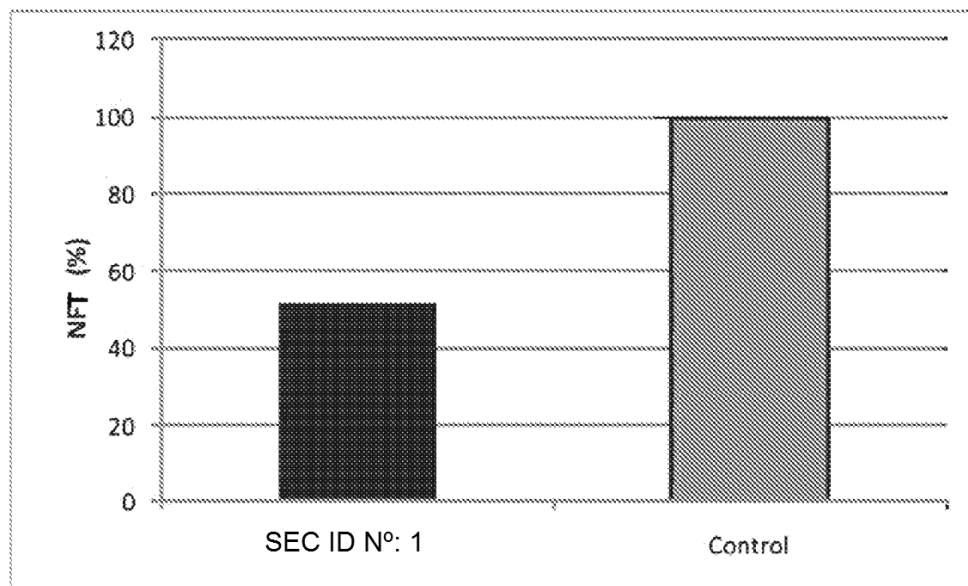


FIGURA 29

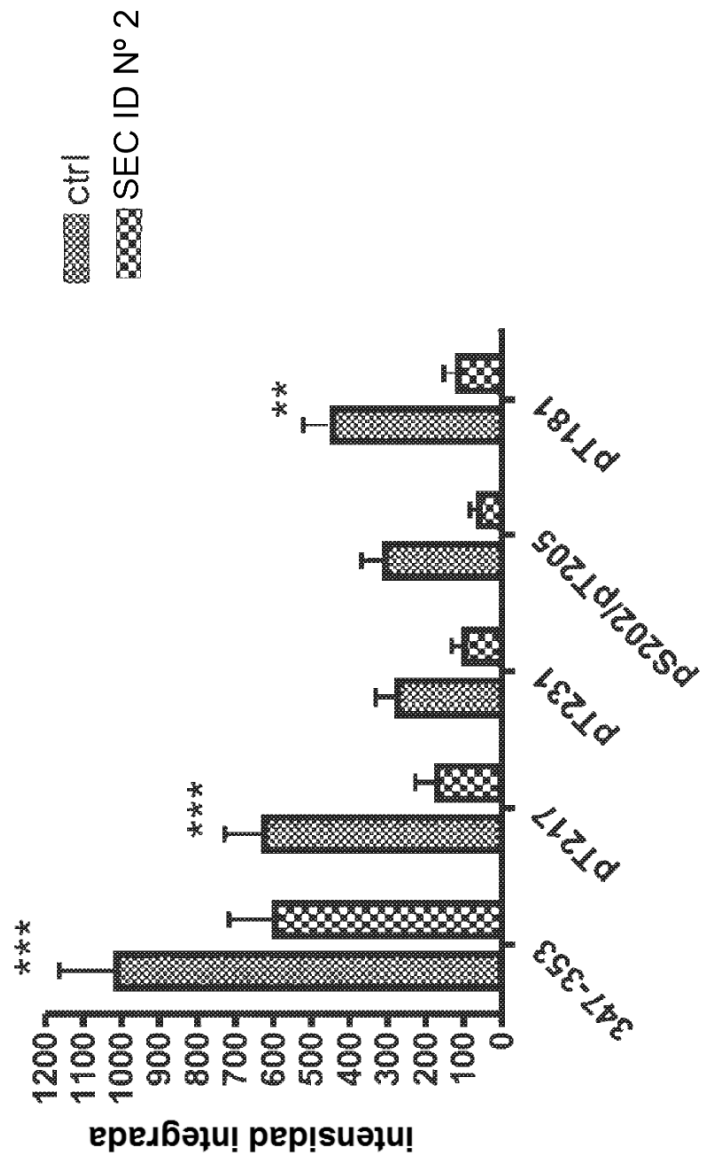
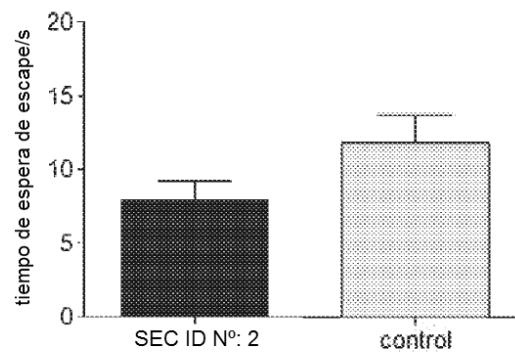


FIGURA 30

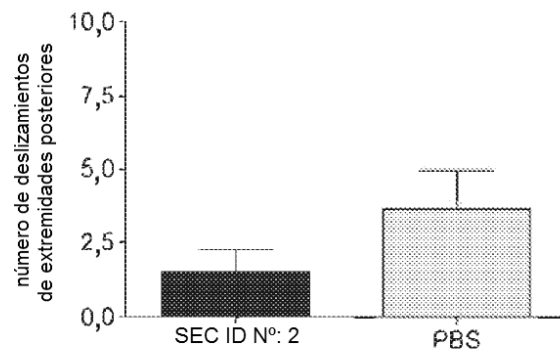
A.

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B.

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C.

Neuroescala

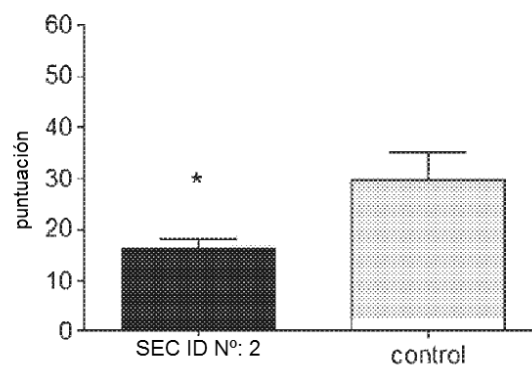


FIGURA 31

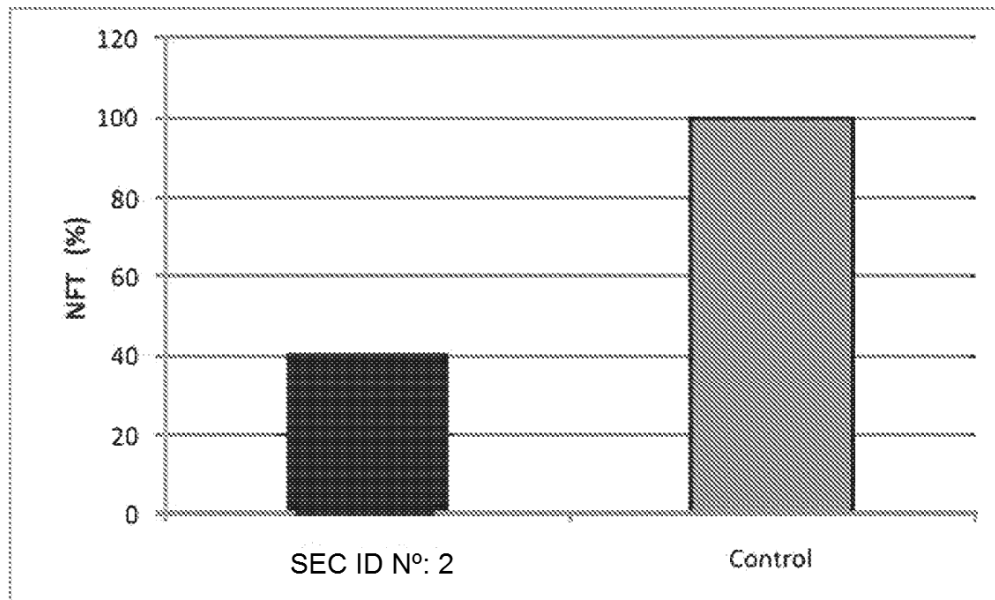


FIGURA 32

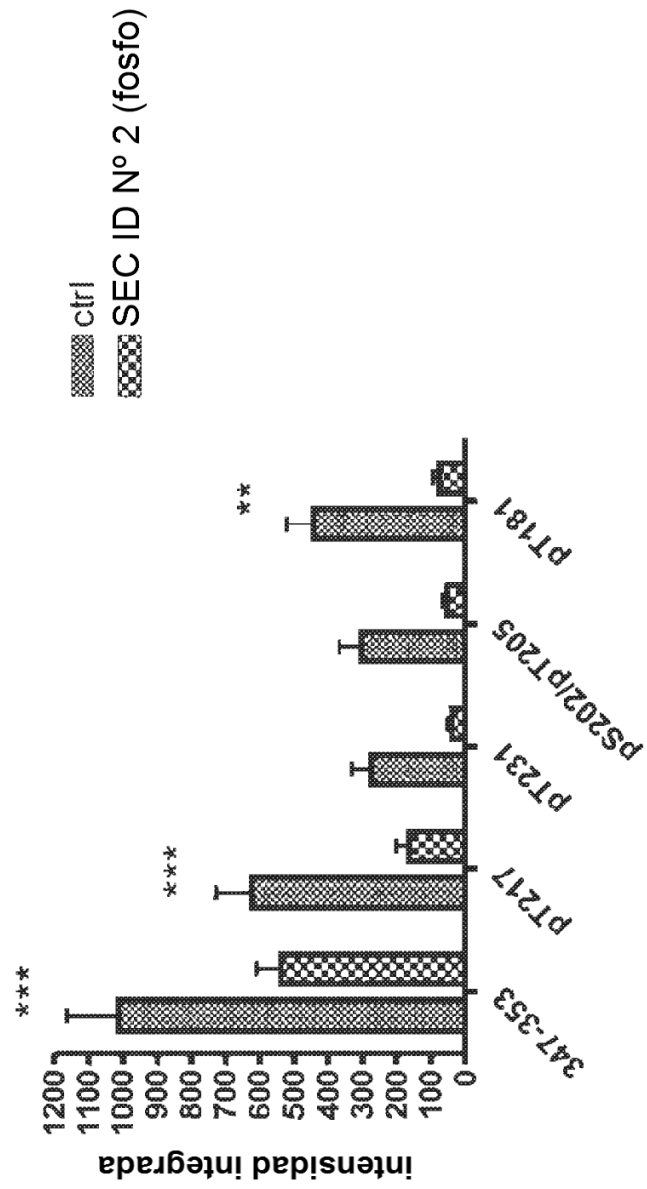


FIGURA 33

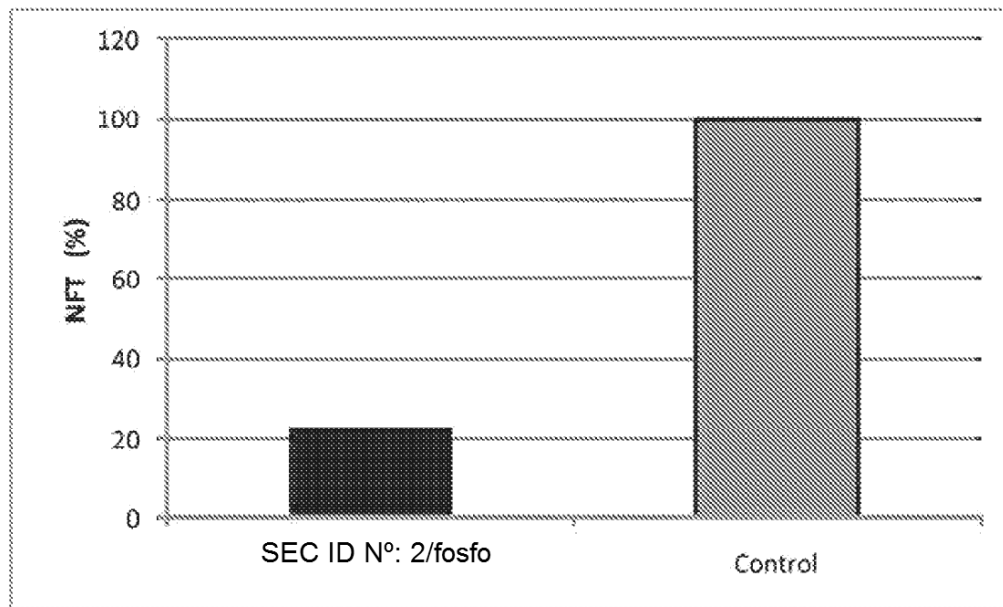


FIGURA 34

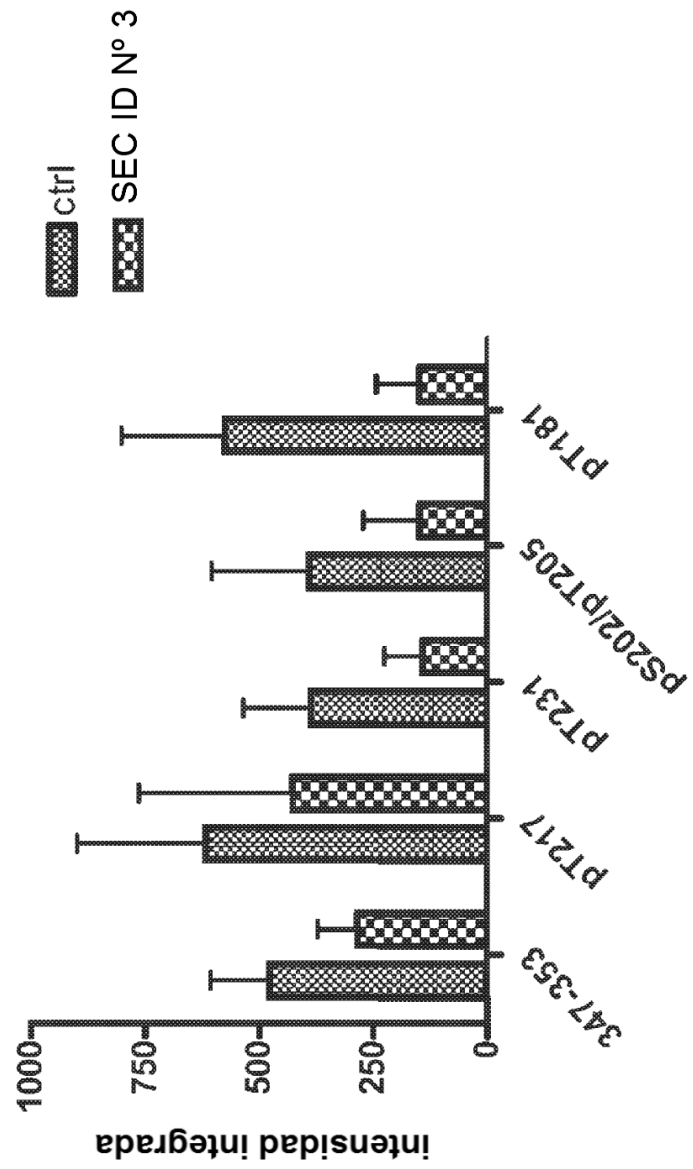
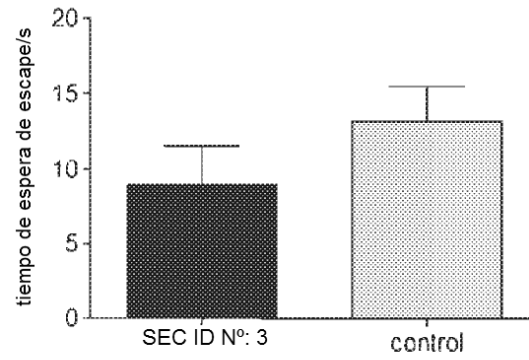


FIGURA 35

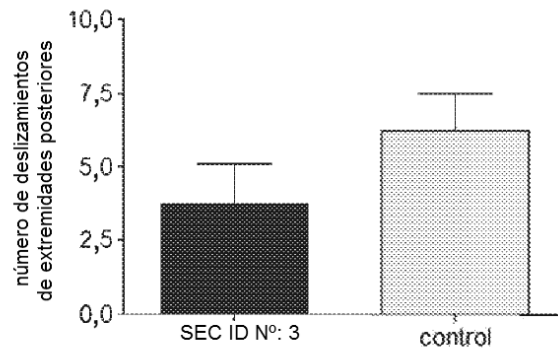
A.

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B.

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C.

Neuroescala

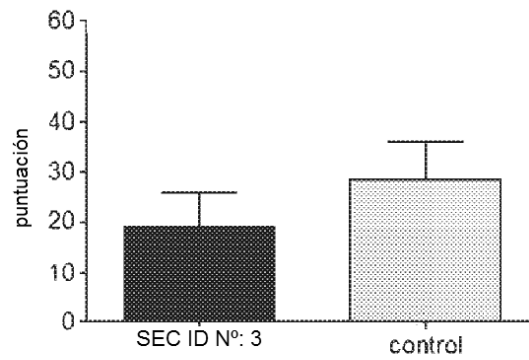


FIGURA 36

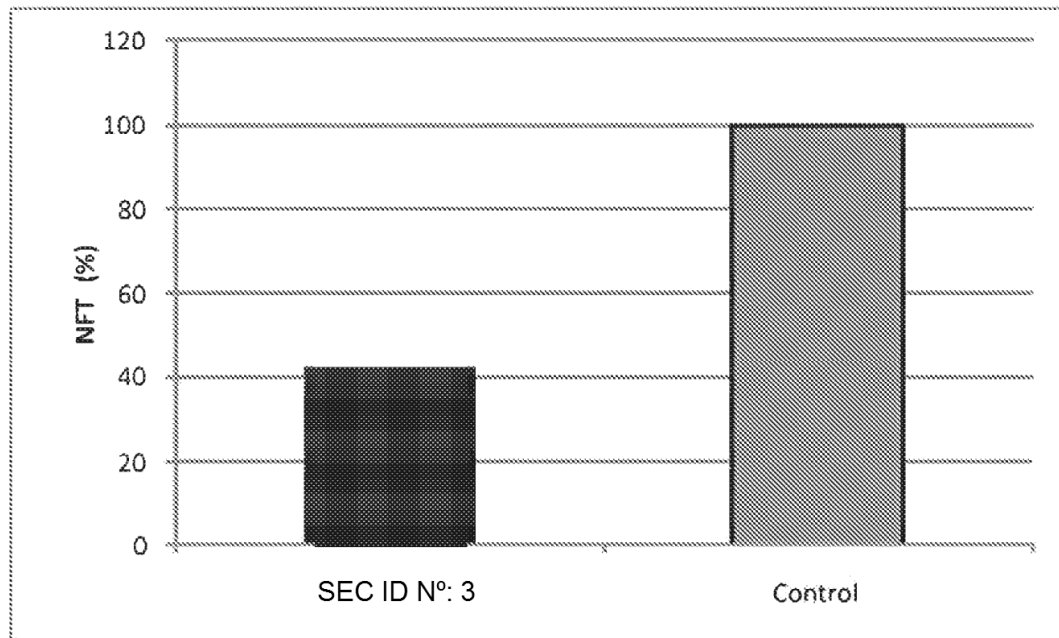


FIGURA 37

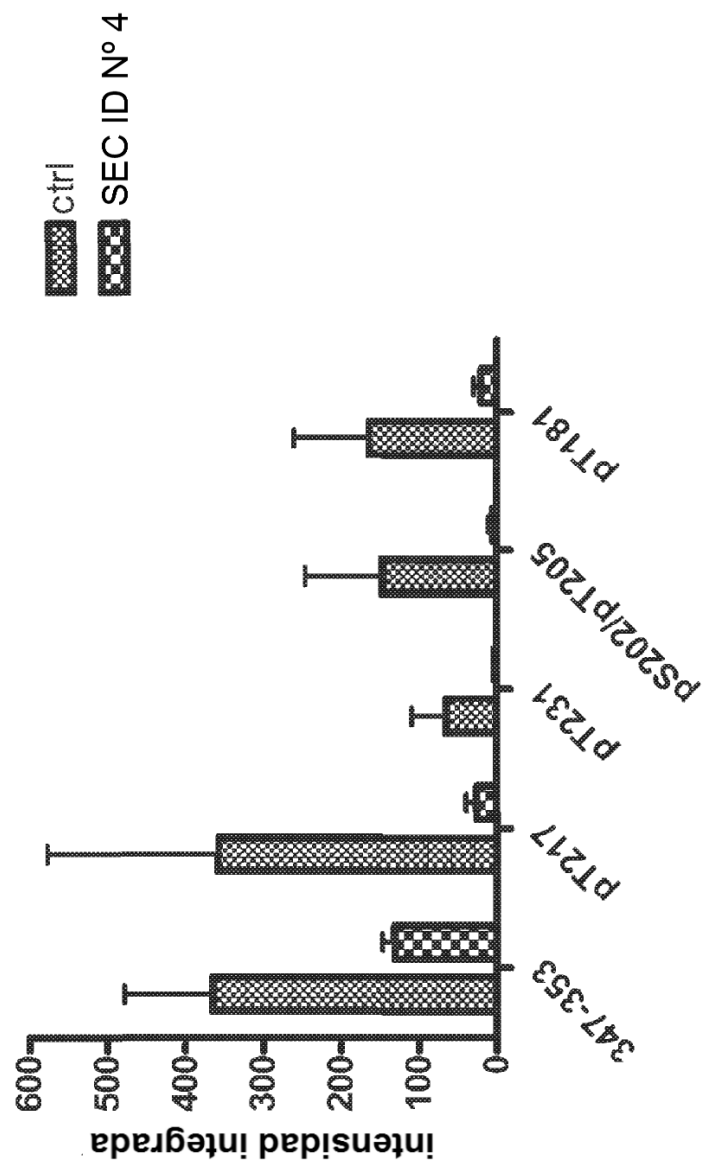
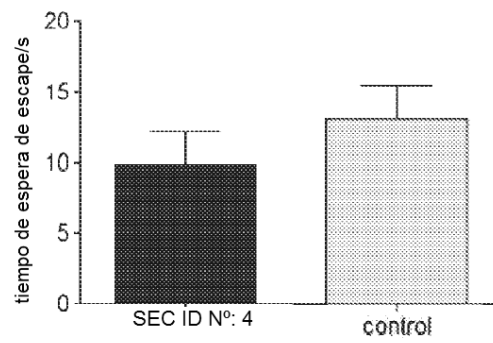


FIGURA 38

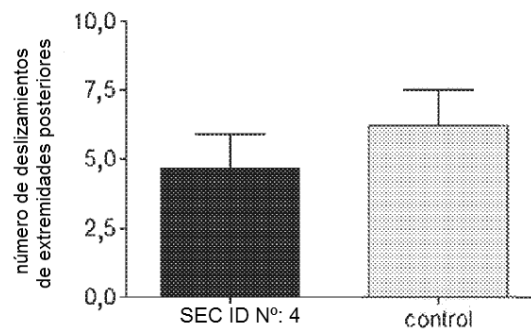
A

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C

Neuroescala

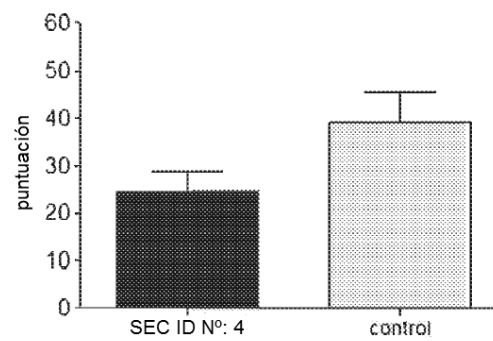


FIGURA 39

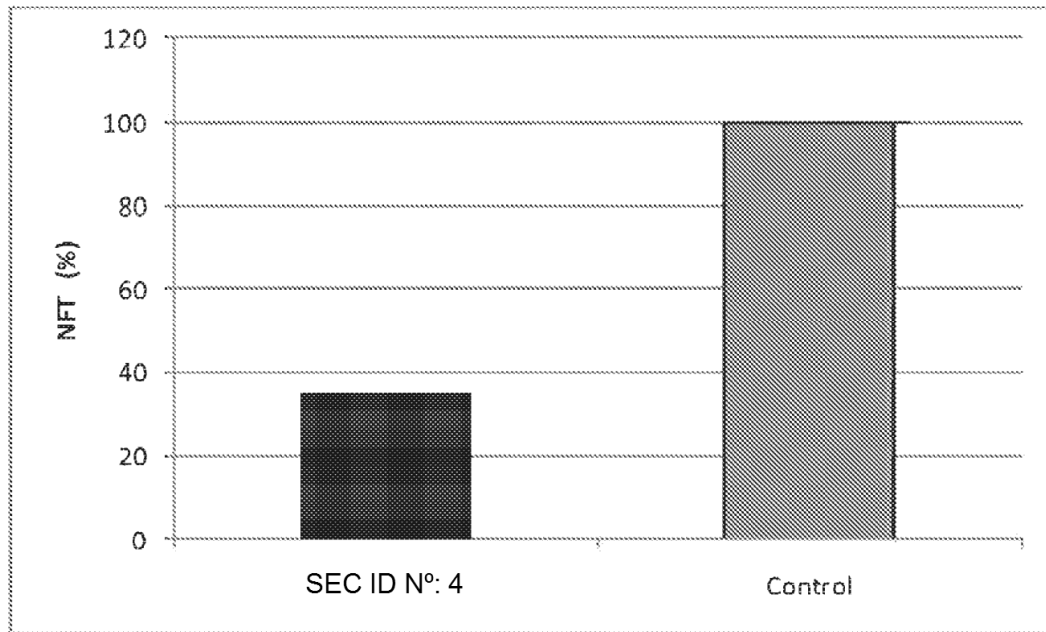


FIGURA 40

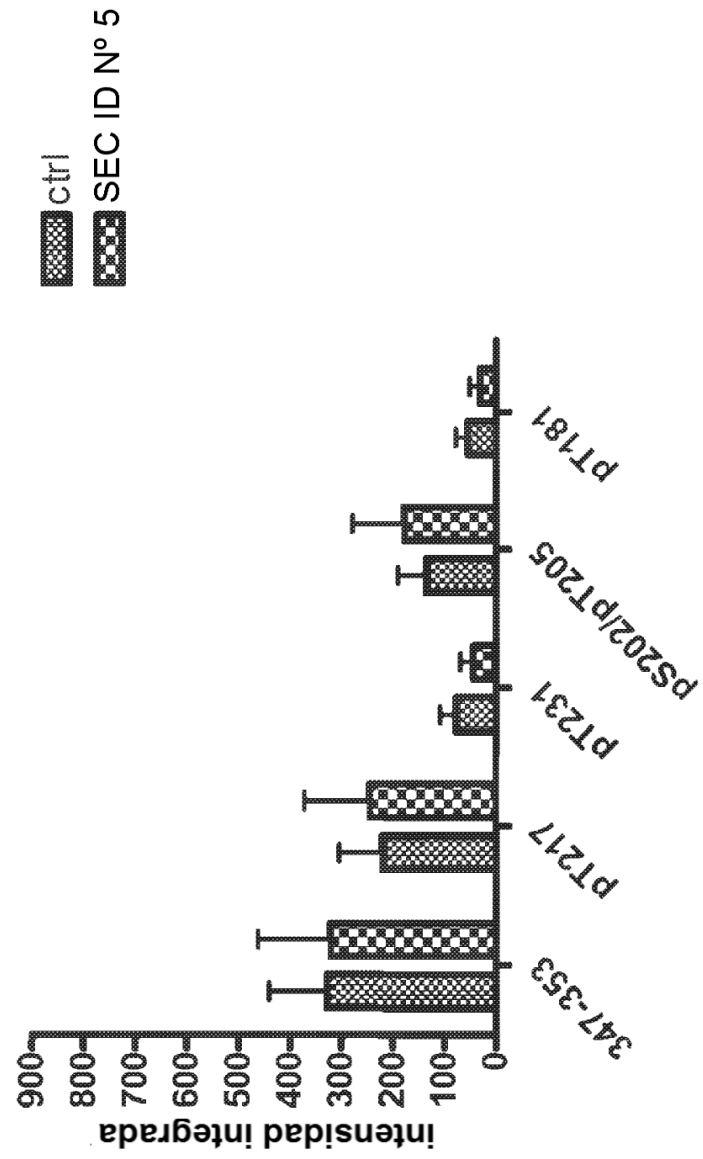
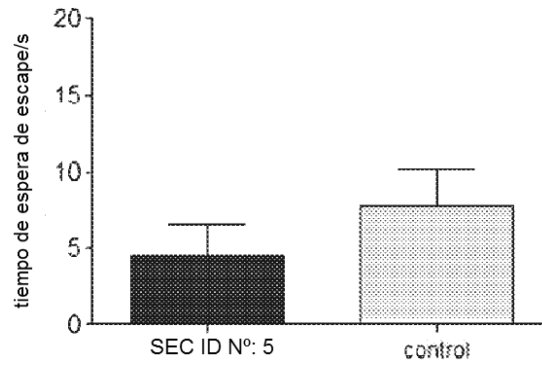


FIGURA 41

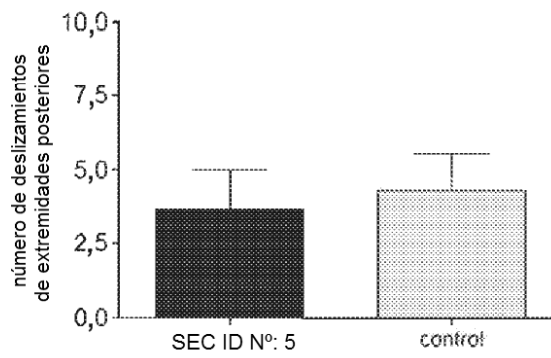
A.

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B.

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C.

Neuroescala

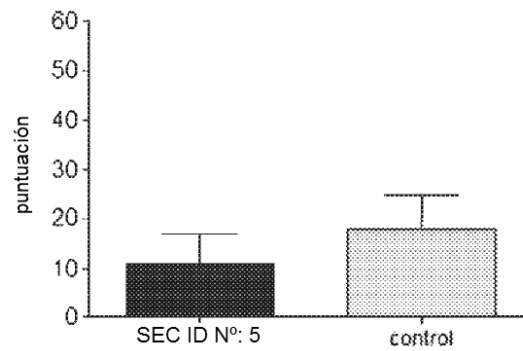


FIGURA 42

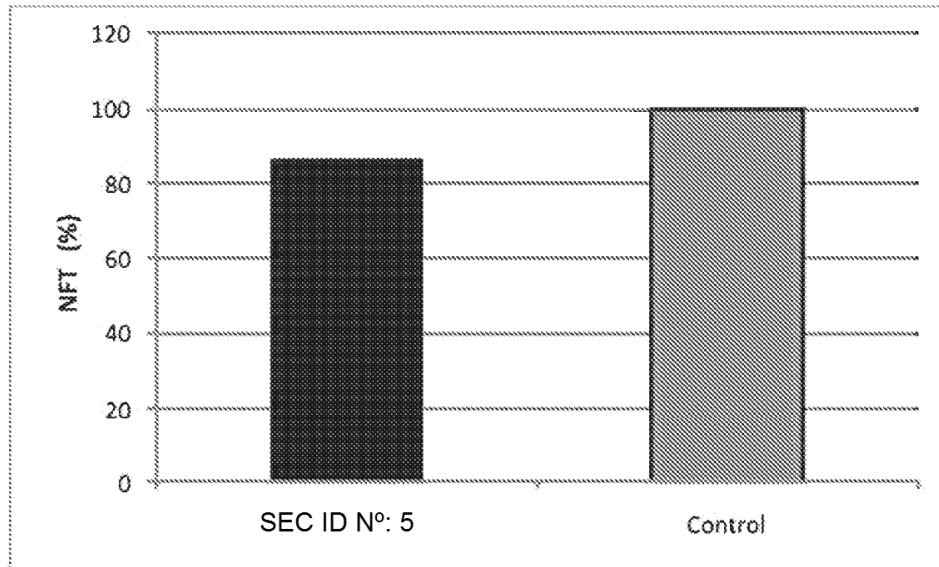


FIGURA 43

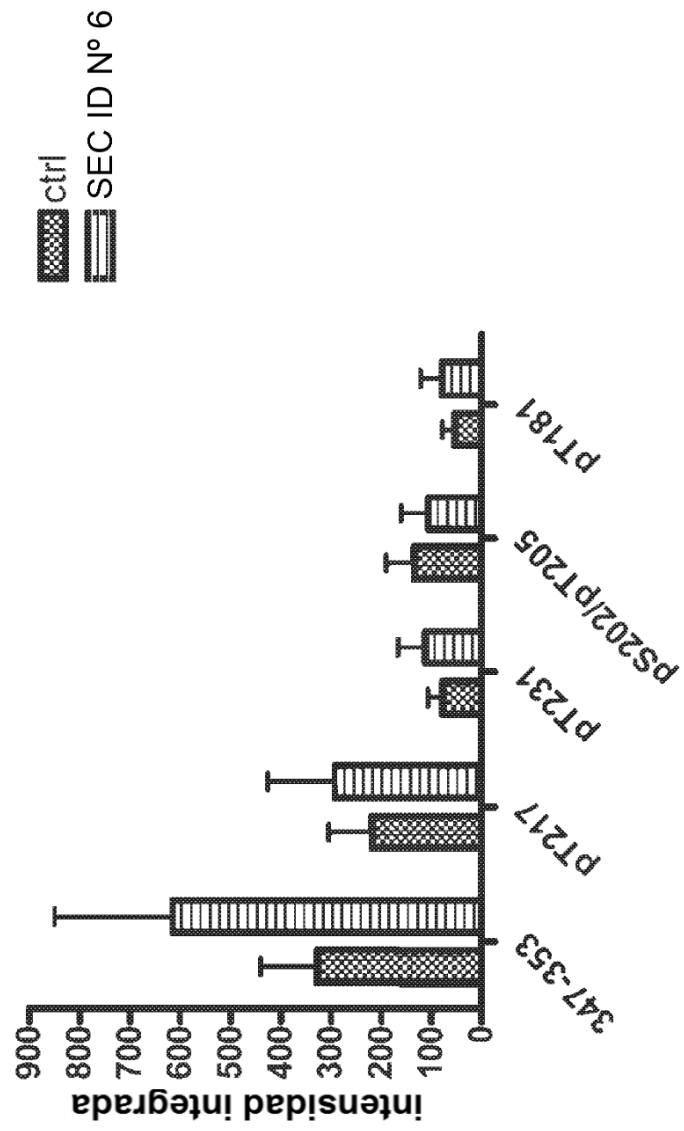
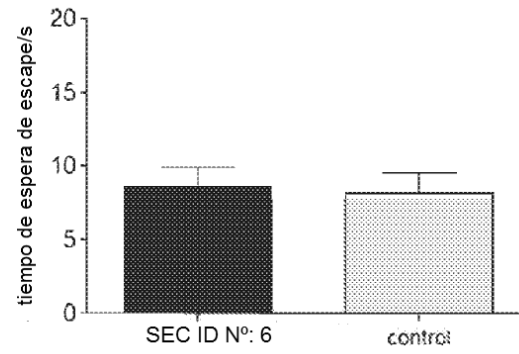


FIGURA 44

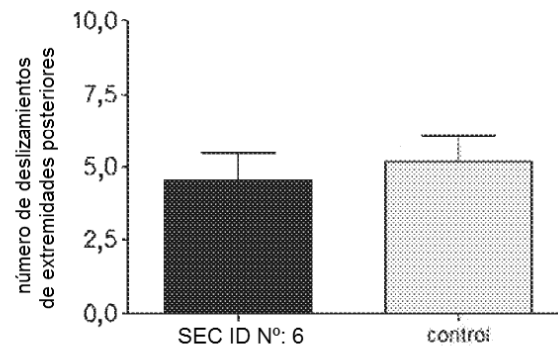
A.

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B.

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C.

Neuroescala

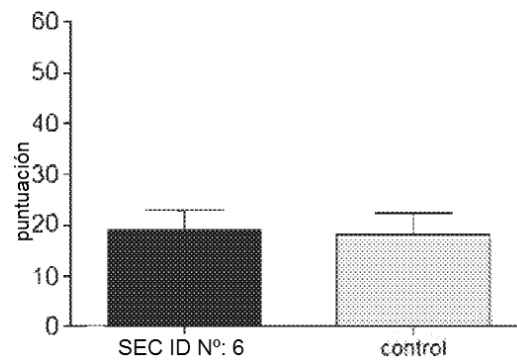


FIGURA 45

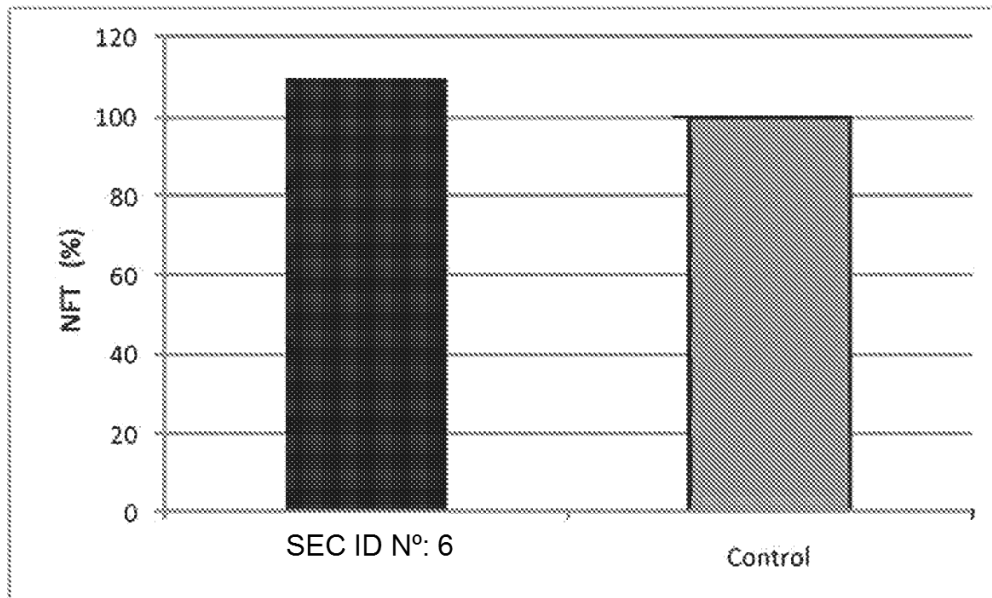


FIGURA 46

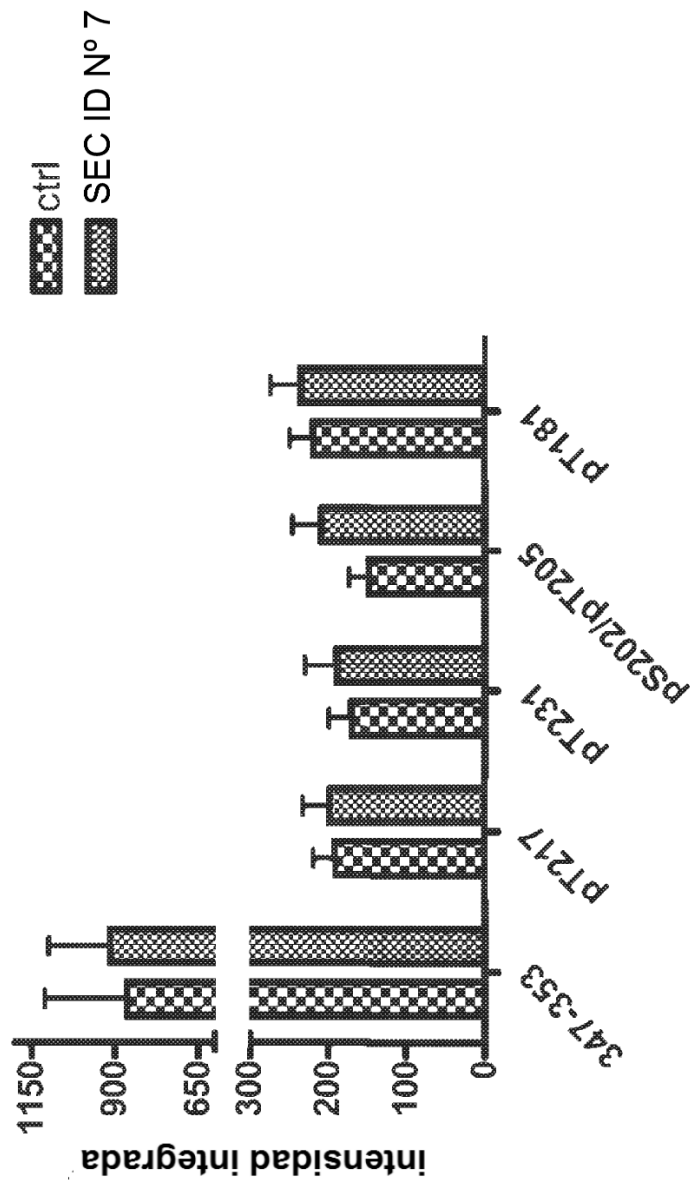
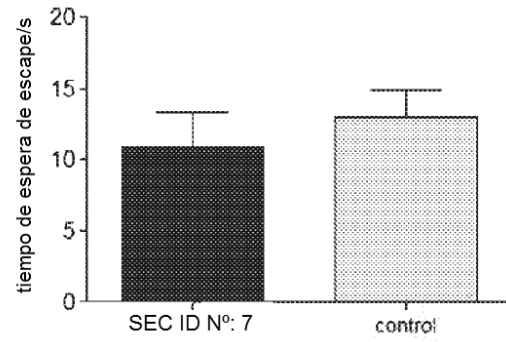


FIGURA 47

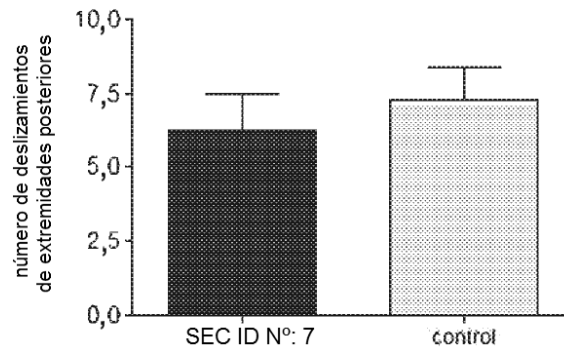
A.

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B.

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C.

Neuroescala

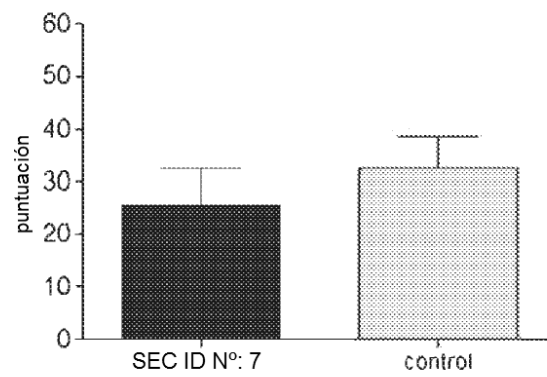


FIGURA 48

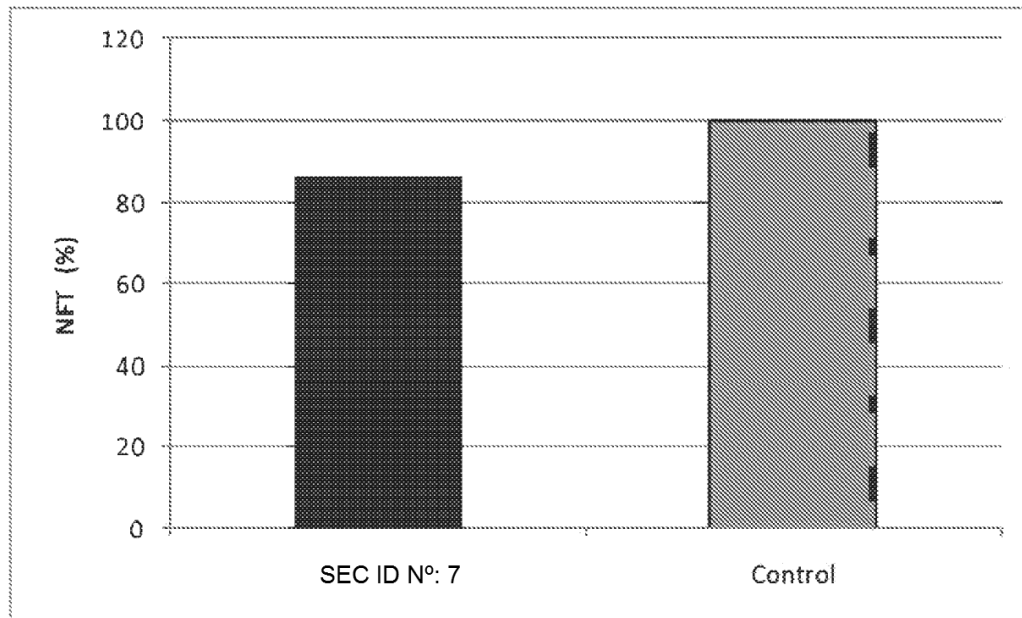


FIGURA 49

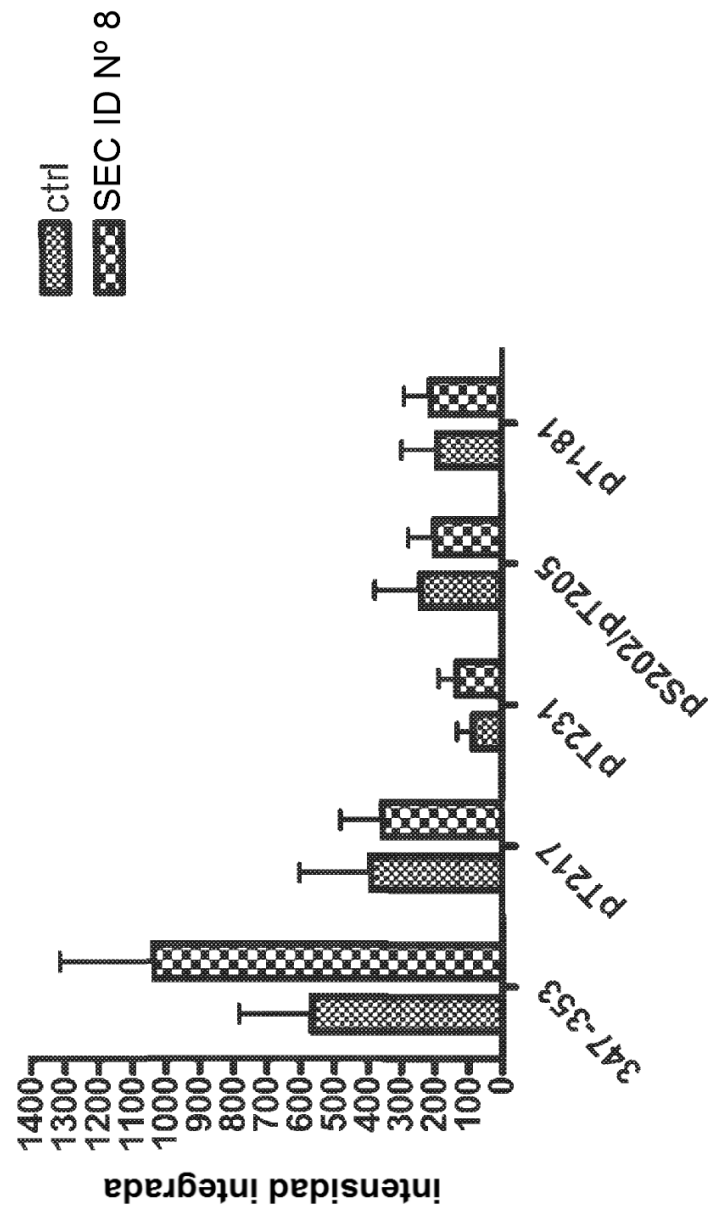
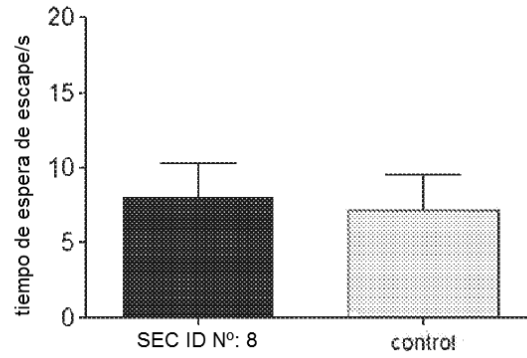


FIGURA 50

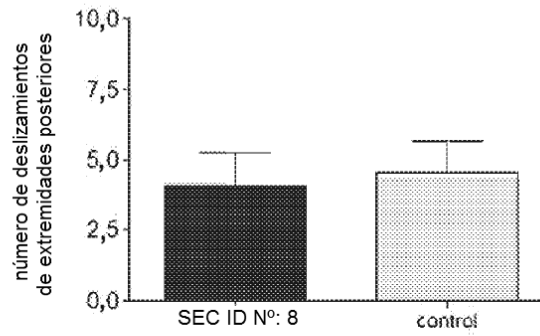
A.

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B.

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C.

Neuroescala

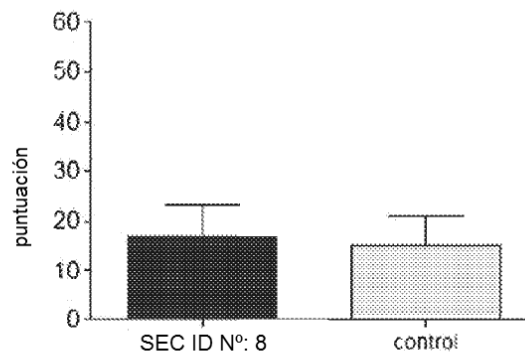


FIGURA 51

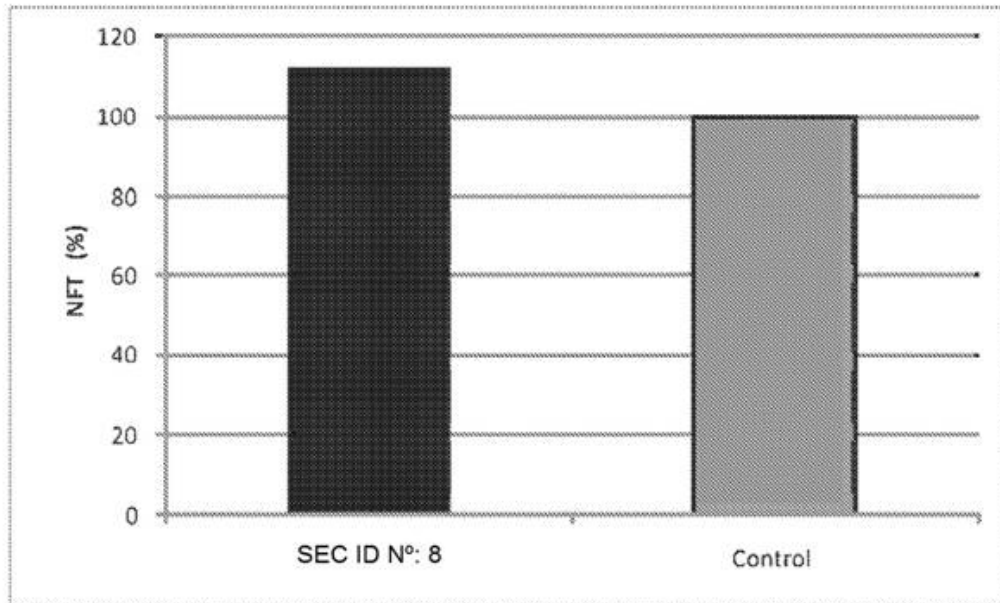


FIGURA 52

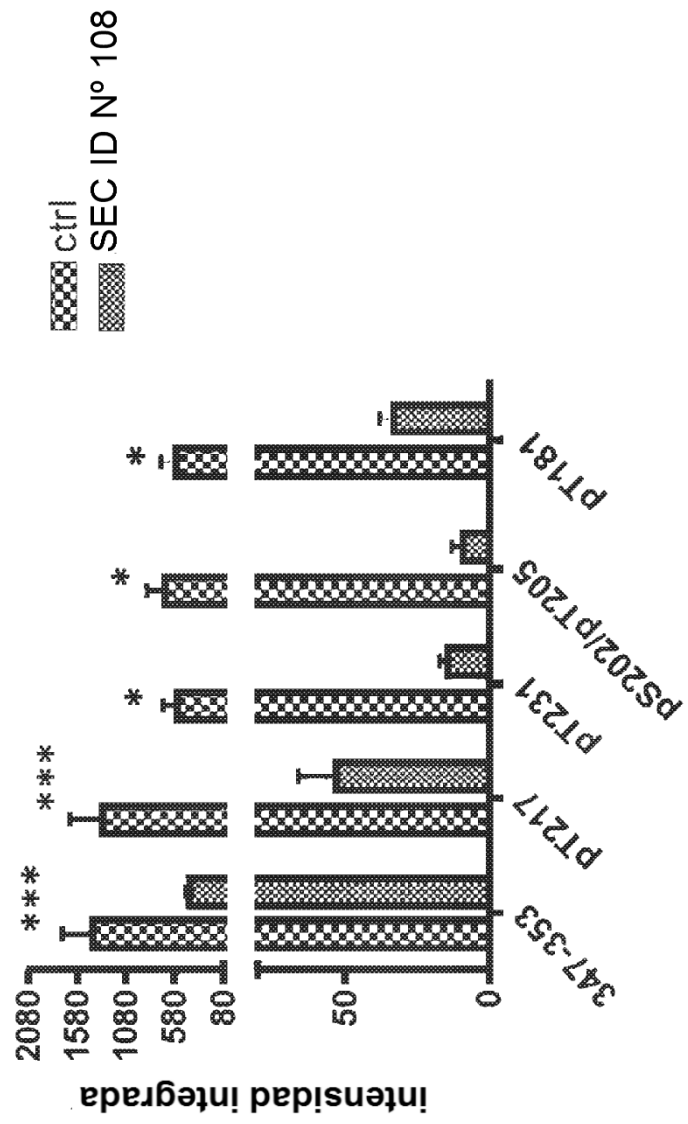
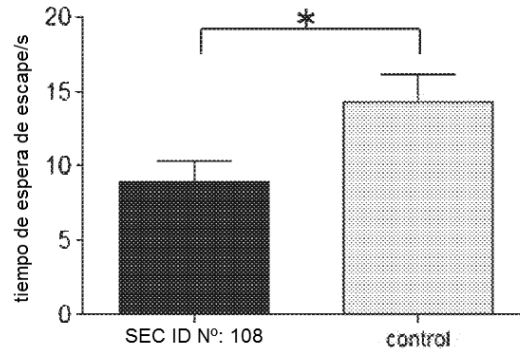


FIGURA 53

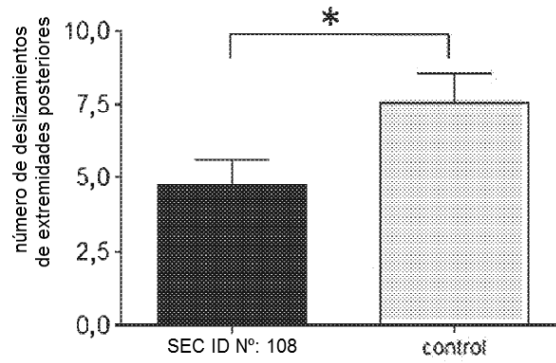
A

Ensayo de caminar por una viga: (viga de 3,5)



B

Número de deslizamientos de extremidades posteriores (viga de 3,5)



C

Neuroescala

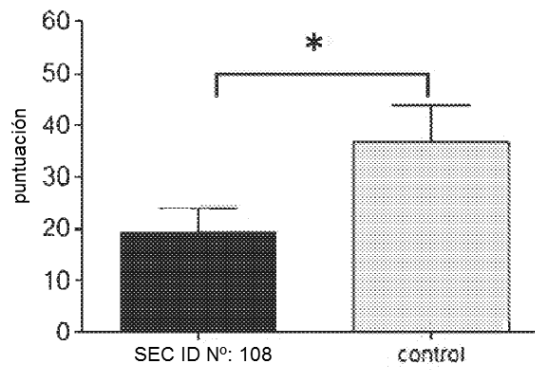


FIGURA 54

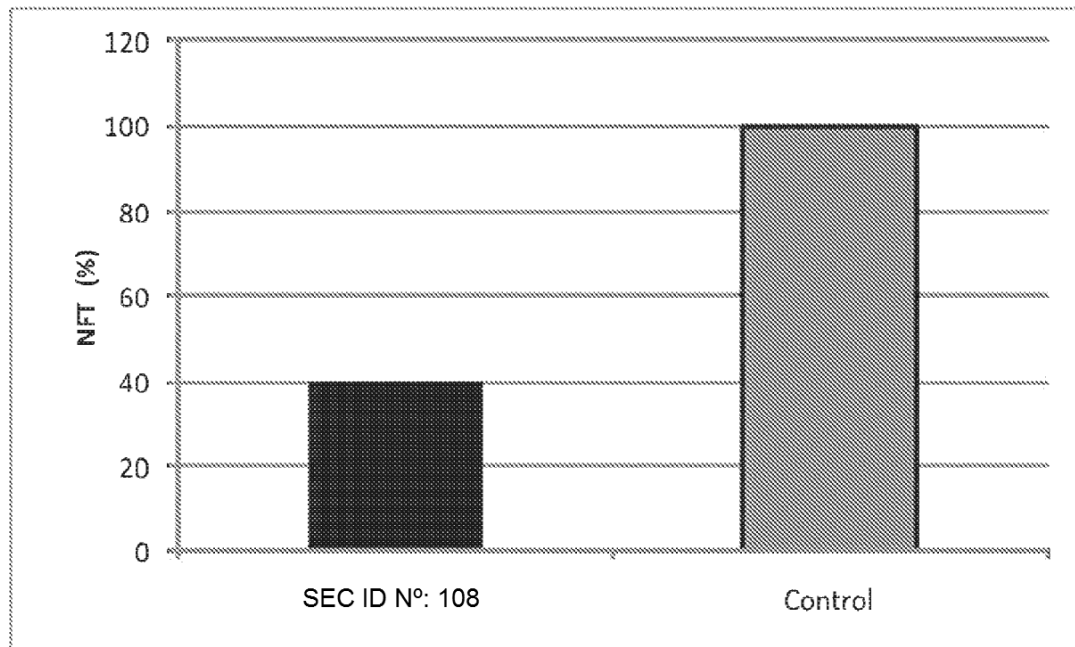


FIGURA 55

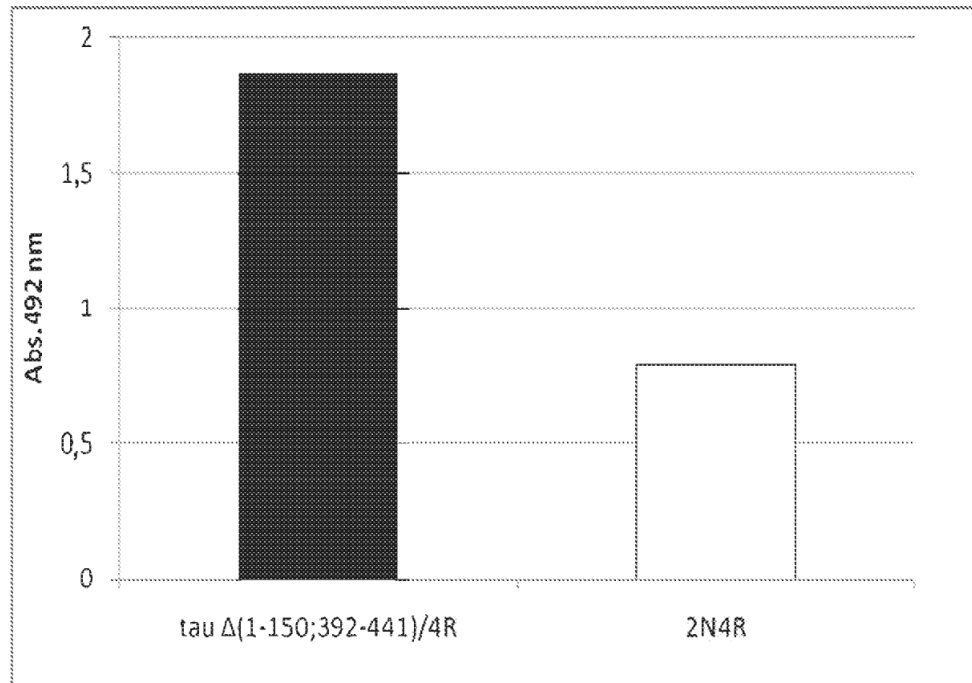


FIGURA 56

Media geométrica de los títulos de anticuerpo			
Diluciones de suero	Fase sólida		
	Péptido SEC ID Nº 108	Tau $\Delta(1-150;392-441)/4R$	Tau 2N4R
100	0 ^a	0	0
200	0	0	0
400	0	0	0
800	0	0	2
1 600	0	0	1
3 200	1	0	3
6 400	0	4	1
12 800	2	2	1
25 600	5	4	2
51 200	2	0	0
GMT ^b	20800	12800	4200

Notas a pie de página:

^a Número de individuos que responden

^b Media geométrica del título

FIGURA 57

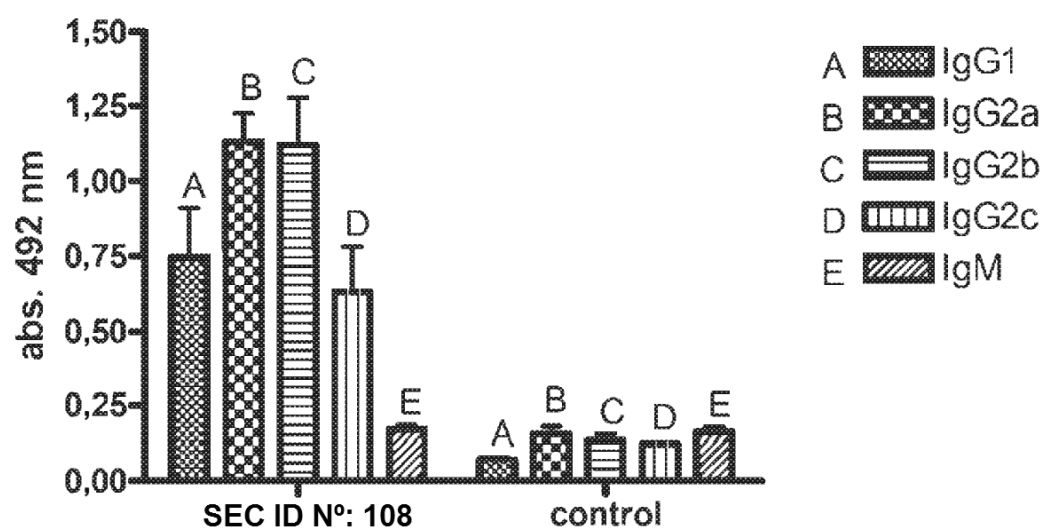


FIGURA 58

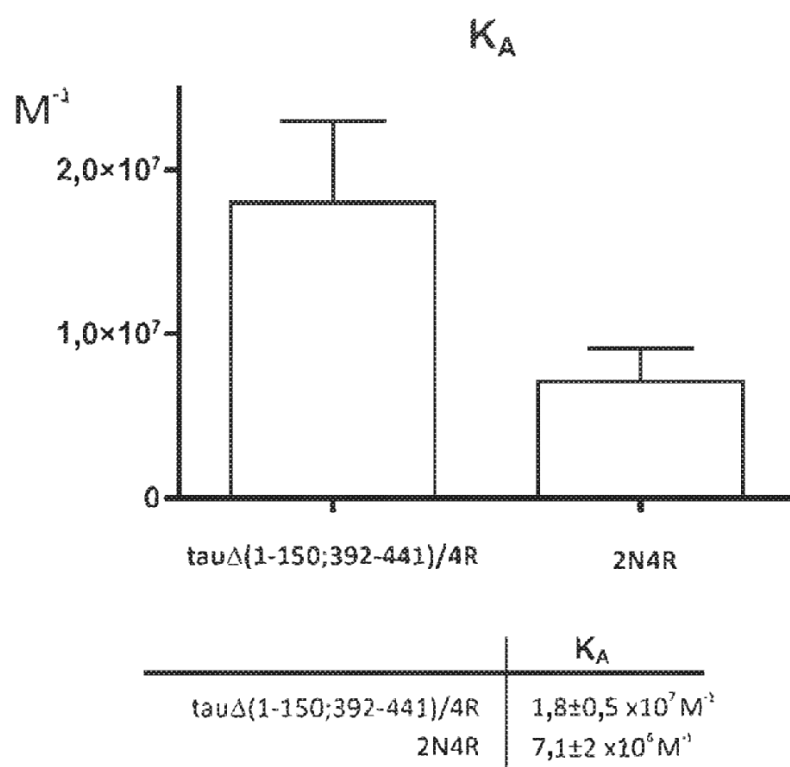


FIGURA 59

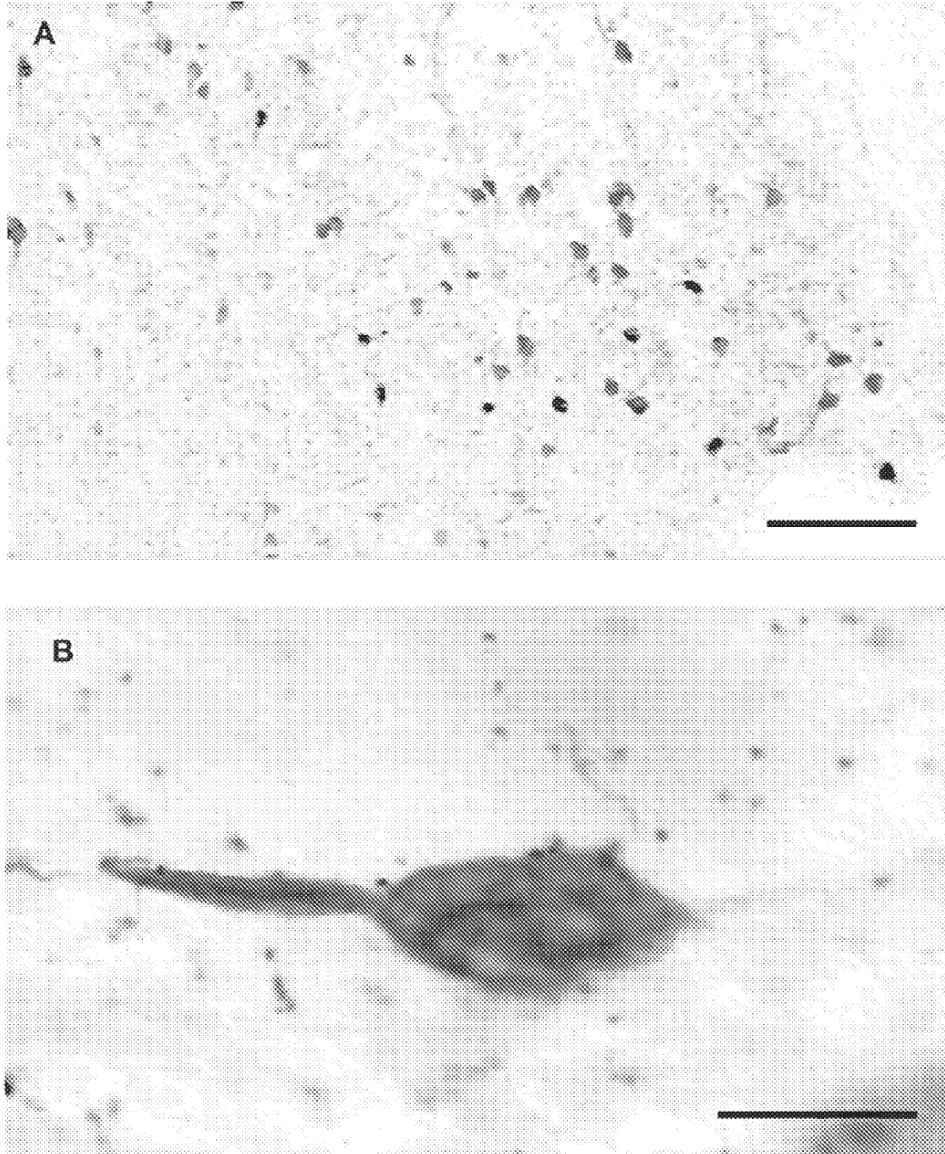


FIGURA 60

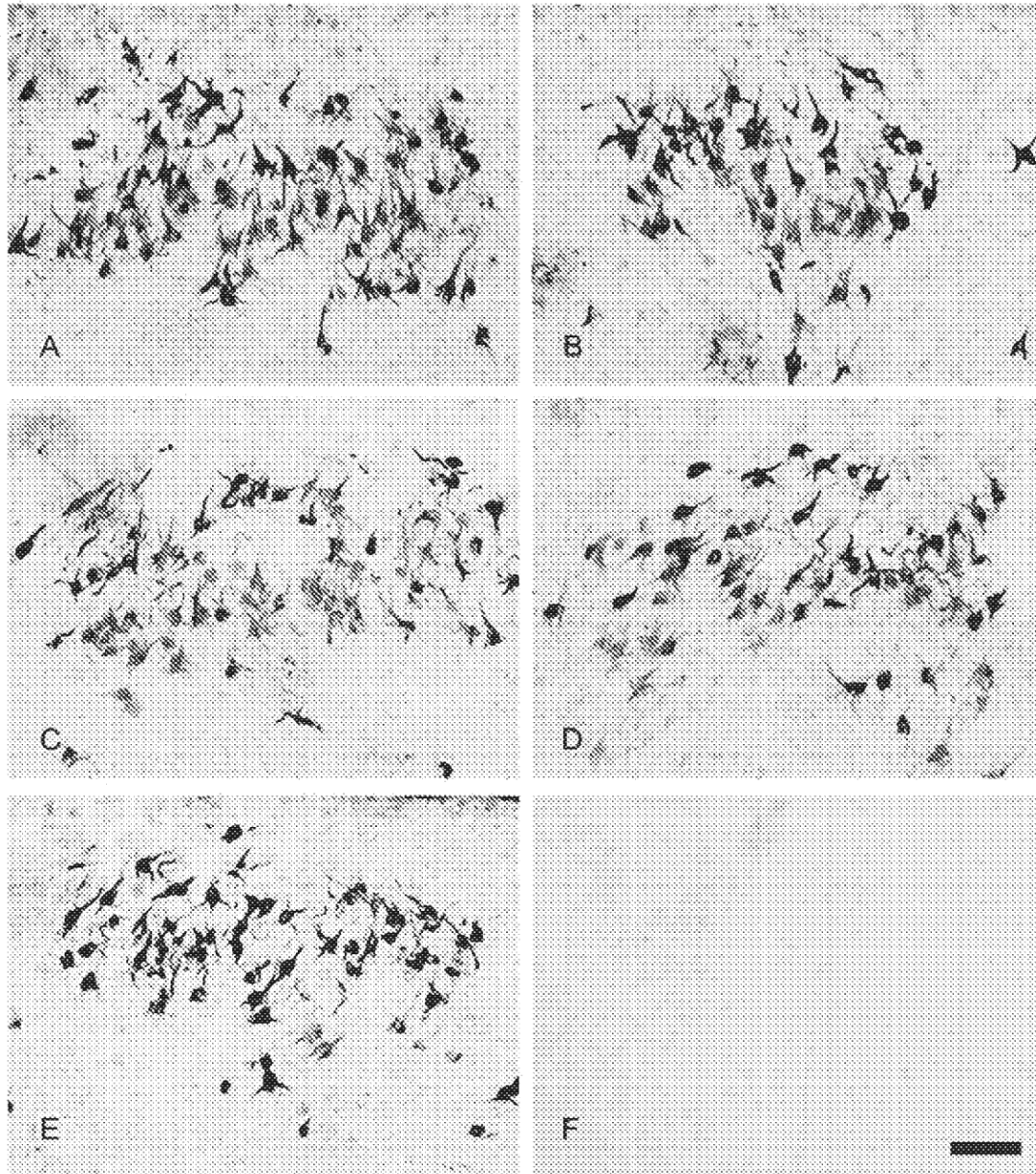


FIGURA 61

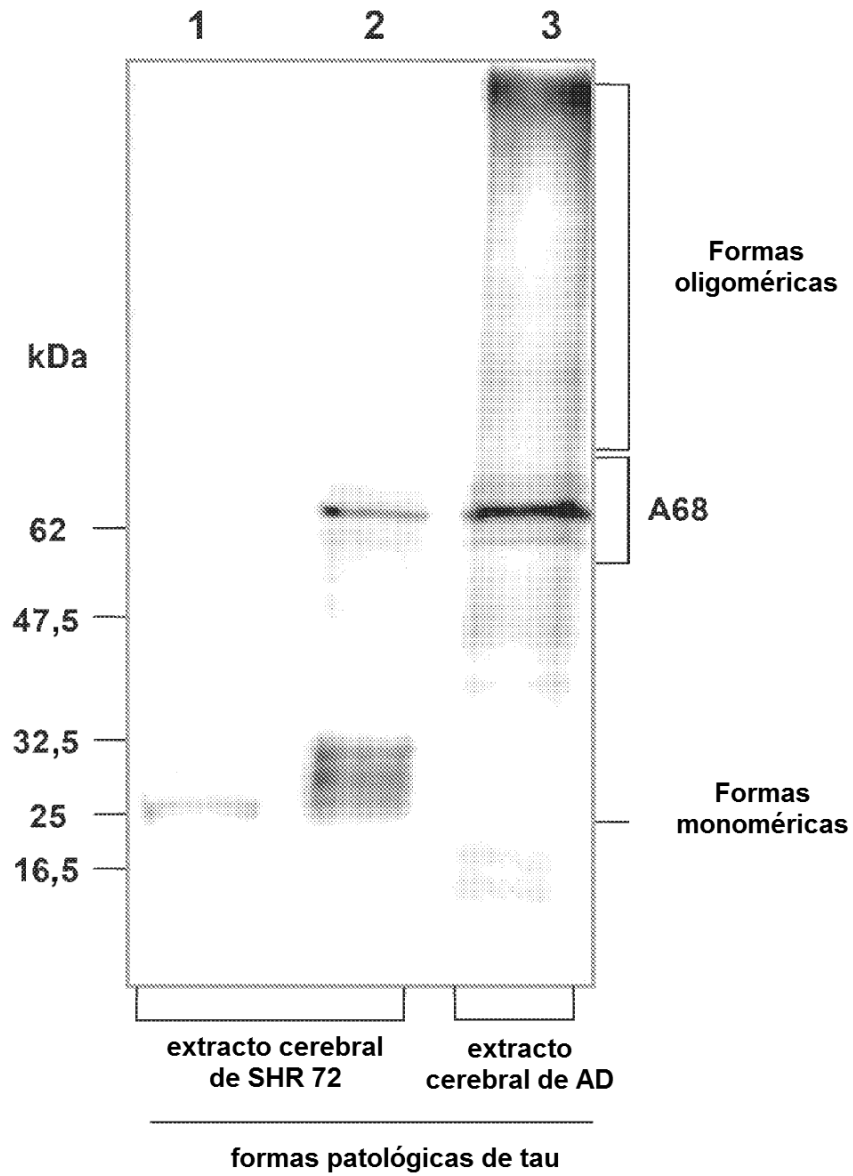


FIGURA 62

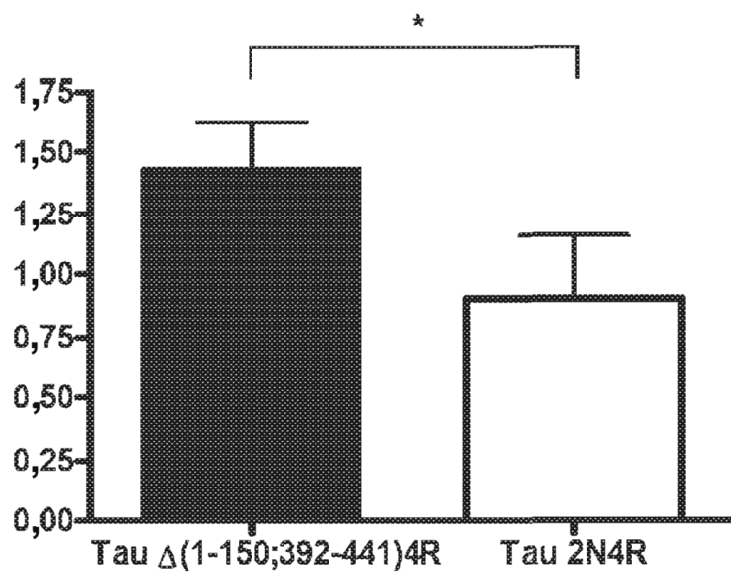


FIGURA 63

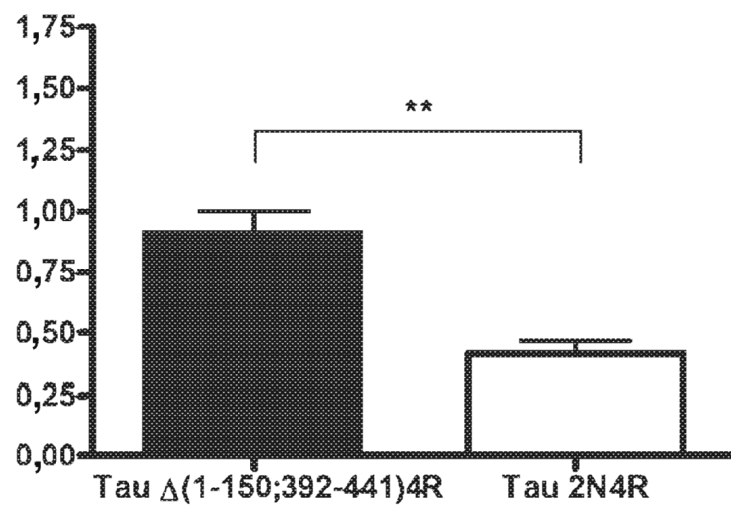


FIGURA 64

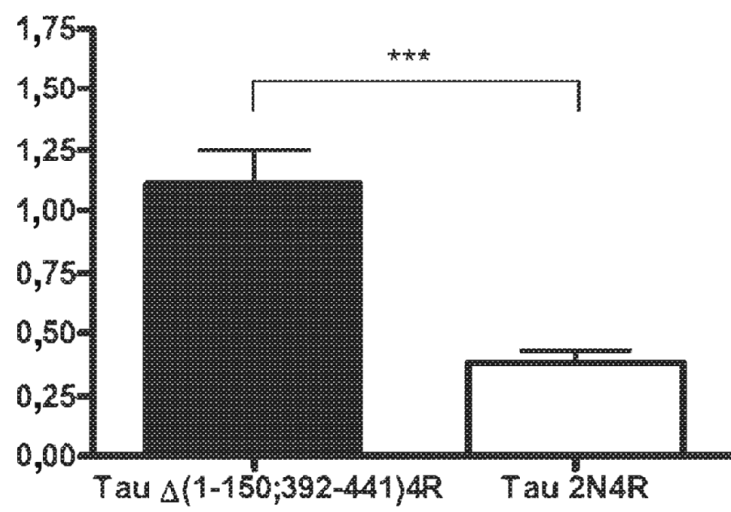


FIGURA 65

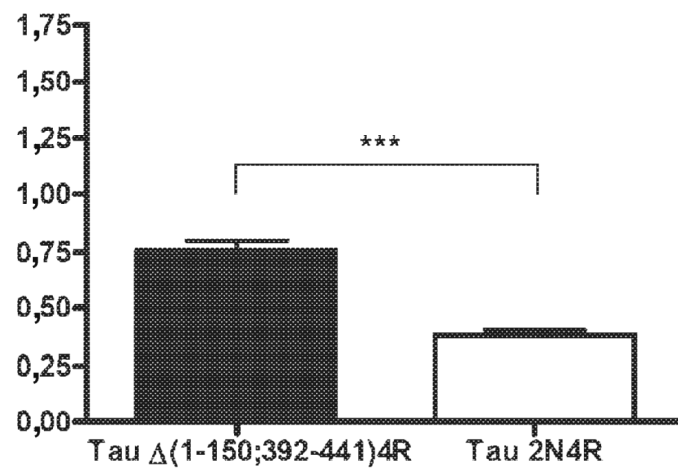


FIGURA 66

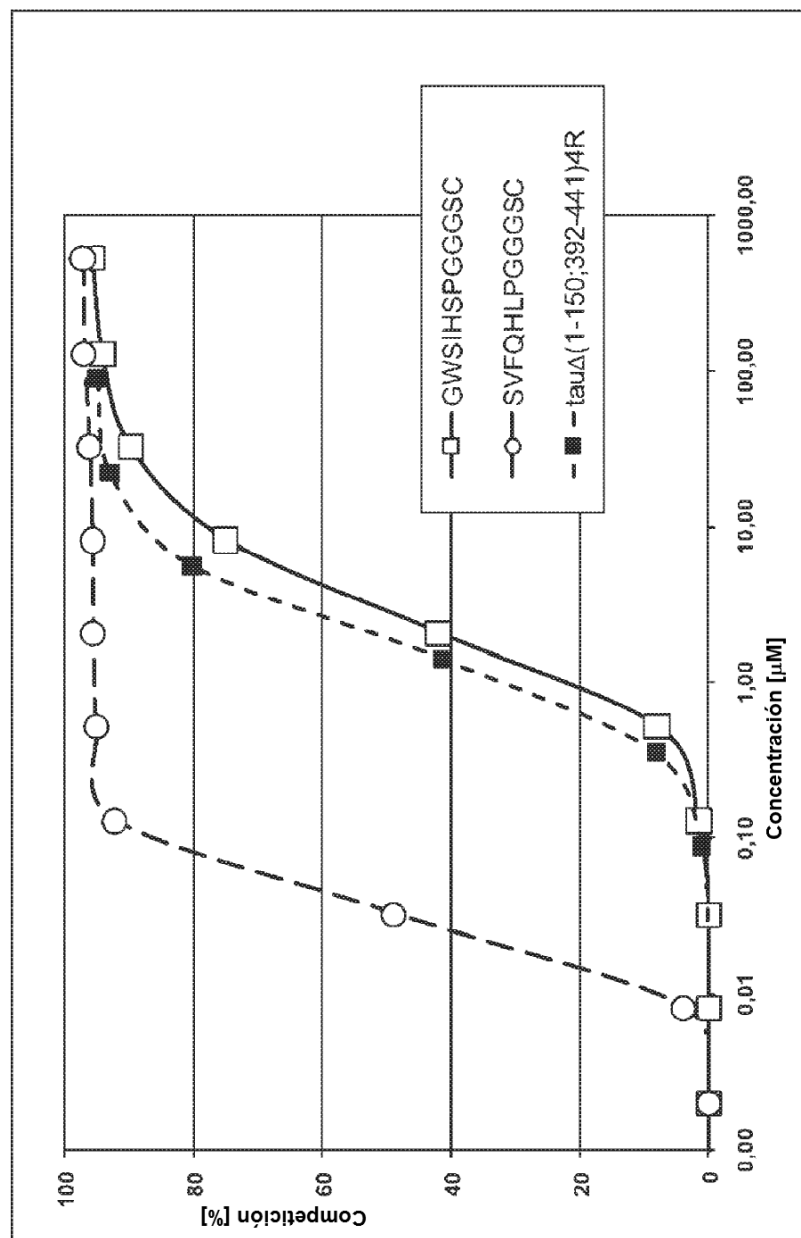


FIGURA 67

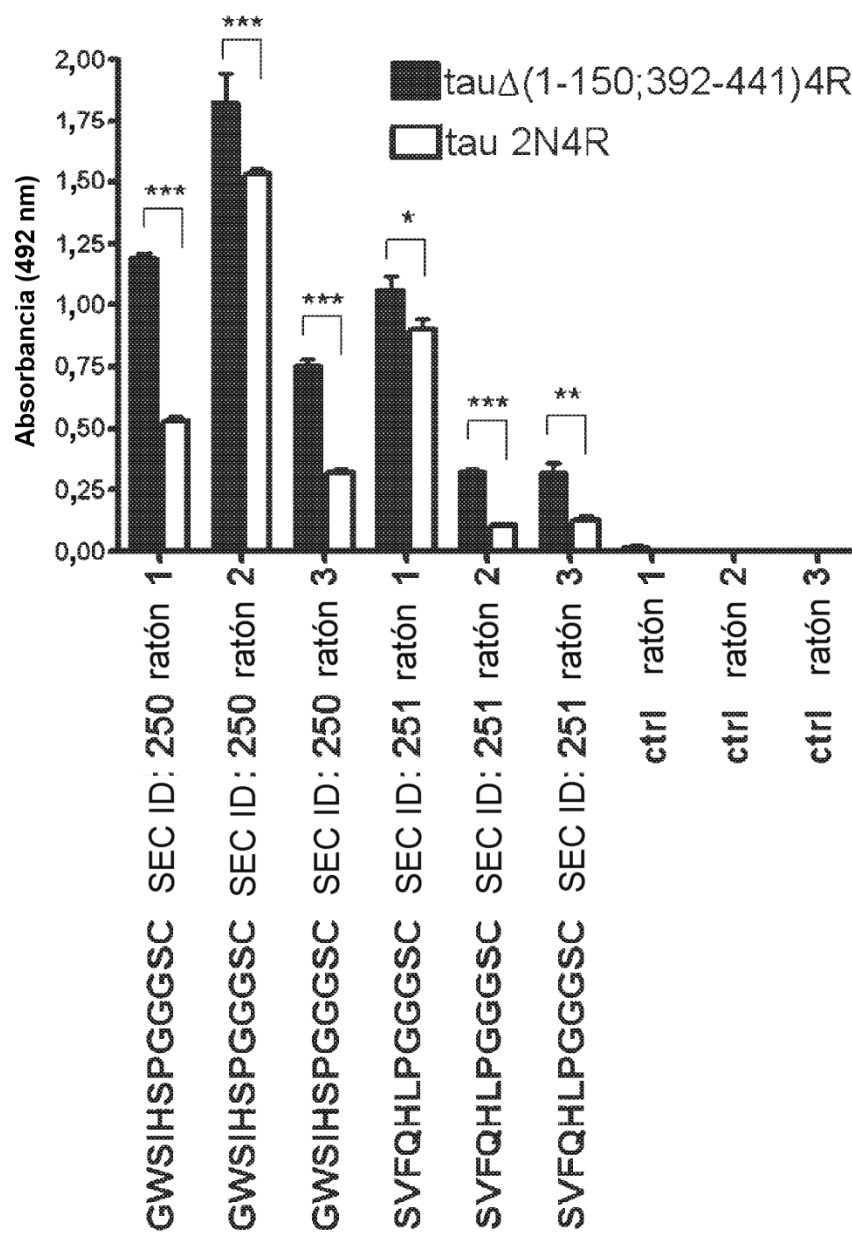


FIGURA 68

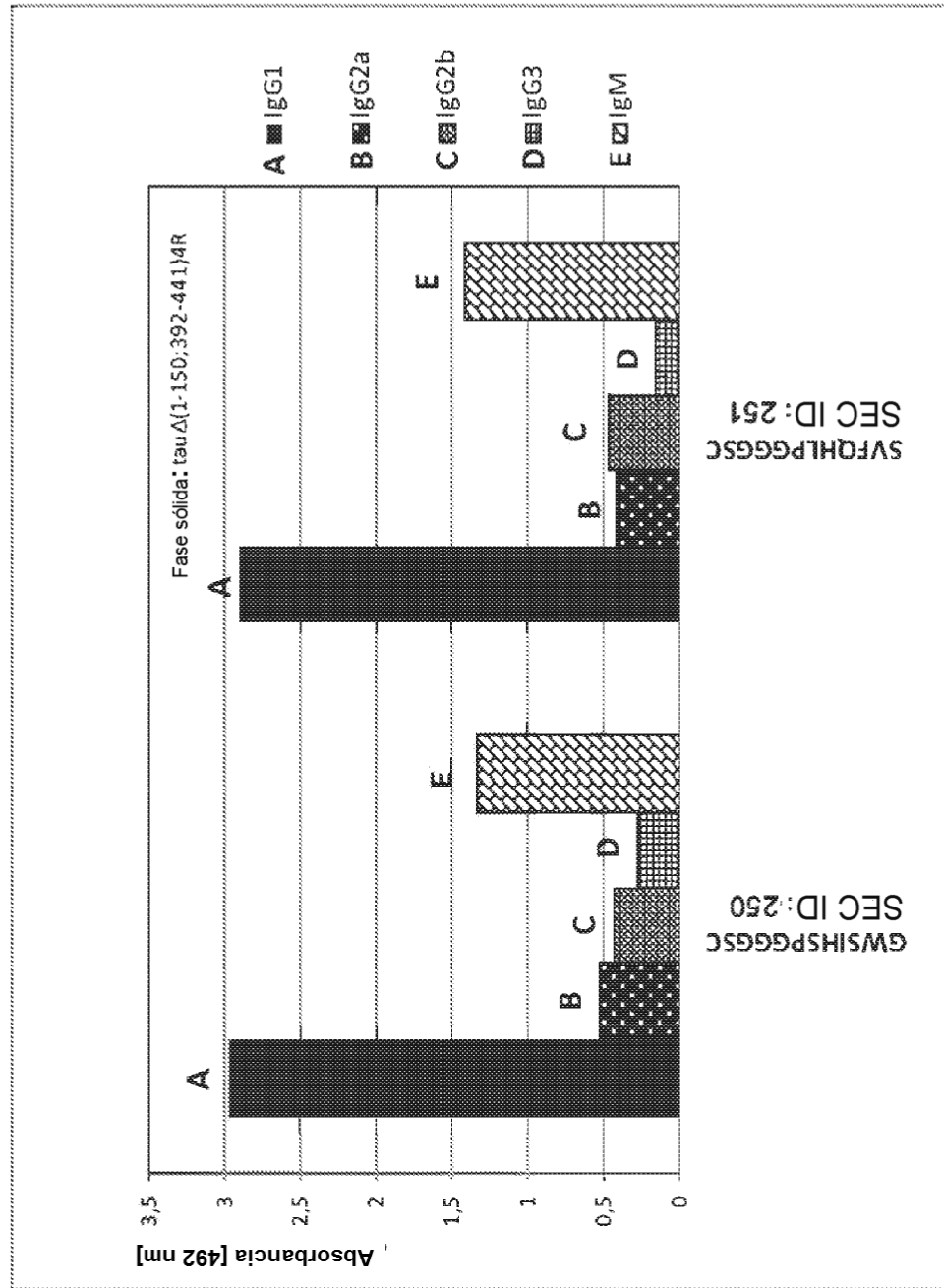
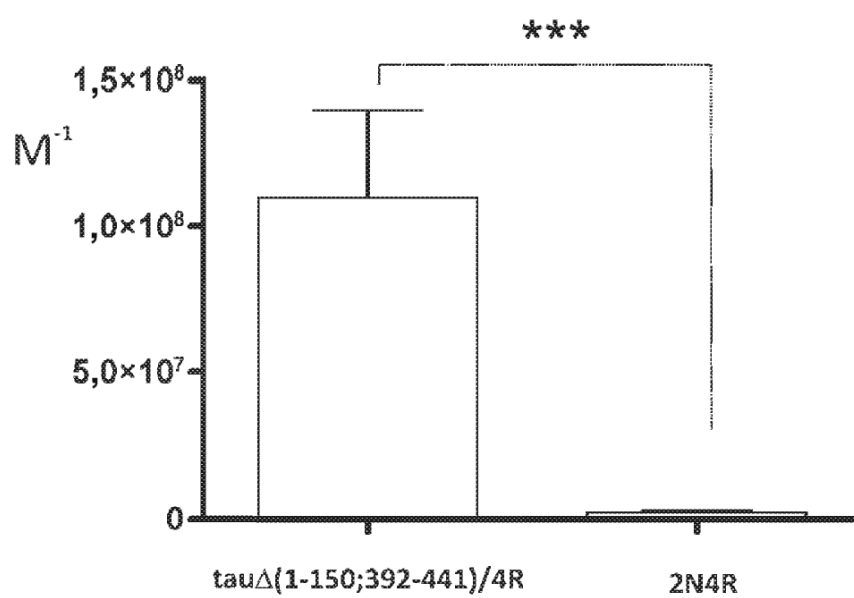


FIGURA 69A

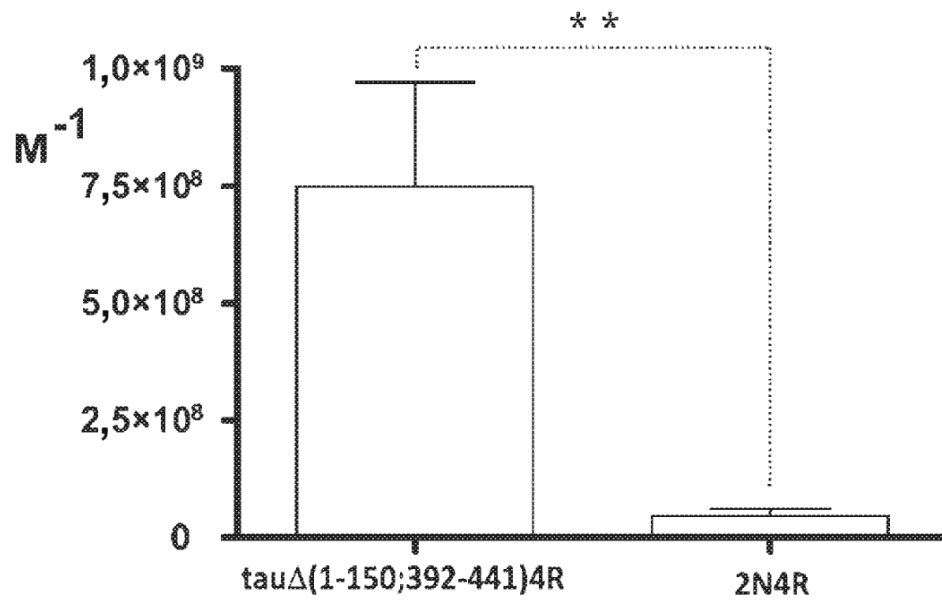
[GWSIHSPGGGSC (SEC ID: 250)]



	K_A
$\text{tau}\Delta(1-150;392-441)/4R$	$1,1 \pm 0,3 \times 10^8 M^{-1}$
$2N4R$	$2,3 \pm 0,7 \times 10^6 M^{-1}$

FIGURA 69B

[SVFQHLPGGGSC (SEC ID: 251)]



	K_A
$\tau\Delta(1-150;392-441)4R$	$7,5 \pm 2,2 \times 10^8 M^{-1}$
$2N4R$	$4,7 \pm 1,4 \times 10^7 M^{-1}$

FIGURA 70-A a F

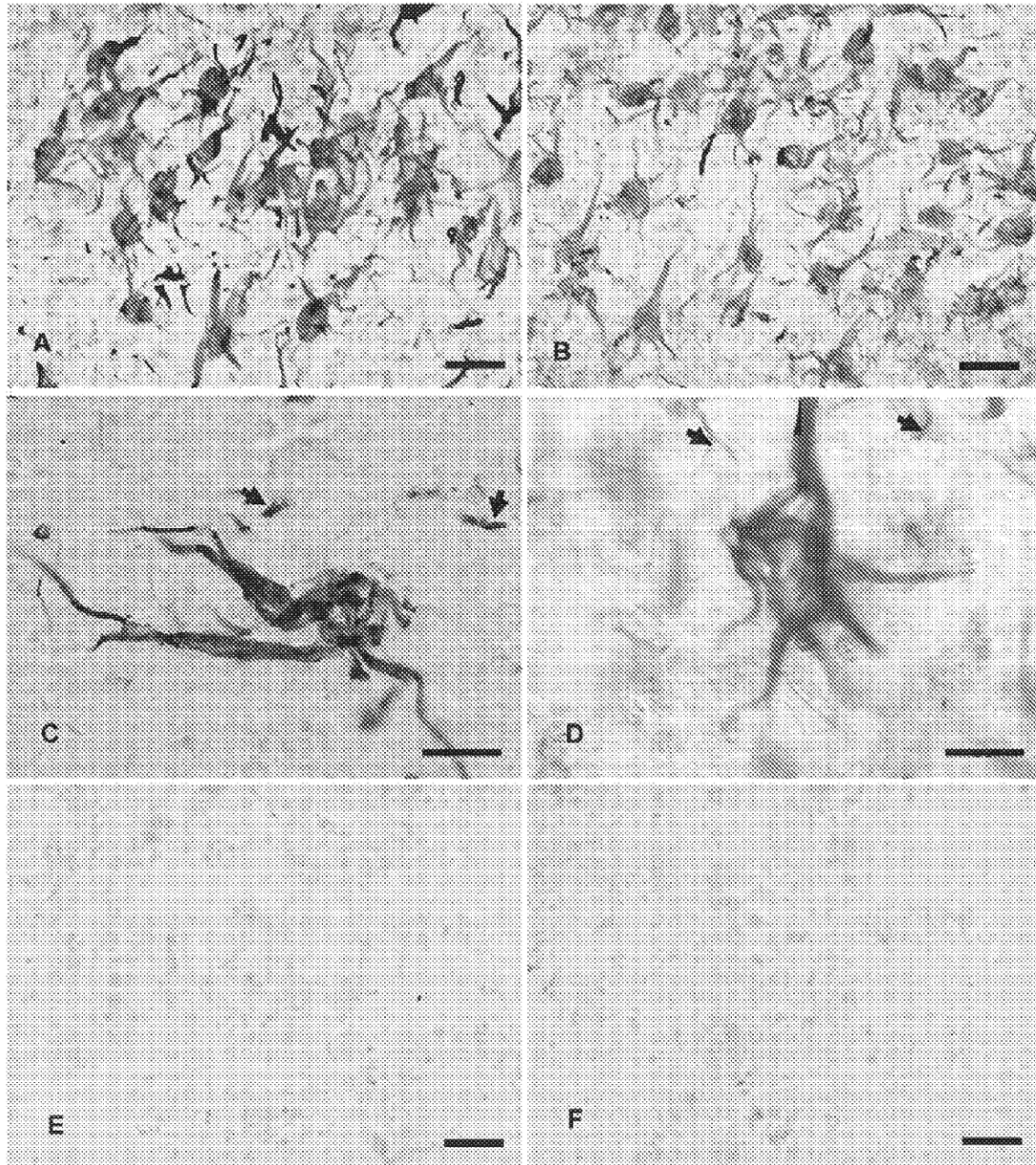


FIGURA 70G-J

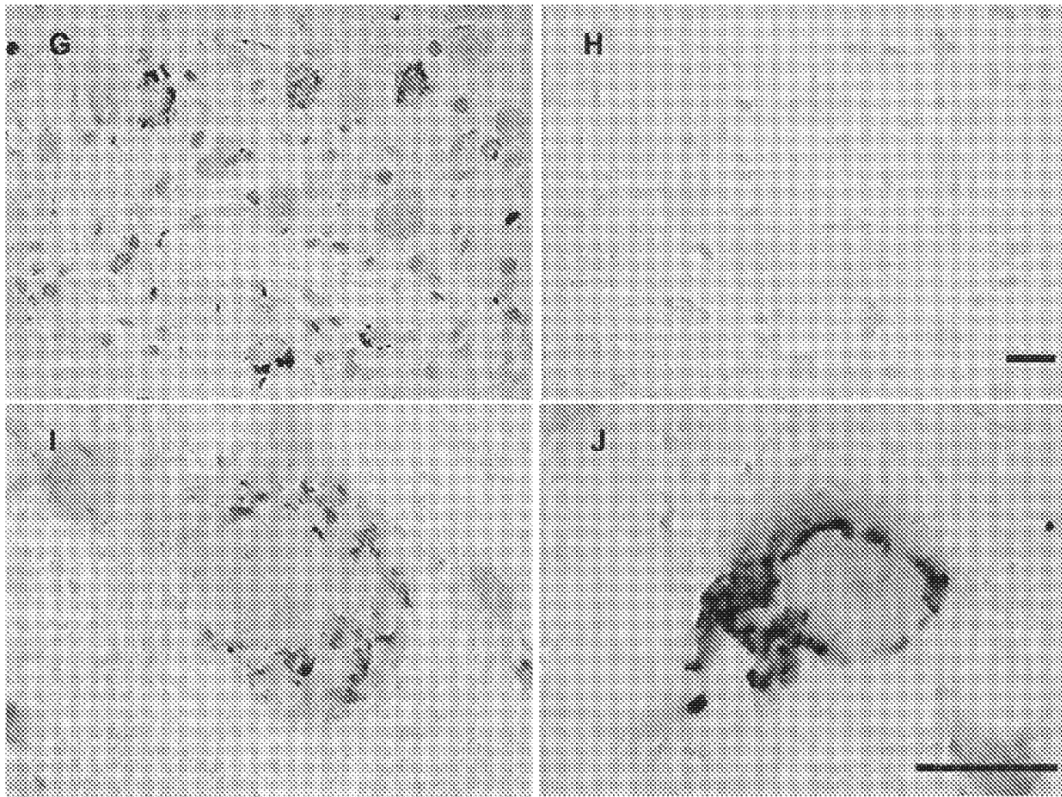


FIGURA 71

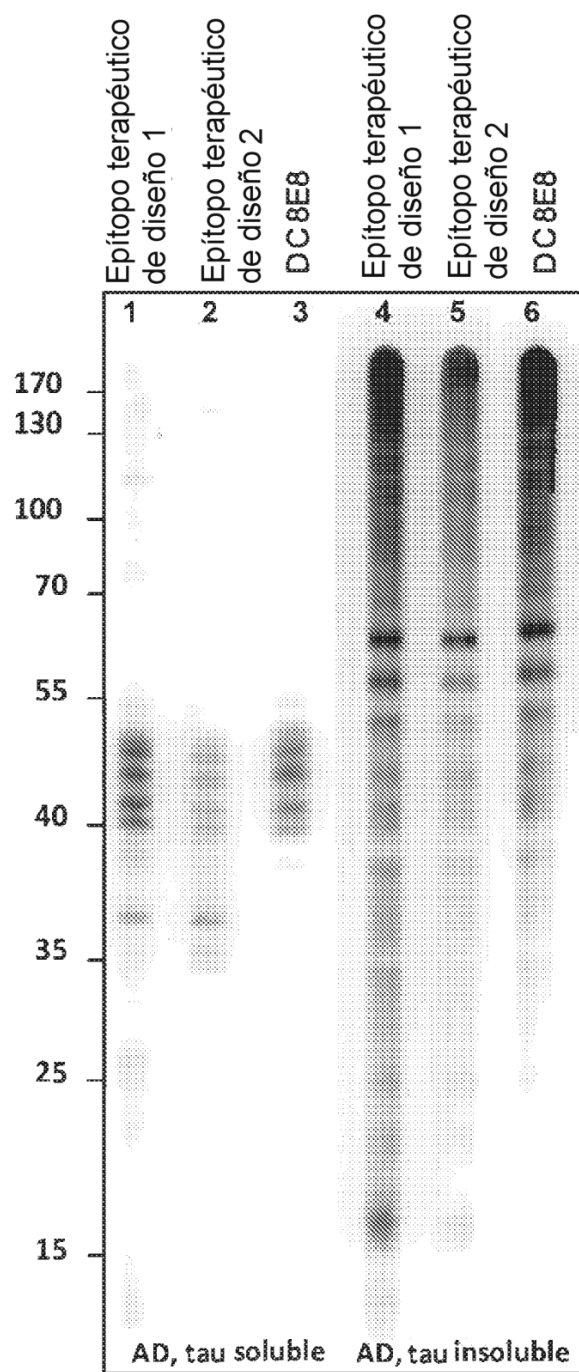


FIGURA 72

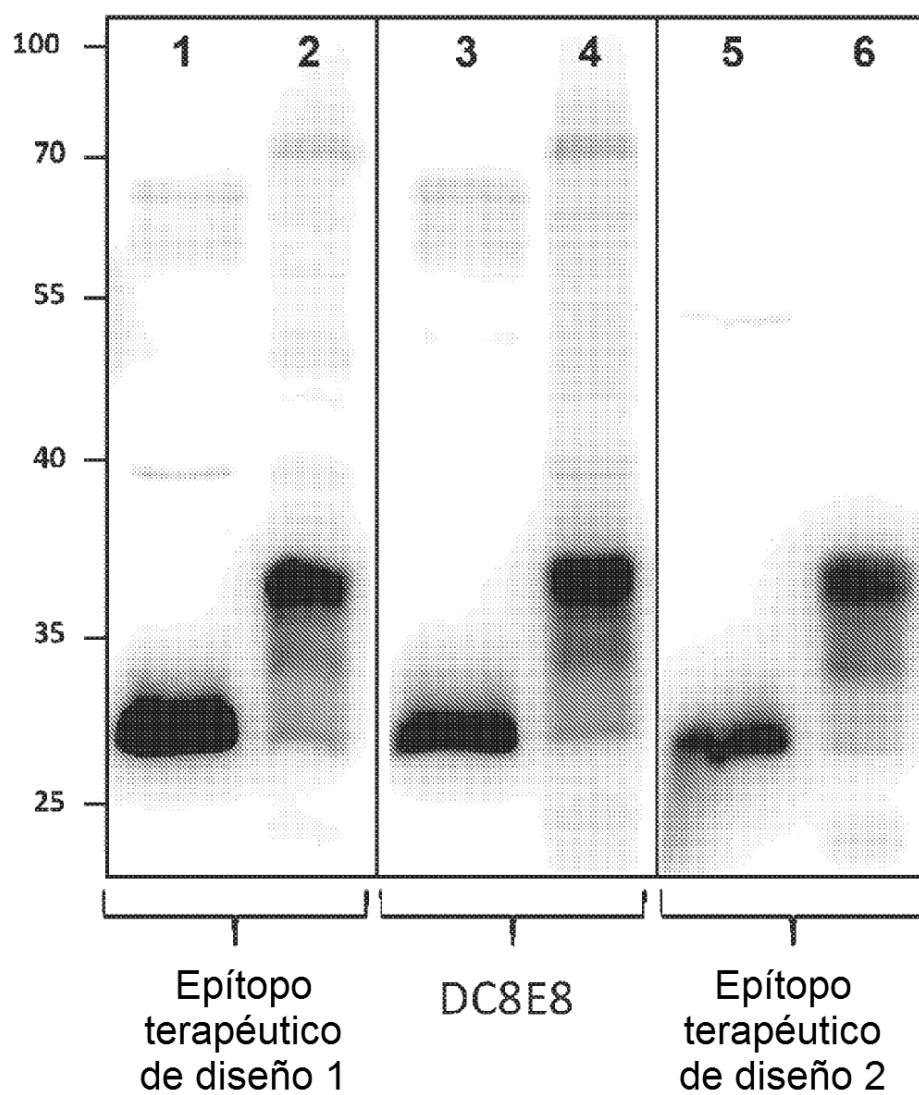
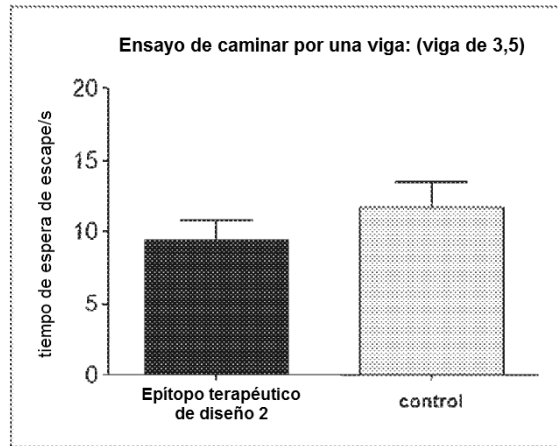
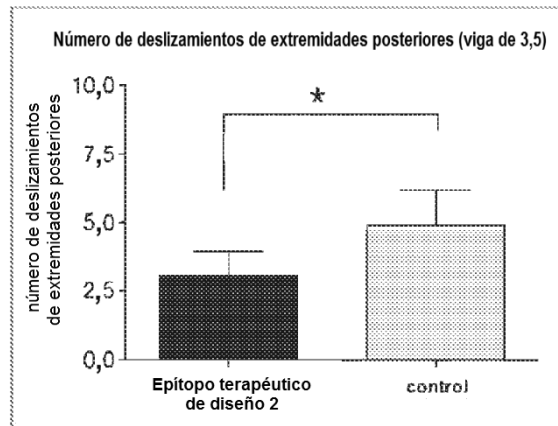


FIGURA 73

A.



B.



C.

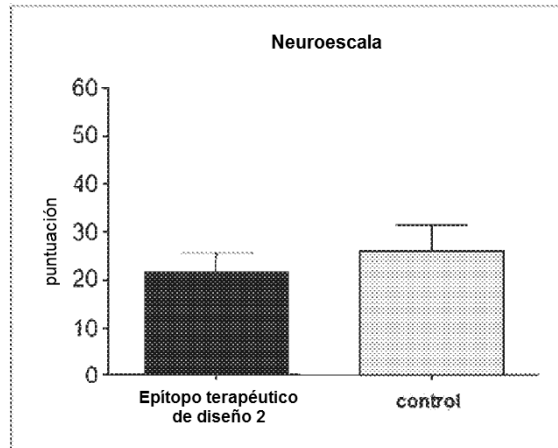


FIGURA 74

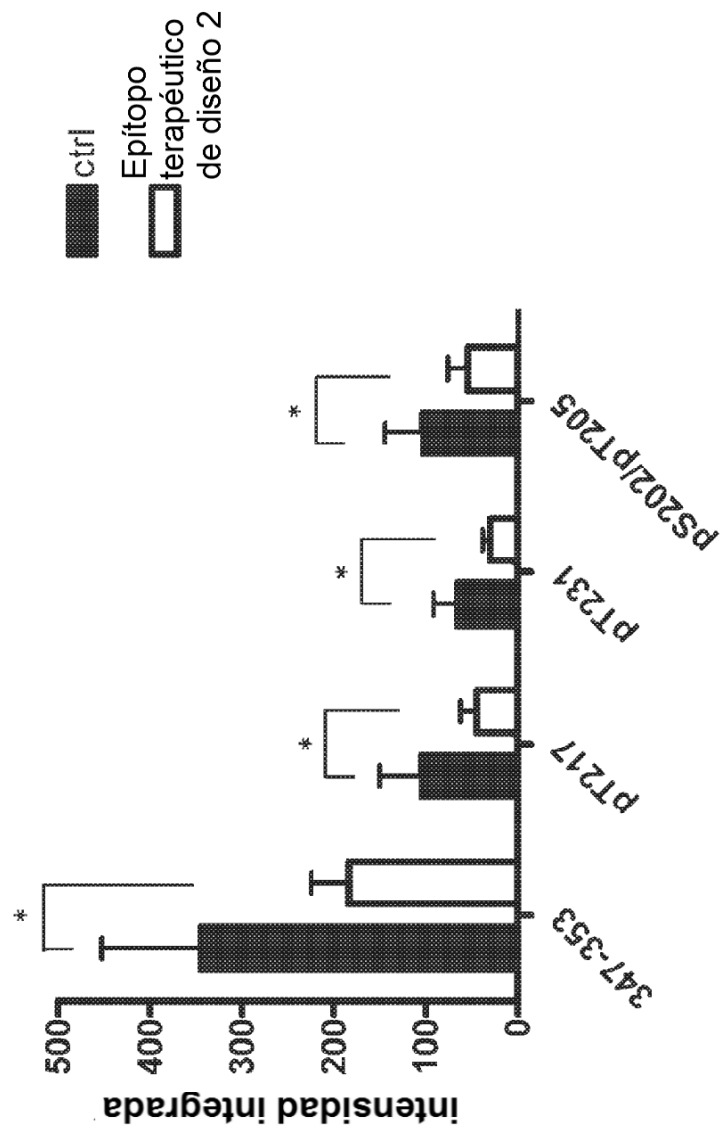


FIGURA 75A

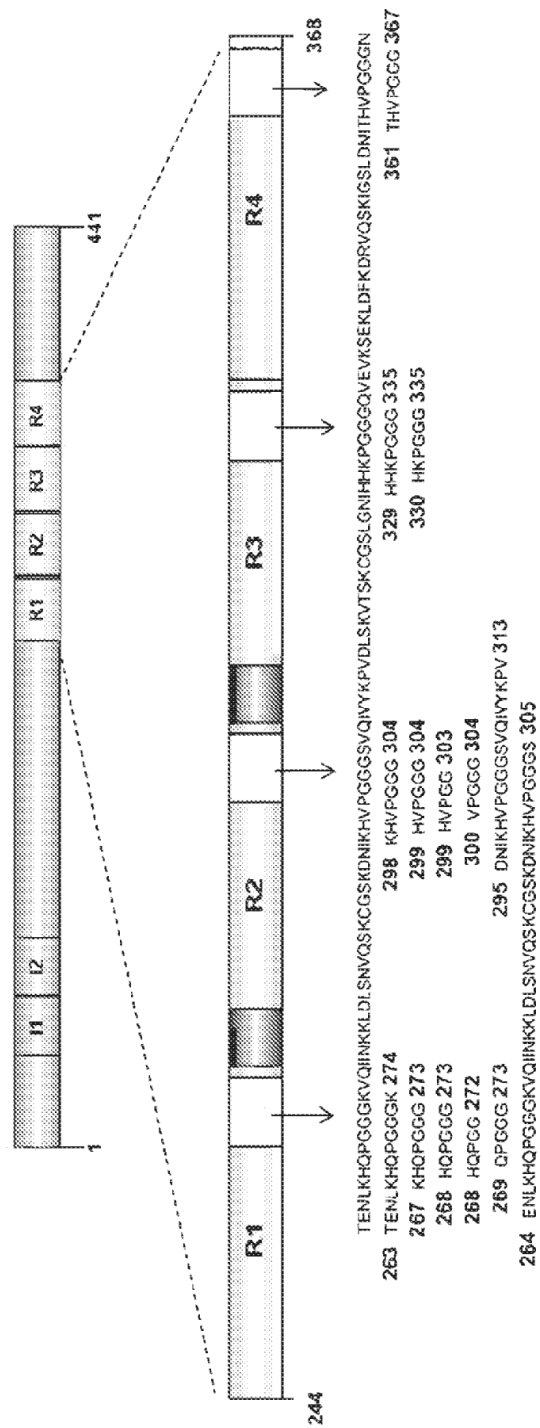


FIGURA 75B

Péptido sintético	SEC ID N°	Secuencia
Tau263-274	SEC ID N°: 270	TENLKHQPGGGK
Tau267-273	SEC ID N°: 271	KHQPGGG
Tau268-273	SEC ID N°: 272	HQPGGG
Tau268-272	SEC ID N°: 273	HQPGG
Tau269-273	SEC ID N°: 274	QPGGG
Tau264-305	SEC ID N°: 275	ENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGG
Tau298-304	SEC ID N°: 276	KHVPGGG
Tau299-304	SEC ID N°: 277	HVPGGG
Tau299-303	SEC ID N°: 278	HVPGG
Tau300-304	SEC ID N°: 279	VPGGG
Tau295-313	SEC ID N°: 280	DNIKHVPGGGSVQIVYKPV
Tau329-335	SEQ ID NO: 281	HKPGGG
Tau330-335	SEQ ID NO: 282	HKPGGG
Tau361-367	SEQ ID NO: 283	THVPGGG

FIGURA 76

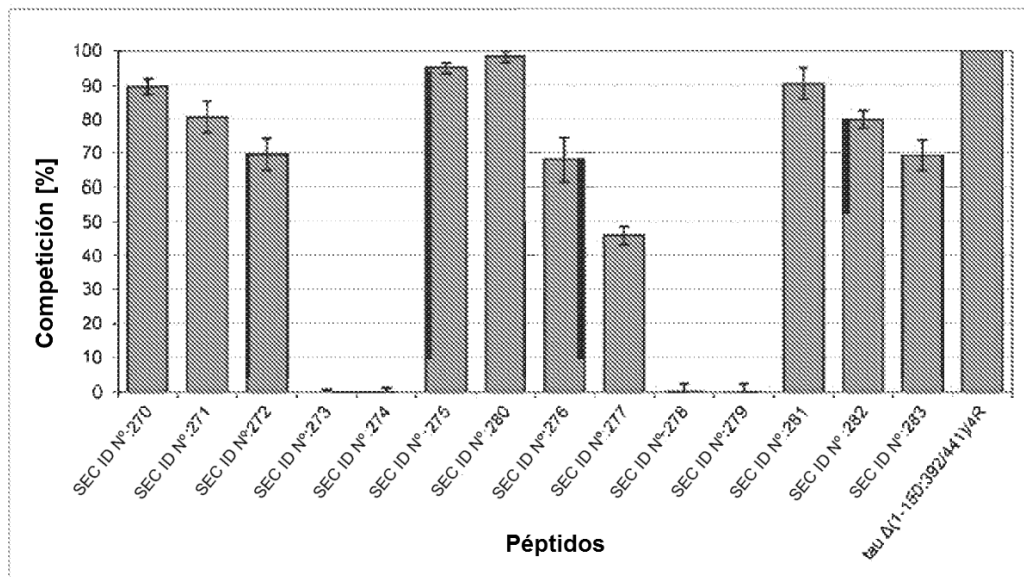


Figura 77A

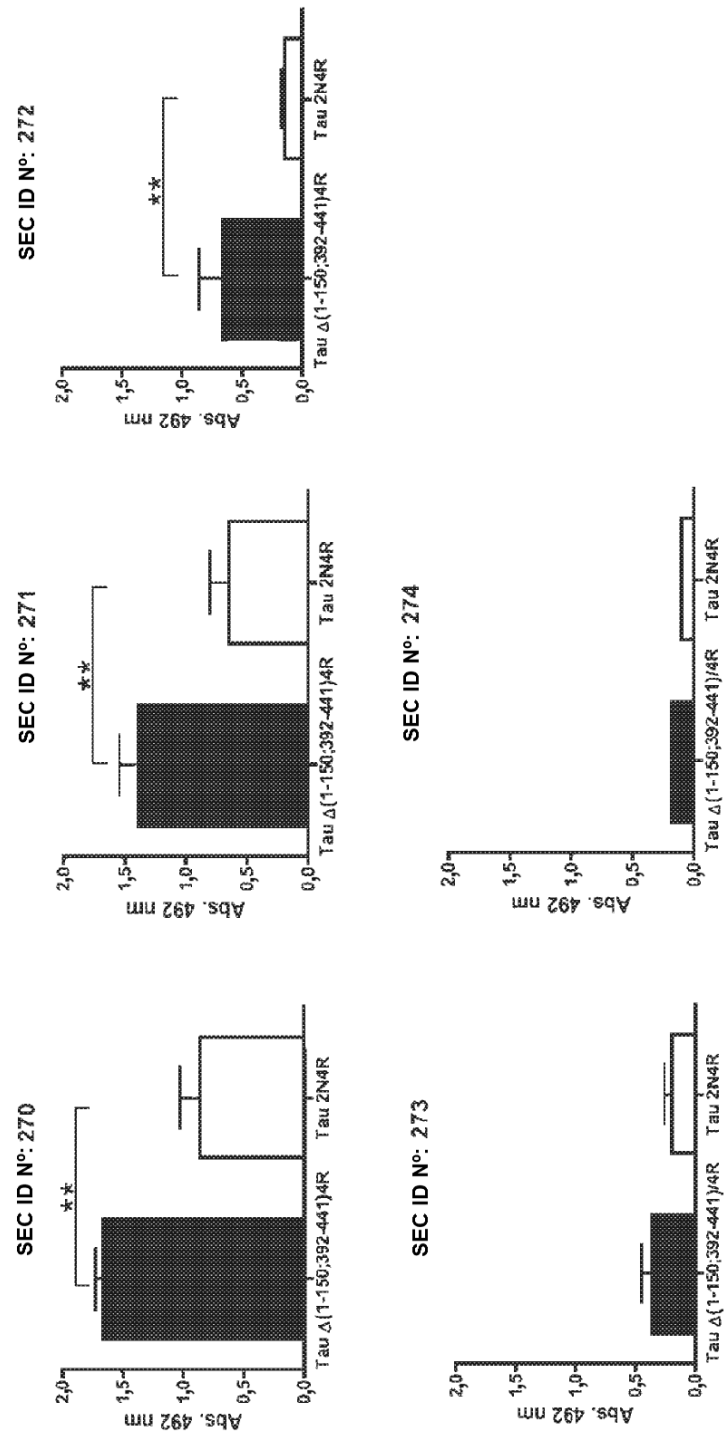


Figura 77B

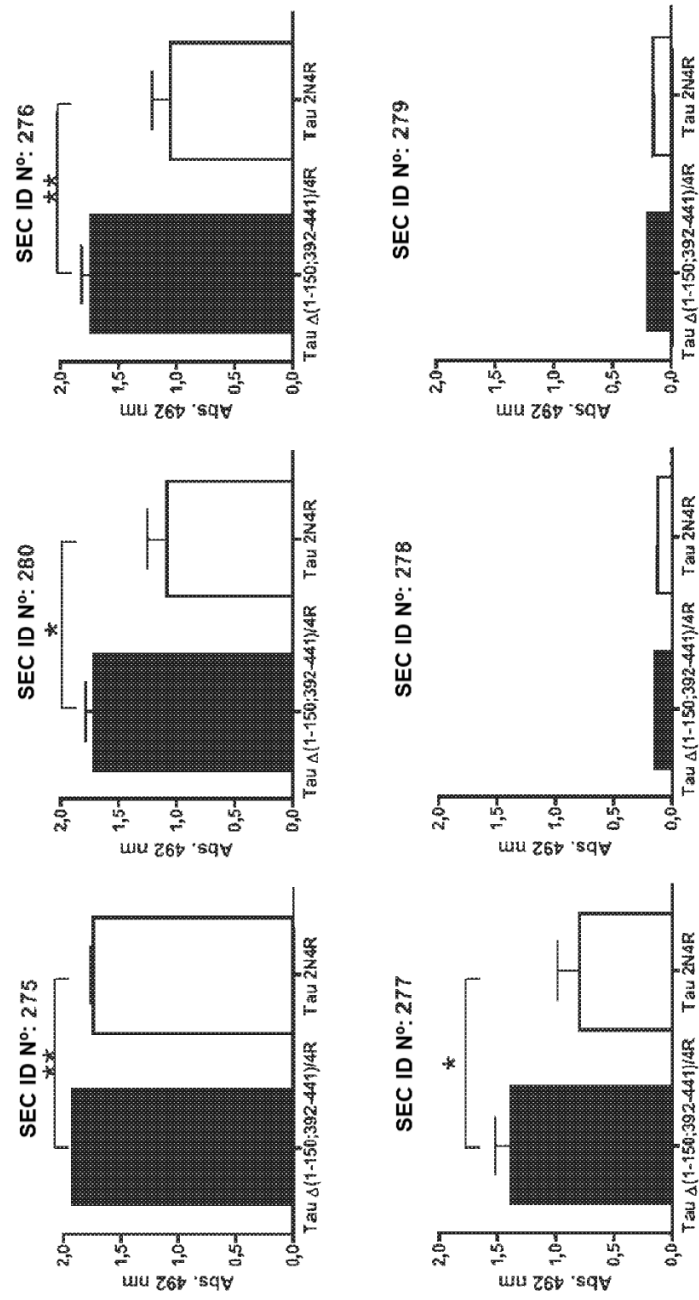


Figura 77C

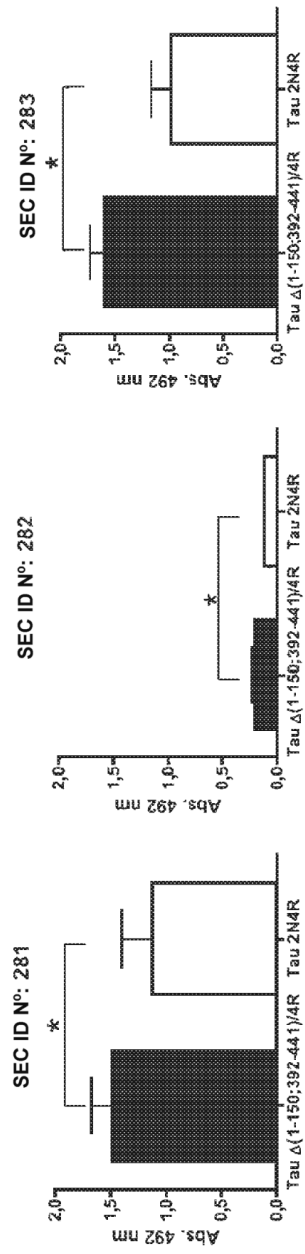


FIGURA 78

Media geométrica de los títulos de anticuerpo		
Péptidos	Fase sólida	
	Tau $\Delta(1-150; 392-441)/4R$	Tau 2N4R
SEC ID N°: 270	22286	4222
SEC ID N°: 271	12800	3200
SEC ID N°: 272	2786	264
SEC ID N°: 273	400	<100
SEC ID N°: 274	152	0
SEC ID N°: 275	>51200	16890
SEC ID N°: 280	51200	12800
SEC ID N°: 276	22286	4038
SEC ID N°: 277	12800	3805
SEC ID N°: 278	277	383
SEC ID N°: 279	<100	<100
SEC ID N°: 281	8445	2425
SEC ID N°: 282	174	<100
SEC ID N°: 283	14703	4222

FIGURA 79A

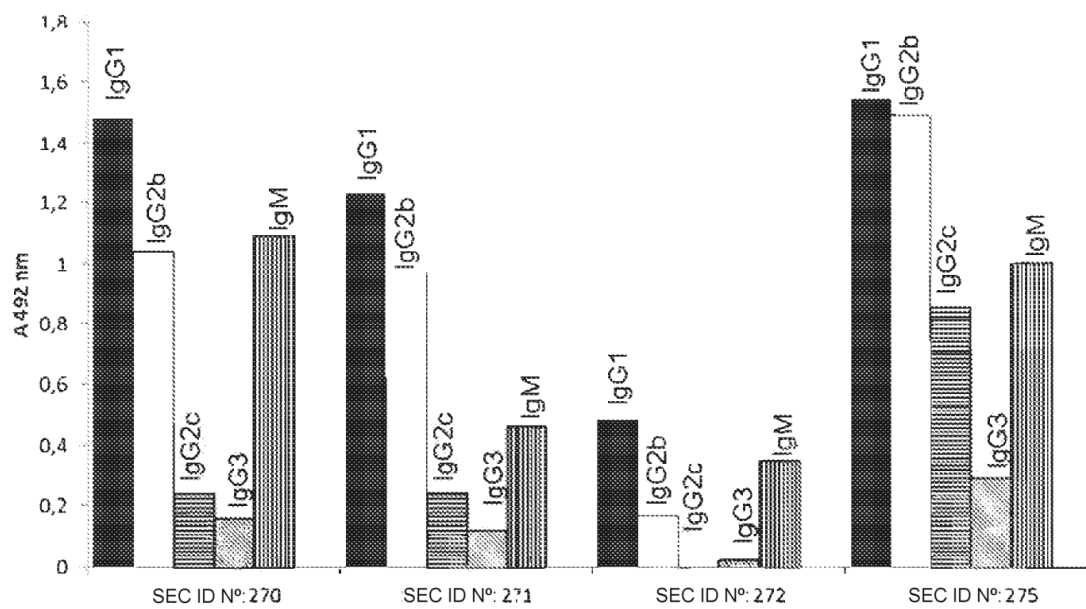


FIGURA 79B

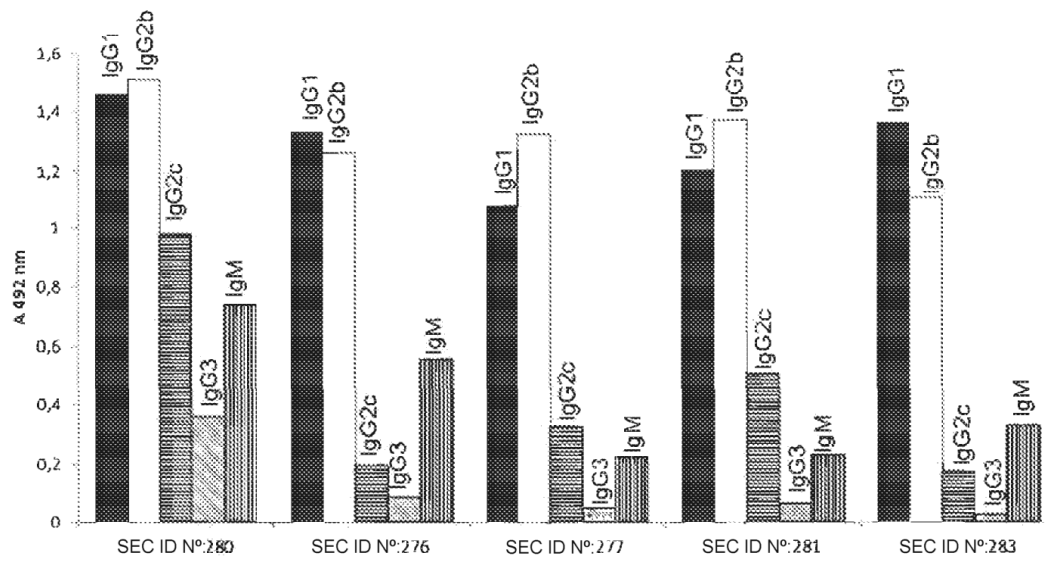


FIGURA 80

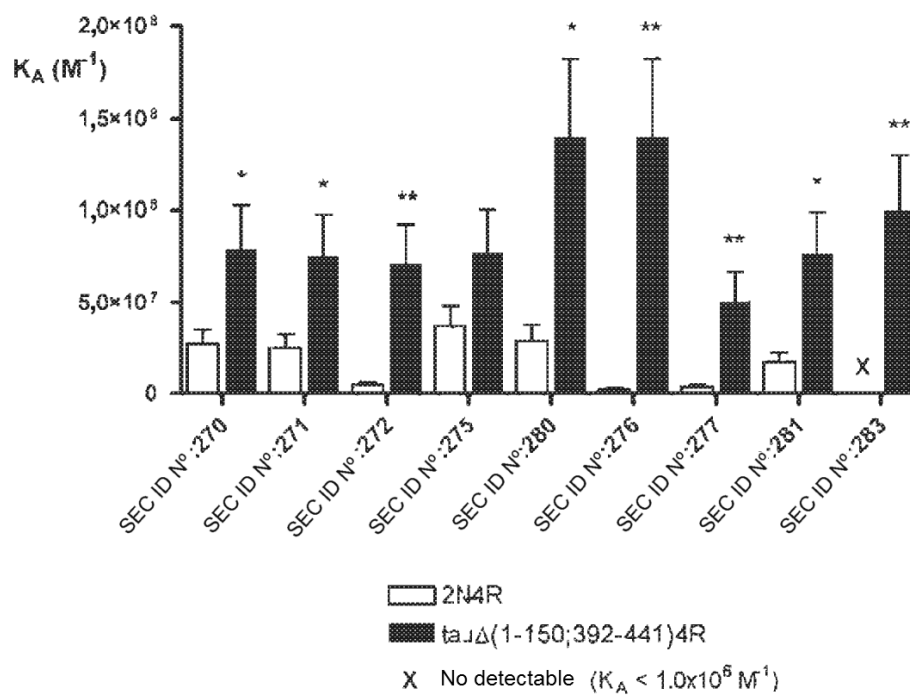


FIGURA 81

Formas patológicas de tau reconocidas por anticuerpos
inducidos por péptidos de tau en transferencia Western

Péptidos	Extracto de cerebro de SHR 72	Extracto de cerebro con AD
SEC ID N°: 270	-	+
SEC ID N°: 271	-	+
SEC ID N°: 272	-	+
SEC ID N°: 273	-	-
SEC ID N°: 274	-	-
SEC ID N°: 275	-	+
SEC ID N°: 276	-	+
SEC ID N°: 277	-	+
SEC ID N°: 278	-	-
SEC ID N°: 279	-	-
SEC ID N°: 280	-	+
SEC ID N°: 281	-	+
SEC ID N°: 282	-	-
SEC ID N°: 283	-	+

+ positivo
- negativo

FIGURA 82A

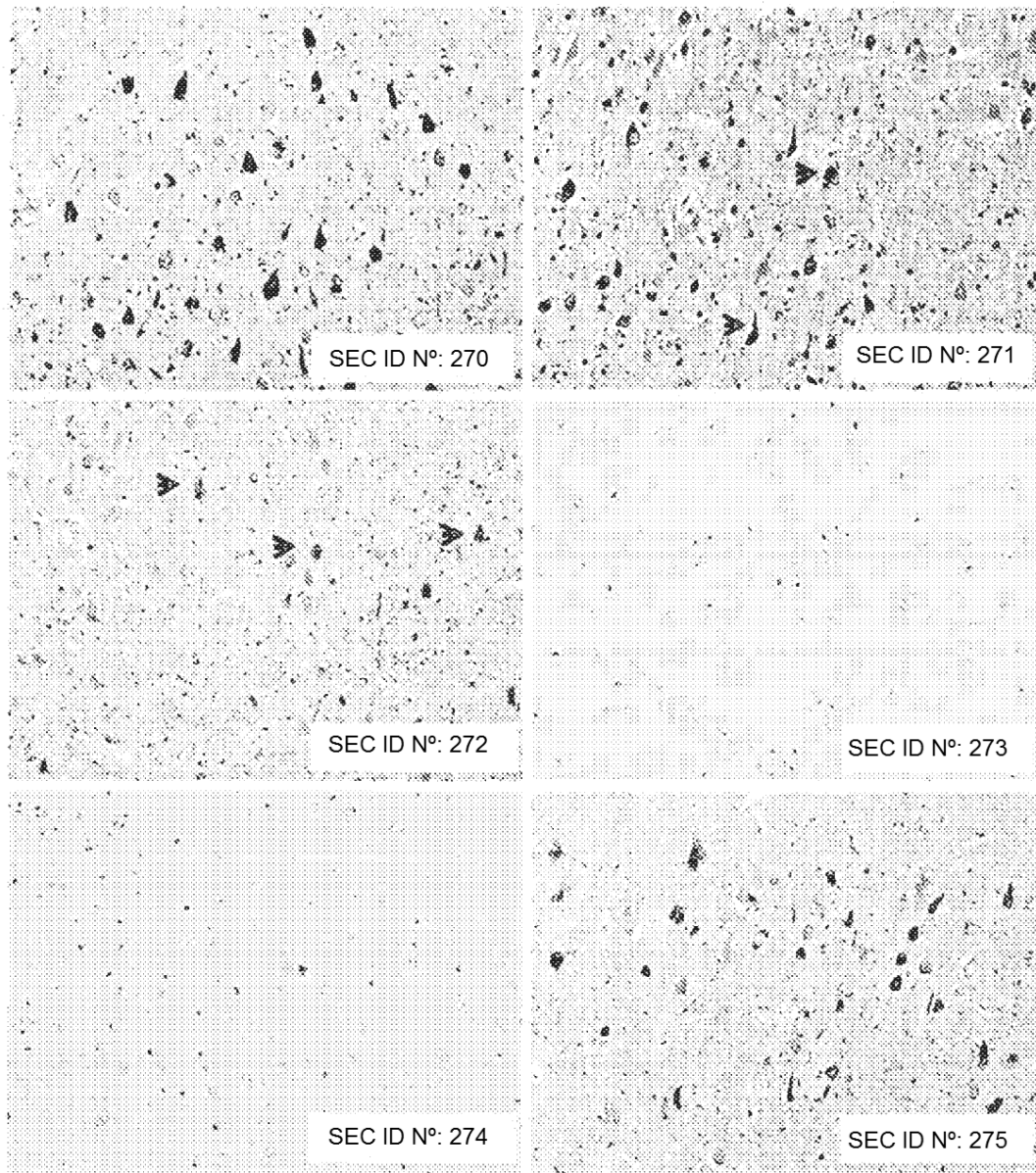


FIGURA 82B

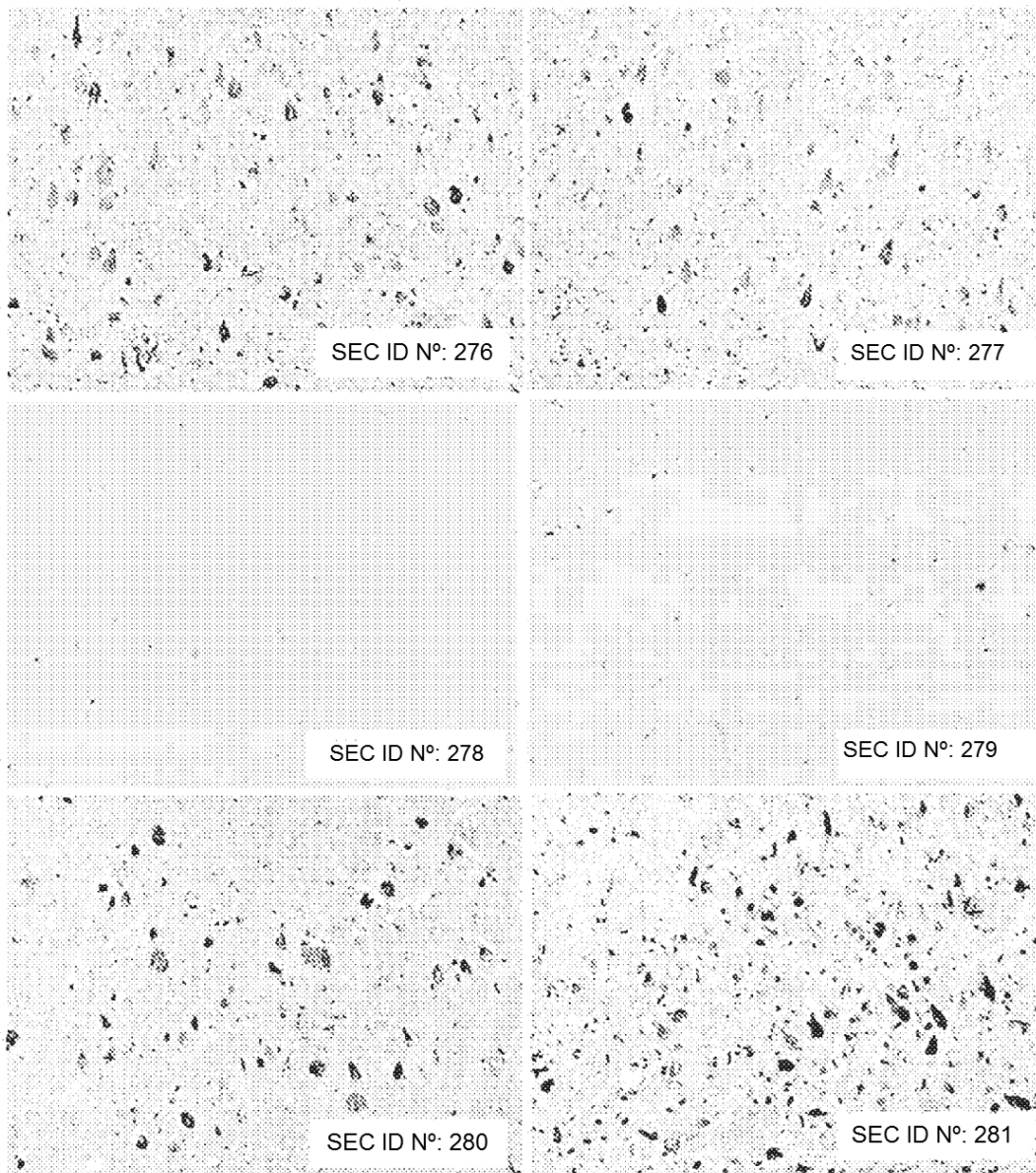


FIGURA 82C

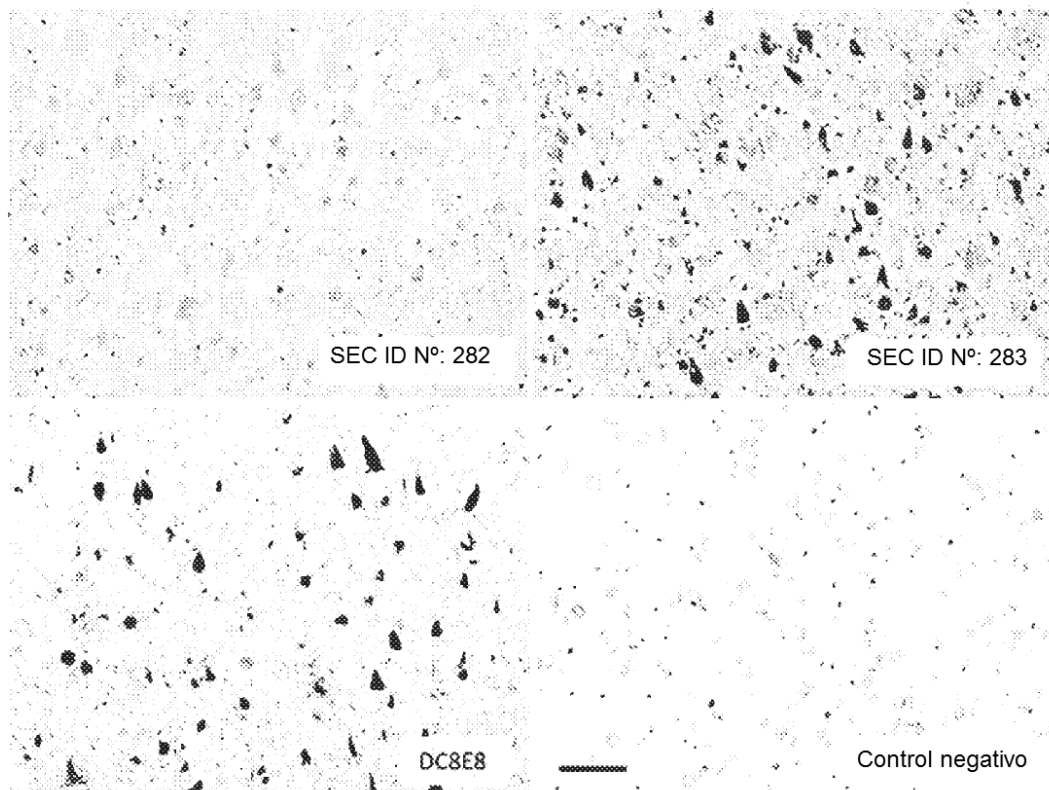


FIGURA 83

Ovillos neurofibrilares reconocidos por anticuerpos inducidos por peptidos de tau en tejidos cerebrales con AD humana		
Péptidos	Intensidad de la tinción	Número de NFT
SEC ID N°: 270	Tinción muy intensa NFT	+++
SEC ID N°:271	Tinción intensa de NFT	++
SEC ID N°:272	Tinción débil de algunos NFT	+
SEC ID N°: 273	Sin tinción de NFT	-
SEC ID N°: 274	Sin tinción de NFT	-
SEC ID N°: 275	Tinción muy intensa de NFT	+++
SEC ID N°:280	Tinción intensa de NFT	+++
SEC ID N°: 276	Tinción intensa de NFT	+++
SEC ID N°:277	Tinción débil de NFT	++
SEC ID N°:278	Sin tinción de NFT	-
SEC ID N°: 279	Sin tinción de NFT	-
SEC ID N°: 281	Tinción intensa de NFT	++
SEC ID N°: 282	Sin tinción de NFT	-
SEC ID N°: 283	Tinción muy intensa de NFT	+++