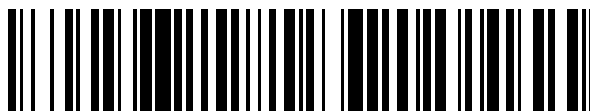


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 692**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2012 PCT/US2012/023375**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106363**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12741643 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2670434**

54 Título: **Tratamiento de tauopatías**

30 Prioridad:

**31.01.2011 US 201161438083 P**

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

**29.05.2019**

73 Titular/es:

**TAU BIO-LOGIC CORP. (100.0%)  
41 Madison Avenue, 31st Floor  
New York, NY 10010, US**

72 Inventor/es:

**CHAIN, DANIEL G.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 714 692 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

Tratamiento de tauopatías

5 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica progresiva común, en la que hay una pérdida irreversible de funciones cognitivas y conductuales. La enfermedad puede persistir por más de 10 años, pasando de síntomas leves a manifestaciones extremadamente graves. Se dice que la EA afecta aproximadamente al 10 % de la población de más de 65 años y a más del 30 % de la población de más de 80 años.

Desde el punto de vista patológico, La enfermedad de Alzheimer se presenta como placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Los ovillos neurofibrilares están compuestos, por ejemplo, de la proteína de unión a microtúbulos tau, que se ensambla en filamentos helicoidales y rectos emparejados. Se ha sugerido que estas entidades pueden estar vinculadas funcionalmente, aunque los mecanismos por los que la deposición amiloide propicia el ensamblaje patológico de filamentos de tau no están claros.

El denominador común de las estructuras neurofibrilares intracelulares (ovillos neurofibrilares, neuritas distróficas y ovillos neurófilos) son los filamentos helicoidales emparejados (los FHE). La subunidad proteica principal de los FHE es la proteína asociada a los microtúbulos tau, en una forma hiperfosforilada de forma anormal (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Wischik *et al.*, 1988 a,b). Las neuronas con cambios neurofibrilares degeneran, y el grado de esta degeneración se correlaciona directamente con el grado de demencia en los individuos afectados (Blessed *et al.*, 1968).

Tau normal es una proteína asociada a microtúbulos que se distribuye principalmente en los axones. La proteína tau participa en la modulación del ensamblaje, la organización espacial y el comportamiento de los microtúbulos (MT) en las neuronas y, probablemente, en los cuerpos de los gliocitos (Drewes *et al.*, 1998; Drubin y Kirschner, 1986; *Lo-Presti et al.*, 1995). Las proteínas tau están codificadas por un único gen ubicado en el cromosoma 17, pero se detectan como múltiples isoformas en extractos de tejidos de cerebros de adulto (Goedert *et al.*, 1989; Himmler A., 1989; Kosik *et al.*, 1989). La heterogeneidad de las proteínas tau se debe en parte a corte y empalme alternativo, dando lugar a seis isoformas en el cerebro humano adulto. Estas distintas isoformas difieren en la presencia o ausencia de insertos de 29 o 58 aminoácidos en la región amino terminal y por la adición o delección de una repetición en tándem (que puede estar repetida 3 o 4 veces) en una región carboxilo terminal de tau denominada dominio de unión a microtúbulos. Esta región está compuesta por repeticiones imperfectas de 31 o 32 restos de aminoácido. En referencia a la isoforma de la proteína tau humana más larga, htau40, que contiene todos los insertos (441 aminoácidos de longitud) en humanos, la isoforma de tau más pequeña contiene 352 restos de aminoácido con tres repeticiones en tándem en el dominio de unión a MT y sin insertos amino terminales, mientras que la isoforma más grande contiene 441 restos con cuatro repeticiones y ambos insertos amino terminales.

Se sabe que varias enfermedades neurológicas tienen inclusiones celulares filamentosas que contienen la proteína tau asociada a microtúbulos, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer (EA), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Pick (EPi) y un grupo de trastornos relacionados denominados de forma colectiva demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (DFTP-17), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), demencia pugilística (DP), enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (EGSS), enfermedad con cuerpos de Lewy y enfermedad de Huntington (Dickinson *et al.*, 1998; DiFiglia *et al.*, 1997; Forno, 1986; Hirano y Zimmerman, 1962; Nishimura *et al.*, 1995; Prusiner 1996; Reed *et al.*, 1998; Roberts, 1998; Schmidt *et al.*, 1996; Shankar *et al.*, 1989; Spillantini *et al.*, 1998). Aunque la etiología, los síntomas clínicos, los hallazgos patológicos y la composición bioquímica de las inclusiones en estas enfermedades son distintos, hay nuevas evidencias que sugieren que los mecanismos implicados en la agregación de proteínas celulares normales para formar diversas inclusiones filamentosas son comparables. Se cree que una alteración inicial en la conformación de la proteína tau asociada a microtúbulos, que inicia la generación de núcleos o puntos de inicio para el ensamblaje de filamentos, es una de las características clave. Este proceso puede verse influenciado por la modificación postraduccional de proteínas normales, por la mutación o la delección de determinados genes y por factores que se unen a proteínas normales y, así, alteran su conformación.

La proteína tau es muy hidrófila y es una de las proteínas más solubles conocidas. Se puede extraer fácilmente de tejido cerebral o de células cultivadas. Por lo tanto, la agregación de la proteína tau en la EA es altamente sospechosa. En comparación, la tau filamentosas extraída de tejidos cerebrales afectados de enfermedad de Alzheimer es relativamente insoluble. Además de la fosforilación, las tau insoluble y soluble normal difieren en el grado de modificaciones postraduccionales, las cuales incluyen glucosilación, glucación, ubiquitinación y racemización (Kenessey *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1994).

Anteriormente se ha informado de que la tau en los depósitos neurofibrilares del cerebro con EA está truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 (Novak, *et al.*, 1989; Novak *et al.*, 1993). El truncamiento de tau en Glu391 conduce a cambios conformacionales específicos para la EA que son reconocidos por el anticuerpo conformacional MN423 (Novak, *et al.*, 1989; Novak, *et al.*, 1993; Csokova, *et al.*, 2006; Skrabana, *et al.*, 2006; y

Skrabana *et al.*, 2007).

El mecanismo por el cual la proteína tau se modifica para participar en la formación de filamentos en la EA es desconocido. La fosforilación de tau afecta el potencial de tau para formar agregados, produciendo efectos estimulantes o inhibidores, presumiblemente dependiendo del sitio de fosforilación (Crowther *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1999). La hiperfosforilación de tau en muchos sitios parece preceder el ensamblaje en filamentos, basándose en hallazgos en líneas de ratón que expresan tau humana con mutaciones de FTDP-17T (Lewis *et al.* 2000; Allen *et al.*, 2002). Muchos estudios *in vitro* tomados en conjunto sugieren (a) que el dominio de unión a microtúbulos es importante para el ensamblaje de los filamentos de tau; y (b) que la formación de filamentos de tau precisa un cambio (o cambios) conformacional de tau. Estos estudios también indican que ninguna de las modificaciones de tau descritas en ellos tiene la capacidad de inducir formaciones filamentosas de tau que se correlacionen con la expresión clínica de la enfermedad de Alzheimer.

Asuni *et al.*, "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements", *Journal of Neuroscience*, 27 (34): 9115-9129 (2 agosto de 2007) discutieron un estudio en el que buscaron determinar la eficacia de la inmunización activa dirigida contra los conformeros de tau fosforilada en el SNC mediante la inmunización de ratones P301L con un epítipo de tau fosforilado, con el análisis posterior de la patología de tau y las afectaciones funcionales asociadas. Determinaron que la inmunización activa con un epítipo de tau fosforilado Tau 379-408 (P-Ser396, 404) reduce la tau agregada en el cerebro y ralentiza la progresión del fenotipo conductual relacionado con ovillos en los ratones.

Gamblin *et al.* "Caspase Cleavage of Tau: Linking Amyloid and Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease", *PNAS* vol. 100, n.º 17, pág. 10032-10037 (19 de agosto de 2003), informaron que múltiples caspasas proteolizan a tau en un resto de aspartato altamente conservado (Asp<sup>421</sup>) en su extremo C *in vitro* y en neuronas tratadas con péptido amiloide-β (Aβ<sub>1-42</sub>). Se informó que tau se escindió rápidamente en Asp<sup>421</sup> en neuronas tratadas con Aβ (en 2 horas) y que su proteólisis parece preceder a los sucesos de apoptosis nucleares. Gamblin *et al.* también demostraron que la escisión por caspasa de tau genera una proteína truncada que carece de sus 20 aminoácidos C-terminales y se ensambla *in vitro* más rápidamente y de forma más extensa en filamentos de tau que tau de tipo silvestre. Usando un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente tau truncada en Asp<sup>421</sup>, Gamblin *et al.* demostraron que tau se escinde proteolíticamente en este sitio en las patologías fibrilares del cerebro con EA y sugirieron que los péptidos Aβ propician en las neuronas el ensamblaje patológico de filamentos de tau al desencadenar la escisión por caspasa de tau y generar un producto proteolítico con una cinética de polimerización potenciada.

Delobel *et al.*, "Analysis of Tau Phosphorylation and Truncation in a Mouse Model of Human Tauopathy", *American Journal of Pathology*, Vol. 172, n.º 1, pág. 123-131 (enero de 2008), investigaron la evolución temporal de la aparición de tau fosforilada y truncada en el cerebro y la médula espinal de ratones transgénicos para la proteína tau P301S humana. Informaron que la tau soluble estaba fuertemente fosforilada entre los 1 a 6 meses, y se detectaron bajos niveles tau fosforilada, insoluble en sarcosil a los 2 meses, con un aumento estable hasta los 6 meses de edad. Informaron además que la tau truncada en D421 se detectó a niveles bajos en tau soluble en Tris y soluble en detergente a los 3-6 meses de edad. Llegaron a la conclusión de que la aparición tardía y la baja abundancia de tau que termina en D421 indican que es improbable que el truncamiento en este sitio sea necesario para el ensamblaje de tau en filamentos.

Zhang *et al.*, "Truncated Tau at D421 is Associated with Neurodegeneration and Tangle Formation in the Brain of Alzheimer Transgenic Models", *Acta Neuropathol* 117:687-697 (2009), analizaron las relaciones espaciales entre el truncamiento de tau, la fosforilación de tau y la neurodegeneración o formación de ovillos en ratones con tau P302L y en un modelo de ratón triple transgénico que produce placas amiloides y ovillos neurofibrilares. Informaron que se detectaron unas pocas neuronas que contenían abundante tau truncada pero que carecían de hiperfosforilación, y estas neuronas presentaban condensación nuclear, mientras que la tau truncada se asoció comúnmente con una alta inmunorreactividad de la tau hiperfosforilada y una tinción densa con plata de Gallyas. Llegaron a la conclusión de que el truncamiento de tau aparece después de la hiperfosforilación de tau en el cerebro de estos dos modelos de ratón transgénico, y que la acumulación de tau truncada, en ausencia o en presencia de tau fosforilada, está estrechamente asociada con un subconjunto de neuronas que experimentan degeneración o que contienen ovillos neurofibrilares.

Asimismo, Khurana, *et al.*, (2010), "Lysosomal Dysfunction Promotes Cleavage and Neurotoxicity of Tau InVivo", *PLoS Genet* 6(7): e1001026. doi:10.1371/journal.pgen.1001026, demostraron que la eliminación de la catepsina D en neuronas postmitóticas adultas conduce a una expansión lisosómica anómala y a la activación de la caspasa *in vivo*, lo que sugiere un mecanismo para el truncamiento C-terminal de tau. Llegaron a la conclusión de que la escisión por caspasa de tau puede ser un mecanismo molecular a través del cual la disfunción lisosómica y la neurodegeneración están asociadas causalmente en la EA.

Sigurdsson, "Tau-Focused Immunotherapy for Alzheimer's Disease and Related Tauopathies", *Current Alzheimer Research*, Vol. 6, pág. 446-450 (2009), inmunizó ratones transgénicos que expresaban la mutación de tau P301L con un fragmento tau de 30 aminoácidos que contenía dos sitios de fosforilación que son importantes en la EA (Tau 379-408[P-Ser396,404] y descubrió que la inmunización activa dirigida a este epítipo de fosfo-tau de EA reduce la

tau agregada en el cerebro y previene/desacelera la progresión del fenotipo conductual relacionado con ovillos, incluyendo el deterioro cognitivo. Concluyó que estos anticuerpos entran al cerebro y se unen a tau patológica dentro de las neuronas, aunque el efecto terapéutico puede deberse, al menos en parte, a la depuración de tau extracelular que pueda tener efectos biológicos.

5 Calignon *et al.*, "Caspase Activation Precedes and Leads to Tangles", Nature Vol. 464/22, pág. 1201-1205 (abril de 2010), utilizando la obtención de imágenes multifotónica *in vivo* para observar los ovillos y la activación de las caspasas ejecutoras en ratones transgénicos para tau vivos (cepa Tg4510), descubrieron que la activación de la caspasa se produce en primer lugar y precede a la formación de ovillos entre horas y días. Basándose en estos  
10 datos, Calignon *et al.* propusieron que la activación de la caspasa escinde a tau para iniciar la formación de ovillos, después, la tau truncada incorpora tau normal para el plegamiento erróneo y formar enredos. Además, sugirieron que los ovillos están "fuera de ruta" hacia la muerte neuronal aguda, y que la tau soluble, en lugar de la tau fibrilar, puede ser la fracción tóxica clave subyacente a la neurodegeneración.

15 Kovacech *et al.*, "Tau Truncation is a Productive Posttranslational Modification of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease", Current Alzheimer Research, vol. 7, pág. 708-716 (2010), concluyen que se supone que dos modificaciones postraduccionales de tau encontradas en la EA desempeñan un papel inductor en la degeneración neurofibrilar; el truncamiento y la hiperfosforilación, y que es imposible determinar de forma precisa el papel temporal de la fosforilación en el desarrollo de la patología de tau debido a que se sabe que las mutaciones de tau alteran la  
20 conformación de la proteína y conducen a su fosforilación mayor y más rápida *in vitro*.

Horowitz *et al.*, "Early N-Terminal Changes and Caspase-6 Cleavage of Tau in Alzheimer's Disease", The Journal of Neuroscience, 24(36), pág. 7895-7902 (2004), informaron sobre la tinción inmunohistoquímica en una cohorte de 35  
25 casos que variaban desde personas con deterioro cognitivo hasta una EA precoz, con un panel de tres anticuerpos anti-tau N-terminales: Tau-12, 5A6 y 9G3-pY18. De estos tres, el epítipo independiente de fosforilación de 5A6 fue el más temprano en surgir en las lesiones patológicas de tau, seguido de la aparición del epítipo de Tau-12. Se informó que el desenmascaramiento del epítipo de Tau-12 en ovillos positivos para 5A6 más maduros no se correlacionaba con la fosforilación de tau en la tirosina 18 (9G3-pY18). El extremo N de tau se perdió más tarde en el transcurso de la evolución de los ovillos, lo que se correlacionaba temporalmente con la aparición de un epítipo C-terminal truncado por caspasa que carece de los restos 422-441. Además, la caspasa-6 escindió el extremo N de tau  
30 *in vitro*, previniendo la inmunorreactividad tanto con Tau-12 como con 5A6, identificándose el sitio de truncamiento por caspasa-6 *in vitro* como Asp13. Los autores concluyeron que sus resultados sugerían un papel para la caspasa-6 y el truncamiento N-terminal de tau durante la evolución de ovillos neurofibrilares y la progresión de la EA.

35 El documento WO 2010/144711 divulga métodos y composiciones para el tratamiento, la prevención y el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en un sujeto, mediante la administración de un péptido tau inmunogénico o de un anticuerpo que reconoce el epítipo de tau inmunogénica en condiciones eficaces para tratar, prevenir o diagnosticar la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías. Además se describen métodos para propiciar la depuración de los agregados en el cerebro del sujeto y para ralentizar la progresión del fenotipo conductual  
40 relacionado con la patología de tau en un sujeto.

Sería conveniente proporcionar tratamientos que pudieran interferir en el inicio de los cambios de tau que conducen a la formación de filamentos o que pudieran interferir con la formación de filamentos que conduce a ovillos en enfermedades tales como la EA, y desarrollar agentes terapéuticos y formas de dosificación para tratar, prevenir o  
45 interferir en la progresión de las tauopatías.

La cita de cualquier documento en el presente documento no pretende ser una admisión de que tal documento es de la técnica anterior pertinente o se considere material para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración sobre el contenido o la fecha de cualquier documento está basada en la información  
50 disponible para el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión en cuanto a la precisión de tal declaración.

### Sumario de la invención

55 Un objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proporcionar métodos de tratamiento, agentes terapéuticos y composiciones para la intervención terapéutica en y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

Es un objetivo adicional de la invención proporcionar anticuerpos que tengan la capacidad de reconocer selectivamente una tau truncada en su extremo C (por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421) o su extremo N (por ejemplo, en aminoácido Asp13) (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores). Estos anticuerpos solo reconocerían, se unirían o mostrarían reactividad con tau truncada, pero no reconocerán, se unirán o mostrarán reactividad con una proteína tau normal (por ejemplo, una htau40 no truncada de longitud completa). En otras palabras, estos anticuerpos reconocerían el neoepítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos del  
65

extremo N libre o el extremo C libre del péptido creado por la escisión de tau), pero no reconocerán la misma secuencia de aminoácidos presente en la proteína tau normal. Por lo tanto, no se espera que estos anticuerpos afecten las funciones biológicas de la proteína tau normal, y, en las realizaciones preferentes, se espera que eliminen los péptidos creados por la escisión de tau y minimicen o prevengan la formación de ovillos neurofibrilares.

5 Por lo tanto, estos anticuerpos pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de la EA y otras tauopatías, y en la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, vacunas) para el tratamiento y la prevención de estos trastornos.

10 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar anticuerpos que tengan la capacidad de reconocer selectivamente una tau truncada fosforilada de forma anormal, preferentemente, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores (por ejemplo, tau fosforilada en una o más de las siguientes ubicaciones: Ser199, Ser202, Ser214, Ser235, Ser396, Ser404, Thr205, Thr231 y Thr212). Estos anticuerpos solo reconocerían, se unirán o mostrarían reactividad con la tau truncada fosforilada de forma anormal, pero no reconocerán, se unirán o mostrarán reactividad con una proteína tau normal (es decir, una htau40 no truncada de longitud completa). En otras palabras, estos anticuerpos reconocerían el neopéptido creado por la escisión y la fosforilación anormal de tau, pero no reconocerían la misma secuencia de aminoácidos pero que no está fosforilada, que está presente internamente en la proteína tau normal. Además, no se espera que estos anticuerpos afecten las funciones biológicas de la proteína tau normal y/o inhiban la escisión por caspasa de tau, y, en las realizaciones preferentes, se espera que eliminen los péptidos creados por la escisión de tau y minimicen o prevengan la formación de ovillos neurofibrilares, y se utilicen para tratar y/o prevenir la EA y otras tauopatías.

25 En realizaciones preferentes, los anticuerpos útiles en la presente invención deben ser adecuados para (i) la inhibición, reducción, depuración y eliminación de tau truncada en su extremo C, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o en su extremo N (por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13), (ii) la inhibición, reducción, depuración y eliminación de tau truncada fosforilada anormal (por ejemplo, tau fosforilada en Ser396 y/o Ser404), y/o (iii) adecuada para la prevención de la formación de ovillos neurofibrilares y/o la depuración aumentada de los ovillos neurofibrilares, todo ello sin afectar las funciones biológicas de la proteína tau normal. Por lo tanto, estos anticuerpos deben ser adecuados para el tratamiento sintomático y la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

35 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar un péptido inmunogénico aislado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos del neopéptido creado por la escisión de tau, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391, en el resto de ácido aspártico Asp421 o en el resto de ácido aspártico Asp13, o un fragmento de tal péptido, que puede usarse para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero, y, en las realizaciones preferentes, es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

40 Es un objetivo adicional de la invención proporcionar un mimótopo que comprende dos péptidos fusionados entre sí con o sin restos espaciadores, imitando el primer péptido la estructura del neopéptido creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, e imitando el segundo péptido la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico), mimótopo que es adecuado para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, y, en las realizaciones preferentes, es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la EA y de otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

50 Estos objetivos se abordan con la presente invención, la cual se refiere a un anticuerpo específico para la proteína tau truncada preovillo soluble, no mostrando dicho anticuerpo unión y/o reactividad para la proteína tau normal, y es para su uso en el tratamiento o la prevención de la EA como se define mediante la reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes detallan realizaciones ventajosas de la invención. Un aspecto preferente se refiere a un método para tratar o prevenir, o ralentizar la progresión de un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita terapia para la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, uno o más anticuerpos con una especificidad por formas anormales de la proteína tau truncada soluble que es o es potencialmente neurotóxica, no mostrando dicho anticuerpo unión y/o reactividad con una proteína tau normal. Estos anticuerpos son, preferentemente, específicos para el neopéptido creado por la escisión de tau, no reconocen la misma secuencia de aminoácidos presente internamente en la proteína tau normal y se administran en condiciones y en una cantidad (o cantidades) eficaz para retardar, inhibir y/o invertir un fenotipo conductual relacionado con ovillos en el sujeto. En determinadas realizaciones preferentes, los anticuerpos tienen especificidad para una tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, y/o una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13 (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores) y se administran en condiciones y en una cantidad (o cantidades) eficaces para retardar, inhibir y/o invertir un fenotipo conductual relacionado con ovillos

en el sujeto. En determinadas realizaciones, estos anticuerpos reconocen selectivamente un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 2-30, o un fragmento de la misma, de tau; un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; y/o un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende o que consiste en los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma, de tau; péptido (o péptidos) que se crea (o crean) por escisión de tau; y no reconocen estas secuencias cuando estas secuencias están presentes internamente en la tau no escindida/no truncada. En algunas de estas realizaciones, estos anticuerpos reconocen selectivamente un C-terminal de tau1-421 ( $\Delta$ Tau), por ejemplo, secuencias de aminoácidos que comprenden o que consisten en tau416-421, tau417-421, tau418-421 o tau419-421 de  $\Delta$ Tau, no reconocen estas secuencias en htau40 y no inhiben la escisión por caspasa de tau (por ejemplo, en Asp421).

La invención también se refiere a la administración a un sujeto que necesita terapia para la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, de uno o más anticuerpos con una especificidad para formas anormales de la proteína tau que son conformacionalmente distintas de tau normal y/o especificidad para tau truncada, no mostrando dichos anticuerpos unión y/o reactividad con una proteína tau normal. Estos anticuerpos son, preferentemente, específicos para el neoepítipo creado por la escisión de tau y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando está presente internamente en la proteína tau normal. En determinadas realizaciones preferentes, los anticuerpos tienen especificidad para una tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, y/o una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13 (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores), y se administran en condiciones y en una cantidad (o cantidades) eficaces para prevenir la agregación, inhibir la agregación y/o propiciar la depuración de agregados en el cerebro de un sujeto. En algunas de estas realizaciones, estos anticuerpos reconocen selectivamente un C-terminal de tau1-421 ( $\Delta$ Tau), por ejemplo, secuencias de aminoácidos que comprenden o que consisten en tau416-421, tau417-421, tau418-421 o tau419-421 de  $\Delta$ Tau, no reconocen estas secuencias en htau40 y no inhiben la escisión por caspasa de tau (por ejemplo, en Asp421).

Otro aspecto de la presente invención incluye un método para ralentizar la progresión de un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto. Este método incluye la administración, a un sujeto que necesita terapia para la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, de uno o más anticuerpos con especificidad para formas anormales de la proteína tau (por ejemplo, tau truncada) que son lineales o conformacionalmente distintas de tau normal, no mostrando dichos anticuerpos unión y/o reactividad con una proteína tau normal. Estos anticuerpos son, preferentemente, específicos para el neoepítipo creado por la escisión de tau y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos presente internamente en la proteína tau normal. Por lo tanto, no se espera que estos anticuerpos afecten las funciones biológicas de la proteína tau normal, y, en las realizaciones preferentes, se espera que eliminen los péptidos creados por la escisión de tau y minimicen o prevengan la formación de ovillos neurofibrilares. En determinadas realizaciones preferentes, los anticuerpos tienen especificidad para una tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, y/o una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13 (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores), y se administran en condiciones y en una cantidad (o cantidades) eficaces para retardar, inhibir y/o invertir un fenotipo conductual relacionado con ovillos en el sujeto.

En otro aspecto de la presente invención, los anticuerpos administrados reconocen selectivamente una forma fosforilada de la proteína tau anormal (es decir, una tau truncada) y no muestran unión y/o reactividad con una proteína tau normal. Por lo tanto, no se espera que estos anticuerpos afecten las funciones biológicas de la proteína tau normal, y, en las realizaciones preferentes, se espera que eliminen los péptidos creados por la escisión de tau y minimicen o prevengan la formación de ovillos neurofibrilares.

En determinadas realizaciones preferentes, los anticuerpos administrados reconocen selectivamente una forma fosforilada de una tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención reconocen selectivamente solo la forma lineal o conformacionalmente distinta de la proteína tau truncada, y los anticuerpos no muestran unión y/o afinidad con la proteína tau normal (es decir, no muestra reactividad con la htau40 normal no truncada). En determinadas realizaciones, estos anticuerpos reconocen un péptido fosforilado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-30, o un fragmento de la misma, de tau; un péptido fosforilado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; y/o un péptido fosforilado que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma, de tau; péptido (o péptidos) que se crea (o crean) por escisión de tau; y no reconocen estas secuencias cuando estas secuencias están presentes internamente en la tau no escindida/no truncada. En algunas de estas realizaciones, estos anticuerpos reconocen selectivamente un C-terminal de  $\Delta$ Tau, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que comprenden o que consisten en tau416-421, tau417-421, tau418-421 o tau419-421 de  $\Delta$ Tau, y no reconocen estas secuencias en htau40.

La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos con

especificidad para una proteína tau truncada en su extremo C y/o su extremo N. En determinadas realizaciones, el anticuerpo reconoce selectivamente una proteína tau preovillo soluble truncada en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13. En realizaciones preferentes, los anticuerpos no muestran unión y/o afinidad con la proteína tau normal (es decir, no muestran reactividad con la proteína tau normal no truncada). En algunas de estas realizaciones, el anticuerpo es específico para  $\Delta$ Tau, y no muestra unión y/o afinidad por htau40. En las realizaciones preferentes, la composición es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo la composición una pluralidad de anticuerpos que son específicos para el neopítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones del extremo N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau), y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando están presentes internamente en la proteína tau normal. En las realizaciones preferentes, el neopítipo comprende o consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas.

La invención se refiere adicionalmente a anticuerpos que reconocen epítomos del extremo libre lineales o conformacionales de tau truncada. En realizaciones preferentes, los anticuerpos no muestran unión y/o afinidad con la proteína tau normal (es decir, no muestran reactividad con la proteína tau normal no truncada).

La invención también se refiere en parte a un péptido inmunogénico (por ejemplo, un péptido inmunogénico aislado), que comprende una porción o fragmento de tau truncada, por ejemplo, expresado por un virus o bacteria, incorporado en un genoma o episoma del virus o bacteria (es decir, el virus o bacteria comprende un gen que codifica el péptido inmunogénico), aislado de un mamífero, sintetizado químicamente o producido utilizando técnicas de ADN recombinante, como parte de una composición inmunogénica. En todas estas realizaciones, la porción inmunogénica de los péptidos comprende una secuencia lineal de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos unidos covalentemente a un extremo N libre o un extremo C libre de una tau truncada, cuya secuencia es idéntica a la secuencia de los primeros dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos o los últimos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez aminoácidos de un péptido (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) creado por la escisión de tau. En determinadas realizaciones preferentes, el péptido inmunogénico comprende una porción de una proteína tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391, una porción de la proteína tau truncada en su extremo C en el resto de ácido aspártico Asp421, de una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13, o combinaciones de las mismas (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores). La porción inmunogénica del péptido, en las realizaciones preferentes, comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. El péptido inmunogénico tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero, y, preferentemente, es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos. En las realizaciones preferentes, la respuesta inmunogénica es la producción de los anticuerpos específicos para neopítipo descritos en el presente documento, por ejemplo, *in situ* en un animal vivo (por ejemplo, un ser humano).

La invención también se refiere a un mimótopo que comprende dos péptidos fusionados entre sí con o sin restos espaciadores, imitando el primer péptido la estructura del neopítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, e imitando el segundo péptido la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico), mimótopo que es adecuado para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. En las realizaciones preferentes, la respuesta inmunogénica es la producción de los anticuerpos específicos para neopítipo descritos en el presente documento. En las realizaciones preferentes, es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un mimótopo que comprende dos péptidos fusionados entre sí con o sin restos espaciadores, imitando el primer péptido la estructura del neopítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, e imitando el segundo péptido la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico), mimótopo que es adecuado para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. En las realizaciones preferentes, la respuesta inmunogénica es la producción de los anticuerpos específicos para neopítipo descritos en el presente documento. La composición se utiliza para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero, y, en las realizaciones preferentes, para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende (i) un mimótopo que comprende dos péptidos fusionados entre sí con o sin restos espaciadores, imitando el primer péptido la estructura

del neopéptido creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, e imitando el segundo péptido la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico); (ii) un mimótopo que comprende dos péptidos fusionados entre sí con o sin restos espaciadores, imitando el primer péptido la estructura del neopéptido creado por la escisión de APP (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de APP) en un mamífero, e imitando el segundo péptido la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico). La composición se utiliza para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero y, en las realizaciones preferentes, es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

La invención se refiere adicionalmente a un método para tratar, prevenir y/o ralentizar la progresión de un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento uno o más anticuerpos específicos de extremo libre generados a partir de péptidos sintéticos que comprenden secuencias inmunogénicas lineales o conformacionales de tau anormal, anticuerpos que reconocen selectivamente los extremos libres de la tau truncada (por ejemplo, tau truncada soluble) y no muestran reactividad (unión o afinidad por tau no truncada normal). En determinadas realizaciones, estos anticuerpos pueden (i) inhibir o desacelerar, por ejemplo, la polimerización de tau y la formación de ovillos neurofibrilares, y (ii) propiciar la depuración de tau anormal y/o de los agentes responsables de la formación de tau anormal.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método de prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en un sujeto, a través de la administración de una proteína tau truncada, preferentemente una tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421 (por ejemplo,  $\Delta$ Tau), y/o una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13, o un fragmento de cualquiera de las anteriores, en condiciones y en las cantidades para inducir la producción *in situ* de anticuerpos específicos de extremo libre para la proteína (o proteínas) truncada y eficaces para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías. En las realizaciones preferentes, los anticuerpos específicos de extremo libre reconocen selectivamente un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 2-30, o un fragmento de la misma, de tau; un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; y/o un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma, de tau; péptido (o péptidos) que se crea (o crean) por escisión de tau; pero no reconocen estas secuencias cuando estas secuencias están presentes internamente en la tau no escindida/no truncada. En algunas de estas realizaciones, el método comprende la administración de  $\Delta$ Tau, o un fragmento del mismo, y los anticuerpos producidos en respuesta a esta administración reconocen selectivamente un C-terminal de  $\Delta$ Tau, y no reconocen estas secuencias en htau40.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método para ralentizar la progresión de un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto. Este método incluye la administración, a un sujeto que necesita terapia para la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías, de una proteína tau truncada, preferentemente una tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421 y/o una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13, en condiciones y en las cantidades para inducir la producción *in situ* de anticuerpos específicos de extremo libre para la proteína (o proteínas) truncada y eficaces para retardar, inhibir y/o invertir un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto.

La invención se refiere adicionalmente, en parte, a un vector de terapia génica unido operativamente a un gen que codifica un inmunógeno, comprendiendo el inmunógeno una porción de una proteína tau truncada. En determinadas realizaciones, la proteína tau truncada se selecciona del grupo que consiste en una proteína tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391, una proteína tau truncada en el resto de ácido aspártico Asp421, una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13, y combinaciones de las mismas (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores). En algunas de estas realizaciones, el inmunógeno comprende o consiste en los últimos diez, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro o tres aminoácidos de  $\Delta$ Tau.

La invención también se refiere en parte a una composición farmacéutica que comprende ADN desnudo que codifica un inmunógeno que comprende una porción de la proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391, una proteína tau truncada en el resto de ácido aspártico Asp421, una tau truncada en su extremo N en el resto de ácido aspártico Asp13, y combinaciones de las mismas (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores, y combinaciones de las mismas).

La invención se refiere adicionalmente a una vacuna que comprende una porción de una o más proteínas tau anormales o truncadas como se expone en el presente documento, en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable, o una vacuna que comprende uno o más anticuerpos específicos para una porción (o



porciones) de una proteína (o proteínas) tau anormal o truncada como se expone en el presente documento y que tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable. En las realizaciones preferentes, la vacuna es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y comprende un mimótopo fusionado con un péptido bacteriano, imitando el mimótopo la estructura del neopéptido creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, y comprendiendo o consistiendo el péptido bacteriano en un toxoide tetánico bacteriano natural o equivalente. El uso del mimótopo, en las realizaciones preferentes, previene la posibilidad de una respuesta autoinmunitaria que no se aplica a un péptido bacteriano. La vacuna puede o no comprender un mimótopo adicional que comprende un mimótopo que imita la estructura del neopéptido creado por la escisión de APP (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de la APP) en un mamífero, estando fusionado el mimótopo adicional, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que es un toxoide tetánico bacteriano natural o equivalente. La vacuna es para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero. En las realizaciones preferentes, la respuesta inmunogénica es la producción de los anticuerpos específicos para neopéptido descritos en el presente documento. En las realizaciones preferentes, la vacuna es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos.

La invención se refiere adicionalmente a una vacuna que comprende un mimótopo que imita la estructura del neopéptido creado por la escisión de tau en un mamífero, estando el mimótopo fusionado, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que comprende o que consiste en un toxoide tetánico bacteriano natural o equivalente, en donde el neopéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-30, o un fragmento de la misma, de tau; un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; y/o un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma, de tau; y el mimótopo es adecuado para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero. En algunas de estas realizaciones, el neopéptido comprende o consiste en los aminoácidos 16-421, 17-421, 18-421 o 19-421 de  $\Delta$ Tau. En las realizaciones preferentes, la vacuna es para su uso en una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

La invención se refiere adicionalmente a una vacuna que comprende (i) un mimótopo que imita la estructura del neopéptido creado por la escisión de tau en un mamífero, (por ejemplo, en Asp421), estando el mimótopo fusionado, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que comprende o que consiste en una estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico); y (ii) un mimótopo que imita la estructura del neopéptido creado por la escisión de A $\beta$  en un mamífero, fusionado, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que comprende o que consiste en la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico). El epítipo de linfocitos T en el primer mimótopo y el segundo mimótopo pueden ser el mismo o distintos. En determinadas realizaciones, el epítipo de linfocitos T en el primer mimótopo y en el segundo mimótopo comprenden la misma estructura que un epítipo promiscuo bien estudiado del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95 (Ho *et al.*, 1990; Panina-Bordignon *et al.* 1989), dado que se sabe que este epítipo funciona en varios de diversos contextos genéticos humanos (Valmori *et al.*, 1992 y 1994). En las realizaciones preferentes, la vacuna es para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

En determinadas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un péptido (o péptidos) quimérico que comprende (i) unos 2-10 o 2-6 restos de aminoácido del extremo N o C libre de una tau truncada (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) fusionado con o sin un espaciador a (ii) un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente distinta a la de los restos de aminoácido. La tau truncada se selecciona del grupo que consiste en la tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o una tau truncada en su extremo N, por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13. En determinadas realizaciones, la tau truncada es  $\Delta$ Tau. En determinadas realizaciones, el epítipo de linfocitos T auxiliares es el muy estudiado epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95. La composición que comprende una cantidad eficaz inmunizante del péptido o péptidos quiméricos y un transportador, excipiente, diluyente o agente auxiliar farmacéuticamente aceptable, se puede administrar entonces a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) para inducir la formación de anticuerpos que son específicos para el neopéptido creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones del extremo N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau), y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando están presentes en la proteína tau normal.

El epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares puede ser un epítipo de linfocito T procedente de, por ejemplo, la toxina tetánica, la toxina pertúsica, la toxina diftérica, la proteína F del virus del sarampión, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, la proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, del circumsporozoito de *Plasmodium falciparum*, la triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* o TraT de *Escherichia coli*. En las realizaciones preferentes el epítipo de linfocitos T es el muy estudiado epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95 (Ho *et al.*, 1990; Panina-Bordignon *et al.* 1989), dado que se sabe que este epítipo funciona en varios de diversos contextos genéticos humanos (Valmori *et al.*, 1992 y 1994).

Aspectos adicionales de la invención se refieren a una proteína tau truncada en donde los últimos 20 aminoácidos en el C-terminal o N-terminal de tau se retiran y no están presentes en la proteína truncada (por ejemplo,  $\Delta$ Tau); la porción inmunogénica de la proteína tau truncada; genes que codifican la proteína truncada y/o un péptido que  
 5 contienen la porción inmunogénica de la proteína; anticuerpos selectivos/específicos para la proteína truncada - monoclonales, policlonales, quiméricos, recombinantes, humanizados y porciones de cualquiera de los anteriores; producidos *in situ* y *ex situ*; "animales" transgénicos que secretan anticuerpos selectivos/específicos para la proteína truncada; la inmunización activa (administración de la proteína truncada o porciones inmunogénicas de la misma a un sujeto); la inmunización pasiva (administración de anticuerpos en conformidad con la invención a un sujeto); y  
 10 formulaciones farmacéuticas para las inmunizaciones activa y pasiva.

El fragmento inmunogénico de la tau truncada, en determinadas realizaciones, comprende una secuencia lineal de dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos unidos covalentemente a un extremo N libre o un extremo C libre, cuya secuencia es idéntica a la secuencia de los primeros dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos o los  
 15 últimos dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete aminoácidos de un péptido (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) creado por la escisión de tau. En determinadas realizaciones, el péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-30, o un fragmento de la misma, de tau; una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; o una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma. En algunas de estas realizaciones, la secuencia comprende o consiste en los aminoácidos 16-421, 17-  
 20 421, 18-421 o 19-421 de  $\Delta$ Tau.

En una realización, el fragmento inmunogénico de la tau truncada comprende una secuencia lineal de al menos cinco aminoácidos de la proteína tau que garantiza que el grupo amino libre específico en el extremo N constituye una parte esencial del epítipo reconocido por el nuevo anticuerpo específico de extremo libre de epítipo lineal. En  
 25 otras realizaciones, los fragmentos de tau truncada tienen al menos los últimos 20, 30 o 45 aminoácidos de la tau truncada, y se generan anticuerpos específicos de conformación o específicos de extremo libre de epítipo lineal. En determinadas realizaciones adicionales preferentes, la invención se refiere a una vacuna que es una combinación de una composición que proporciona inmunización contra productos de escisión de tau (es decir, proteína tau truncada) y una composición que proporciona inmunización contra productos de escisión de APP.  
 30

En determinadas realizaciones preferentes, la composición que proporciona inmunización contra la proteína tau truncada comprende un péptido (o péptidos) quimérico que comprende (i) unos 2-10 o 2-6 restos de aminoácido del extremo N o C libre de una tau truncada (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) fusionado con o sin un espaciador a (ii) un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente distinta a la de los restos de aminoácido; y la  
 35 composición que proporciona inmunización contra el producto de escisión de APP comprende un péptido (o péptidos) quimérico que comprende (i) unos 2-10 o 2-6 restos de aminoácido del extremo N o C libre de una APP truncada (por ejemplo,  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{1-43}$ , etc.) fusionado con o sin un espaciador a (ii) un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente distinta a la de los restos de aminoácido. El epítipo de linfocitos T en la composición que proporciona inmunización contra productos de escisión de tau y en la composición que  
 40 proporciona inmunización contra productos de escisión de APP puede ser el mismo o uno distinto. En determinadas realizaciones, el epítipo de linfocitos T de ambas composiciones comprende el muy estudiado epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95.

"Anticuerpo", como se usa en el presente documento pretende incluir moléculas intactas y fragmentos de las mismas, así como derivados sintéticos y biológicos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab,  $F(ab)_2$  y  $F_v$  - libres o expresados, por ejemplo, en la superficie de fagos filamentosos en pIII o pVIII, u otras proteínas de superficie, o en la superficie de bacterias, que tienen la capacidad de unirse a un antígeno. Los fragmentos Fab,  $F(ab)_2$  y  $F_v$  carecen de los fragmentos  $F_c$  del anticuerpo intacto, se depuran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos  
 45 unión a tejido no específica del anticuerpo. Adicionalmente, el anticuerpo  $F_v$  (a menudo llamado minicuerpo) puede manipularse fácilmente para portar un indicador específico en su C-terminal y usarse para el diagnóstico precoz intravital presintomático de la enfermedad de Alzheimer, dado que los estadios I, II y III de la EA, que son reconocidos por los anticuerpos de acuerdo con la presente invención no están asociados con el deterioro intelectual. El término anticuerpo abarca, por ejemplo, anticuerpos quiméricos y humanizados. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Además abarca anticuerpos recombinantes. Los  
 50 anticuerpos pueden ser, preferentemente, anticuerpos lineales o anticuerpos conformacionales.

Las expresiones "no se une", "no reconoce", y "no muestra reactividad" como se usa en la presente solicitud significa que un anticuerpo no muestra una unión detectable a un péptido o proteína (por ejemplo, htau40), o que la constante de equilibrio KD del anticuerpo con el péptido o proteína es de  $1 \times 10^{-4}$  molar a  $1 \times 10^{-6}$  M, como se mide mediante un  
 60 ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en un chip de estreptavidina.

Las expresiones "se une específicamente", "reconoce específicamente", "reconoce selectivamente", "que tiene especificidad" y "específico para" como se usa en la presente memoria descriptiva significa que un anticuerpo se une al antígeno para el que es específico (por ejemplo, el neoepítipo creado por escisión de htau en Asp421) con una  
 65 constante de equilibrio KD de  $1 \times 10^{-9}$  M a  $1 \times 10^{-11}$  M, como se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en un chip de estreptavidina; y tiene una constante de equilibrio KD con otros

péptidos o proteínas (por ejemplo, htau40) que es de  $1 \times 10^{-4}$  M a  $1 \times 10^{-6}$  M, como se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en un chip de estreptavidina, o no muestra unión detectable con estos otros péptidos o proteínas.

- 5 La expresión "proteína tau", como se usa en la presente solicitud, se refiere a una cualquiera de las isoformas conocidas de tau (por ejemplo, la isoforma más larga de la proteína tau asociada a microtúbulos humana que contiene todos los insertos que han sufrido corte y empalme de forma alternativa, como se describe en M. Goedert *et al.*, 1989 (htau40)).
- 10 La expresión "anticuerpo humanizado" al que se hace referencia anteriormente en el presente documento a un anticuerpo en el que las regiones determinantes de complementariedad (las CDR) de un ratón u otro anticuerpo no humano se injertan en un armazón de anticuerpo humano. Por armazón de anticuerpo humano se entiende el anticuerpo humano completo excluyendo las CDR.
- 15 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que la totalidad de las regiones variables de un anticuerpo de ratón o rata se expresa junto con regiones constantes humanas.

El término "tratamiento" al que se hace referencia anteriormente en el presente documento a retrasar o prevenir la aparición, retardar la progresión o mejorar los síntomas relacionados con la enfermedad de Alzheimer u otra enfermedad o trastorno caracterizado por la deposición de A $\beta$ .

20

El término "mimótopo", como se usa en la presente solicitud, es una macromolécula, a menudo un péptido (es decir, un péptido inmunogénico o inmunógeno), que imita la estructura de un epítipo.

- 25 El término "tauopatía" se refiere a trastornos o afecciones relacionadas con tau, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), enfermedad de Pick, demencia frontotemporal y parkinsonismo asociados con el cromosoma 17 (FTDP-17), enfermedad de Parkinson, ictus, traumatismo craneoencefálico, deterioro cognitivo leve y similares.
- 30 El término "inmunógeno" se refiere a una molécula que tiene la capacidad de unirse a un anticuerpo, un receptor de linfocito B (BCR) o un receptor de linfocitos T (TCR), si la presentan moléculas de MHC. El término "inmunógeno", como se usa en el presente documento, también abarca epítipos de linfocitos T. Adicionalmente, un inmunógeno tiene la capacidad de ser reconocido por el sistema inmunitario y/o la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular que conduce a la activación de los linfocitos B y/o T. Esto puede, sin embargo, precisarse que, al menos en determinados casos, el inmunógeno contenga o esté unido a un epítipo de linfocitos T auxiliares y se administre un adyuvante. Un inmunógeno puede tener uno o más epítipos (por ejemplo, epítipos B y T). El "inmunógeno", como se usa en el presente documento, también puede ser mezclas de varios inmunógenos individuales. El término "inmunógeno" abarca, pero sin limitación, péptidos.
- 35
- 40 Como se usa en el presente documento, el término "fosforilado", en referencia a un resto de aminoácido, se refiere a la presencia de un grupo fosfato en la cadena lateral del resto donde normalmente está presente un grupo hidroxilo. Dicha fosforilación normalmente se produce como una sustitución del átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo por un grupo fosfato ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ). Como reconocen un experto en la materia, dependiendo del pH del entorno local, este grupo fosfato puede existir como un grupo neutro no cargado ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ), o con una carga negativa única ( $-\text{PO}_3\text{H}^-$ ) o una doble ( $-\text{PO}_3^{2-}$ ). Los restos de aminoácidos que normalmente pueden fosforilarse incluyen las cadenas laterales de la serina, la treonina y la tirosina.
- 45

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento. Adicionalmente, a no ser que el contexto requiera otra cosa, Los términos en singular incluirán las pluralidades, y los términos en plural incluirán el singular, a no ser que el contenido indique claramente otra cosa.

50

El término "aislado", con respecto a un péptido inmunogénico, se refiere a un péptido que, en virtud de su origen o fuente de procedencia (1) no está asociado con los componentes asociados de manera natural que lo acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente exento de otras proteínas de la misma especie, (3) lo expresa una célula de una especie distinta o (4) no está presente en la naturaleza. Por lo tanto, un péptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular distinto de la célula a partir de la que se origina de forma natural, estará "aislado" de sus componentes asociados de manera natural. Un péptido también puede volverse esencialmente exento de componentes asociados de manera natural mediante el aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

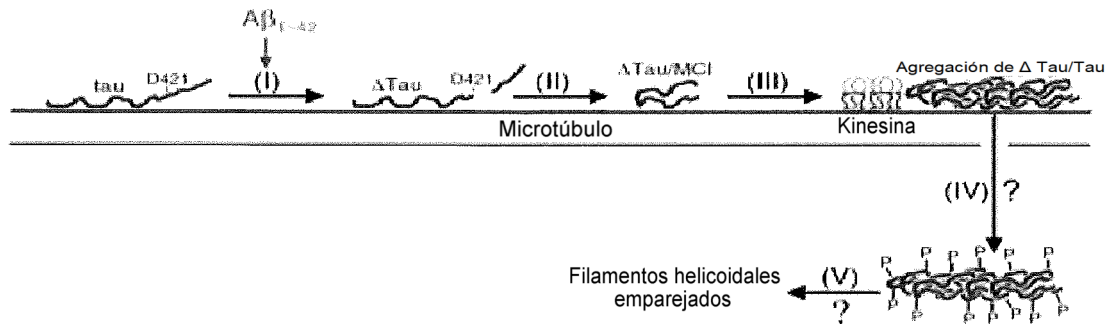
55

60

El término "neopítipo", como se usa en la presente solicitud, se refiere a un epítipo que no es de origen natural creado como resultado de la escisión de una proteína precursora (por ejemplo, tau, APP, etc.) y/o Tau fosforilada.

65 **Descripción detallada de la invención**

Un modelo propuesto para la formación de ovillos neurofibrilares estipula que los estímulos apoptóticos (por ejemplo,  $A\beta_{1-42}$ ) dan como resultado la escisión por caspasa de tau, por ejemplo, en el aminoácido Asp421, lo que conduce a una formación patológica aumentada de filamentos neurofibrilares (los FNF) y de filamentos helicoidales emparejados (los FHE), así como a la agregación patológica de tau. Por ejemplo, Rissman *et al.*, J. Clin. Invest. 114: 121-130 (2004), proponen el siguiente mecanismo para la formación de ovillos neurofibrilares:



De acuerdo con Rissman *et al.*, la exposición a estímulos apoptóticos tales como  $A\beta_{1-42}$  da como resultado la escisión por caspasa de tau después de Asp421 (I); la tau escindida por caspasa adopta rápidamente el epítipo conformacional MC1 (II), lo que conduce a la formación aumentada de filamentos y la agregación de tau (III); para compensar la agregación de tau, tau puede posteriormente hiperfosforilarse y disociarse de los microtúbulos (IV); y, como resultado, la escisión por caspasa de tau puede conducir a la formación de FHE (V).

La formación aumentada de los FNF y FHE patológicos y la agregación patológica de tau se observa comúnmente en mamíferos que padecen trastornos neurodegenerativos progresivos (por ejemplo, EA y otras tauopatías), y se asocia con la pérdida de funciones cognitivas y conductuales en mamíferos. Dado que se cree que la escisión de tau por caspasas ejecutoras después de la exposición a un estímulo apoptótico (por ejemplo,  $A\beta$ ) da como resultado una forma que es especialmente propensa a la formación de ovillos, una inhibición o disminución de tau escindida por caspasa debería, por lo tanto, disminuir y/o prevenir la formación patológica de FNF y FHE, y la agregación patológica de tau. La inhibición o disminución de la tau escindida por caspasa también debería ser útil en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas progresivas.

La presente invención se refiere a anticuerpos específicos para extremos libres de tau truncada (por ejemplo, htau40 escindida por caspasa (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) y que no muestra unión y/o reactividad con la tau normal, y a usos de estos anticuerpos en el tratamiento y/o prevención de la EA y otras tauopatías, en la depuración de tau truncada soluble del cerebro de un paciente que padece EA u otra tauopatía, y en la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o la prevención de estos trastornos. Estos anticuerpos reconocerían el neopéptido creado por la escisión de tau (por ejemplo, el extremo C de  $\Delta$ Tau), pero no reconocerán la misma secuencia de aminoácidos presente en la proteína tau normal (por ejemplo, htau40), que carece del neopéptido. No se espera que estos anticuerpos afecten las funciones biológicas de la proteína tau normal y se espera que depuren los péptidos creados por la escisión de tau y minimicen o prevengan la formación patológica de los FNF y los FHE, y la agregación patológica de tau. Tampoco se espera que estos anticuerpos inhiban la escisión por caspasa de htau40 en Asp421.

Los anticuerpos que pueden reconocer selectivamente el extremo (o extremos) libre (neopéptido o neopéptidos) de los péptidos solubles (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) formados por la escisión de tau (por ejemplo, de htau40), aunque no reconocen y no muestran reactividad con la proteína tau de longitud completa, se cree que tienen la capacidad de inhibir directamente la polimerización de tau y/o la formación de los FNF, los FHE y/u otros precursores patológicos de tau. Un significado del uso de estos anticuerpos específicos de neopéptido es que estos anticuerpos pueden usarse para depurar la tau neurotóxica soluble antes de que se formen los FNF y los FHE, y/o antes de que tau se agregue o polimerice patológicamente, y/o antes de que estos neopéptidos se vuelvan inaccesibles o menos accesibles para los anticuerpos, y/o el daño neurológico esté hecho.

Se contempla específicamente que estos anticuerpos se puedan usar para (i) la inhibición, reducción, depuración y eliminación de tau truncada en su extremo C, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o en su extremo N (por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp421), (ii) la inhibición, reducción, depuración y eliminación de tau truncada forforilada anormal (por ejemplo, tau fosforilada en Ser396 y/o Ser404), y/o (iii) la prevención de la formación de los FNF y/o los FHE, y/o la depuración aumentada de los FNF y los FHE, todo ello sin afectar las funciones biológicas de la proteína tau normal (por ejemplo, htau40).

Dos anticuerpos específicos para neopéptidos específicamente contemplados por la presente invención para los usos descritos anteriormente son: un anticuerpo que es específico para el extremo C-terminal libre de tau truncada en Asp421 (es decir,  $\Delta$ Tau) y no muestra unión y/o reactividad con la tau normal (por ejemplo, htau40); y un

anticuerpo que es específico para el extremo C-terminal libre de tau14-421 y no muestra unión y/o reactividad con la proteína tau normal. En las realizaciones preferentes, estos anticuerpos no inhiben la escisión por caspasa de httau40 en Asp421.

5 Se cree que, desde la fecha efectiva de presentación de la presente solicitud, no hay informes en la bibliografía sobre el uso de anticuerpos específicos o selectivos para tau truncada preovillos soluble, por ejemplo, en Asp421, Glu391 y/o Asp13, y que no muestren una unión o reactividad específica para la proteína tau de longitud completa (o anticuerpos que tengan estructuras tridimensionales similares a los anticuerpos específicos para la tau truncada preovillos soluble en Asp421, Glu391 y/o Asp13) en el tratamiento o la prevención de la EA y otras tauopatías. El uso  
10 de estos anticuerpos específicos de neoepitopo para tratar la EA u otra tauopatía no es obvio, por ejemplo, debido a que la literatura no informa dónde existen las formas truncadas solubles de tau en la célula y si tales formas y ubicaciones son accesibles para los anticuerpos. Este enfoque tampoco depende de la producción de anticuerpos conformacionales para los ovillos de tau preformados que ya estén provocando daño, y está destinado a abordar el problema antes de que se formen los FNF y/o los FHE patológicos, y que tau se agregue patológicamente.

15 La presente invención también abarca un método de tratamiento o de prevención de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en un sujeto. Este método incluye administrar anticuerpos frente a proteínas tau truncadas, que reconocen selectivamente estas proteínas tau truncadas, o porciones de las proteínas tau truncadas, a un paciente, en condiciones y en las cantidades eficaces para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías.  
20 Los anticuerpos pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa, vía subcutánea, vía nasal, vía bucal, vía transdérmica, etc., como se describe con mayor detalle a continuación. En determinadas realizaciones preferentes, los anticuerpos reconocen selectivamente a tau truncada preovillos soluble, y no muestran unión y/o reactividad con tau normal. Por lo tanto, los anticuerpos deben facilitar la depuración de la tau truncada y no deben afectar las funciones biológicas de la tau normal. En determinadas realizaciones, los anticuerpos administrados bloquean la agregación de  $\Delta$ Tau directamente (por ejemplo, uniéndose al extremo C de ATau y, de este modo, interfiriendo directamente con la capacidad del extremo C de  $\Delta$ Tau para interactuar con proteínas y péptidos externos). Los anticuerpos que bloquean la agregación tau directamente tendrán, preferentemente, una baja constante de disociación.

30 En un aspecto, la presente invención incluye un método para propiciar la depuración de los agregados tau del cerebro de un sujeto. Este método incluye administrar anticuerpos con una especificidad para formas anormales (truncadas) de la proteína tau (o porciones de las formas anormales (truncadas) de la proteína tau) que pueden o no ser conformacionalmente distintas de tau normal, siendo los anticuerpos no específicos para una proteína tau normal (no muestran afinidad, unión o reactividad con tau normal), a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano). En determinadas realizaciones preferentes, los anticuerpos tienen especificidad para una tau truncada en su extremo C  
35 en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421. En otras realizaciones preferentes, los anticuerpos tienen especificidad para una tau truncada en su extremo N, por ejemplo, en el aminoácido Asp13. En realizaciones preferentes adicionales, los anticuerpos tienen especificidad para  $\Delta$ Tau (tau1-421) y/o tau14-421. Los agregados a depurar incluyen, por ejemplo, ovillos neurofibrilares o sus precursores patológicos de tau. Los ovillos neurofibrilares están asociados a menudo con enfermedades neurodegenerativas, que incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal hereditaria y parkinsonismo asociados con el cromosoma 17 (FTDP-17), enfermedad de Pick, degeneración corticobasal esporádica y parálisis supranuclear progresiva. Los anticuerpos pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa, vía subcutánea, vía nasal, vía bucal, vía transdérmica, etc., como se describe con mayor detalle a continuación.

45 Otro aspecto de la presente invención incluye un método para ralentizar la progresión de o invertir un fenotipo conductual relacionado con ovillos en un sujeto. Este método incluye administrar una tau truncada o una porción de la tau truncada (por ejemplo, como una vacuna), o anticuerpos que reconocen específicamente una tau truncada o una porción de una tau truncada, en condiciones y en las cantidades eficaces para retardar o invertir un fenotipo  
50 conductual relacionado con ovillos en un sujeto. La tau truncada, una porción de tau truncada, o los anticuerpos, se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, vía subcutánea, vía nasal, vía bucal, vía transdérmica, etc., como se describe con mayor detalle a continuación.

55 En determinadas realizaciones preferentes, la invención se refiere a la administración de anticuerpos con una especificidad para formas anormales (truncadas) de la proteína tau (o porciones de las formas anormales (truncadas) de la proteína tau) que pueden o no ser conformacionalmente distintas de tau normal, siendo dicho anticuerpos no específicos para una proteína tau normal (no muestran unión o reactividad con tau normal), por ejemplo, a un paciente humano. Preferentemente, estos anticuerpos reconocen epitopos de extremo libre lineales o conformacionales de tau truncada. En determinadas realizaciones preferentes, estos anticuerpos específicos de extremo libre inhiben la polimerización tau. Los anticuerpos pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa,  
60 vía subcutánea, vía nasal, vía bucal, vía transdérmica, etc., como se describe con mayor detalle a continuación.

65 Como afirma Kovacech *et al.*, "Tau Truncation is a Productive Posttranslational Modification of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease", Current Alzheimer Research Vol. 7 pág. 708-716 (2010), teniendo en cuenta que varios truncamientos de tau C-terminales puede promover el ensamblaje de tau en filamentos helicoidales emparejados (los FHE), diversas proteínas tau truncadas de forma N- y C-terminal ejercen un ensamblaje anormal

de los microtúbulos, y tanto las moléculas tau truncadas en Glu391 como Asp421 indujeron niveles similares de células apoptóticas, muchas de las proteínas presentes en el proteoma de tau truncada del cerebro afectado pueden servir como inductores de la degeneración neurofibrilar de tau. Se sabe que las mutaciones de tau alteran la conformación de la proteína y conducen a su fosforilación mayor y más rápida *in vitro*. El truncamiento de tau puede incluso inducir su hiperfosforilación. Aunque no se ha determinado el papel temporal de la fosforilación en el desarrollo de la patología de tau, Kovacech *et al.* informan que el modelo *in vivo* de tauopatías basado en la proteína tau truncada muestra claramente que el truncamiento es una modificación "productiva" que puede iniciar la degeneración neurofibrilar por tau. Kovacech *et al.* afirman que el mapeo inmunohistoquímico de la distribución de tau truncada en Asp421 y Glu391 en cerebros con EA indicó que estos epítomos aparecen en un orden temporal específico en el desarrollo de ovillos, y proponen que los ovillos neurofibrilares (los ONF) pasan por varias fases durante las cuales tau cambia de conformación varias veces y se trunca progresivamente en los extremos N y C; inicialmente, ensamblándose las moléculas de tau de longitud completa en neuronas de preovillo que presentan el epítipo conformacional Alz50, y se propone que los sucesos de truncamiento se producen poco después de la formación de ovillos, truncándose en primer lugar tau en el punto de escisión Asp421 (por ejemplo, por caspasa-3) y escindiéndose más tarde adicionalmente en Glu391.

Asuni *et al.* 2007 informaron sobre la depuración de tau del cerebro mediante inmunoterapia. El resultado fue sorprendente e ilógico, debido a que se pensaba que la diana era principalmente intracelular y estaba principalmente en el citoplasma y, por lo tanto, generalmente inaccesible a los anticuerpos generados o suministrados fuera de la célula. Se han postulado diversos mecanismos, pero ninguno ha mostrado explicar de forma definitiva cómo funciona la inmunoterapia en este caso. Una sugerencia fue que la proteína tau que se depuró del cerebro de los ratones transgénicos, era, en realidad, extracelular. Otra sugerencia fue que el complejo tau-anticuerpo se formaba en un compartimento vacuolar que está asociado a la ruta endosómica secretoria. Una tercera idea fue que los anticuerpos entraban en las células nerviosas degenerativas (véase la revisión de Sigurdsson, Current Alzheimer's Research 2009, 6, 446-450).

#### Tau truncada

Las formas anormales de las proteínas tau que son objeto de la presente invención son normalmente proteínas tau truncadas (por ejemplo, proteínas tau escindidas por caspasa), muy preferentemente tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o una tau truncada en su extremo N, por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13 (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores). En determinadas realizaciones, la proteína tau truncada es tau1-421 ( $\Delta$ Tau), o un fragmento C-terminal de la misma. Estas proteínas tau anormales pueden ser conformacionalmente distintas de tau normal y en ocasiones se las denomina "tauones" (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2004/0082763, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad). Distintas conformaciones en comparación con la tau humana normal pueden atribuirse desde el punto de vista patológico a un truncamiento anormal en el extremo N o en el extremo C o en ambos extremos de la molécula de tau.

Estas proteínas tau anormales o truncadas, o fragmentos de las mismas, pueden usarse como inmunógenos o mimótopos para generar anticuerpos específicos para la proteína tau truncada (por ejemplo, neoepítomos creados por la escisión de tau en, por ejemplo, Asp421) y no específicos para tau no truncada, *in situ* y *ex situ* del cerebro de un sujeto, y/o administrarse a un sujeto para inducir la formación de los anticuerpos específicos de neoepítipo en el sujeto. Por ejemplo, las proteínas tau truncadas mencionadas anteriormente pueden administrarse a un mamífero (por ejemplo, un paciente humano), que puede ser susceptible a la formación de ovillos neurofibrilares, para producir anticuerpos contra tales proteínas tau truncadas, siempre y cuando se formen *in vivo*. En determinadas realizaciones, la proteína tau truncada comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-30, o un fragmento de la misma, de tau; una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; o una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma, de tau. En determinadas realizaciones, la proteína tau truncada es tau1-421 ( $\Delta$ Tau), o un fragmento C-terminal de la misma (por ejemplo, tau411-421, tau412-421, tau413-421, tau414-421, tau415-421, tau416-421, tau417-421 o tau418-421). En algunas de estas realizaciones, la proteína tau truncada está fosforilada en Ser412 y/o Ser413.

En determinadas realizaciones, la tau truncada comprende o consiste en tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381, tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores, de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau humana. La tau truncada, en determinadas realizaciones, puede estar fosforilada en uno o más de los siguientes: Ser199, Ser202, Ser214, Ser235, Ser396, Ser404, Thr205, Thr231 y Thr212, en el caso de estar presentes.

La proteína tau truncada descrita anteriormente se puede obtener de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau humana o un segmento de las mismas. La proteína tau tiene 0, 1 o 2 insertos N-terminales que son el resultado del corte y empalme de los exones dos y tres, y 3 o 4 dominios de unión a microtúbulos que son el resultado del corte y empalme del exón diez. En determinadas realizaciones, la proteína tau truncada se obtiene de la isoforma más larga de tau (es decir, httau40). Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las isoformas de la proteína tau humana de la presente invención se proporcionan en las SEQ ID NO: 1-6.

## ES 2 714 692 T3

La SEQ ID NO: 1, la isoforma de tau más larga, httau40, que contiene dos insertos N-terminales y cuatro dominios de unión a microtúbulos (2N4R), es la siguiente:

	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG	60
	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEAEAGIGD	TPSLEDEAAG	120
	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKQANATR	IPAKTPPAPK	180
	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSRS	RTPSLTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK	240
	SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV	300
	PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDLFKDRV	QSKIGSLDNI	360
	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV	420
5	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L				441

La SEQ ID NO: 2 contiene dos insertos N-terminales y tres dominios de unión a microtúbulos (2N3R) de la siguiente manera:

	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG	60
	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHTEIPEG	TTAEAEAGIGD	TPSLEDEAAG	120
	HVTQARMVSK	SLDGTGSDDK	KAKGADGKTK	IATPRGAAPP	GQKQANATR	IPAKTPPAPK	180
	TPPSSGEPPK	SGDRSGYSSP	GSPGTPGSRS	RTPSLTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK	240
	SRLQTAPVPM	PDLKNVSKSI	GSTENLKHQP	GGGKVQIVYK	PVDLSKVTSK	CGSLGNIHHK	300
	PGGGQVEVKS	EKLDLFKDRVQ	SKIGSLDNIT	HVPGGGNKKI	ETHKLTFREN	AKAKTDHGAE	360
10	IYKSPVVS	DTSPAHLNSV	SSTGSIDMVD	SPQLATLADE	VSASLAKQGL		410

La SEQ ID NO: 3 contiene un inserto N-terminal y cuatro dominios de unión a microtúbulos (1N4R) de la siguiente manera:

	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTGDGSEEPG	60
	SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSLDGTGSDD	KKAKGADGKT	120
	LIATPRGAAP	PGQKQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR	180
	SRTPSLTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ	240
	PGGGKVQIIN	KKLDLSNVQS	KCGSLDNILH	VPGGGSVQIV	YKPVLDLSKVT	SKCGSLGNIH	300
	HKPGGGQVEV	KSEKLDLFKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIETHKLTFR	ENAKAKTDHG	360
15	AEIVYKSPVV	SGDTSPRHLS	NVSSTGSIDM	VDSPQLATLA	DEVASLAKQ	GL	412

La SEQ ID NO: 4 no contiene inserto N-terminal y contiene cuatro dominios de unión a microtúbulos (0N4R) de la siguiente manera:

	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEEAGI	GDTPSLEDEA	60
	AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKQANA	TRIPAKTPPA	120
	PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VATPPKSPSS	180
	AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	LIGSTENLKH	QPGGGKVQII	NKKLDLSNVQ	SKCGSKDNIK	240
	HVPGGGSVQI	VYKPVLDLSKV	TSKCGSLGNI	HHKPGGGQVE	VKSEKLDLFK	RVQSKIGSLD	300
	NITHVPGGGN	KKIETHKLTF	RENAKALTDH	GAEIVYKSPV	VSGDTSPRHL	SNVSSTGSID	360
20	MVDSPQLATL	ADEVASLAK	QGL				383

La SEQ ID NO: 5 contiene un inserto N-terminal y tres dominios de unión a microtúbulos (1N3R) de la siguiente manera:

	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT	PTEDGSEEPG	60
	SETSDAKSTP	TAEAEAGIG	DTPSLEDEAA	GHVTQARMVS	KSKDGTGSDD	KKAKGADGKT	120
	KIATPRGAAP	PGQKQANAT	RIPAKTPPAP	KTPPSSGEPP	KSGDRSGYSS	PGSPGTPGSR	180
	SRTPSLTPP	TREPKKVAVV	RTPPKSPSSA	KSRLQTAPVP	MPDLKNVSK	IGSTENLKHQ	240
	PGGGKVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDLFKDRV	QSKIGSLDNI	300
	THVPGGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS	GDTSPRHLSN	VSSTGSIDMV	360
25	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L				381

La SEQ ID NO: 6 no contiene inserto N-terminal y contiene tres dominios de unión a microtúbulos (0N3R) de la siguiente manera:

MAEPRQEFV	MEDHAGTYGL	GDRKDQGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKAEFAGI	GDTPSLEDEA	60
AGHVTQARMV	SKSKDGTGSD	DKKAKGADGK	TKIATPRGAA	PPGQKGQANA	TRIPAKTPPA	120
PKTPPSSGEP	PKSGDRSGYS	SPGSPGTPGS	RSRTPSLPTP	PTREPKKVAV	VRTPPKSPSS	180
AKSRLQTAPV	PMPDLKNVKS	KIGSTENLKH	QPGGGKVQIV	YKPVDLKSVT	SKCGSLGNIH	240
HKPGGGQVEV	KSEKLDKFKDR	VQSKIGSLDN	ITHVPGGGNK	KIGTHKLTFR	ENAKAKTDHG	300
AEIVYKSPVV	SGDTSRHL	NVSSTGSDM	VDSPQLATLA	DEVSASLAKQ	GL	352

La proteína tau truncada de la presente invención puede estar fosforilada en uno o más restos de aminoácidos. En una realización, la proteína tau truncada está totalmente fosforilada. Los restos de aminoácido en la proteína tau de longitud completa, la SEQ ID NO: 1, que están fosforilados o pueden fosforilarse incluyen tirosinas en las posiciones de aminoácido 18, 29, 97, 310 y 394; serinas en las posiciones de aminoácido 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413 y 422; y treoninas en las posiciones de aminoácido 175, 181, 205, 212, 217, 231 y 403. Los restos de aminoácido que están fosforilados o pueden fosforilarse en la SEQ ID NO: 2 incluyen tirosinas en las posiciones 18, 29, 197, 279 y 363; serinas en las posiciones 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 325, 365, 369, 373, 378, 381, 382, 391; y treonina en las posiciones 175, 181, 205, 212, 217, 231, 372. Los restos de aminoácido que están fosforilados o pueden fosforilarse en la SEQ ID NO: 3 incluyen tirosinas en las posiciones 18, 29, 168, 281 y 365; serinas en las posiciones 155, 156, 169, 170, 173, 179, 185, 206, 208, 209, 233, 264, 295, 327, 367, 371, 375, 380, 383, 384, 393; y treoninas en las posiciones 146, 152, 176, 183, 188, 202 y 374. Los restos de aminoácido que están fosforilados o pueden fosforilarse en la SEQ ID NO: 4 incluyen tirosinas en las posiciones 18, 29, 139, 252, 336; serinas en las posiciones 126, 127, 140, 141, 144, 150, 156, 177, 179, 180, 204, 235, 266, 298, 338, 342, 346, 351, 354, 355, 364 y treoninas en las posiciones 117, 123, 147, 154, 159, 173 y 345. Los restos de aminoácido que están fosforilados o pueden ser restos fosforilados en la SEQ ID NO: 5 incluyen tirosinas en las posiciones 18, 29, 168, 250, 334; serinas en las posiciones 155, 156, 169, 170, 173, 179, 185, 206, 208, 209, 233, 264, 296, 336, 340, 344, 349, 352, 353, 362; y treoninas en las posiciones 146, 152, 1376, 183, 188, 202, 343. Los restos de aminoácido que están fosforilados o pueden fosforilarse en la SEQ ID NO: 6 incluyen tirosinas en las posiciones 18, 29, 139, 221 y 305; serinas en las posiciones 126, 127, 140, 141, 144, 150, 156, 177, 179, 180, 204, 235, 267, 307, 311, 315, 320, 323, 324, 333; y treonina en las posiciones 117, 123, 147, 154, 159, 173 y 314. También pueden ser fosforilados dentro de las secuencias de tau aminoácidos tirosina, serina o treonina adicionales.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención se refiere a una proteína tau truncada fosforilada o una porción de la misma, y a una composición farmacéutica que contiene la proteína tau truncada fosforilada o una porción de la misma. En determinadas realizaciones, la proteína tau truncada es tau1-421 ( $\Delta$ Tau), o un fragmento C-terminal de la misma (por ejemplo, tau411-421, tau412-421, tau413-421, tau414-421, tau415-421, tau416-421, tau417-421, tau418-421 o tau419-421), que esta fosforilada en uno o más de las siguientes Tyr<sup>18</sup>, Tyr<sup>29</sup>, Ser<sup>184</sup>, Ser<sup>185</sup>, Ser<sup>198</sup>, Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Ser<sup>208</sup>, Ser<sup>214</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>237</sup>, Ser<sup>238</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>293</sup>, Thr<sup>175</sup>, Thr<sup>181</sup>, Thr<sup>205</sup>, Thr<sup>212</sup>, Thr<sup>217</sup>, Ser<sup>411</sup>, Ser<sup>412</sup>, Ser<sup>416</sup>, Thr<sup>414</sup>. En algunas de estas realizaciones, la proteína tau truncada es un fragmento C-terminal de  $\Delta$ Tau que está fosforilado en uno o más de las siguientes Ser<sup>411</sup>, Ser<sup>412</sup>, Ser<sup>416</sup> y Thr<sup>414</sup>. La proteína tau truncada fosforilada puede ser una isoforma, un fragmento o una forma recombinante de la proteína. Asimismo, la proteína tau truncada fosforilada también puede contener una o más mutaciones de aminoácidos. Además de la proteína tau truncada fosforilada, la composición farmacéutica también puede contener un transportador farmacéutico y/o un adyuvante adecuado como se describe a continuación. En determinadas realizaciones, la vacunación de un sujeto con una proteína tau truncada fosforilada, o un fragmento de la misma, conduce a la generación de anticuerpos que pueden cruzar la barrera hematoencefálica y/o producirse en el cerebro, y posteriormente se unen y reaccionan selectivamente con tau anormal y, por ejemplo, reducen el grado de tau agregada en el cerebro y disminuyen la progresión de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías. En determinadas realizaciones, la tau truncada está fosforilada en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las siguientes posiciones: Tyr<sup>18</sup>, Tyr<sup>29</sup>, Ser<sup>184</sup>, Ser<sup>185</sup>, Ser<sup>198</sup>, Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Ser<sup>208</sup>, Ser<sup>214</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>237</sup>, Ser<sup>238</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>293</sup>, Thr<sup>175</sup>, Thr<sup>181</sup>, Thr<sup>205</sup>, Thr<sup>212</sup>, Thr<sup>217</sup>, Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>411</sup>, Ser<sup>412</sup>, Ser<sup>416</sup>, y Thr<sup>414</sup>.

En determinadas realizaciones, la tau truncada está fosforilada en uno o más de los siguientes aminoácidos: Ser<sup>199</sup>, Ser<sup>202</sup>, Ser<sup>214</sup>, Ser<sup>235</sup>, Ser<sup>396</sup>, Ser<sup>404</sup>, Thr<sup>205</sup>, Thr<sup>231</sup>, y Thr<sup>212</sup>, Ser<sup>411</sup>, Ser<sup>412</sup>, Ser<sup>416</sup>, y Thr<sup>414</sup>.

A menos que se indique otra cosa, la referencia a tau incluye las secuencias de aminoácidos humanas naturales (SEQ ID NO: 1-6), y se refiere específicamente a la isoforma más larga de tau (SEQ ID NO: 1), también conocida como httau40. Además pueden usarse variantes de tales segmentos, análogos y miméticos del péptido tau natural que inducen y/o reaccionan de forma cruzada con anticuerpos para las proteínas tau anormales. Las variantes análogas, incluyendo las alélicas, de especie e inducidas, normalmente difieren de los péptidos de origen natural en una, dos, o unas pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservativas. Los análogos normalmente presentan al menos el 80 o 90 % de identidad de secuencia con los péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de los aminoácidos N o C-terminales en una, dos, o unas pocas posiciones.

Además de las proteínas tau de tipo silvestre o naturales, también se contempla el uso de proteínas tau truncadas que contienen una o más sustituciones de aminoácidos. En una realización de la presente invención, la proteína tau truncada contiene una mutación de prolina a leucina en la posición de aminoácido 301 (P301L) de la SEQ ID NO: 1. También se contemplan otras mutaciones de aminoácidos de la proteína tau. Estas mutaciones incluyen una



- mutación de lisina a treonina en el resto de aminoácido 257 (K257T) en la SEQ ID NO: 1; una mutación de isoleucina a valina en la posición de aminoácido 260 (I260V) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de glicina a valina en la posición de aminoácido 272 (G272V) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de asparagina a lisina en la posición de aminoácido 279 (N279K) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de asparagina a histidina en la posición de aminoácido
- 5 296 (N296H) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de prolina a serina en la posición de aminoácido 301 (P301S) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de glicina a valina en la posición de aminoácido 303 (G303V) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de serina a asparagina en la posición de 305 (S305N) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de glicina a serina en la posición de aminoácido 335 (G335S) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de valina a metionina en la posición de 337 (V337M) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de ácido glutámico a valina en la posición de 342
- 10 (E342V) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de lisina a isoleucina en la posición de aminoácido 369 (K369I) de la SEQ ID NO: 1; una mutación de glicina a arginina en la posición de aminoácido 389 (G389R) de la SEQ ID NO: 1; y una mutación de arginina a triptófano en la posición de aminoácido 406 (R406W) de la SEQ ID NO: 1. En una realización de la presente invención, la proteína mutante tau truncada, o el fragmento peptídico, está fosforilada.
- 15 Los fragmentos inmunogénicos de la proteína tau truncada útiles para la presente invención pueden identificarse basándose en la antigenicidad, hidrofiliidad y accesibilidad de la secuencia. En una realización preferente, la proteína tau truncada o sus epítopos inmunogénicos pueden o no estar fosforilados en uno o más aminoácidos. Aunque en algunos casos se han utilizado péptidos de longitudes más largas para generar satisfactoriamente anticuerpos específicos de extremo, Saido y colaboradores (1993; 1994) establecieron que hay una longitud de cinco
- 20 aminoácidos para cualquier péptido dado que garantiza que el grupo amino libre específico en el extremo N constituya una parte esencial del epítipo reconocido por el nuevo anticuerpo. Por lo tanto, en una realización preferente, el fragmento inmunogénico de la tau truncada comprende una secuencia lineal de al menos cinco aminoácidos de la proteína tau que garantiza que el grupo amino libre específico en el extremo N constituye una parte esencial del epítipo reconocido por el nuevo anticuerpo específico de extremo libre de epítipo lineal. En otras
- 25 realizaciones, los fragmentos de tau truncada tienen al menos los últimos 20, 30 o 45 aminoácidos de la tau truncada, y se generan anticuerpos específicos de conformación o específicos de extremo libre de epítipo lineal. En realizaciones adicionales, un fragmento de una tau truncada comprende o consiste en una secuencia lineal de cuatro aminoácidos de la tau truncada.
- 30 En determinadas realizaciones, el fragmento inmunogénico de la tau truncada comprende o consiste en las siguientes secuencias, o fragmentos de las mismas, o una secuencia homóloga:
- 35 SEQ ID NO:7 EPRQFEVMD;  
SEQ ID NO:8 PRQFEVMD;  
SEQ ID NO:9 QFEVMD;  
SEQ ID NO:10 EFEVMD;  
SEQ ID NO:11 FEVMD;  
SEQ ID NO:12 EVMD;  
SEQ ID NO:13 VMED;  
40 SEQ ID NO:14 MED;  
SEQ ID NO:15 HAGTYGLGDRKD;  
SEQ ID NO:16 HAGTYGLGDRK;  
SEQ ID NO:17 HAGTYGLGDR;  
SEQ ID NO:18 HAGTYGLGD;  
45 SEQ ID NO:19 HAGTYGLG;  
SEQ ID NO:20 HAGTYGL;  
SEQ ID NO:21 HAGTYG;  
SEQ ID NO:22 HAGTY;  
SEQ ID NO:23 HAGT;  
50 SEQ ID NO:24 IVYKSPVVSGD;  
SEQ ID NO:25 IVYKSPVVSG;  
SEQ ID NO:26 IVYKSPVVS;  
SEQ ID NO:27 IVYKSPVV;  
SEQ ID NO:28 IVYKSPV;  
55 SEQ ID NO:29 IVYKSP;  
SEQ ID NO:30 IVYKS;  
SEQ ID NO: 31 IVYK;  
SEQ ID NO: 32 IVY;  
SEQ ID NO:33 PQLATLADEV S  
60 SEQ ID NO:34 PQLATLADEV;  
SEQ ID NO:35 PQLATLADE;  
SEQ ID NO:36 PQLATLAD;  
SEQ ID NO:37 PQLATLA;  
SEQ ID NO:38 PQLATL;  
65 SEQ ID NO:39 PQLAT;  
SEQ ID NO:40 PQLA;

SEQ ID NO:41 PQL;  
 SEQ ID NO:42 SPQLATLADE;  
 SEQ ID NO:43 SPQLATLAD;  
 SEQ ID NO:44 SPQLATLA;  
 5 SEQ ID NO:45 SPQLATL;  
 SEQ ID NO:46 SPQLAT;  
 SEQ ID NO:47 SPQLA;  
 SEQ ID NO:48 SPQL;  
 SEQ ID NO:49 SPQ;  
 10 SEQ ID NO:50 DSPQLATL;  
 SEQ ID NO:51 NAKAKTDHGAE;  
 SEQ ID NO:52 AKAKTDHGAE;  
 SEQ ID NO:53 KAKTDHGAE;  
 SEQ ID NO:54 AKTDHGAE;  
 15 SEQ ID NO:55 KTDHGAE;  
 SEQ ID NO:56 TDHGAE;  
 SEQ ID NO:57 DHGAE;  
 SEQ ID NO:58 HGAE;  
 SEQ ID NO:59 GAE;  
 20 SEQ ID NO:60 SSTGSIDMVDS;  
 SEQ ID NO:61 STGSIDMVDS;  
 SEQ ID NO:62 TGSIDMVDS;  
 SEQ ID NO:63 GSIDMVDS;  
 SEQ ID NO:64 SIDMVDS;  
 25 SEQ ID NO:65 IDMVDS;  
 SEQ ID NO:66 DMVDS;  
 SEQ ID NO:67 MVDS;  
 SEQ ID NO:68 VDS;  
 SEQ ID NO:69 NVSSTGSIDMV;  
 30 SEQ ID NO:70 VSSTGSIDMV;  
 SEQ ID NO:71 SSTGSIDMV;  
 SEQ ID NO:72 STGSIDMV;  
 SEQ ID NO:73 TGSIDMV;  
 SEQ ID NO:74 GSIDMV;  
 35 SEQ ID NO:75 SIDMV;  
 SEQ ID NO:76 IDMV;  
 SEQ ID NO:77 DMV;  
 SEQ ID NO:78 NVSTGSIDMVD;  
 SEQ ID NO:79 VSTGSIDMVD;  
 40 SEQ ID NO:80 STGSIDMVD;  
 SEQ ID NO:81 TGSIDMVD;  
 SEQ ID NO:82 GSIDMVD;  
 SEQ ID NO:83 SIDMVD;  
 SEQ ID NO:84 IDMVD;  
 45 SEQ ID NO:85 DMVD;  
 SEQ ID NO:86 SSTGSIDMVD;  
 SEQ ID NO:87 SPQLATLADE;  
 SEQ ID NO:88 SPQLATLAD;  
 SEQ ID NO:89 SPQLATLA;  
 50 SEQ ID NO:90 SPQLATL;  
 SEQ ID NO:91 SPQLAT;  
 SEQ ID NO:92 SPQLA;  
 SEQ ID NO:93 SPQL;  
 SEQ ID NO: 94 SPQ; y  
 55 SEQ ID NO: 116.

En algunas de estas realizaciones, el fragmento inmunogénico de la tau truncada comprende o consiste en una secuencia de las SEQ ID NO: 78-86 o 116 y, preferentemente, las SEQ ID NO: 83-86 o 116.

60 El extremo libre (extremo N o extremo C) del péptido trucado es parte del fragmento inmunogénico y es necesario para la generación de los anticuerpos específicos de neoepitopo de la presente invención (es decir, el extremo N o el extremo C libre es una parte esencial del epitopo del anticuerpo). En determinadas realizaciones, al menos una de las serinas y treoninas en estas secuencias está fosforilada, y la serina (o serinas) y/o treonina (o treoninas) fosforiladas también forman parte esencial del epitopo del anticuerpo.

65 En determinadas realizaciones, la tau truncada comprende o consiste en tau391-421 fosforilado o no fosforilado,

5 tau395-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser396, Ser400, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Tyr394, Thr205 y/o Thr212), tau408-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser409, Ser412 y/o Ser413), tau414-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser396, Ser400, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Tyr394, Thr205 y/o Thr212), tau415-421, tau416-421, tau417-421, tau418-421 o tau419-421, tau361-391, tau386-391, tau385-391, tau384-391.

10 En una realización de la presente invención, los péptidos de tau truncada de la presente invención pueden contener uno o más restos de D-aminoácido. Los aminoácidos en forma de U tendrían el efecto de potenciar la estabilidad del péptido. Estos D-aminoácidos pueden estar en el mismo orden que la forma L del péptido o ensamblarse en orden  
 15 inverso a partir de la secuencia de la forma L para mantener la topología global de la secuencia nativa (Ben-Yedidia *et al.*, "A Retro-Inverso Peptide Analogue of Influenza Virus Hemagglutinin B-cell Epitope 91-108 Induces a Strong Mucosal and Systemic Immune Response and Confers Protection in Mice after Intranasal Immunization," *Mol Immunol.* 39:323 (2002); Guichard, *et al.*, "Antigenic Mimicry of Natural L-peptides with Retro-Inverso-Peptidomimetics," *PNAS* 91:9765-9769 (1994); Benkirane, *et al.*, "Antigenicity and Immunogenicity of Modified Synthetic Peptides Containing D-Amino Acid Residues," *J. Bio. Chem.* 268(35):26279-26285 (1993)).

20 Los agentes terapéuticos pueden ser polipéptidos más largos que incluyen, por ejemplo, un fragmento activo (por ejemplo, una porción inmunogénica) del péptido de tau (por ejemplo,  $\Delta$ Tau), junto con otros aminoácidos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones los agentes terapéuticos incluyen proteínas de fusión que comprenden un segmento de tau unido, con o sin un espaciador, a un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares que propicia una respuesta de linfocitos B contra el segmento de tau.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene (uno o más de) los epítopos inmunogénicos de la proteína tau truncada. En determinadas realizaciones, el epítipo inmunogénico de tau truncada comprende tau391-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser396, Ser400, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Tyr394, Thr205 y/o Thr212), tau395-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser396, Ser400, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Tyr394, Thr205 y/o Thr212), tau408-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser409, Ser412 y/o Ser413), tau361-391 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en Ser396), tau411-421, tau416-421, tau417-421, tau418-421, tau419-421, o un fragmento de cualquiera de las anteriores. En determinadas realizaciones, la secuencia del epítipo inmunogénico comprende o consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-94, o 116, o un fragmento de las mismas.

35 Otras porciones o fragmentos de la proteína tau que son adecuados para poner en práctica la presente invención pueden incluir formas recombinantes de proteína tau anormal (por ejemplo, tau truncada) creadas por escisión y/o fosforilación de la proteína tau normal.

40 Las formas truncadas anormalmente de las proteínas tau humanas -tauones- se pueden preparar utilizando cualquiera de numerosas técnicas de síntesis recombinante bien conocidas. En resumen, la mayoría de las técnicas que se usan para transformar células, construir vectores, extraer ARN mensajero, preparar bibliotecas de ADNc y similares, se practican extensamente en la técnica, y la mayoría de los expertos están familiarizados con los materiales de recurso convencionales, que describen las condiciones y procedimientos específicos extensamente  
 45 practicados en la técnica. Las proteínas tau anormales, tales como la tau truncada, pueden sintetizarse mediante síntesis peptídica en fase sólida o expresión recombinante, o pueden obtenerse de fuentes naturales. Los sintetizadores automáticos de péptidos están disponibles en el mercado de numerosos proveedores, tales como Applied Biosystems (Foster City, California). Los sistemas de expresión recombinantes pueden incluir bacterias, tales como *E. coli*, levaduras, células de insecto o células de mamífero. Los procedimientos para la expresión recombinante se describen en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (C.S.H.P. Press, NY 2ª ed., 1989).

50 El sistema procariótico más comúnmente utilizado para la producción de proteínas recombinantes sigue siendo *E. coli*, sin embargo, también se pueden usar otras cepas bacterianas, tales como *Bacilli*, por ejemplo *Bacillus subtilis*, diversas especies de *Pseudomonas*, u otras cepas bacterianas. En tales sistemas procarióticos, se utilizan vectores plasmídicos que contienen sitios de replicación y secuencias de control procedentes de una especie compatible con el hospedador. Las secuencias de control procarióticas comúnmente usadas incluyen promotores para el inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, junto con secuencias del sitio de unión al ribosoma.

60 Ahora también hay disponible una amplia diversidad de hospedadores eucarióticos para la producción de proteínas recombinantes exógenas. Como en las bacterias, los hospedadores eucarióticos pueden transformarse con sistemas de expresión que producen la proteína deseada directamente, pero más comúnmente, para efectuar la secreción de la proteína se proporcionan secuencias señal. Los sistemas eucarióticos tienen la ventaja adicional de que tienen la capacidad de procesar intrones que pueden estar presentes en las secuencias genómicas que codifican proteínas de organismos superiores. Los sistemas eucarióticos también proporcionan diversos mecanismos de procesamiento que dan como resultado, por ejemplo, la glucosilación, la oxidación o la derivatización de determinados restos de aminoácido, el control conformacional y así sucesivamente.

Los sistemas eucarióticos usados comúnmente incluyen levaduras, células de insecto, células de mamífero, células de ave y células de plantas superiores. El listado no es exhaustivo. Se dispone de promotores adecuados que son compatibles y operativos para su uso en cada uno de estos tipos de hospedadores, así como secuencias de terminación y potenciadores, como por ejemplo, el promotor de poliedros de baculovirus. Al igual que en el caso anterior, los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, en un sistema de mamífero, se puede inducir el promotor MTII mediante la adición de iones de metales pesados.

Los detalles para la construcción de sistemas de expresión adecuados para un hospedador deseado son conocidos por los expertos en la materia. Para la producción recombinante de la proteína, el ADN codificante se liga de forma adecuada en el sistema de expresión de elección, y después el sistema se transforma en la célula hospedadora compatible, que después se cultiva y se mantiene en condiciones en donde tiene lugar la expresión del gen exógeno. Los tauones de la presente invención producidos de esta manera, se recuperan del cultivo, ya sea lisando las células o a partir del medio de cultivo, según sea apropiado y conocido por los expertos en la materia.

Los ligamientos correctos para la construcción del plásmido se pueden confirmar transformando en primer lugar un hospedador adecuado con la mezcla de ligamiento. Los transformantes satisfactorios se seleccionan mediante ampicilina, tetraciclina u otra resistencia a antibiótico, o usando otros marcadores dependiendo del modo de construcción del plásmido, como se entiende en la técnica.

En una variación de la presente invención, un péptido inmunogénico, tal como una tau truncada, se puede expresar/presentar mediante un virus o bacteria como parte de una composición inmunogénica. Se incorpora en un genoma o episoma del virus o bacteria un ácido nucleico que codifica el péptido inmunogénico. Opcionalmente, el ácido nucleico se incorpora de tal manera que el péptido inmunogénico se expresa como una proteína secretada o como una proteína de fusión con una proteína de superficie externa de un virus o una proteína transmembrana de bacterias, de forma que se presente el péptido. Los virus o bacterias utilizados en tales métodos deben ser atenuados o no patógenos. Los virus adecuados incluyen adenovirus, VHS, virus de la encefalitis equina venezolana y otros alfavirus, virus de la estomatitis vesicular y otros rabdovirus, virus de la variolovacuna y de la viruela aviar. Las bacterias adecuadas incluyen *Salmonella* y *Shigella*. Es particularmente adecuada la fusión de un péptido inmunogénico a HBsAg del VHB.

Las respuestas inmunitarias contra los ovillos neurofibrilares también pueden inducirse mediante la administración de ácidos nucleicos que codifican segmentos de un péptido de tau anormal o una tau truncada, y fragmentos de los mismos, otros inmunógenos peptídicos, o de anticuerpos y sus cadenas componentes, utilizados para inmunización pasiva. Dichos ácidos nucleicos pueden ser ADN o ARN. Un segmento de ácido nucleico que codifica un inmunógeno se asocia, normalmente, a elementos reguladores, tal como un promotor y un potenciador, lo que permite la expresión del segmento de ADN en las células diana deseadas de un paciente. Para la expresión en células sanguíneas, como es conveniente para la inducción de una respuesta inmunitaria, son adecuados para la expresión directa los elementos promotores y potenciadores de los genes de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, o el promotor temprano intermedio principal y el potenciador de CMV. Los elementos reguladores asociados y las secuencias codificantes a menudo se clonan en un vector. Para la administración de anticuerpos bicatenarios, las dos cadenas pueden clonarse en el mismo vector o en vectores separados.

Se dispone de varios sistemas de vectores víricos, incluyendo los sistemas retrovíricos (véase, por ejemplo, Lawrie *et al.*, Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109 (1993); vectores adenovíricos (Bett *et al.*, J. Virol. 67:5911 (1993); vectores de virus adenoasociados (Zhou *et al.*, J. Exp. Med. 179:1867 (1994), que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad), vectores víricos de la familia de la viruela, incluyendo el virus de la variolovacuna y los virus de la viruela aviar, vectores víricos del género de los alfavirus, tales como los obtenidos de los virus Sindbis y del bosque Semliki (Dubensky *et al.*, J. Virol 70:508-519 (1996)), virus de la encefalitis equina venezolana (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.643.576, para Johnston *et al.*) y los rabdovirus, tales como el virus de la estomatitis vesicular (véase el documento WO 96/34625) y los papilomavirus (Ohe, *et al.*, Human Gene Therapy 6:325-333 (1995); documento WO 94/12629 para Woo *et al.*; y Xiao y Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24:2630-2622 (1996).

El ADN que codifica un inmunógeno, o un vector que lo contenga, se puede empaquetar en liposomas. Los lípidos adecuados y los análogos relacionados se describen en las patentes de Estados Unidos 5.208.036 de Eppstein *et al.*, la patente de Estados Unidos n.º 5.264.618 para Felgner *et al.*, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.279.833 para Rose y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.283.185, para Eppard *et al.* Los vectores y el ADN que codifican un inmunógeno también pueden adsorberse o asociarse con transportadores de partículas, los ejemplos de los cuales incluyen polímeros de polimetil metacrilato y polilactidas, y poli(lactida-co-glicólidos).

Los vectores de terapia génica o el ADN desnudo se pueden suministrar *in vivo* mediante la administración a un paciente individual, normalmente, mediante administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, nasal, gástrica, intradérmica, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o aplicación tópica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5.399.346 para Anderson *et al.*). Dichos vectores pueden incluir, adicionalmente, agentes facilitadores (patente de Estados Unidos n.º 5.593.970 para Attardo *et al.*). El ADN también se puede administrar usando una pistola génica (Xiao y Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24:2630-2622 (1996)). El

ADN codificante de un inmunógeno se precipita sobre la superficie de perlas de metal microscópicas. Los microproyectiles se aceleran con una onda de choque o gas de helio en expansión, y penetran en los tejidos a una profundidad de varias capas de células. Por ejemplo, es adecuado el Accel™ Gene Delivery Device fabricado por Agacetus, Inc. Middleton Wis. Como alternativa, el ADN desnudo puede pasar a través de la piel al torrente sanguíneo simplemente aplicando de forma puntual el ADN sobre la piel, con irritación química o mecánica (véase el documento WO 95/05853 de Carson *et al.*).

En una variación adicional, los vectores que codifican inmunógenos se pueden suministrar a células *ex vivo*, tal como a células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejido) o células madre hematopoyéticas de donantes universales, seguido de la reimplantación de las células en un paciente, generalmente después de la selección de las células que han incorporado el vector.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una proteína tau truncada fosforilada y a una composición farmacéutica que contiene la proteína tau truncada fosforilada. La proteína tau truncada fosforilada puede ser una isoforma, un fragmento o una forma recombinante de la proteína. Asimismo, la proteína tau truncada fosforilada también puede contener una o más mutaciones de aminoácidos. Además de la proteína tau truncada fosforilada, la composición farmacéutica también contiene un transportador farmacéutico y/o un adyuvante adecuado como se describe a continuación.

Los péptidos de tau también pueden producirse por síntesis química de la secuencia de aminoácidos de una proteína tau (Goedert *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4051-4055), como se predijo a partir de la clonación y secuenciación de un ADNc codificante de una proteína tau. Esta información de la secuencia de la proteína tau puede utilizarse para predecir los péptidos de tau amino y carboxilo terminales apropiados para ser sintetizados químicamente utilizando métodos de síntesis peptídica convencionales conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen un método en fase sólida ideado por R. Bruce Merrifield, (Erickson y Merrifield, "Solid-Phase Peptide Synthesis", en The Proteins, Volumen 2, H. Neurath y R. Hill (eds.) Academic Press, Inc., Nueva York pág. 255-257; Merrifield, 1986, "Solid phase synthesis", Science, 242:341-347). En el método en fase sólida, los aminoácidos se añaden paso a paso a una cadena peptídica en crecimiento que está unida a una matriz insoluble, tal como perlas de poliestireno. Una ventaja importante de este método es que el producto deseado en cada fase está unido a perlas que pueden filtrarse y lavarse rápidamente y, por lo tanto, se evita la necesidad de purificar los intermediarios. Todas las reacciones se llevan a cabo en un solo recipiente, lo que elimina pérdidas debidas a las repetidas transferencias de productos. Este método de síntesis química de péptidos en fase sólida se puede automatizar fácilmente haciendo factible sintetizar de forma rutinaria péptidos que contienen aproximadamente 50 restos con buen rendimiento y pureza (Stewart y Young, 1984, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chemical Co.; Tam *et al.*, 1983, J. Am. Chem. Soc., 105:6442). Por ejemplo, podrían sintetizarse los péptidos de tau correspondientes a los restos de aminoácido 1 a 30 y 331 a 352.

La producción de péptidos de tau se puede conseguir además mediante tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, las secuencias nucleotídicas codificantes de tau apropiadas pueden sintetizarse, clonarse y expresarse en células hospedadoras apropiadas. Dado que la secuencia de ADN que codifica una proteína tau es conocida (Goedert *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:4051-4055), pueden sintetizarse sondas de ADN mediante métodos convencionales conocidos en la técnica para analizar bibliotecas de ADNc preparadas a partir de tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer, en cuanto a ADNc específicos de la proteína tau. Estas sondas de ADN pueden usarse además para aislar la familia completa de genes de proteína tau a partir de estas bibliotecas de ADNc, utilizando métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., Capítulo 7.

Se puede utilizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los miembros individuales de la familia tau, para la posterior clonación y expresión de los ADNc de proteína tau, véase las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202; 4.683.195; 4.889.818; Gyllensten *et al.*, 1988, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:7652-7656; Ochman *et al.*, 1988, Genetics, 120:621-623; Triglia *et al.*, 1988, Nucl. Acids. Res., 16:8156; Frohman *et al.*, 1988, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:8998-9002; Loh *et al.*, 1989, Science, 243:217-220).

Pueden usarse métodos que conocen bien los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen las secuencias codificantes de proteínas tau o fragmentos de las mismas y señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación/recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., Capítulo 12.

Se puede utilizar diversos sistemas de vectores de expresión en hospedadores para expresar las proteínas tau o fragmentos de las mismas. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen una secuencia codificante para una proteína tau o un fragmento de la misma; levaduras transformadas con vectores de expresión en levaduras recombinantes que contienen una secuencia codificante para una proteína tau o un fragmento de la misma; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante

(por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante de una proteína tau un fragmento de la misma; o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, adenovirus, virus de la variolovacuna) que contienen una secuencia codificante para una proteína tau o fragmento de la misma.

5 Los elementos de expresión de estos vectores varían en su fuerza y especificidades. Dependiendo del sistema de hospedador/vector utilizado, se puede usar en el vector de expresión cualquier número de elementos de transcripción y de traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tales como pL del bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-lac) y similares; cuando se clona en células de insecto, se pueden usar  
10 promotores tales como el promotor de polihedrina de baculovirus; cuando se clona en sistemas de células de mamífero, se pueden usar promotores tales como el promotor tardío de baculovirus o el promotor 7.5K del virus de la variolovacuna. Además pueden usarse promotores producidos por técnicas de ADN recombinante o de síntesis para proporcionar la transcripción de la secuencia codificante de una proteína tau insertada o fragmento de la misma.

15 En levaduras, pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles. Para una revisión véase, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, 1988, Ed. Ausubel *et al.*, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience Cap. 13; Grant *et al.*, 1987, Expression and Secretion Vectors for Yeast, en Methods in Enzymology, Ed. Wu y Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y., Vol. 153, pág. 516-544; Glover, 1986, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash., D.C. Cap.3; y Bitter, 1987, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods in Enzymology, Ed. Berger y  
20 Kimmel, Acad. Press, N.Y., Vol. 152, pág. 673-684; y The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, 1982, Ed. Strathern *et al.*, Cold Spring Harbor Press, vol. I y II. Para los ensayos de complementación en levaduras, los ADNc de las proteínas tau o fragmentos de las mismas pueden clonarse en plásmidos episómicos de levadura (YEp) que se replican de forma autónoma en la levadura debido a la presencia del plásmido 2 $\mu$  de levadura. La secuencia de la proteína tau o fragmento de la misma puede clonarse detrás de un promotor de levadura constitutivo, tal como ADH o LEU2, o de un promotor inducible tal como GAL (Cloning in Yeast, Cap. 3, R. Rothstein en; DNA Cloning Vol. 11, A Practical Approach, Ed. DM Glover, 1986, IRL Press, Wash., D.C.). Las construcciones pueden contener las regiones 5' y 3' no traducidas de un ARNm de una proteína tau afin o las correspondientes a un gen de levadura. Los plásmidos YEp se transforman con alta eficiencia y son extremadamente estables. Como alternativa, se pueden usar vectores que propicien la integración de secuencias de ADN exógenas en el cromosoma de la levadura.  
25

30 En determinadas realizaciones, se podría usar un sistema de insecto para expresar proteínas de tau o fragmentos de las mismas. En uno de tales sistemas, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) como un vector para expresar genes exógenos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de la proteína tau o fragmento de la misma puede clonarse en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor del VPNAc (por ejemplo, el promotor de la polihedrina). La inserción satisfactoria del gen de la polihedrina da como resultado la producción de un virus recombinante no ocluido (es decir, un virus que carece de la cubierta proteinácea, codificada por el gen de la polihedrina). Después, estos virus recombinantes se utilizan para infectar células de *Spodoptera frugiperda*, en las que se expresa el gen insertado. (por ejemplo, véase Smith *et al.*, 1983, J. Biol., 46:586; Smith, Patente de Estados Unidos n.º 4.215.051).  
35

40 En los casos en que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de la proteína tau o fragmento de la misma puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen quimérico puede insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vivo* o *in vitro*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, la región E1 o E3) da como resultado un virus recombinante que es viable y que tiene la capacidad de expresar la proteína tau o fragmento de la misma en hospedadores infectados. (por ejemplo, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., (EE.UU.) 81:3655-3659). Como alternativa, puede usarse el promotor 7,5K del virus de la variolovacuna. (por ejemplo, véase Mackett *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., (EE.UU.) 79:7415-7419; Mackett *et al.*, 1984, J. Virol., 49:857-864; Panicali *et al.*, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 4927-4931).  
45

50 Además pueden precisarse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de la proteína tau insertada o fragmento de la misma. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. En los casos en que todo el genoma de la proteína tau, incluyendo su propio codón de iniciación y las secuencias adyacentes, se insertan en vectores de expresión apropiados, pueden no necesitarse señales de control traduccional adicionales. Sin embargo, en los casos en que solo se inserta una porción de la secuencia codificante de la proteína tau, deben proporcionarse las señales de control traduccional exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG. Adicionalmente, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante de la proteína tau o fragmento de la misma, para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control traduccionales y codones de iniciación exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, de terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase Bitter *et al.*, 1987, Methods in Enzymol., 153:516-544).  
55

60 Además, se puede escoger una cepa de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. La expresión dirigida por  
65

determinados promotores puede elevarse en presencia de determinados inductores, (por ejemplo, iones de zinc y cadmio para los promotores de metalotioneína). Por lo tanto, puede controlarse la expresión de la proteína tau modificada genéticamente o un fragmento de la misma. Esto es importante si el producto proteico del gen exógeno clonado es letal para las células hospedadoras. Adicionalmente, las modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Distintas células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación postraduccionales de proteínas. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína exógena expresada.

5  
10  
15 Las células hospedadoras que contienen la secuencia codificante de la proteína tau o fragmento de la misma y que expresan el producto génico biológicamente activo de la proteína tau o fragmento de la misma, pueden identificarse mediante al menos cuatro enfoques generales: (a) hibridación ADN-ADN; (b) la presencia o ausencia de funciones genéticas "marcadoras"; (c) evaluación del nivel de transcripción según se mide por la expresión de transcritos de ARNm de la proteína tau en células hospedadoras; y (d) detección de productos génicos de la proteína tau según se mide por inmunoensayos o por su actividad biológica. Véase la Patente de Estados Unidos n.º 5.492.812.

Una vez que se identifica un recombinante que expresa una proteína tau o fragmento de la misma, se debe analizar el producto génico. Esto se puede lograr mediante ensayos basados en las propiedades físicas, inmunológicas o funcionales del producto.

20  
25 Una proteína tau o fragmento de la misma debe ser inmunoreactiva, ya sea que sea el resultado de la expresión de la secuencia génica completa, de una porción de la secuencia génica o de dos o más secuencias génicas que se ligan para dirigir la producción de proteínas quiméricas. Esta reactividad se puede demostrar mediante técnicas inmunológicas convencionales, tales como radioinmunoprecipitación, competición radioinmunitaria o inmunotransferencias.

#### 1. Anticuerpos frente a tau truncada

30 Los anticuerpos que se unen a y/o reconocen específicamente cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau truncada o la versión hiperfosforilada de las mismas y no reconocen, se unen o muestran reactividad con tau no truncada, pueden ser terapéuticamente eficaces en el contexto de la presente invención, por ejemplo, para tratar y/o prevenir la EA y/u otra tauopatía.

35 Preferentemente, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente el neoepítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos del extremo N libre o el extremo C libre del péptido creado por la escisión de tau), pero no reconocen la misma secuencia de aminoácidos presente internamente en la proteína tau normal. Los anticuerpos de la invención, preferentemente, no inhiben la escisión por caspasa de tau en Asp421. En determinadas realizaciones, los anticuerpos reconocen específicamente una secuencia de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o cualquier fragmento de las mismas, en la tau truncada, y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando está presente en la proteína tau normal. En determinadas realizaciones, los anticuerpos reconocen específicamente una secuencia de las SEQ ID NO: 78-86 o 116, y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando está presente en la proteína tau normal. Los anticuerpos de la invención, en las realizaciones preferentes, tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) y tienen la capacidad de depurar los péptidos o la tau truncada creados por la escisión de tau, y de minimizar o prevenir la formación de ovillos neurofibrilares. Al mismo tiempo, no se espera que estos anticuerpos afecten funciones biológicas de la proteína tau normal, debido a que estas secuencias en la proteína tau normal son internas y no contienen un extremo N o C libre, lo que es necesario para el reconocimiento de los anticuerpos de su epítipo. Por lo tanto, estos anticuerpos pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y en la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, vacunas) para el tratamiento y la prevención de estos trastornos.

50 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención reconocen específicamente el neoepítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos del extremo N libre o el extremo C libre del péptido creado por la escisión de tau), pero no reconocen específicamente la misma secuencia de aminoácidos presente en la proteína tau normal o no se unen de forma suficiente para depurar la tau normal o afectar su función. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos reconocen específicamente el neoepítipo creado por la escisión de tau en Asp421 (es decir, el extremo C libre de  $\Delta$ Tau), pero no reconocen específicamente la misma secuencia de aminoácidos presente en la proteína tau normal o no se unen de forma suficiente para depurar la tau normal o afectar su función.

60 En determinadas realizaciones, los anticuerpos reconocen, se unen o muestran reactividad con  $\Delta$ Tau, y no reconocen, se unen o muestran reactividad con la isoforma más larga de tau (es decir, htau40).

En determinadas realizaciones, cuando el objetivo es bloquear directamente la polimerización de  $\Delta$ Tau, el anticuerpo tiene una baja constante de disociación.

65 En determinadas realizaciones, el anticuerpo reconoce un sitio de escisión (por ejemplo, Asp421) y un aminoácido

fosforilado dentro de diez, seis, cinco o cuatro aminoácidos desde el sitio de escisión.

5 En las realizaciones preferentes de la invención, los anticuerpos de la invención (i) inhiben, reducen, depuran y/o eliminan a tau truncada en su extremo C, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o en su extremo N (por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13), (ii) inhiben, reducen, depuran y/o eliminan a tau truncada forforilada anormal (por ejemplo, tau fosforilada en Ser396 y/o Ser404), y/o (iii) previenen la formación de ovillos neurofibrilares y/o aumentan la depuración de los ovillos neurofibrilares, todo ello sin afectar las funciones biológicas de la proteína tau normal.

10 En determinadas realizaciones, el anticuerpo usado en los métodos de la invención es el anticuerpo conformacional MN423, TauC3, Tau12, 5A6, DC11, anti-Tau escindida (ASP421), clon C3 o anticuerpos estructuralmente similares. En algunas de estas realizaciones, el anticuerpo es TauC3, o un anticuerpo estructural y/o funcionalmente similar.

15 Se ha postulado que el truncamiento de tau en Glu391 conduce a cambios conformacionales específicos para la enfermedad de Alzheimer, que son reconocidos por el anticuerpo conformacional MN423 [Kovacech, *et al.* 2010; Novak, *et al.* 1989; Novak, *et al.* 1993; Csokava, *et al.* 2006; Skrabana, *et al.* 2006; Skrabana, *et al.* 2007]. Otro anticuerpo antitau, DC11, reconoce proteínas tau anormales presentes en cerebros con EA.

20 Adicionalmente, se ha informado de que el anticuerpo TauC3 reconoce específicamente tau truncada en Asp421, mientras que tau de tipo silvestre, que contiene tres repeticiones de unión a microtúbulos (producidas por corte y empalme alternativo, designadas 3R), o las proteínas tau truncadas en los restos de aminoácido Glu391 o Ala429, no fueron reconocidas por TauC3. (Gamblin, *et al.*, citado anteriormente).

25 Además, el anti-tau escindida (ASP421), clon C3 está disponible en el mercado de Millipore y se puede usar en los métodos de la presente invención. El anti-tau escindida (ASP421) es selectivo para un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 412-421 (CSSTGSIDMVD) de tau humana con una Cys en el extremo N-terminal.

30 Se cree que, sin embargo, hasta la presente invención, no hubo enseñanza ni sugerencia en la bibliografía sobre el uso de TauC3, DC11, MN423 y anti-Tau escindida (ASP421), clon C3, o de anticuerpos relacionados, para tratar o prevenir la EA u otra tauopatía.

35 Se piensa adicionalmente que TauC3, DC11, MN423 y anti-Tau escindida (ASP421), clon C3, o un anticuerpo que tenga una forma/estructura tridimensional como TauC3, MN423 y anti-Tau escindida (ASP421), pueden usarse en los métodos de la presente invención para tratar y/o prevenir la EA u otra tauopatía.

40 El anticuerpo 5A6 fosfoindependiente es el primero de los tres anticuerpos N-terminales para marcar ovillos difusos tempranos. (Horowitz, 2004). Horowitz, *et al.* informan que el epítipo Tau-12 se desenmascara a medida que las lesiones asumen una morfología fibrilar y, posteriormente, los epítopos del extremo N-terminal de tau se pierden en los ovillos de cerebros humanos afectados de EA, un proceso que se correlaciona de forma temporal con la aparición epítipo específico del truncamiento por caspasa C-terminal en D421. Adicionalmente, Horowitz, *et al.* informan que la caspasa-6 escinde a tau *in vitro* en el resto de ácido aspártico Asp421, provocando pérdida de inmunorreactividad con los anticuerpos Tau-12 y 5A6.

45 Se cree que la barrera hematoencefálica ("BHE") está comprometida en diversas enfermedades neurodegenerativas tales como la EA, y los inmunólogos son conscientes del hecho de que las células secretoras de anticuerpos pueden entrar al cerebro y secretar anticuerpos a nivel local. En sujetos sanos, la BHE sería relativamente impermeable a los anticuerpos de tau. A medida que la patología de tau comienza, los cambios inflamatorios asociados y el estrés celular pueden facilitar la captación de anticuerpos selectivos para tau truncada, y que no muestran unión y/o reactividad con tau normal, en el cerebro y posteriormente en las neuronas, permitiendo de este modo la depuración de tau patológica antes de que se forme y/o a medida que se forma, lo que, a su vez, retrasaría el inicio, mejoraría o prevendría la enfermedad. Los anticuerpos de las realizaciones preferentes de la invención tienen la capacidad de cruzar la BHE en un mamífero que padece o con riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, EA).

55 Los anticuerpos para tau truncada de acuerdo con la invención pueden dirigirse a tau truncada patológicos de forma extracelular, intracelular o ambas. En el direccionamiento extracelular, los anticuerpos que se unen a sus dianas pueden propiciar directamente su desensamblaje y pueden ser una señal para que la microglía depure los complejos de anticuerpo-proteína, previniendo o reduciendo de este modo el potencial efecto tóxico directo o indirecto de los agregados extracelulares de tau. La tau intracelular puede depurarse a través de la captación de anticuerpos o mediante la depuración mediada por anticuerpos de tau extracelular, propiciando la secreción de tau intracelular a través de un cambio en el equilibrio.

65 En determinadas realizaciones, el anticuerpo es específico y reconoce y reacciona selectivamente con Tau391-421, o un fragmento del mismo, (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser396, Ser400, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Tyr394, Thr205 y/o Thr212), Tau395-421 (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser396, Ser400, Ser404, Ser409, Ser412, Ser413, Tyr394, Thr205 y/o Thr212),



Tau408-421, o un fragmento del mismo, (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en uno o más de los siguientes Ser409, Ser412 y/o Ser413), o Tau361-391, o un fragmento del mismo, (por ejemplo, fosforilado o no fosforilado en Ser396), y no reconoce y no muestra reactividad con tau normal (por ejemplo, tau no truncada), o los péptidos mencionados anteriormente acoplados/conjugados a una proteína soporte. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es específico para los primeros sitios de escisión N-terminales de tau, por ejemplo, el sitio de truncamiento Asp13.

En las realizaciones preferentes, el anticuerpo reconoce una secuencia de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o cualquier fragmento de las mismas, en la tau truncada, y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando está presente internamente en la proteína tau normal. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos reconocen una secuencia de las SEQ ID NO: 78-86 o 116, y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando está presente en la proteína tau normal (por ejemplo, la isoforma más larga de la proteína tau (htau40)).

Por lo tanto, una realización preferente de la invención se refiere a la inmunoterapia (pasiva y/o activa) contra los epítopos de extremo libre de tau truncada o los neoepítopos creados por la escisión de tau (por ejemplo, en Asp421). Se cree que la inmunoterapia contra los epítopos de extremo libre de tau truncada depura a tau truncada soluble del cerebro y minimiza o previene la formación de los ovillos neurofibrilares, filamentos helicoidales emparejados y/o la agregación patológica de tau. En determinadas realizaciones, la inmunoterapia contra los epítopos de extremo libre de tau truncada bloquea la polimerización de tau de forma directa. La inmunoterapia puede prevenir o retrasar la pérdida de memoria y el deterioro mental asociados con las tauopatías (por ejemplo, la EA), y en las realizaciones preferentes puede mejorar la función cognitiva o mental en pacientes que padecen o con riesgo de desarrollar una tauopatía (por ejemplo, EA). Esto no se enseña o sugiere en la literatura hasta la fecha. La bibliografía tampoco informa dónde existen formas truncadas solubles en la célula y si tales formas y ubicaciones son accesibles para los anticuerpos. Este enfoque puede ser útil para depurar la tau neurotóxica soluble antes de que forme ovillos, microfibrillas y/o agregados patológicos, y no depende de la producción de anticuerpos conformacionales frente a los ovillos de tau preformados que ya están provocando daño. Se cree que los anticuerpos generados contra secuencias lineales que reconocen extremos libres de las proteínas tau solubles (por ejemplo, proteínas/péptidos creados por la escisión de tau) pueden inhibir directamente la polimerización de tau.

Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos específicos para los neoepítopos creados por la escisión de la proteína tau (por ejemplo, anticuerpos que reconocen una secuencia de la SEQ ID NO: 7-94 o 116, o cualquier fragmento de la misma, en la tau truncada, y que no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando esté presente en la proteína tau normal). Dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, policlonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, monocatenarios, fragmentos Fab y una biblioteca de expresión de Fab. Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con una proteína tau truncada particular, o con un péptido sintético de tau, o porciones inmunogénicas de la misma, que pueden o no estar conjugados (por ejemplo, a seroalbúmina bovina), incluyendo, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc., usando un protocolo de inmunización convencional (Taggart y Samloff, 1983). Después acabar la inmunización, se puede realizar un procedimiento de fusión usando, por ejemplo, esplenocitos de los ratones hiperinmunizados y una línea celular de mieloma SP2/O Ag14 (ATCC CRL 1581, NS-1 (ATCC TIB18), o equivalente, usando, por ejemplo, polietilenglicol, y los productos de fusión satisfactorios pueden seleccionarse mediante medios HAT y después se pueden crecer las colonias de hibridoma viables en placas de pocillos. Después, los pocillos que contienen los productos de fusión satisfactorios pueden explorarse usando, por ejemplo, ELISA (por ejemplo, especificidad y afinidades de unión) y pueden aislarse anticuerpos selectivos para proteínas tau truncadas específicas de extremo libre o porciones inmunogénicas de las mismas, y que no muestran unión y/o reactividad frente a una tau normal.

Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, incluyendo, pero sin limitación, el de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guérin) y *Corynebacterium parvum*. En determinadas realizaciones, el adyuvante es alumbre.

En una realización preferente, los métodos para generar anticuerpos que son específicos de extremo libre para sitios de escisión internos de tau son los mismos que los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 7.901.689 y la correspondiente Patente EP n.º 2203433 ("Recall-Vax" de Intellect), excepto en que se utiliza el epítipo específico de extremo N- o C-terminal libre de una tau truncada, en lugar de un epítipo de linfocito B N- o C-terminal específico de extremo de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una proteína precursora o madura descrito en la patente de Estados Unidos n.º 7.901.689. Estas presentaciones de patente proporcionan métodos para generar anticuerpos que son específicos de extremo libre para los sitios de escisión internos de determinadas proteínas. En determinadas realizaciones de la presente invención, un péptido quimérico o una mezcla de péptidos quiméricos en que el extremo N- o C-terminal libre de una tau truncada (en lugar de un epítipo de linfocito B N- o C-terminal específico de extremo de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una proteína precursora o madura descrito en la patente de Estados Unidos n.º 7.901.689) se fusiona con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador a un epítipo de linfocitos T auxiliares de una fuente distinta. El

péptido o los péptidos quiméricos se usan después en una composición inmunizante para inmunizar a un mamífero contra el extremo N libre o el extremo C libre de un producto de escisión de péptido interno que es una molécula propia del mamífero inmunizado (es decir, una tau truncada). Más específicamente, como una realización preferente de la presente invención, el péptido (o péptidos) quimérico tiene un epítipo de tau truncada específico de extremo N- o C-terminal, que son los primeros dos a diez o los primeros dos a cinco restos de aminoácido del extremo N o los últimos dos a diez o los últimos dos a cinco restos de aminoácido del extremo C de un péptido tau truncado fusionado a un epítipo de linfocitos T auxiliares. Cuando tal péptido (o péptidos) quimérico se administra a un individuo humano como parte de una composición inmunizante, el individuo se inmunizará contra el péptido o péptidos tau truncados de los que procede el epítipo específico de extremo.

Es bien sabido que las respuestas de anticuerpos producidas por los linfocitos B frente a una región definida de una proteína o péptido precisan que los linfocitos T auxiliares del sistema inmunitario reconozcan otra parte de ese antígeno de forma simultánea. Esto se denomina comúnmente colaboración de linfocitos B/T. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, este fenómeno se puede imitar fabricando un péptido quimérico sintético que contenga epítopos de linfocitos B y T en una secuencia lineal contigua. Dichos péptidos quiméricos se han utilizado de forma muy satisfactoria para dirigir la producción de anticuerpos en ratones, quimeras de ser humano/ratones y primates (Sharma *et al.*, 1993; Iversen *et al.*, 1995; O'Hern *et al.*, 1997). En algunas de estas realizaciones, el epítipo que contiene los primeros dos a veinte, dos a diez o dos a cinco restos de aminoácido del extremo N libre o los últimos dos a cinco, dos a diez, cinco a treinta, diez a veinticinco, o quince a veinticinco restos de aminoácido del extremo C libre de una tau truncada (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) se fusiona, con o sin restos de aminoácido espaciadores, a un epítipo fuerte de linfocitos T auxiliares conocido, para formar un péptido quimérico. Un ejemplo no limitante de tal epítipo fuerte de linfocitos T conocido es el epítipo promiscuo del toxoide tetánico muy estudiado de la SEQ ID NO: 95. La inmunización con el péptido (o péptidos) quimérico que contiene un epítipo específico de extremo de tau truncada fusionado con el epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares del toxoide tetánico, como una realización preferente, debería dar lugar a anticuerpos específicos para esa tau truncada.

Los anticuerpos para tau truncada específicos anti-extremo N-terminal o anti-extremo C-terminal deseados generados por el método de inmunización de acuerdo con la presente invención tienen la capacidad de discriminar entre una tau truncada (por ejemplo, tau escindida por caspasa (por ejemplo,  $\Delta$ Tau)) y la tau de la que se obtiene proteolíticamente (tau no truncada (por ejemplo, la isoforma más larga de tau). Estos anticuerpos para tau truncada específicos de extremo se unen específicamente al extremo/final de una tau truncada para desacelerar, reducir o prevenir la acumulación, la agregación y/o la polimerización de la tau truncada (ya sea en forma soluble o la forma conformacionalmente distinta de tau).

También pueden producirse, de acuerdo con la presente invención, anticuerpos monocatenarios como moléculas específicas de extremo libre para el extremo N o C de tau truncada (por ejemplo,  $\Delta$ Tau). Estos anticuerpos monocatenarios pueden ser polipéptidos combinados monocatenarios que tienen capacidad de unión a tau truncada, específicos de extremo libre y que comprenden una pareja de secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a las regiones variables la cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina ( $V_H$ - $V_L$  unidas o un Fv monocatenario). Tanto  $V_H$  como  $V_L$  pueden copiar secuencias de anticuerpos naturales, o una o ambas de las cadenas pueden comprender una construcción de CDR del tipo descrito en la patente de Estados Unidos 5.091.513. Los polipéptidos separados análogos a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se mantienen unidos por un enlazador peptídico. Los métodos de producción de tales anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, Fv individual (scFv), particularmente cuando el ADN que codifica las estructuras polipeptídicas de las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  está caracterizado o puede determinarse fácilmente mediante análisis de secuencia, se pueden llevar a cabo en conformidad con los métodos descritos, por ejemplo, en la patente Estados Unidos n.º 4.946.778, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.091.513, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.096.815, Biocca *et al.*, 1993, Duan *et al.*, 1994, Mhashlikar *et al.*, 1995, Marasco *et al.*, 1993 y Richardson *et al.*, 1995. Las FIG. 3A-3D (de Biocca *et al.*, 1995) muestran de forma esquemática un anticuerpo intacto (FIG. 3A), un fragmento Fab (FIG. 3B), un fragmento Fv que consiste en un complejo de la región variable unido no covalentemente ( $V$ , - $V$ , (FIG. 3C) y un anticuerpo Fv monocatenario (FIG. 3D).

Theo y colaboradores (1993; 1994) establecieron que hay una longitud de cinco aminoácidos para cualquier péptido dado que garantiza que el grupo libre específico en el extremo N constituya una parte esencial del epítipo reconocido por el nuevo anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo generado contra un péptido inmunogénico puede evaluarse o se evalúa para la selectividad del anticuerpo en su reconocimiento de un extremo N o C libre de una proteína tau truncada. Un ensayo de inhibición competitiva, utilizando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o inmunoprecipitación con péptidos correspondientes a distintas regiones de la proteína tau truncada, y la región inmediatamente anterior al sitio de escisión por caspasa en el dominio extracelular de la proteína tau, puede determinar la selectividad del anticuerpo.

Los expertos en la materia apreciarán que se puede añadir un resto de cisteína en el extremo de los péptidos inmunogénicos anteriores, junto al extremo correspondiente al extremo N libre o al extremo C libre de la proteína tau truncada, para facilitar el acoplamiento a una proteína soporte. Por ejemplo, se puede añadir un resto de cisteína a los péptidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-94 o 116 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 14, La SEQ ID NO: 32, La SEQ ID NO: 41, La SEQ ID NO: 49, La SEQ ID NO: 59, La SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 77 o SEQ ID NO: 94). La

hemocianina de lapa californiana (KLH, forma siglada de *keyhole limpet hemocyanin*), la ovoalbúmina y la seroalbúmina bovina (BSA) son ejemplos no limitantes de proteínas que pueden usarse como soporte de inmunógenos. La presencia de un resto de cisteína N-terminal o C-terminal en los péptidos sintéticos inmunógenos proporciona un grupo sulfhidrilo libre para el acoplamiento covalente a una proteína activada con maleimida. Se utiliza un reactivo heterobifuncional, tal como un éster de N-maleimidobenzil-6-aminocaproilo o un éster de m-maleimidobenzil-N-hidroxisuccinimida (MBS), para acoplar covalentemente el péptido sintético inmunogénico a la proteína soporte (véase, por ejemplo, Hartlow, E. *et al.*, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988). Además están disponibles kits comerciales para su uso en el acoplamiento de antígenos peptídicos a proteínas soporte grandes activadas con maleimida.

La invención proporciona adicionalmente una célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monocatenario que es específico de extremo libre para el extremo N o el extremo C libres de una proteína tau truncada (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381 o tau14-355) o un fragmento de la misma, y discrimina entre una proteína tau truncada y el precursor de la proteína tau del que procede proteolíticamente. En determinadas realizaciones, el hibridoma produce anticuerpos que son específicos para los neopéptidos formados por el truncamiento de tau, comprendiendo los neopéptidos una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. En determinadas realizaciones, el hibridoma produce anticuerpos específicos para  $\Delta$ Tau. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención se producen siguiendo los procedimientos generales descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256, pág. 495 (1975). En ese procedimiento, los hibridomas se preparan fusionando células productoras de anticuerpos (normalmente células de bazo de ratones inmunizados previamente con una beta amiloide como fuente de antígeno) con células de una línea inmortal de células tumorales utilizando procedimientos de hibridación de células somáticas.

Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos hospedadores, incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, ratones humanizados, seres humanos, y otros, mediante inyección con el epítipo pertinente o con cualquier fragmento u oligopéptido del mismo, que tenga propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie hospedadora, se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero sin limitación, el de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, KLH y dinitrofenol. En determinadas realizaciones, el adyuvante es alumbre.

Los agentes inmunoestimulantes o adyuvantes se han usado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunitarias del hospedador, por ejemplo, para vacunas. Los adyuvantes intrínsecos, tales como los lipopolisacáridos, normalmente son los componentes de bacterias destruidas o atenuadas usadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que normalmente están unidos de forma no covalente a antígenos, y están formulados para potenciar la respuesta inmunitaria del hospedador. Por lo tanto, se han identificado adyuvantes que potencian la respuesta inmunitaria frente a antígenos suministrados por vía parenteral. No obstante, algunos de estos adyuvantes son tóxicos, y pueden producir efectos secundarios indeseables, haciéndolos inadecuados para el uso en seres humanos y muchos animales. De hecho, se usan rutinariamente solo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (comúnmente denominados colectivamente alumbre) como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia del alumbre en el aumento de las respuestas de anticuerpos contra los toxoides diftérico y tetánico está bien establecida y la vacuna de HBsAg también se ha adyuvantado con alumbre.

Se dejan crecer los hibridomas que son el resultado del proceso de fusión. Posteriormente, los sobrenadantes resultantes se exploran utilizando procedimientos de inmunoensayo, para detectar anticuerpos presentes en los sobrenadantes que tengan la capacidad de unirse a los antígenos específicos.

En otra realización, la tecnología de biblioteca de anticuerpos combinatoria, es decir, la selección basada en antígeno de bibliotecas de anticuerpos expresados en la superficie del fago filamentosos M13, se puede usar para la generación de anticuerpos monoclonales y posee varias ventajas con respecto a las metodologías de hibridoma (Huse, *et al.*, 1989. Barbas, *et al.* 1991; Clackson, *et al.*, 1991; Burton y Barbas, 1994). El anticuerpo de la invención puede generarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos. Las metodologías generales implicadas en la creación de grandes bibliotecas combinatorias que utilizan tecnología de presentación en fagos se describen y divulgan en las patentes de Estados Unidos n.º 5.223.409 presentada el 29 de junio de 1993.

Una vez que se han generado los anticuerpos monoclonales, la selectividad y la afinidad de unión (Kd) pueden evaluarse mediante ELISA, Biacore u otro método. Por ejemplo, pueden realizarse sobre los anticuerpos bioensayos *in vitro* para probar la eficacia de los anticuerpos específicos de tau truncada en el bloqueo de la citotoxicidad inducida por tau. Además, pueden realizarse sobre los anticuerpos bioensayos *in vitro* para probar la falta de interferencia con la función de la tau normal. Después, pueden aislarse los anticuerpos selectivos para la tau truncada, y que no muestren unión y/o reactividad con tau normal y evaluarse adicionalmente en experimentos *in vivo*, por ejemplo, en modelos transgénicos de EA. Los experimentos *in vivo*, si se realizan, evaluarán la seguridad y la eficacia de los anticuerpos aislados, utilizando diversos métodos para medir la seguridad y la eficacia, que incluyen, por ejemplo, herramientas bioquímicas, neuropatológicas, de formación de imágenes y cognitivas.

Los anticuerpos preferentes pueden unirse específicamente a la forma agregada de tau truncada, sin unirse a la forma disociada. Como alternativa, un anticuerpo puede unirse específicamente a la forma disociada sin unirse a la forma agregada. Un anticuerpo puede reconocer otras formas de tau que se acumulan en el cerebro con EA y trastornos relacionados. Estas formas difieren de la tau normal en términos de modificación postraduccional, glucación, truncamiento proteolítico y racemización. Los anticuerpos utilizados en los métodos terapéuticos habitualmente tienen una región constante intacta o al menos una porción suficiente de la región constante para interactuar con un receptor de Fc. Es preferente el isotipo IgG1 humano debido a que tiene la mayor afinidad de los isotipos humanos por el receptor FcR1 en fagocitos. Además se pueden usar fragmentos Fab biespecíficos, en los que un brazo del anticuerpo tiene especificidad por tau y el otro por un receptor de Fc. Algunos anticuerpos se unen a tau con una afinidad de unión mayor o igual a aproximadamente  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , o  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>.

Los anticuerpos útiles en conformidad con la presente invención (por ejemplo, los que tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica) pueden administrarse a un paciente humano que puede ser susceptible de, o que padece, la formación de ovillos neurofibrilares, para unirse y tratar selectivamente, reducir o eliminar la neurotoxicidad provocada por, por ejemplo, las proteínas tau truncadas diana a las que se unen selectivamente, siempre y cuando tales proteínas tau truncadas se formen *in vivo*.

Como alternativa, los anticuerpos pueden expresarse en el cerebro de un mamífero (por ejemplo, un paciente humano), por ejemplo, administrando un péptido inmunogénico aislado que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de la misma, o un gen o una molécula de ADN que codifica el anticuerpo.

Los anticuerpos utilizados en conformidad con la invención pueden ser anticuerpos monoclonales y derivados de los mismos, nativos o recombinantes, estar inmovilizados, libres en solución o presentarse en la superficie de diversas moléculas o bacterias, virus u otras superficies. Los anticuerpos también pueden ser humanizados.

Los sueros policlonales normalmente contienen poblaciones mixtas de anticuerpos que se unen a varios epítopos a lo largo de la longitud de tau. Sin embargo, los sueros policlonales pueden ser específicos de un segmento particular de tau, tal como tau379-408. Los anticuerpos monoclonales se unen a un epítipo específico dentro de la tau truncada que puede ser un epítipo conformacional o no conformacional.

En algunos métodos, se utilizan múltiples anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para distintos epítopos. Dichos anticuerpos pueden administrarse de forma secuencial o simultánea.

En otra realización, los anticuerpos se producirán *in vivo*, en el sujeto que lo necesite, administrando un antígeno tal como un péptido de tau truncada o fragmentos del mismo. En determinadas realizaciones, el antígeno comprende o consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. El título de los anticuerpos se determinará mediante técnicas que son conocidas por un experto en la materia y se administrará antígeno adicional si es necesario.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos descritos anteriormente y un método para usar la composición para la inhibición de la formación de ovillos neurofibrilares. La presencia disminuida de ovillos neurofibrilares retrasará la progresión de la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades caracterizadas por la agregación/formación de tau de ovillos neurofibrilares, en un sujeto que lo necesite.

En una realización, la composición incluye un anticuerpo en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz suficiente para inhibir la neurotoxicidad de tau truncada, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones preferentes, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención inhiben la actividad de la proteína tau anormal o truncada deseada de forma intraneuronal y, por lo tanto, pueden usarse como fármacos intracelulares. Estos anticuerpos reconocen preferentemente la conformación específica de tauón de la proteína tau diana (por ejemplo, truncada), sin reconocer la tau soluble humana normal. En otras palabras, en realizaciones preferentes, los anticuerpos de la presente invención se unen a y tienen reactividad con la proteína tau anormal o truncada diana y no se unen y no muestran reactividad con tau normal. Se puede decir que los anticuerpos de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención son "específicamente reactivos" con la proteína tau anormal diana si son capaces de unirse con esa proteína tau anormal, para acoplarse de este modo la molécula al anticuerpo. La especificidad se puede analizar mediante cualquier prueba convencional disponible para detectar la especificidad de anticuerpos, por ejemplo, pruebas de ELISA, radioinmunoensayos, microscopio de fuerza atómica con compañeros de unión unidos a un voladizo, etc.

En un aspecto adicional de la invención, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden usarse para la preparación de un fármaco o una composición farmacéutica para el tratamiento de tauopatías tales como la EA, por modificación biotecnológica en moléculas monocatenarias equipadas con una secuencia de direccionamiento capaz de suministrarlos a las células de neuroblastoma que expresan tauones, donde se unen a los tauones e interfieren con sus efectos patológicos, y aumentan la degradación de las proteínas tau anormalmente truncadas.

En aún otra realización de la invención, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con un agente citoprotector o un agente que facilitará y/o mejorará la capacidad del anticuerpo para cruzar la BHE. El agente citoprotector puede ser un antioxidante (por ejemplo, melatonina); y el agente que facilita o mejora la capacidad del anticuerpo para cruzar la BHE es una sustancia hidrófoba que tiene la capacidad de cruzar la BHE y que generalmente es reconocida como segura (GRAS, forma siglada de *generally recognized as safe*) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ("FDA", forma siglada de *Food and Drug Administration*). El agente citoprotector o el agente que facilita o mejora la capacidad del anticuerpo de cruzar la BHE puede conjugarse con el anticuerpo directamente o a través de un enlazador. El enlazador se puede seleccionar del grupo que comprende o consiste en un enlazador de hidrazina, un enlazador de disulfito, un enlazador de tioéter, un enlazador peptídico. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es específico para  $\Delta$ Tau, y el agente citoprotector es la melatonina.

## 2. Péptido inmunogénico

Un péptido inmunogénico aislado de la presente invención comprende o consiste en de aproximadamente 2 a aproximadamente 427 aminoácidos. En determinadas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado comprende o consiste en tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau14-421, tau114-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381, tau143-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores.

En las realizaciones preferentes, la porción inmunogénica del péptido aislado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es idéntica u homóloga a la secuencia de aminoácidos del neopítipo creado por la escisión de tau, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391, en el resto de ácido aspártico Asp421 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o un fragmento de tal péptido (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau13-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381, tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores). La porción inmunogénica del péptido aislado generalmente comprende de dos a diez, de dos a nueve, de dos a ocho, de dos a siete, de dos a seis, de dos a cinco, o de dos a cuatro aminoácidos en una secuencia idéntica u homóloga a la secuencia de estos aminoácidos en un neopítipo creado por la escisión de tau, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391, en el resto de ácido aspártico Asp421 o en el resto de ácido aspártico Asp13. En las realizaciones preferentes, la secuencia inmunogénica se selecciona de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. En algunas de estas realizaciones preferentes, el péptido inmunogénico aislado comprende o consiste en tau1-421 ( $\Delta$ Tau) o un fragmento del mismo, en donde la porción inmunogénica del péptido comprende o consiste en las SEQ ID NO: 78-86 o 116, o un fragmento de las mismas. En determinadas realizaciones, la porción inmunogénica del péptido aislado comprende o consiste en una secuencia de los últimos seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos de  $\Delta$ Tau. Como se ha indicado anteriormente, el extremo libre (extremo N o extremo C) del péptido inmunogénico aislado es parte del fragmento inmunogénico y es necesario para la generación de los anticuerpos específicos de neopítipo de la presente invención; y cualquiera de las serinas y/o treoninas en las secuencias enumeradas anteriormente puede o no estar fosforilada.

En determinadas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado es un mimótopo que comprende dos péptidos fusionados entre sí con o sin restos espaciadores, imitando el primer péptido la estructura del neopítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, e imitando el segundo péptido la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico), mimótopo que puede usarse para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, y, en las realizaciones preferentes, es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, y/o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estos trastornos. En las realizaciones preferentes, el primer péptido comprende o consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. En algunas de estas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado comprende o consiste en tau1-421 ( $\Delta$ Tau) o un fragmento del mismo, en donde la porción inmunogénica del péptido comprende o consiste en las SEQ ID NO: 78-86 o 116, o un fragmento de las mismas.

En determinadas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado es un péptido (o péptidos) quimérico que comprende una secuencia de 2-10 o 2-5 restos de aminoácido del neopítipo de linfocito B creado por la escisión de tau (por ejemplo, las SEQ ID NO: 78-86 o 116), estando el neopítipo fusionado a, con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador, a un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares de una fuente distinta a la del neopítipo de linfocito B en una secuencia lineal contigua, dando como resultado un péptido quimérico sintético. Los péptidos quiméricos que contienen epítipos de linfocitos B y T en una secuencia lineal contigua se han utilizado de forma muy satisfactoria para dirigir la producción de anticuerpos en ratones, quimeras de ser humano/ratones y primates (Sharma *et al.*, 1993; Ifversen *et al.*, 1995; O'Hern *et al.*, 1997).

El péptido inmunogénico aislado de la invención (por ejemplo, un mimótopo, péptidos quiméricos, etc.) puede obtenerse de fuentes naturales y aislarse de un mamífero, tal como, por ejemplo, un ser humano, un primate, un gato, un perro, un caballo, un ratón o una rata, utilizando técnicas convencionales de purificación de proteínas.

El péptido inmunogénico aislado (por ejemplo, un mimótopo, péptidos quiméricos, etc) también puede sintetizarse químicamente o producirse utilizando técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, el péptido inmunogénico (por ejemplo, una tau truncada) se puede sintetizar mediante procedimientos en fase sólida muy conocidos en la técnica. Las síntesis adecuadas se pueden realizar utilizando los procedimientos de "T-boc" o "F-moc". Los péptidos cíclicos se pueden sintetizar mediante métodos en fase sólida que emplean el bien conocido procedimiento de "F-moc" y resina de poliamida en un aparato completamente automatizado. Como alternativa, los expertos en la materia conocerán los procedimientos de laboratorio necesarios para realizar el proceso manualmente. Las técnicas y procedimientos para la síntesis en fase sólida se describen en *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* por E. Atherton y R. C. Sheppard, publicado por IRL en Oxford University Press (1989) y *Methods in Molecular Biology*, Vol. 35: *Peptide Synthesis Protocols* (ed. M. W. Pennington y B. M. Dunn), capítulo 7, pág. 91-171 por D. Andreau *et al.*

En determinadas realizaciones, los péptidos quiméricos aislados de la presente invención pueden fabricarse por métodos químicos de síntesis que son muy conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, los péptidos quiméricos se pueden sintetizar usando las técnicas de síntesis en fase sólida automatizada de Merrifield con química t-Boc o F-moc en sintetizadores de péptidos, tal como un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems. Después de completar el ensamblaje del péptido quimérico deseado, la resina se trata de acuerdo con los procedimientos habituales para escindir el péptido de la resina y desbloquear los grupos protectores en las cadenas laterales de los aminoácidos. El péptido libre se purifica por HPLC y se caracteriza bioquímicamente, por ejemplo, por análisis de aminoácidos o por secuenciación. Los métodos de purificación y caracterización de péptidos son muy conocidos para un experto en la materia. Como alternativa, los péptidos quiméricos lineales más largos pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante muy conocidas. Cualquier manual convencional sobre tecnología de ADN proporciona protocolos detallados para producir los péptidos quiméricos de la invención. Para construir un gen que codifica un péptido quimérico de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se transcribe de forma inversa en una secuencia de ácido nucleico y preferentemente utilizando el uso de codones optimizado para el organismo en que se expresará el gen. A continuación, se fabrica un gen sintético, normalmente sintetizando oligonucleótidos solapantes que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, si es necesario. El gen sintético se inserta en un vector de clonación adecuado y se obtienen y caracterizan los clones recombinantes. El péptido quimérico se expresa después en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión y el hospedador seleccionados, y el péptido quimérico se purifica y se caracteriza por métodos convencionales.

Como alternativa, la secuencia de aminoácidos del péptido inmunogénico aislado (por ejemplo, un mimótopo, péptidos quiméricos, etc.) puede introducirse en un vector de expresión que puede expresarse en un sistema de expresión adecuado, usando técnicas muy conocidas en la técnica, seguido de aislamiento o purificación del polipéptido expresado de interés. Se dispone en la técnica de diversos sistemas de expresión bacterianos, de levaduras, de plantas, de mamíferos y de insectos, y se puede usar cualquiera de tales sistemas de expresión. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica el péptido inmunogénico puede traducirse en un sistema de traducción sin células.

El péptido inmunogénico aislado (por ejemplo, un mimótopo, péptidos quiméricos, etc.) también puede comprender un péptido que se produce como resultado de la existencia de múltiples genes, sucesos alternativos de transcripción, sucesos alternativos de corte y empalme de ARN, y sucesos alternativos de traducción y postranscripcionales. El péptido se puede expresar en sistemas, por ejemplo, células cultivadas, que dan como resultado sustancialmente las mismas modificaciones postraduccionales presentes cuando el péptido se expresa en una célula nativa, o en sistemas que dan como resultado la alteración u omisión de las modificaciones postraduccionales, por ejemplo, glucosilación o escisión, presentes cuando se expresa en una célula nativa.

El péptido inmunogénico aislado de la invención, en determinadas realizaciones, puede producirse como una proteína de fusión que contiene otras secuencias de aminoácidos que no son de tau o no procedentes de tau, tales como enlazadores de aminoácidos o secuencias señal o soportes inmunogénicos, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como la glutatión- S-transferasa, una etiqueta de histidina y la proteína estafilocócica A. Puede estar presente en una proteína de fusión más de un péptido inmunogénico de la invención. El polipéptido heterólogo se puede fusionar, por ejemplo, al extremo N o al extremo C del péptido inmunogénico de la invención. Un polipéptido de la divulgación también se puede producir como un polipéptido de fusión que comprende secuencias de aminoácidos homólogas, es decir, otras secuencias de tau u obtenidas de tau.

En determinadas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado puede estar unido a una molécula transportadora inmunogénica para formar inmunógenos para protocolos de vacunación. El soporte inmunogénico puede comprender un material que tiene la propiedad de suscitar de forma independiente una respuesta inmunogénica en un mamífero y que puede estar unido (por ejemplo, acoplado covalentemente) al péptido inmunogénico o una porción del mismo, ya sea directamente a través de la formación de enlaces peptídicos o éster entre grupos carboxilo, amino o hidroxilo libres en el péptido, y los correspondientes grupos en el material soporte inmunogénico, o alternativamente enlazando a través de un grupo de unión bifuncional convencional, o como una proteína de fusión.

Los expertos en la materia conocerán fácilmente los tipos de transportadores que se pueden usar en los péptidos

inmunogénicos de la invención. En determinadas realizaciones, el transportador se selecciona del grupo que comprende o consiste en partículas similivíricas (VLP, forma sigla del inglés *virus-like particles*); seroalbúminas (por ejemplo, seroalbúmina bovina (BSA)); globulinas; tiroglobulinas; hemoglobinas; hemocianinas (en particular hemocianina de lapa californiana (KLH)); proteínas extraídas de áscaris, toxinas o toxoides bacterianos inactivados tales como las toxinas tetánica o diftérica (TT y TD) o CRM197, el derivado proteico purificado de la tuberculina (PPD); o la Proteína D de *Haemophilus influenzae* (Publicación PCT No. WO 91/18926) o fragmentos recombinantes de los mismos (por ejemplo, Dominio 1 del Fragmento C de la TT, o el dominio de translocación de la TD o el 1/3 de la Proteína D que comprende los aminoácidos 100 a 110 del extremo N-terminal de la proteína D de *Haemophilus influenzae* (documento GB 9717953. 5); polilisina; ácido poliglutámico; copolímeros de lisina-ácido glutámico; copolímeros que contienen lisina u ornitina; transportadores de liposomas, o similares. En determinadas realizaciones, el soporte inmunogénico es la KLH. En otra realización, el soporte inmunogénico es una partícula similivírica (VLP), preferentemente una partícula similivírica recombinante.

En determinadas realizaciones, la partícula transportadora es un epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95. En otras realizaciones, la partícula transportadora es un péptido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 96-115.

En determinadas realizaciones, el péptido inmunogénico se puede acoplar a soportes inmunogénicos a través de conjugación química o por expresión de compañeros de fusión modificados genéticamente. El acoplamiento no necesariamente necesita ser directo, pero puede producirse a través de secuencias enlazadoras. Más en general, en el caso en que los péptidos antigénicos se fusionan, conjugan o se unen de otro modo a un soporte inmunogénico, las secuencias espaciadoras o enlazadoras se añaden normalmente en uno o ambos extremos de los péptidos antigénicos. Dichas secuencias enlazadoras generalmente comprenden secuencias reconocidas por el proteasoma, las proteasas de los endosomas u otro compartimento vesicular de la célula.

En una realización, el péptido inmunogénico se expresa como una proteína de fusión con el soporte inmunogénico. La fusión del péptido se puede efectuar mediante inserción en la secuencia primaria del soporte inmunogénico o mediante fusión con el extremo N o C del soporte inmunogénico. En lo sucesivo en el presente documento, cuando se hace referencia a proteínas de fusión de un péptido con un soporte inmunogénico, se abarcan la fusión a cualquiera de los extremos de la secuencia de la subunidad o la inserción interna del péptido dentro de la secuencia del transportador. La fusión, como se denomina en lo sucesivo en el presente documento, se puede llevar a cabo mediante inserción del péptido inmunogénico en la secuencia del transportador, mediante la sustitución de parte de la secuencia del transportador por el péptido inmunogénico o mediante una combinación de delección, sustitución o inserciones.

Un experto en la materia encontrará fácilmente orientación sobre cómo construir proteínas de fusión utilizando técnicas clásicas de biología molecular. Se han descrito vectores y plásmidos que codifican proteínas de fusión de HBcAg y HBcAg útiles para la expresión de proteínas de fusión de HBcAg y HBcAg (Pumpens *et al.*, *Intervirology* 44: 98-114 (2001), Neyrinck, S. *et al.*, *Nature Med.* 5:1157-1163 (1999)) y puede utilizarse en la práctica de la presente divulgación.

Se pueden añadir restos de aminoácido flanqueantes a cualquiera de los extremos de la secuencia del péptido inmunogénico aislado a fusionar con cualquier extremo de la secuencia de la subunidad de una VLP, o para la inserción interna de tal secuencia peptídica en la secuencia de la subunidad de una VLP. Los restos de glicina y serina son aminoácidos particularmente favorecidos su uso en las secuencias flanqueantes añadidas al péptido a fusionar. Los restos de glicina confieren flexibilidad adicional, lo que puede disminuir el efecto potencialmente desestabilizador de fusionar una secuencia extraña en la secuencia de una subunidad de VLP.

En determinadas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado se acopla químicamente a un soporte inmunogénico, usando técnicas muy conocidas en la técnica. La conjugación puede estar presente para permitir el movimiento libre de los péptidos a través de una conjugación de un solo punto (por ejemplo, N-terminal o C-terminal), o como una estructura bloqueada en la que ambos extremos de los péptidos se conjugan con una proteína transportadora inmunogénica o con una estructura de armazón tal como, por ejemplo, una VLP. Dicha conjugación se puede llevar a cabo a través de química de conjugación, conocida por los expertos en la materia, tal como a través de restos de cisteína, restos de lisina u otras fracciones carboxilo conocidas comúnmente como puntos de conjugación, tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Por lo tanto, por ejemplo, para el acoplamiento covalente directo, es posible utilizar una carbodiimida, glutaraldehído o un éster de (N-[ $\gamma$ -malcimidobutirilo]succinimida, utilizando enlazadores heterobifuncionales disponibles en el mercado, tales como CDAP y SPDP (siguiendo las instrucciones del fabricante). Los ejemplos de conjugación de péptidos, en particular de péptidos ciclados, a un soporte proteico a través de derivados peptídicos de acilhidrazina, se describen en la publicación PCT n.º WO 03/092714. Después de la reacción de acoplamiento, el inmunógeno puede aislarse fácilmente y purificarse mediante un método de diálisis, un método de filtración en gel, un método de fraccionamiento, etc. Los péptidos que terminan con un resto de cisteína (preferentemente con un enlazador fuera de la región ciclada) pueden conjugarse convenientemente a una proteína soporte a través de química de maleimida.

### 3. Vacunas

Una vacuna en conformidad con la presente invención puede comprender uno o más anticuerpos específicos de neopéptido descritos anteriormente, o un fragmento de los mismos. La vacuna se utiliza para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero. En las realizaciones preferentes, la respuesta inmunogénica es una reacción  
 5 inmunogénica frente a tau truncada patógena creada por escisión y, en determinadas realizaciones, la fosforilación de tau normal, y/o la producción *in vivo* de los anticuerpos específicos de neopéptido descritos anteriormente. En determinadas realizaciones, la respuesta también incluye una reacción inmunogénica frente al péptido (o péptidos) de A $\beta$  patógeno (por ejemplo, reacción inmunogénica frente al péptido (o péptidos) de A $\beta$  patógeno y/o la  
 10 generación de los anticuerpos que son específicos de extremo libre para el péptido (o péptidos) de A $\beta$  patógeno y no reconocen, reaccionan con o se unen a APP), además de la reacción inmunogénica frente a tau truncada patógena creada por escisión y, en determinadas realizaciones, la fosforilación de tau normal, y/o la producción *in vivo* de los anticuerpos específicos de neopéptido descritos anteriormente.

En determinadas realizaciones, la vacuna comprende uno o más anticuerpos específicos de neopéptido descritos  
 15 anteriormente. La presencia de anticuerpos específicos anti-neopéptido para la tau truncada en la sangre y en el espacio extracelular, el líquido intersticial y el líquido cefalorraquídeo del cerebro, donde está presente la tau truncada (fosforilada o no fosforilada), en determinadas realizaciones, propicia la formación de complejos de tau truncada solubles. Estos complejos truncados solubles pueden depurarse del sistema nervioso central mediante el drenaje del espacio extracelular, el líquido intersticial y el líquido cefalorraquídeo en la circulación sanguínea general  
 20 a través de, por ejemplo, las vellosidades aracnoideas del seno longitudinal superior. De esta manera, se impide que la tau truncada se agregue en los ovillos neurofibrilares. Por lo tanto, en las realizaciones preferentes de la invención, los anticuerpos anti-neopéptido específicos para la tau truncada: (i) inhiben y/o reducen a tau truncada en su extremo C, por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp421, y/o (iii) previenen la formación de ovillos neurofibrilares y/o aumentan la depuración de los ovillos neurofibrilares, todo ello sin afectar las funciones biológicas  
 25 de la proteína tau normal. En realizaciones adicionales, los anticuerpos específicos anti-neopéptido pueden bloquear directamente la polimerización de  $\Delta$ Tau. En las realizaciones preferentes, la vacuna es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y/o otra tauopatía.

En una divulgación adicional, la vacuna comprende el péptido inmunogénico aislado descrito anteriormente, o un  
 30 fragmento del mismo (un péptido de la SEQ ID NO: 7-94 o 116). La respuesta inmunogénica proporcionada por la administración de la vacuna que comprende el péptido inmunogénico, o un fragmento del mismo, en las realizaciones preferentes, es la producción de los anticuerpos específicos de neopéptido descritos anteriormente.

Los anticuerpos administrados o producidos en el cuerpo en respuesta a la administración del péptido inmunogénico  
 35 aislado reconocen el neopéptido creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos del extremo N libre o el extremo C libre del péptido creado por la escisión de tau), pero no reconocen la misma secuencia de aminoácidos presente en la proteína tau normal. En determinadas realizaciones, los anticuerpos reconocen específicamente una secuencia de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o cualquier fragmento de las mismas, en la tau truncada, y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando esté presente en la proteína tau normal. En  
 40 algunas de estas realizaciones, los anticuerpos reconocen el neopéptido creado por la escisión de tau en Asp421 (por ejemplo, el neopéptido que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 78-86 o 116, que puede estar o no estar fosforilada). En las realizaciones preferentes de la invención, los anticuerpos administrados y/o producidos en respuesta a la administración de la vacuna (i) inhiben, reducen, depuran y/o eliminan a tau truncada en su extremo C, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido  
 45 aspártico Asp421, o en su extremo N (por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13), (ii) inhiben, reducen, depuran y/o eliminan a tau truncada forforilada anormal (por ejemplo, tau fosforilada en Ser396 y/o Ser404), y/o (iii) previenen la formación de ovillos neurofibrilares y/o aumentan la depuración de los ovillos neurofibrilares, todo ello sin afectar las funciones biológicas de la proteína tau normal. En las realizaciones preferentes, la vacuna es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

En una divulgación adicional, la vacuna comprende un péptido inmunogénico aislado que comprende o consiste en  
 50 una secuencia de aminoácidos que es idéntica u homóloga a la secuencia de aminoácidos del neopéptido creado por la escisión de tau, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391, en el resto de ácido aspártico Asp421 o en el resto de ácido aspártico Asp13, o un fragmento de tal péptido (por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau13-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau13-383, tau13-381, tau13-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores). La porción inmunogénica del péptido generalmente comprende de dos a diez, de dos a nueve, de dos a ocho, de dos a siete, de dos a seis, de dos a cinco, o de dos a cuatro aminoácidos en una secuencia idéntica a u homóloga a la secuencia de estos aminoácidos en un neopéptido creado por la escisión de tau, por ejemplo, en el resto de ácido glutámico Glu391, en el resto de ácido aspártico Asp421 o  
 60 en el resto de ácido aspártico Asp13. En las realizaciones preferentes, la secuencia inmunogénica se selecciona de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. En algunas de estas realizaciones, el péptido inmunogénico aislado comprende o consiste en tau1-421 ( $\Delta$ Tau), o un fragmento del mismo, y la porción inmunogénica del péptido comprende o consiste en las SEQ ID NO: 78-86 o 116, o un fragmento de las mismas.

En determinadas realizaciones, la tau truncada se selecciona del grupo que consiste en la tau truncada en su  
 65 extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o una tau truncada en su



extremo N, por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13. El péptido quimérico, en determinadas realizaciones, comprende o consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas. En determinadas realizaciones preferentes, la tau truncada se selecciona del grupo que consiste en tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau13-421, tau14-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau14-383, tau14-381, tau14-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores, de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau humana. La tau truncada, en determinadas realizaciones, puede estar fosforilada en uno o más de los siguientes: Ser199, Ser202, Ser214, Ser235, Ser396, Ser404, Thr205, Thr231 y Thr212, en el caso de estar presentes. En determinadas realizaciones, el resto de aminoácido comprende o consiste en una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o un fragmento de las mismas.

En determinadas realizaciones preferentes, la porción de tau truncada del péptido quimérico se obtiene de linfocitos B. Es bien sabido que las respuestas de anticuerpos producidas por los linfocitos B frente a una región definida de una proteína o péptido precisan que los linfocitos T auxiliares del sistema inmunitario reconozcan otra parte de ese antígeno de forma simultánea. Esto se denomina comúnmente colaboración de linfocitos B/T. Este fenómeno se puede imitar fabricando un péptido quimérico sintético que contenga epítopos de linfocitos B y T en una secuencia lineal contigua.

En una divulgación adicional, la vacuna comprende una composición (por ejemplo, un mimótopo) que comprende un péptido (o péptidos) quimérico que comprende 2-10 o 2-5 restos de aminoácido del neoepítipo de linfocito B creado por la escisión de tau, estando el neoepítipo fusionado, con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador, a un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares de una fuente distinta a la del neoepítipo de linfocito B en una secuencia lineal contigua, dando como resultado un péptido quimérico sintético. Los péptidos quiméricos que contienen epítopos de linfocitos B y T en una secuencia lineal contigua se han utilizado de forma muy satisfactoria para dirigir la producción de anticuerpos en ratones, quimeras de ser humano/ratones y primates (Sharma *et al.*, 1993; Ifversen *et al.*, 1995; O'Hern *et al.*, 1997). El epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares (T<sub>h</sub>) generalmente se obtiene de una fuente natural distinta de la fuente del neoepítipo B. En otras palabras, el epítipo T<sub>h</sub> no se reconoce como parte de una molécula propia en el sujeto mamífero inmunizado de acuerdo con el método de la presente invención. Dado que las tau truncadas son moléculas propias, no poseen ningún epítipo T<sub>h</sub> reconocible, y los epítopos de linfocito B de 2 a 10 o 2-5 restos de aminoácido carecerían por completo de epítopos de linfocitos T. Dichos epítopos pueden proporcionarse, en determinadas realizaciones, mediante secuencias específicas procedentes de inmunógenos potentes, incluyendo, por ejemplo, la toxina tetánica, la toxina pertúsica, la proteína F del virus del sarampión y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). Los epítopos T<sub>h</sub> seleccionados tienen, preferentemente, la capacidad de suscitar respuestas de linfocitos T auxiliares en un gran número de individuos que expresan diversos haplotipos del MHC. Estos funcionan en muchos individuos distintos de una población heterogénea y se consideran epítopos T<sub>h</sub> promiscuos. Los epítopos T<sub>h</sub> promiscuos proporcionan la ventaja de suscitar respuestas de anticuerpos potentes en la mayoría de los miembros de grupos de población genéticamente diversos.

En una divulgación adicional, las composiciones en conformidad con la presente invención comprenden un péptido (o péptidos) quimérico que comprende unos 2-5 restos de aminoácido del extremo N o C libre de una tau truncada (por ejemplo, ΔTau) fusionado con o sin un resto (o restos) espaciador a un epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares. El epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares (T<sub>h</sub>) generalmente se obtiene de una fuente distinta de la fuente del péptido quimérico. La tau truncada se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en tau truncada en su extremo C en el resto de ácido glutámico Glu391 o en el resto de ácido aspártico Asp421, o una tau truncada en su extremo N, por ejemplo, en el resto de ácido aspártico Asp13. En determinadas realizaciones, la tau truncada es ΔTau. Un ejemplo no limitante de tal epítipo fuerte de linfocitos T conocido es el epítipo promiscuo del toxoide tetánico muy estudiado de la SEQ ID NO: 95.

En una divulgación adicional, la vacuna es para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y comprende un mimótopo fusionado con un péptido bacteriano, imitando el mimótopo la estructura del neoepítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos unidas a las porciones de los extremos N o C libres de un péptido creado por la escisión de tau) en un mamífero, y comprendiendo o consistiendo el péptido bacteriano en un toxoide tetánico bacteriano natural o equivalente. El uso del mimótopo, en las realizaciones preferentes, previene la posibilidad de una respuesta autoinmunitaria que no se aplica a un péptido bacteriano.

En una divulgación adicional, la vacuna comprende un mimótopo que imita la estructura del neoepítipo creado por la escisión de tau en un mamífero, estando el mimótopo fusionado, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que comprende o que consiste en un toxoide tetánico bacteriano natural o equivalente, en donde el neoepítipo comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-30, o un fragmento de la misma, de tau; un péptido que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 380-405, o un fragmento de la misma, de tau; y/o un péptido que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 410-436, o un fragmento de la misma, de tau; y el mimótopo es adecuado para inducir una respuesta inmunogénica en un mamífero. En algunas de estas realizaciones, el neoepítipo comprende o consiste en los aminoácidos 16-421, 17-421, 18-421 o 19-421 de ΔTau. En las realizaciones preferentes, la vacuna es para su uso en una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías.

En una divulgación adicional, la composición que proporciona inmunización contra la proteína tau truncada también comprende la composición que proporciona inmunización contra A $\beta$ . La composición que proporciona inmunización contra A $\beta$ , en determinadas realizaciones, se prepara a partir de un péptido quimérico o una mezcla de péptidos quiméricos con un epítipo de linfocito B específico de extremo de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una proteína precursora o madura, como extremo N o extremo C libre, fusionado con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador a un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente distinta a la del producto de escisión de péptido interno. La composición que proporciona inmunización contra A $\beta$  se explica en detalle, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.901.689 de los cesionarios. Más particularmente, en tales realizaciones, el péptido quimérico de la presente invención está representado por

la fórmula (I):  $N-(S)_m-(T_h)_n$  (I);

o

la fórmula (II):  $(T_h)_n-(S)_m-C$  (II), donde:

N es los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácido del extremo N libre de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau normal, tal como, por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau13-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau13-383, tau13-381, tau13-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores;

C es los últimos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácido del extremo C libre del producto de escisión de péptido interno de origen natural (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau normal;

$T_h$  es un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente natural (es decir, una especie de organismo vivo) distinta de la del producto de escisión de péptido interno de origen natural;

S es un resto (o restos) de aminoácido espaciador;

$m$  es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y

$n$  es 1, 2, 3 o 4.

En las realizaciones, el péptido quimérico de la patente de n.º acabado en 689 está representado por

la fórmula (I):  $N-(S)_m-(T_h)_n$  (I);

o

la fórmula (II):  $(T_h)_n-(S)_m-C$  (II), donde:

N es los primeros 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido del extremo N libre de un producto de escisión de péptido interno de origen natural, tal como un péptido A $\beta$ , el cual, cuando es de origen natural en un mamífero, se obtiene de una proteína precursora o una proteína madura;

C es los últimos 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido del extremo C libre del producto de escisión de péptido interno de origen natural;

$T_h$  es un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente natural (es decir, una especie de organismo vivo) distinta de la del producto de escisión de péptido interno de origen natural;

S es un resto (o restos) de aminoácido espaciador;

$m$  es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y

$n$  es 1, 2, 3 o 4.

En una divulgación adicional, la vacuna comprende (i) un mimótopo que imita la estructura del neopítipo creado por la escisión de tau en un mamífero, (por ejemplo, en Asp421), estando el mimótopo fusionado, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que comprende o que consiste en una estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico); y (ii) un mimótopo que imita la estructura del neopítipo creado por la escisión de A $\beta$  en un mamífero, fusionado, con o sin restos espaciadores, a un péptido bacteriano que comprende o que consiste en la estructura de un epítipo de linfocitos T procedente de una fuente distinta (por ejemplo, toxoide tetánico). El epítipo de linfocitos T en el primer mimótopo y el segundo mimótopo pueden ser el mismo o distintos. En determinadas realizaciones, el epítipo de linfocitos T en el primer mimótopo y en el segundo mimótopo comprenden la misma estructura que un epítipo promiscuo bien estudiado del toxoide

tetánico de la SEQ ID NO: 95.

5 El epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares es, en general, un epítipo de linfocitos T de la toxina tetánica, la toxina pertúsica, toxina diftérica, la proteína F del virus del sarampión, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, la proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, del circumsporozoito de *Plasmodium falciparum*, la triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* o TraT de *Escherichia coli*. En determinadas realizaciones, el epítipo promiscuo de linfocitos T auxiliares es un epítipo fuerte de linfocito T conocido, es el epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEC ID NO: 95.

10 En una divulgación adicional, los epítipos de linfocitos T auxiliares en el péptido quimérico de la presente divulgación se seleccionan no solo por una capacidad de provocar respuestas inmunitarias en la mayoría de los miembros de una población dada, sino también por una capacidad de provocar respuestas de memoria/recuerdo. Cuando el mamífero es un ser humano, la gran mayoría de los sujetos/pacientes humanos que reciben inmunoterapia con el péptido quimérico de la presente invención ya se habrán inmunizado con las vacunas pediátricas (es decir, las vacunas triple vírica SPR y la de difteria+tos ferina+tétanos) y, posiblemente, la vacuna de la hepatitis B. Por lo tanto, estos pacientes han estado expuestos previamente a al menos uno de los epítipos  $T_h$  presentes en las vacunas quiméricas pediátricas. La exposición previa a un epítipo  $T_h$  a través de la inmunización con las vacunas habituales debería establecer clones de linfocitos  $T_h$  que puedan proliferar inmediatamente tras la administración del péptido quimérico (es decir, una respuesta de recuerdo), estimulando de este modo respuestas rápidas de linfocitos B frente al péptido quimérico. Además, los epítipos  $T_h$  evitan cualquier epítipo de linfocito B y/o linfocito T supresor específico de patógeno, lo que podría conducir a una supresión inmunitaria inducida por el soporte, un problema encontrado cuando se utilizan moléculas de toxina para suscitar respuestas de linfocitos T auxiliares.

25 Los epítipos  $T_h$  en el péptido quimérico de la divulgación son promiscuos pero no universales. Esta característica significa que los epítipos  $T_h$  son reactivos en un gran segmento de una población exogámica que expresa distintos antígenos del MHC (reactivos en el 50 al 90 % de la población), pero no en todos los miembros de esa población. Para proporcionar una reactividad inmunitaria amplia casi universal para un producto de escisión de péptido interno, se puede preparar una combinación de péptidos quiméricos con distintos epítipos  $T_h$ . Por ejemplo, una combinación de cuatro péptidos quiméricos con epítipos  $T_h$  promiscuos procedentes de las toxinas tetánica y pertúsica, de la proteína F del virus del sarampión y el HBsAg, puede ser más eficaz.

35 Los epítipos  $T_h$  promiscuos a menudo comparten características estructurales comunes. Por ejemplo, los epítipos  $T_h$  promiscuos varían en tamaño de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 restos. Las hélices anfipáticas son una característica común de los epítipos  $T_h$ . Una hélice anfipática se define por una estructura de  $\alpha$ -hélice con restos de aminoácido hidrófobos que dominan las caras circundantes. Los epítipos  $T_h$  con frecuencia contienen patrones de aminoácidos primarios adicionales, tal como una Gly o un resto cargado, seguido de dos o tres restos hidrófobos seguidos a su vez por un resto cargado o polar. Este patrón define las secuencias de Rothbard. Los epítipos  $T_h$  a menudo obedecen la regla 1, 4, 5, 8, en la que un resto cargado positivamente está seguido de restos hidrófobos en la cuarta, quinta y octava posiciones después del resto cargado. Dado que todas estas estructuras están compuestas de aminoácidos hidrófobos, cargados y polares comunes, cada estructura puede existir simultáneamente dentro de un único epítipo  $T_h$ .

45 Por lo tanto,  $T_h$  es una secuencia de aminoácidos (naturales o no naturales) que contiene un epítipo  $T_h$ . El epítipo  $T_h$  puede ser un epítipo continuo o discontinuo. Por lo tanto, no todos los aminoácidos de la  $T_h$  son necesariamente parte del epítipo. Por consiguiente, los epítipos  $T_h$ , incluyendo los análogos y segmentos de epítipos  $T_h$ , tienen la capacidad de potenciar o estimular una respuesta inmunitaria frente al producto de escisión del péptido interno. Los epítipos  $T_h$  inmunodominantes son reactivos en sentido amplio en poblaciones animales y humanas con tipos de MHC extensamente divergentes (Celis *et al.*, 1988; Demotz *et al.*, 1989; y Chong *et al.*, 1992). El dominio  $T_h$  de los péptidos quiméricos de la presente divulgación tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 restos de aminoácido y, preferentemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 restos de aminoácido. Cuando están presentes múltiples epítipos  $T_h$ , entonces cada epítipo  $T_h$  es independientemente igual o distinto.

55 Los análogos del epítipo  $T_h$  incluyen sustituciones, deleciones e inserciones de uno a aproximadamente cinco restos de aminoácido en el epítipo  $T_h$ . Los segmentos  $T_h$  son porciones contiguas de un epítipo  $T_h$  que son suficientes para potenciar o estimular una respuesta inmunitaria frente al producto de escisión de péptido interno. Un ejemplo de segmentos  $T_h$  es una serie de péptidos solapantes que proceden de un único péptido más largo.

60 Los epítipos  $T_h$  de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, los epítipos de linfocitos T auxiliares del antígeno de superficie de la hepatitis B ( $HB_s T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares de la toxina pertúsica ( $TP T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares de la toxina tetánica ( $TT T_h$ ); el epítipo de linfocitos T auxiliares de la proteína F del virus del sarampión ( $VS_{F1} T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares de la proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis* ( $CT T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares de la toxina diftérica ( $TD T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares del circumsporozoito de *Plasmodium falciparum* ( $PF T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares de la triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* ( $SM T_h$ ); los epítipos de linfocitos T auxiliares de TraT de *Escherichia coli* ( $TraT T_h$ ) y los análogos inmunopotenciadores de cualquiera de los anteriores. Los epítipos

de estos linfocitos T auxiliares son los que se proporcionan en la Tabla 1:

Tabla 1

linfocito T auxiliar	Epítipo
TT <sub>0</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 96
HB <sub>3</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 97
TT <sub>1</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 98
TT <sub>1</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 99
TT <sub>2</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 100
TP <sub>1A</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 101
TT <sub>3</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 102
PT <sub>2</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 103
VS <sub>F1</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 104
VS <sub>F2</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 105
TT <sub>4</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 106
TT <sub>5</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 107
CT <sub>1</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 108
TD <sub>1</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 109
TD <sub>2</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 110
PF T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 111
SM T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 112
TraT <sub>1</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 113
TraT <sub>2</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 114
TraT <sub>3</sub> T <sub>H</sub>	SEQ ID NO: 115

- 5 En una divulgación adicional, la vacuna comprende un péptido (o péptidos) quimérico que comprende 2-10 o 2-5 restos de aminoácido del neoepítipo de linfocito B creado por la escisión de tau, estando el neoepítipo fusionado a, con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador, el epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95 en una secuencia lineal contigua. La inmunización con el péptido (o péptidos) quimérico que comprende 2-10 o 2-5 restos de aminoácido del neoepítipo de linfocito B creado por la escisión de tau, estando el neoepítipo fusionado, con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador, a un epítipo promiscuo del toxoide tetánico de la SEQ ID NO: 95 en una secuencia lineal contigua, debería dar lugar a los siguientes anticuerpos:

- 15 (1) anticuerpo anti-tetánico, que sería irrelevante en los seres humanos dado que la mayoría de los individuos ya son seropositivos para el toxoide tetánico (es decir, por las inmunizaciones previas contra el tétanos), o que serviría como un refuerzo para la inmunización previa contra el tétanos;
- (2) anticuerpos anti-uniones, que reconocen nuevos epítipos creados por la unión que une el neoepítipo de linfocitos B específico de extremo creado por la escisión de tau y el epítipo de linfocitos T auxiliares del toxoide tetánico, pero no reconocerían nada más que el inmunógeno en sí y, por lo tanto, no se espera que produzcan alguna respuesta en un ser humano; y
- 20 (3) anticuerpos anti-neoepítipo específicos para la tau truncada, que son los anticuerpos deseados que se busca generar mediante el método de acuerdo con la presente invención para inhibir, reducir o incluso quizás invertir los ovillos neurofibrilares y/o depurar la tau truncada del cerebro de un mamífero. Estos anticuerpos específicos anti-neoepítipo para la tau truncada reconocen el neoepítipo creado por la escisión de tau (es decir, las secuencias de aminoácidos del extremo N libre o el extremo C libre del péptido creado por la escisión de tau), pero no reconocen la misma secuencia de aminoácidos presente en la proteína tau normal. En determinadas realizaciones, los anticuerpos reconocen una secuencia de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, o cualquier fragmento de las mismas, en la tau truncada, y no reconocen la misma secuencia de aminoácidos cuando esté presente en la proteína tau normal. En determinadas realizaciones, estos anticuerpos reconocen (es decir, se unen y muestran reactividad) a ΔTau y no reconocen (es decir, no se unen ni muestran reactividad) a htau40. Las ventajas de este método de inmunización incluyen, por ejemplo: (1) que se utiliza en la inmunización activa un inmunógeno peptídico barato, que se produce y controla para garantizar la calidad sin problemas y fácilmente; (2) la inclusión de solo dos a tres, y quizás hasta cuatro o cinco, restos de aminoácido del extremo N o C de un producto de escisión de péptido interno de tau debe minimizar la cantidad de anticuerpo producido que pueda reaccionar con la normal proteína tau de la que se obtuvo la tau truncada (es decir, se escindió); (3) el uso de un epítipo de linfocitos T independiente no propio debe romper la autotolerancia y permitir la producción de anticuerpos frente a un antígeno propio (Schofield *et al.*, 1991); (4) la ausencia en el péptido (o péptidos) quimérico de un epítipo de linfocitos T procedente del producto de escisión de péptido interno (tau truncada) debe evitar cualquier problema significativo de autoinmunidad, dado que la inmunidad de linfocitos T anti-lo propio subyace a la progresión de todas las enfermedades autoinmunitarias conocidas; y (5) la inmunización debe ser reversible y autolimitada, con títulos de anticuerpos que caigan gradualmente con el tiempo, dado que no se espera que el
- 35
- 40

sistema inmunitario del paciente encuentre de forma natural como inmunógeno la combinación de la tau truncada o un fragmento de la misma con la toxina tetánica.

5 En una divulgación adicional, la inmunogenicidad se puede mejorar a través de la adición de restos espaciadores (por ejemplo, Gly-Gly) entre el epítipo  $T_h$  promiscuo y el epítipo de linfocito B del péptido quimérico de acuerdo con la presente divulgación. Además de separar físicamente el epítipo  $T_h$  del epítipo de linfocitos B, los restos espaciadores de glicina pueden alterar cualquier estructura secundaria artificial creada por la unión del epítipo  $T_h$  con el epítipo de linfocitos B y, de este modo, eliminar la interferencia entre las respuestas de linfocitos T y/o B. La separación conformacional entre el epítipo auxiliar y el dominio que suscita anticuerpos permite así interacciones  
10 más eficaces entre el inmunógeno presentado y los linfocitos  $T_h$  y B apropiados. El resto (o restos) de aminoácido para el resto (o restos) espaciador pueden ser aminoácidos de origen natural o aminoácidos que no son de origen natural, que incluyen, pero sin limitación,  $\beta$ -alanina, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, tiroxina, ácido gamma aminobutírico, homoserina, citrulina y similares.

15 En una divulgación adicional, se puede unir un epítipo inmunoestimulante de la proteína invasina de una especie de *Yersinia* al epítipo de linfocitos T auxiliares del péptido quimérico junto al epítipo de linfocitos B, como un segmento opcional para el péptido quimérico. Las invasiones de la bacteria patógena *Yersinia* spp. son por proteínas de membrana externa que median la entrada de las bacterias en células de mamíferos (Isberg *et al.*, 1990). Se demostró que las invasiones por la bacteria de células de mamíferos cultivadas precisan la interacción entre la  
20 molécula de invasina de *Yersinia* y varias especies de la familia  $\beta 1$  de integrinas presentes en las células cultivadas (Tran Van Nhieu *et al.*, 1991). Dado que los linfocitos T son ricos en integrinas  $\beta 1$  (especialmente, los linfocitos T inmunitarios o de memoria activados), se han investigado los efectos de la invasina en los linfocitos T humanos (Brett *et al.*, 1993). Se piensa que las integrinas facilitan la migración de los linfocitos T inmunitarios fuera de los vasos sanguíneos y a través del tejido conectivo a los sitios de exposición antigénica, a través de su interacción con  
25 proteínas de la matriz extracelular, incluyendo la fibronectina, la laminina y el colágeno. Se descubrió que el extremo carboxilo de la molécula de invasina es coestimulante para los T  $CD4^+$  humanos sin tratamiento previo en presencia de un mitógeno no específico, el anticuerpo anti-CD3, provocando una marcada proliferación y expresión de citocinas. Además, se identificó el dominio de invasina específico que interactúa con las integrinas  $\beta 1$  para provocar esta estimulación (Brett *et al.*, 1993). Debido a las propiedades coestimulantes de linfocitos T demostradas  
30 asociadas con este dominio, se lo puede unir al epítipo  $T_h$  promiscuo en el péptido quimérico de la presente divulgación junto al epítipo de linfocitos B.

En una divulgación adicional, se puede acoplar un lípido común para las proteínas de la membrana bacteriana a los péptidos sintéticos que representan epítopos de linfocitos B o de linfocitos T citotóxicos. Muchas de las proteínas de  
35 la membrana externa de las bacterias gramnegativas están modificadas por lípidos y son muy inmunogénicas. Debido a la evidente correlación entre el enlace covalente de lípidos y la inmunogenicidad, se puede acoplar tripalmitoil-S-glicerol cisteína (Pam<sub>3</sub>Cys), un lípido común para las proteínas de la membrana bacteriana, a los péptidos sintéticos que representan epítopos de linfocitos B o de linfocitos T citotóxicos. Debido a que este enlace  
40 lipídico suscita respuestas adyuvantes significativas, el epítipo  $T_h$  promiscuo del péptido quimérico puede modificarse con lípidos junto a su enlace con el epítipo de linfocitos B. Es probable que tales péptidos quiméricos modificados con lípidos sean más inmunogénicos que la versión no modificada del mismo péptido. La Patente de Estados Unidos n.º 5.843.446, incluye una divulgación de los epítopos  $T_h$  y las propiedades inmunoestimulantes de los epítopos de invasina y los restos lipídicos.

45 La vacuna también puede incluir opcional o preferentemente agentes inmunoestimulantes o adyuvantes. Los adyuvantes se han usado durante muchos años para mejorar las respuestas inmunitarias del hospedador, por ejemplo, para vacunas. Los adyuvantes intrínsecos, tales como los polisacáridos, normalmente son componentes de bacterias destruidas o atenuadas usadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que normalmente están unidos de forma no covalente a antígenos, y están formulados para potenciar la respuesta  
50 inmunitaria del hospedador. Por lo tanto, se han identificado adyuvantes que potencian la respuesta inmunitaria frente a antígenos suministrados por vía parenteral. No obstante, algunos de estos adyuvantes son tóxicos, y pueden producir efectos secundarios indeseables, haciéndolos inadecuados para el uso en seres humanos y muchos animales. De hecho, se usan rutinariamente solo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (comúnmente denominados colectivamente alumbre) como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La  
55 eficacia del alumbre en el aumento de las respuestas de anticuerpos contra los toxoides diftérico y tetánico está bien establecida y la vacuna de HBsAg también se ha adyuvantado con alumbre.

Una amplia variedad de adyuvantes extrínsecos puede provocar respuestas inmunitarias potentes contra los  
60 inmunógenos. Estos incluyen saponinas formando complejos con antígenos proteicos de membrana (complejos inmunoestimulantes), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias destruidas en aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos, tales como muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas. Para inducir de forma eficaz respuestas inmunitarias humorales (RIH) y la inmunidad mediada por células (IMC), se emulsionan los inmunógenos en adyuvantes. Muchos adyuvantes son tóxicos, induciendo granulomas, inflamaciones agudas y crónicas (adyuvante completo de Freund, ACF), citótoxisis (saponinas y polímeros de Pluronic) y pirogenicidad, artritis y uveítis anterior (LPS y MDP). Aunque ACF es un excelente  
65 adyuvante y se usa extensamente en investigación, no está autorizado para su uso en vacunas humanas o

veterinarias debido a su toxicidad. En determinadas realizaciones, el adyuvante es alumbre.

La patente de Estados Unidos n.º 4.855.283 enseña análogos de glucolípido, que incluyen N-glucosilamidas, N-glucosilureas y N-glucosilcarbamatos, cada uno de los cuales está sustituido en el resto de azúcar por un aminoácido, como inmunomoduladores o adyuvantes. La Patente de Estados Unidos 4.258.029 enseña que el clorhidrato de octadecil tirosina (OTH) actúa como un adyuvante cuando se está formando complejo con el toxoide tetánico y con vacuna para el poliovirus de tipo I, II y III inactivado con formalina. Además, Nixon-George *et al.*, 1990, informaron que los octadecil ésteres de aminoácidos aromáticos formando complejo con un antígeno de superficie de hepatitis B recombinante potenciaron las respuestas inmunitarias del hospedador contra el virus de la hepatitis B.

Es preferente la adición de formulaciones adyuvantes/de emulsiones exógenas que maximicen las respuestas inmunitarias frente al producto de escisión de péptido interno. Los adyuvantes y transportadores que son adecuados son los: (1) que se han utilizado satisfactoriamente en ensayos de Fase I en humanos; (2) basándose en su falta de reatogenia en los estudios de seguridad preclínicos, tienen potencial de aprobación para su uso en seres humanos; o (3) se han aprobado para su uso en alimentos y animales de compañía.

Los regímenes de inmunoterapia que producen respuestas inmunitarias máximas después de la administración del menor número de dosis, idealmente solo una dosis, son muy convenientes. Este resultado se puede abordar a través del aprisionamiento del inmunógeno en micropartículas. Por ejemplo, el copolímero de poli(lactida-co-glicólido) de material de sutura absorbible puede conformarse en micropartículas que contienen inmunógeno. Después de la administración oral o parenteral, la hidrólisis de micropartículas *in vivo* produce los subproductos no tóxicos, los ácidos láctico y glicólico, y libera el inmunógeno, en gran parte no alterado por el proceso de aprisionamiento. La velocidad de degradación de las micropartículas y la liberación de inmunógeno aprisionado pueden controlarse mediante varios parámetros, que incluyen (1) la relación de polímeros utilizada en la formación de partículas (las partículas con concentraciones más altas de co-glicólido se degradan más rápidamente); (2) el tamaño de partícula, (las partículas más pequeñas se degradan más rápidamente que las más grandes); y, (3) la eficacia de aprisionamiento, (las partículas con concentraciones más altas de antígeno aprisionado se degradan más rápidamente que las partículas con cargas más bajas). Las formulaciones de micropartículas también pueden proporcionar las inmunizaciones primarias y las posteriores de refuerzo en una única administración, mezclando micropartículas con inmunógeno aprisionado con distintas velocidades de liberación. Se pueden lograr fácilmente formulaciones de dosis únicas que tienen la capacidad de liberar antígeno variando de menos de una semana a más de seis meses. Además, el suministro de péptido quimérico de acuerdo con la presente divulgación, aprisionado en micropartículas, también puede proporcionar una eficacia mejorada cuando el inmunógeno microparticulado se mezcla con formulaciones de adyuvantes/de emulsiones exógenas.

La eficacia de los péptidos quiméricos puede establecerse y analizarse inyectando a un animal, por ejemplo, ratones o ratas, el péptido quimérico formulado en alumbre y, después, siguiendo la respuesta inmunitaria frente al producto de escisión de péptido interno.

En una divulgación adicional, la vacuna contiene una mezcla de dos o más de los péptidos quiméricos de la presente divulgación, por ejemplo, para potenciar la inmunoeficacia en una población más amplia, y así, proporcionar una mejor respuesta inmunitaria contra la tau truncada. Otros inmunógenos de péptidos quiméricos sintéticos inmunoestimulantes se obtienen mediante la modificación en lipopéptidos, para proporcionar una capacidad adyuvante incorporada para vacunas potentes. La respuesta inmunitaria frente a los inmunógenos de péptidos quiméricos sintéticos de la presente divulgación puede mejorarse mediante el suministro a través de aprisionamiento en o sobre micropartículas biodegradables del tipo descrito por O'Hagan *et al* (1991). Los inmunógenos pueden encapsularse con o sin adyuvante, incluyendo una fracción lipídica unida covalentemente, tal como Pam<sub>3</sub>Cys, y tales micropartículas pueden administrarse con un adyuvante inmunoestimulante tal como adyuvante incompleto de Freund o alumbre. Las micropartículas actúan para potenciar las respuestas inmunitarias frente a un inmunógeno y para proporcionar una liberación controlada en el tiempo para respuestas sostenidas o periódicas para la administración oral y para la administración tópica (O'Hagan *et al.*, 1991).

La composición que comprende una cantidad inmunizante eficaz del péptido o péptidos quiméricos y un transportador, adyuvante, excipiente, diluyente o agente auxiliar farmacéuticamente aceptable, se puede administrar un a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) para el que el péptido tau truncado es una molécula propia del mamífero.

En determinadas realizaciones, la composición vacunal incluye adicionalmente un péptido quimérico o una mezcla de péptidos quiméricos con un epítipo de linfocito B específico de extremo de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una proteína precursora o madura (por ejemplo, APP), como extremo N o extremo C libre, fusionado con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador a un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente distinta a la del producto de escisión de péptido interno. Dichas composiciones se explican con detalle, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 7.901.689 de los cesionarios.

En una divulgación adicional, la vacuna comprenderá uno o más de los péptidos quiméricos de la divulgación y un vehículo, excipiente, diluyente o agente auxiliar farmacéuticamente aceptable, incluyendo adyuvantes. La vacuna

puede administrarse por cualquier vía conveniente incluyendo, la oral, la intramuscular, u otra vía parenteral o interna. De manera similar, las vacunas se pueden administrar como una dosis única o se pueden dividir en múltiples dosis para la administración. El experto en la materia determina fácilmente los programas de inmunización. Por ejemplo, los adyuvantes o emulsionantes que se pueden usar en la presente invención incluyen alumbre, adyuvante incompleto de Freund, liposyn, saponina, escualeno, L121, emulsigen y ISA720. En realizaciones preferentes, los adyuvantes/emulsionantes son el alumbre, adyuvante incompleto de Freund, una combinación de liposyn y saponina, una combinación de escualeno y L121, o una combinación de emulsigen y saponina.

En determinadas realizaciones, la vacuna contiene una mezcla de dos o más de los anticuerpos específicos de neoepítipo descritos anteriormente, por ejemplo, para potenciar la inmunoeficacia en una población más amplia y, así, proporcionar una mejor respuesta inmunitaria contra la tau truncada, y uno o más de los agentes seleccionados del grupo que comprende o consiste en transportadores, adyuvantes, excipientes, diluyentes o agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables. En algunas de estas realizaciones, la vacuna también comprende uno o más anticuerpos específicos del extremo N o C libre de una APP truncada (por ejemplo, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>1-43</sub>, etc.).

#### 4. Administración

La administración de una proteína tau truncada, su epítipo inmunogénico o un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína o el epítipo, y/o una vacuna descrita anteriormente, se pueden usar como una terapia para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía asociada con el desarrollo de ovillos neurofibrilares. Adicionalmente, la administración de una proteína tau truncada, su epítipo inmunogénico y/o un anticuerpo específico que reconoce específicamente la proteína o el epítipo, y/o la vacuna, también se pueden usar como un tratamiento profiláctico para prevenir el inicio de la enfermedad de Alzheimer u otra tauopatía asociada con ovillos neurofibrilares.

Los pacientes susceptibles de tratamiento incluyen individuos con riesgo de enfermedad pero que no presentan síntomas, así como pacientes que presentan síntomas actualmente. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, prácticamente cualquiera está en riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, Los presentes métodos pueden administrarse de forma profiláctica a la población general sin necesidad de evaluar el riesgo del sujeto en cuestión. Dicha administración profiláctica puede comenzar, por ejemplo, a los 50 años o más tarde. Los presentes métodos son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido de enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen los que tienen familiares que han experimentado esta enfermedad y aquellos cuyo riesgo está determinado por el análisis de marcadores genéticos o bioquímicos. Los marcadores genéticos de riesgo para la enfermedad de Alzheimer incluyen mutaciones en el gen de APP, particularmente las mutaciones, en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671, denominadas mutaciones Hardy y Swedish, respectivamente. Otros de los marcadores de riesgo son mutaciones en los genes de presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de EA, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los individuos que actualmente padecen la enfermedad de Alzheimer pueden reconocerse por la demencia característica, por la presencia de los factores de riesgo descritos anteriormente. Además, están disponibles varias pruebas de diagnóstico para identificar a los individuos que tienen EA. Estas incluyen diagnóstico por imagen y/o la medición de los niveles de tau y A $\beta$ 42 en LCR. Los niveles elevados de tau y reducidos de A $\beta$ 42 significan la presencia de EA. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse por los criterios de la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados.

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, a los 10, 20, 30, 40, 50 o 60 años). Habitualmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcance los 40, 50, 60, 70, 75 u 80 años. El tratamiento normalmente implica múltiples dosificaciones a lo largo de un período de tiempo. El tratamiento puede controlarse sometiendo a ensayo el anticuerpo o las respuestas de linfocitos T o B activados frente al agente terapéutico a lo largo del tiempo. Si la respuesta cae, se indica una dosis de refuerzo. En el caso de posibles pacientes de síndrome de Down, el tratamiento puede comenzar de forma prenatal mediante la administración a la madre del agente terapéutico o poco después del nacimiento.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas o los medicamentos se administran a un paciente susceptible de, o de otra forma con riesgo de, Enfermedad de Alzheimer en una cantidad suficiente para eliminar o reducir el riesgo, reducir la gravedad o retrasar el inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o conductuales de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios presentados durante el desarrollo de la enfermedad. En aplicaciones terapéuticas, se administran las composiciones o medicamentos a un paciente que se sospecha que tiene, o que ya padece, tal enfermedad, en una cantidad suficiente para curar, o al menos, detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, bioquímicos, histológicos y/o conductuales), incluyendo sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad. En algunos métodos, la administración del agente reduce o elimina el deterioro cognitivo leve en pacientes que aún no han desarrollado la patología característica del Alzheimer. Una cantidad adecuada para llevar a cabo un tratamiento terapéutico o profiláctico se define como una dosis terapéuticamente - o profilácticamente - eficaz. En los regímenes profilácticos y terapéuticos, los agentes habitualmente se administran en varias dosis hasta que se haya logrado una respuesta inmunitaria suficiente. Normalmente, se controla la respuesta inmunitaria y se proporcionan dosificaciones repetidas si la respuesta inmunitaria comienza a declinar.

- Las dosis eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente, varían dependiendo de muchos factores distintos, incluyendo los medios de administración, el sitio diana, el estado del paciente, otros medicamentos administrados, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.
- 5 Las dosificaciones de tratamiento deben titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. La cantidad de inmunógeno depende de si también se administra adyuvante, precisándose dosificaciones más altas en ausencia de adyuvante. Una ventaja adicional de los anticuerpos específicos de extremo libre de la presente invención en determinadas realizaciones puede ser que, para dosificaciones igual masa, las dosificaciones de los anticuerpos que se unen específicamente a neoepítomos de tau truncada (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) contienen una dosificación molar mayor
- 10 de los anticuerpos eficaces en la depuración y/o la "inactivación", que una composición que comprende una mezcla de los anticuerpos específicos de neoepítomo y anticuerpos no específicos. La cantidad de un inmunógeno para administración en ocasiones varía de 1-500  $\mu$ g por paciente y más habitualmente de 5-500  $\mu$ g por inyección para la administración en humanos. Ocasionalmente, se utiliza una dosis mayor, de 1-2 mg por inyección. Normalmente, para cada inyección humana se utilizan aproximadamente 10, 20, 50 o 100  $\mu$ g. La masa del inmunógeno también depende de la relación en masa del epítomo inmunogénico dentro del inmunógeno con respecto a la masa de inmunógeno en su conjunto. Normalmente, se utilizan  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  micromoles de epítomo inmunogénico por cada microgramo de inmunógeno. 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 proporciona una dosificación de inmunógeno, la dosificación es mayor que 1  $\mu$ g/paciente y, habitualmente, mayor que 10  $\mu$ g paciente si se administra
- 15 también adyuvante, y mayor que 10  $\mu$ g/paciente y, habitualmente, mayor que 100  $\mu$ g/paciente en ausencia de adyuvante. Una pauta típica consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo a intervalos, tales como de 6 semanas. Otra pauta consiste en una inmunización seguida de inyecciones de refuerzo 1, 2 y 12 meses más tarde. Otro régimen implica una inyección cada dos meses de por vida. Como alternativa, las inyecciones de refuerzo pueden ser irregulares, según indique el control de la respuesta inmunitaria.
- 20 Para la 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. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o de 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes, o una vez cada 3 a 6 meses. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos (por ejemplo, recombinantes, monoclonales, quiméricos y/o humanizados) con las mismas o distintas especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado se encuentra dentro de los intervalos indicados. En tales circunstancias, los dos o más anticuerpos pueden dirigirse a, por ejemplo, la tau truncada. Como alternativa, uno o más de los anticuerpos pueden dirigirse a, por ejemplo, tau truncada, y uno o más anticuerpos adicionales pueden dirigirse a los péptidos  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) asociados con la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos se administran
- 25 habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser cada hora, a diario, semanales, mensuales o anuales. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para lograr una concentración plasmática de anticuerpos de 1-1000  $\mu$ g/ml y, en algunos métodos, de 25-300  $\mu$ g/ml. Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se precisa una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En
- 30 aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se precisa una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o finaliza la progresión de la enfermedad y preferentemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, la patente se puede administrar un régimen profiláctico.
- 35 Las dosis para los ácidos nucleicos que codifican inmunógenos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1  $\mu$ g a 10 mg o 30-300  $\mu$ g de ADN por paciente. Las dosis para los vectores víricos infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.
- 40 Se puede obtener la eficacia de la administración/tratamiento midiendo los niveles de tau patógena en el plasma y/o en el LCR. Basándose en esta evaluación, la dosis y/o la frecuencia de administración pueden ajustarse en consecuencia. Además o como alternativa, se obtiene la eficacia de la administración/tratamiento mediante el control de la relación de la concentración de  $\Delta$ Tau con respecto a htau40, viceversa.
- 45 Además o como alternativa, también se puede obtener la eficacia de la administración/tratamiento por obtención de imágenes de placas amiloides mediante PET. Un aumento del metabolismo del cerebro indicaría que la administración/tratamiento es eficaz. También se puede obtener la eficacia mediante un grado de atrofia cerebral, determinado mediante RM.
- 50 Además o como alternativa, se puede obtener la eficacia de la administración/tratamiento midiendo los niveles de IgG e IgM contra  $\Delta$ Tau.



Se puede obtener la seguridad de la administración/tratamiento controlando las microhemorragias y/o el edema angiogénico, por ejemplo, mediante RM. Basándose en esta evaluación, la dosis y/o la frecuencia de administración pueden ajustarse en consecuencia.

- 5 Los anticuerpos e inmunógenos pueden administrarse por vía intranasal, mediante una inyección subcutánea, inyección intramuscular, infusión i.v., por vía transcutánea, vía bucal, etc., o como se describe con mayor detalle a continuación.

#### 5. Formulaciones farmacéuticas

10 Las formulaciones farmacéuticas en conformidad con la presente invención pueden comprender (i) un agente activo que comprende o consiste en uno o más anticuerpos específicos de neoepítipo descritos anteriormente y (ii) uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El agente activo generalmente comprenderá de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 90 % de la formulación, y el uno o más excipientes generalmente comprenderán de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 99,99 % de la formulación. En las realizaciones preferentes, las formulaciones se utilizan para la introducción del agente activo en el cuerpo de un mamífero vivo (por ejemplo, un ser humano) y van acompañadas de instrucciones (por ejemplo, un prospecto de envase) que recitan las indicaciones para la administración del agente activo en el cuerpo del mamífero vivo. En algunas de estas realizaciones, las formulaciones se utilizan para el tratamiento o la prevención de la EA y/u otra tauopatía, y van acompañadas de las instrucciones que recitan indicaciones para el tratamiento y/o la prevención de la EA y/u otra tauopatía.

25 En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende una pluralidad de anticuerpos que reconocen y se unen a  $\Delta$ Tau y no reconocen y no se unen a htau1-40, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los anticuerpos generalmente comprenderán de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 90 % de la formulación, y el uno o más excipientes generalmente comprenderán de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 99,99 % de la formulación. En las realizaciones preferentes, la formulación farmacéutica está acompañada de instrucciones que recitan las indicaciones para la administración del agente activo en el cuerpo del mamífero vivo, y/o las indicaciones para el tratamiento y/o la prevención de la EA y/u otra tauopatía.

30 En una divulgación adicional, la formulación farmacéutica comprende un inmunógeno que comprende o consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO: 7-94 o 116, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El inmunógeno generalmente comprenderá de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 90 % de la formulación, y el uno o más excipientes generalmente comprenderán de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 99,99 % de la formulación. En las realizaciones preferentes, la formulación farmacéutica está acompañada de instrucciones que recitan las indicaciones para la administración del agente activo en el cuerpo del mamífero vivo, y/o las indicaciones para el tratamiento y/o la prevención de la EA y/u otra tauopatía.

40 Las formulaciones administradas en conformidad con la presente invención, por ejemplo, los anticuerpos específicos de neoepítipo descritos anteriormente, se pueden administrar por medios parenterales, tópicos, intranasales, intravenosos, orales, subcutáneos, intrarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica de un agente inmunogénico es subcutánea, aunque otras vías pueden ser igualmente eficaces. La siguiente vía más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección se realiza muy normalmente en los músculos del brazo o la pierna. En algunos métodos, los agentes se inyectan directamente en un tejido particular donde se han acumulado depósitos, por ejemplo, inyección intracraneal. Es preferente para la administración de anticuerpos la inyección intramuscular en infusión intravenosa. En algunos métodos, se inyectan anticuerpos terapéuticos particulares directamente en el cráneo. En algunos métodos, los anticuerpos se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad™ (Elan Pharm. Technologies, Dublin, Irlanda). En determinadas realizaciones, el adyuvante es alumbre.

Las formulaciones farmacéuticas en conformidad con la presente invención también pueden contener uno o más transportadores farmacéuticos y/o adyuvantes adecuados.

55 Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y de la capacidad del modulador para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en que cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del modulador se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

60 Una "cantidad profilácticamente eficaz" (por ejemplo, de un anticuerpo específico para una tau truncada o una porción de tau truncada) se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, tal como prevenir o inhibir la tasa de deposición, agregación, polimerización y/o neurotoxicidad de tau en un sujeto predispuesto a la formación de ovillos neurofibrilares. Una cantidad profilácticamente eficaz puede determinarse como se describe anteriormente para la cantidad terapéuticamente eficaz. Normalmente, dado que una dosis profiláctica se usa en los sujetos antes de o en

un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el apoyo terapéutico deseado, tal como la progresión ralentizada de la enfermedad de Alzheimer, el inicio retrasado, la reducción o la inversión de la formación de agregados y/o de ovillos neurofibrilares, y/o reducción o inversión de la neurotoxicidad. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y de la capacidad del modulador para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en que cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del modulador se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Un factor que puede considerarse cuando se determina una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo para tau truncada es la concentración de tau natural en un compartimiento biológico de un sujeto, tal como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o el plasma del sujeto. Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Además, hay que entender que, para cualquier sujeto particular, las pautas posológicas específicas podrían ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía subcutánea, vía intravenosa, vía intradérmica, vía intramuscular, vía intraperitoneal, vía intracerebral, vía intranasal, vía oral, vía transdérmica, vía bucal, vía intraarterial, vía intracraneal o vía intracefálica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características exclusivas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos. Como se usa en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. En una realización, el transportador es adecuado para la administración parenteral. Preferentemente, el transportador puede ser adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. Como alternativa, el transportador es adecuado para la administración en el sistema nervioso central (por ejemplo, por vía intraespinal o intracerebral). En otra realización, el transportador es adecuado para la administración oral. Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en el caso de que algún agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. Además, pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las formulaciones preparadas en conformidad con la presente invención deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, el anticuerpo puede administrarse en una formulación de liberación temporal, por ejemplo, en una composición que incluya un polímero de liberación lenta. Los compuestos activos pueden prepararse con transportadores que protegerán al compuesto frente a su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros de poliláctico poliglicólico (PLG). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, el anticuerpo para una tau truncada en la cantidad necesaria) en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de

dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizado por filtración.

5 La aplicación tópica puede ser el resultado de la aplicación transdérmica o intradérmica. La administración tópica se puede facilitar mediante la coadministración del agente con toxina colérica o derivados detoxificados o subunidades de la misma. Como alternativa, la administración transdérmica se puede lograr usando un parche cutáneo o usando transfersomas.

10 Otros sistemas de suministro pueden incluir la liberación temporal, sistemas de suministro de liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de los compuestos activos de la invención, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas suministro por liberación y son conocidos para expertos en la materia. Incluyen sistemas basados en polímeros tales como polianhídridos de ácidos polilácticos y poliglicólicos, y policaprolactona; sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides tales como el colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistema de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera, comprimidos compactados que utilizan aglutinantes y excipientes convencionales, implantes parcialmente fusionados y similares. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro con hardware basado en una bomba, algunos de los cuales están adaptados para su implantación.

25 Además se puede usar un implante de liberación sostenida prolongada. Liberación "prologada", como se usa en el presente documento, significa que el implante se construye y dispone para suministrar niveles terapéuticos del principio activo durante al menos 30 días, y preferentemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida prolongada son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente. Dichos implantes pueden ser particularmente útiles para tratar afecciones caracterizadas por agregados de péptidos beta amiloides, colocando el implante cerca de porciones del cerebro afectadas por tales agregados, efectuando de este modo dosis altas localizadas de los compuestos de la invención.

30 Los agentes inmunogénicos de la presente divulgación, tales como péptidos, se administran en ocasiones en combinación con un adyuvante. Se puede usar diversos adyuvantes en combinación con un péptido, tal como tau, para suscitar una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes preferentes aumentan la respuesta intrínseca a un inmunógeno sin provocar cambios conformacionales en el inmunógeno que afecten la forma cualitativa de la respuesta.

35 Una clase preferente de adyuvantes son las sales de aluminio (alumbre), tal como el hidróxido de aluminio, el fosfato de aluminio y el sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como monofosforil lípido A (MPL) 3 Des-O-acilado, o 3-DMP, aminoácidos poliméricos o monoméricos, tales como ácido poliglútamico o polilisina. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como muramil péptidos (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treoniil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida (TM) u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (documento WO 90/14837 para Van Nest *et al.*), conteniendo escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE), formulada en partículas submicrométricas utilizando un microfluidificador, tal como el microfluidificador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (b) SAF, conteniendo escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero bloqueado con pluronic L121 al 5 % y thr-MDP, microfluidificados en una emulsión submicrométrica o sometidos a agitación para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula y (e) el sistema adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi ImmunoChem, Hamilton, Mont.) conteniendo escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípidos A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (EPC), preferentemente MPL+EPC (Detox.TM.). Otros adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund (ACF) y el adyuvante incompleto de Freund (AIF). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2 y IL-12), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor de necrosis tumoral (TNF). En determinadas realizaciones, el adyuvante es alumbre.

60 Un adyuvante se puede administrar con un inmunógeno como una composición única, o se puede administrar antes, de manera simultánea o después de la administración del inmunógeno. El inmunógeno y el adyuvante se pueden envasar y suministrar en el mismo vial o se pueden envasar en viales separados, y mezclar antes de su uso. Normalmente, el inmunógeno y el adyuvante se envasan con una etiqueta, que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunógeno y el adyuvante se envasan por separado, el embalaje normalmente incluye instrucciones para la mezcla antes del uso. La elección de un adyuvante y/o transportador depende de la estabilidad de la formulación inmunogénica que contiene el adyuvante, la vía de administración, la pauta posológica, la eficacia del adyuvante para las especies a vacunar, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido aprobado o es aprobable para la administración humana por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración en seres humanos. Sin

embargo, el alumbre, el MPL o el adyuvante incompleto de Freund (Chang *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:173-186 (1998)) solos u, opcionalmente, todas las combinaciones de los mismos, son adecuados para la administración en seres humanos.

5 Los agentes de la presente invención a menudo se administran como composiciones farmacéuticas que comprenden un agente terapéutico activo y otros diversos componentes farmacéuticamente aceptables. Véase Remington's  
 10 Pharmaceutical Science (15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). La forma preferente depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. Las composiciones pueden incluir también, dependiendo de la formulación deseada, transportadores o diluyentes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, los  
 15 cuales se definen como vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para la administración animal o humana. El diluyente se selecciona para que no afecte la actividad biológica de la combinación. Los ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica tamponada con fosfato, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación también puede incluir otros transportadores, adyuvantes, o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunogénicos y similares.

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

Para administración parenteral, los agentes de la presente invención se pueden administrar como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable, con un  
 25 transportador farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua, aceite, solución salina, glicerol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponadoras del pH, y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético. El aceite de cacahuete, el aceite de soja y el aceite mineral son todos ejemplos de materiales útiles. En general, los glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son transportadores líquidos preferentes, particularmente para soluciones inyectables.  
 30 Los agentes de la invención, particularmente, los anticuerpos, se pueden administrar en forma de una inyección o preparación de implante de efecto prolongado, que se puede formular de tal forma que permita una liberación sostenida del principio activo. Una composición a modo de ejemplo comprende anticuerpo monoclonal a 5 mg/ml, formulado en un tampón acuoso que consiste en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, ajustado a pH 6,0 con HCl.

Normalmente, las composiciones se preparan como inyectables, como soluciones o 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, poliglicólido o copolímero, para potenciar el efecto adyuvante (Langer, *et al.*, *Science* 249:1527 (1990); Hanes, *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28:97-119 (1997)).  
 40

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

45 Para los supositorios, los aglutinantes y transportadores incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el principio activo en el intervalo del 0,5 % al 10 %, preferentemente el 1 %-2 %. Las formulaciones orales incluyen excipientes, tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio de calidades farmacéuticas. Estas composiciones adoptan la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones o polvos de liberación sostenida, y contienen el 10 %-95 % de principio activo, preferentemente el 25 %-70 %.  
 50

La aplicación tópica puede dar como resultado el suministro transdérmico o intradérmico. La administración tópica se puede facilitar mediante la coadministración del agente con toxina colérica o derivados destoxificados o subunidades de la misma, u otras toxinas bacterianas similares (ver Glenn *et al.*, *Nature* 391: 851 (1998)). La coadministración se puede lograr utilizando los componentes como una mezcla o como moléculas unidas obtenidas mediante reticulación química o expresión como una proteína de fusión. Como alternativa, el suministro transdérmico se puede lograr usando un parche cutáneo o usando transfersomas (Paul *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25:3521-24 (1995); Cevc *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1368:201-15 (1998)).  
 55

## 60 6. Terapia de combinación

Otro aspecto de la presente divulgación es una terapia de combinación en donde se emplean inmunógenos peptídicos tanto de tau truncada como de A $\beta$  ("mimótopos") como una terapia de combinación para un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una proteína tau truncada, su epítipo inmunogénico o anticuerpos específicos para la proteína tau truncada o un epítipo inmunogénico, se administra (o administran) en combinación entre sí y/o con otros agentes que son eficaces para el tratamiento de  
 65

enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

En el caso de enfermedades amiloidogénicas, tales como la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, la modulación inmunitaria para depurar los depósitos de beta-amiloide (A $\beta$ ) es una terapia novedosa. Las inmunoterapias dirigidas a A $\beta$  han dado como resultado mejoras cognitivas de manera sistemática. Es probable que las patologías por tau y A $\beta$  sean sinérgicas. Por lo tanto, una terapia de combinación dirigida a la depuración de ambas patologías al mismo tiempo puede ser más eficaz que tener como objetivo a cada una de forma individual. En el caso de la enfermedad de Parkinson y las enfermedades neurodegenerativas relacionadas, la modulación inmunitaria para depurar las formas agregadas de la proteína  $\alpha$ -sinucleína también es una terapia novedosa. Una terapia de combinación que tiene como objetivo la depuración de ambas proteínas tau y sinucleína de forma simultánea, puede ser más eficaz que tener como objetivo a cada una de forma individual.

En determinadas realizaciones preferentes, la terapia de la presente invención se combina con las terapias divulgadas en la Publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2003/0073655 (n.º de serie de Estados Unidos 10/084.380). Esa invención se refiere al uso de anticuerpos frente a los péptidos  $\beta$  amiloides como un método para inhibir selectivamente la acumulación y/o neutralizar la citotoxicidad asociada con las especies  $\beta$  amiloides, y en determinadas realizaciones preferentes, específicamente, A $\beta$ 1-40 (que forma la mayor parte del péptido  $\beta$  amiloide en circulación, LCR, plasma y orina humanos), o las especies A $\beta$ 1-42 y A $\beta$ 1-43 más tóxicas pero menos abundantes, que pueden ser el inicio de la deposición de amiloide. En determinadas realizaciones adicionales preferentes, la divulgación se refiere a una vacuna que es una combinación de una composición que proporciona inmunización contra la proteína tau truncada y una composición que proporciona inmunización contra A $\beta$ .

En determinadas realizaciones preferentes, la composición que proporciona inmunización contra la proteína tau truncada y la composición que proporciona inmunización contra A $\beta$  se administran a un mamífero en las mismas o distintas formulaciones. En determinadas realizaciones preferentes, la composición que proporciona la inmunización contra la proteína tau truncada y/o la composición que proporciona la inmunización contra A $\beta$  se preparan a partir de un péptido quimérico o una mezcla de péptidos quiméricos con un epítipo de linfocito B específico de extremo de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una proteína precursora o madura, como extremo N o extremo C libre, fusionado con o sin un resto (o restos) de aminoácido espaciador a un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente distinta a la del producto de escisión de péptido interno. Más particularmente, en tales realizaciones, la composición que proporciona inmunización contra la proteína tau truncada está representada por

la fórmula (I):  $N-(S)_m-(T_h)_n$  (I); o

la fórmula (II):  $(T_h)_n-(S)_m-C$  (II), donde:

N es los primeros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácido del extremo N libre de un producto de escisión de péptido interno de origen natural de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau normal, tal como, por ejemplo, tau1-13, tau14-441, tau14-391, tau391-414, tau1-391, tau1-421, tau13-410, tau391-410, tau14-412, tau391-412, tau13-383, tau13-381, tau13-355, o un fragmento de cualquiera de las anteriores;

C es los últimos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácido del extremo C libre del producto de escisión de péptido interno de origen natural de una cualquiera de las seis isoformas de la proteína tau normal;

T<sub>h</sub> es un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente natural (es decir, una especie de organismo vivo) distinta de la del producto de escisión de péptido interno de origen natural;

S es un resto (o restos) de aminoácido espaciador;

m es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y

n es 1, 2, 3 o 4.

La composición que proporciona inmunización contra la proteína A $\beta$  está representada por

la fórmula (I):  $N-(S)_m-(T_h)_n$  (I); o

la fórmula (II):  $(T_h)_n-(S)_m-C$  (II), donde:

N es los primeros 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido del extremo N libre de un producto de escisión de péptido interno de origen natural, tal como un péptido A $\beta$ , el cual, cuando es de origen natural en un mamífero, se obtiene de una proteína precursora o una proteína madura;

C es los últimos 2, 3, 4 o 5 restos de aminoácido del extremo C libre del producto de escisión de péptido interno de origen natural;

$T_h$  es un epítipo de linfocitos T auxiliares procedente de una fuente natural (es decir, una especie de organismo vivo) distinta de la del producto de escisión de péptido interno de origen natural;

5 S es un resto (o restos) de aminoácido espaciador;

$m$  es 0, 1, 2, 3, 4, o 5; y

$n$  es 1, 2, 3 o 4.

10 En determinadas realizaciones, la terapia de combinación emplea uno o más anticuerpos específicos para el neopítipo creado por la escisión de tau (por ejemplo, en Asp421), y uno o más anticuerpos específicos para el neopítipo creado por escisión de APP. El uno o más anticuerpos específicos para el neopítipo creado por la escisión de tau puede ser cualquier anticuerpo descrito anteriormente en la sección "Anticuerpos frente a Tau truncada". El uno o más anticuerpos específicos para el neopítipo creado por escisión de APP incluyen, por ejemplo, anticuerpos específicos para el extremo (o extremos) libre de los péptidos A $\beta$ , anticuerpos específicos de conformación para estos péptidos y anticuerpos que se unen a los dominios medios de estos péptidos. En determinadas realizaciones, el uno o más anticuerpos específicos para el neopítipo creado por la escisión de APP es un anticuerpo que es específico de extremo libre para péptidos A $\beta$  (A $\beta$ 1-39, A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-41, A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 1-43, etc.) y/o los sitios de escisión internos en las posiciones 11 y 17 de cualquiera de los anteriores, los que pueden o no tener modificaciones de piroglutamato como un acontecimiento natural. En determinadas realizaciones, el uno o más anticuerpos específicos para el neopítipo creado por escisión de APP pueden seleccionarse de un grupo que comprende o consiste en bapineuzumab, ponezumab, gantenerumab, solaneszumab, MABT5102A y GSK933756.

25 Se puede obtener la eficacia del tratamiento de combinación midiendo los niveles de tau patógena (por ejemplo,  $\Delta$ Tau) y de A $\beta$  en el plasma y/o en el LCR. Además o como alternativa, pueden medirse los niveles de IgG/IgM para A $\beta$  y tau patógena (por ejemplo,  $\Delta$ Tau). Además o como alternativa, se puede obtener al metabolismo cerebral mediante obtención de imágenes por PET. Además o como alternativa, también se pueden tomar los perfiles de citocinas de la sangre. Basándose en estas evaluaciones, pueden ajustarse la dosis y/o la frecuencia de la administración.

30 Se puede obtener la seguridad del tratamiento de combinación controlando las microhemorragias y/o el edema angiogénico, por ejemplo, mediante RM. Basándose en esta evaluación, la dosis y/o la frecuencia de administración pueden ajustarse en consecuencia. Por ejemplo, ante la aparición de microhemorragias y/o de edema angiogénico, el tratamiento de combinación puede suspenderse temporalmente y/o pueden disminuirse las dosis.

### 35 Descripción detallada de las realizaciones preferentes

El siguiente ejemplo representa realizaciones específicas de la presente invención y no es representativo de todo el alcance de la invención.

#### 40 Ejemplo 1

La estrategia y los protocolos para generar anticuerpos que reconocen específicamente el neopítipo creado por la escisión de tau en Asp421 (es decir,  $\Delta$ Tau), pero no a tau de longitud completa (es decir, htau40), se describen en este ejemplo vaticinador.

50 Los siguientes péptidos se preparan utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (430A): un péptido correspondiente a tau416-421 (SEQ ID NO: 83 SIDMVD); un péptido correspondiente a tau417-421 (SEQ ID NO: 84); un péptido correspondiente a tau418-421 (SEQ ID NO: 85); y un péptido correspondiente a la SEQ ID NO: 86, toda la htau40.

Los péptidos sintéticos se purifican después por HPLC y se caracterizan utilizando la composición de aminoácidos.

55 Una vez purificados y caracterizados, los péptidos se conjugan con hemocianina de lapa californiana y se inmunizan cuatro conjuntos de 10 ratones Balb/c con los péptidos conjugados.

Después de acabada la inmunización, se realiza un procedimiento de fusión utilizando esplenocitos de ratones hiperinmunizados y una línea celular de mieloma apropiada, SP2/0-Ag14 (ATCC CRL 1581), NS-1 (ATCC TIB18), o equivalente, usando polietilenglicol.

60 La selección de los productos de fusión satisfactorios se logra a través de medio HAT. Las colonias de hibridomas viables se cultivan en placas de 96 pocillos.

65 La exploración de todos los pocillos que contienen productos de fusión satisfactorios se lleva a cabo utilizando un conjunto de péptidos correspondientes a htau40,  $\Delta$ Tau y los restos 416-421, 417-421, 418-421 y 419-421 de  $\Delta$ Tau mediante ensayos de ELISA. Basándose en los resultados de los ensayos ELISA, se realizan subclonaciones por

dilución limitante sobre las colonias seleccionadas. Se seleccionan los anticuerpos específicos para  $\Delta$ Tau, los restos 416-421, 417-421, 418-421 y 419-421 de  $\Delta$ Tau; y no específicos para tau40. Estos anticuerpos solo reconocen, se unen o muestran reactividad con  $\Delta$ Tau, o los restos 416-421, 417-421, 418-421 o 419-421 de  $\Delta$ Tau, y no reconocen, se unen o muestran reactividad con tau40.

5 Para confirmar que el protocolo puede utilizarse posteriormente para generar anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente el neoepítipo creado por la escisión de tau en Asp421 (es decir,  $\Delta$ Tau), pero no a tau de longitud completa (es decir, htau40), se generan anticuerpos policlonales de alta afinidad específicos para  $\Delta$ Tau y no específicos para htau40 utilizando el péptido restringido: H2N - SEQ ID NO:86 - amino-hexanoato-C-amida. El péptido se sintetiza utilizando química Fmoc en fase sólida. Después, el péptido se escinde y se analiza mediante espectroscopia de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La purificación por HPLC se logra utilizando una columna YMC C-18 (empaquetamiento de 10  $\mu$ , tamaño de poro 120 Å, 10 X 250 mm) en un sistema tamponador de A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,1 % y B: CH<sub>3</sub>CN/TFA 0,08 %. Las fracciones apropiadas se agrupan, se liofilizan y se someten otra vez a espectroscopia de masas y análisis por HPLC. El péptido se acopla a KLH para la inmunización, a BSA para detección por ELISA, con el reticulador MBS. Se inmunizan conejos a intervalos de 3 semanas y se evalúa el título mediante ELISA utilizando acetal-Asp-Ser-amino-hexanoato-C-amida ("péptido abarcador"). Este péptido corresponde a una secuencia de restos de aminoácido que abarca el sitio de corte y empalme de 0 a 1 de htau40, que produce  $\Delta$ Tau. El mismo péptido abarcador se acopla a un gel de acoplamiento de tiol a través de su resto de cisteína y se usa para preabsorber todos los anticuerpos que no dependen de la presencia de carboxi-Asp libre. Después, los anticuerpos se purifican y se recogen utilizando el péptido restringido. Mientras que el suero crudo muestra una actividad sustancial hacia el péptido que abarca, una vez purificado por afinidad, no hay reactividad del anticuerpo resultante con el péptido abarcador, solo con el péptido restringido. Esto confirma que los anticuerpos monoclonales son específicos para  $\Delta$ Tau y no específicos para el péptido abarcador. Dado que estos anticuerpos no son específicos para el péptido abarcador, estos anticuerpos, además, serían no específicos para htau40, debido a que htau40 tampoco tiene un extremo C libre de  $\Delta$ Tau, el cual se crea por escisión de htau40 en Asp421. Por consiguiente, estos anticuerpos solo reconocen, se unen o muestran reactividad con  $\Delta$ Tau, los restos 416-421, 417-421, 418-421 o 419-421 de  $\Delta$ Tau, y no reconocen, se unen o muestran reactividad con tau40.

30 Para generar anticuerpos monoclonales específicos para el extremo C de  $\Delta$ Tau, se inmunizan ratones a intervalos de 3 semanas usando: H2N-SEQ ID NO:86-amino-hexanoato-C-amida conjugado a BSA, preparado como se describe para la preparación del policlonal. Además, se evalúa el título en cada ratón mediante ELISA como se describe anteriormente. Después de la fusión de las células de bazo de los ratones que presentan el título más alto, se aíslan y exploran varios clones utilizando el método de detección ELISA con péptido abarcador. Las secuencias peptídicas inmunogénicas, correspondientes al extremo C de tau40 y conjugadas a una proteína soporte distinta, tal como la seroalbúmina bovina (BSA) y la ovoalbúmina, se utilizan para confirmar que los anticuerpos monoclonales resultantes son específicos de para extremo C de  $\Delta$ Tau y no específicos para la proteína soporte y htau40.

40 Opcionalmente, la especificidad de los anticuerpos para reconocer selectivamente htau40 escindida en Asp421 (es decir,  $\Delta$ Tau), pero no a tau de longitud completa, se evalúa *in vivo*, utilizando el modelo de traumatismo craneoencefálico, un modelo que conduce a la activación de la caspasa neuronal en ratones. El análisis muestra que los anticuerpos detectan específicamente a tau escindida en Asp421 (es decir,  $\Delta$ Tau), restos 416-421, 417-421, 418-421 o 419-421 de tau40, y no detectan específicamente ni reaccionan de forma cruzada con la tau de longitud completa (es decir, tau40). En otras palabras, estos anticuerpos solo reconocen, se unen o muestran reactividad con  $\Delta$ Tau, los restos 416-421, 417-421, 418-421 o 419-421 de  $\Delta$ Tau, y no reconocen, se unen o muestran reactividad con htau40.

## Ejemplo 2

50 En el Ejemplo 2, se evalúa el potencial terapéutico de una vacuna contra A $\beta$ , tau y en combinación, en un modelo de enfermedad de Alzheimer de ratón triple transgénico (3xTg-EA), que expresa la patología por placas y por ovillos. Una primera meta del Ejemplo 2 es evaluar tales vacunas como preventivas contra la neuropatología y el deterioro cognitivo de la EA. La segunda meta del Ejemplo 2 es evaluar tales vacunas como terapéuticas una vez que se ha establecido la neuropatología de la EA. En el Ejemplo 2, se utiliza la tecnología de vacuna RECALL-Vax del cesionario.

55 El modelo de ratón triple transgénico contiene 3 mutaciones importantes para la patología del Alzheimer (PS1<sub>M146V</sub>,  $\beta$ APP<sub>Swe</sub>, y tau<sub>P301L</sub>) (Oddo *et al.*, 2003). (Dr. Frank LaFerla, UC Irvine). Los ratones se generaron mediante microinyección de dos transgenes ( $\beta$ APP<sub>Swe</sub> y tau<sub>P301L</sub>) en un embrión de una sola célula procedente de un animal homocigótico con inserción de presenilina-1. El gen de presenilina-1 insertado contiene la mutación M146V, que aumenta la cantidad de A $\beta$ 1-42 producida con respecto a A $\beta$ 1-40. A partir de esta estrategia se obtuvieron varias líneas triple transgénicas y estas líneas desarrollan características clave de la neuropatología del Alzheimer en un modo dependiente de la edad. Presentan patología por placas y ovillos, así como disfunción sináptica, incluyendo deficiencia de la PLP (Oddo *et al.*, 2003). Adicionalmente, la formación de placas precede a la formación de ovillos y, así, se imita el desarrollo de la enfermedad en los seres humanos, y se acompaña de una inflamación extensa y un deterioro cognitivo sustancial. Por lo tanto, los ratones 3xTg-EA representan un modelo avanzado de EA.

**Diseño y métodos:**

Objetivo 1: Estudio preventivo sobre las vacunas RECALL-VAX™ en ratones 3xTg-EA.

5 Ratones 3xTg-EA homocigóticos de 6 meses de edad se tratarán con un adyuvante, la vacuna anti-amiloide RECALL-VAX, la vacuna anti-ATau RECALL-VAX o la combinación de la vacuna anti-amiloide y anti- $\Delta$ Tau RECALL-VAX (n=20 por grupo). RECALL-VAX™ es una vacuna patentada propiedad de Intellect Neurosciences, un ejemplo de la cual se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.901.689.

10 Doce meses más tarde, estos ratones 3xTg-EA se analizarán con una serie de tareas cognitivas, como se detalla a continuación. Más tarde, los ratones se sacrificarán y sus cerebros se extraerán, y después se cortarán por la línea media, para análisis patológicos. Además, se extraerá sangre para análisis.

15 Se enviarán dos grupos de ratones 3xTg-EA (n=20 por grupo) a CEA-DSV-I2BM-MIRGen, Francia, para utilizar estrategias de obtención de imágenes por RM y PET traslacionales *in vivo* y *ex vivo*, basadas en biomarcadores que potencialmente se pueden trasladar a ensayos clínicos en seres humanos. Algunos de los biomarcadores potenciales que se pueden usar en las instalaciones de MIRGen incluyen: Atrofia cerebral (RM), obtención de imágenes de placas amiloides (RM, AV45, PET), nivel plasmático de Ac y Tau, Metabolismo cerebral (FDG-PET, autorradiografía 2DG), Transporte axónico, salud neuronal (MEMRI), conducta (LAM), Microhemorragias, Edema angiogénico (RM).

Este objetivo utilizará un total de 120 ratones 3xTg-EA.

25 Objetivo 2: Estudio terapéutico sobre las vacunas RECALL-VAX en ratones 3xTg-EA.

Ratones 3xTg-EA homocigóticos de 12 meses de edad se tratarán con un adyuvante, la vacuna anti-amiloide RECALL-VAX, la vacuna anti-ATau RECALL-VAX o la combinación de la vacuna anti-amiloide y anti- $\Delta$ Tau RECALL-VAX (n=15 por grupo). Seis meses más tarde, los ratones se analizarán con una serie de tareas cognitivas, como se detalla a continuación. Más tarde, los ratones se sacrificarán y sus cerebros se extraerán, y después se cortarán por la línea media, para análisis patológicos. Además, se extraerá sangre para análisis.

Este objetivo utilizará un total de 60 ratones 3xTg-EA.

**35 Ensayos conductuales**Reconocimiento de objeto/lugar/contexto

40 Estas tareas están basadas en la tendencia espontánea de los roedores a explorar un objeto nuevo con más frecuencia que un objeto conocido (Ennaceur y Delacour, 1988) y se ha descubierto que no es dependiente de la amígdala (Moses *et al.*, 2005).

45 Las lesiones de la corteza perirrinal y los estudios de activación neuronal y de respuestas en ratas sugieren que son neuronas corticales y no del hipocampo las que están implicadas en la tarea de reconocimiento de objetos (Aggleton *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 1999). Para la tarea de objeto nuevo, los ratones se familiarizarán con un campo abierto vacío durante un período de 10 minutos. Al día siguiente, los ratones se someterán a una sesión de exploración de 5 minutos en el mismo contexto, con dos objetos idénticos (Objeto A; por ejemplo, dos bolas idénticas o dos dados idénticos) colocados en ubicaciones simétricas en el campo abierto. Noventa minutos y 24 horas más tarde, los animales se someterán a una prueba de fase de retención de 3 minutos, donde estarán expuestos a un Objeto A y también a un objeto nuevo, el Objeto B (para el punto de tiempo de 90 minutos) y el Objeto C (para el punto de tiempo de 24 horas), colocados en las mismas ubicaciones simétricas en el campo abierto.

55 Una versión distinta de la tarea de novedad requiere que los ratones reconozcan que un objeto está colocado en una nueva ubicación (Save *et al.*, 1992; Ennaceur *et al.*, 1997). Esta tarea depende principalmente del hipocampo (Mumby *et al.*, 2002). Para el paradigma de lugar nuevo, los ratones se colocarán otra vez en el campo abierto con dos objetos idénticos (Objeto D), distintos de los objetos utilizados para la tarea de objeto nuevo, durante 5 minutos. 90 minutos más tarde, los animales se someterán a una prueba de fase de retención de 3 minutos, donde se expondrán a los Objetos D nuevamente, pero uno de los objetos se habrá movido de su ubicación original.

60 Otra versión del paradigma de novedad-preferencia requiere que los ratones recuerden un objeto encontrado en un contexto particular (Dix y Aggleton, 1999). Además, se ha demostrado que esta tarea de memoria depende del hipocampo (Mumby *et al.*, 2002). La tarea de contexto nuevo requería que los ratones se familiarizaran con un segundo contexto. Los ratones se colocarán en un segundo campo abierto en una habitación distinta durante 10 minutos. Se presentará a los ratones dos objetos idénticos en el contexto 1 (Objeto E) y después se les presentarán dos objetos idénticos distintos en el contexto 2 (Objeto F). Para la prueba de la fase de retención de 90 minutos, los animales se colocarán en el contexto 1 con el Objeto E y un objeto del contexto 2 (Objeto F).



El tiempo utilizado para explorar el objeto conocido y el objeto nuevo se calculará cuando la exploración es igual a tocar el objeto con la nariz o las patas, u olfatear dentro una distancia de 1,5 cm del objeto. El tiempo utilizado con el objeto nuevo en comparación con el tiempo utilizado con ambos objetos se utilizará como índice de memoria. La puntuación la realizarán de forma independiente dos puntuadores, con ocultación, para eliminar el sesgo experimental.

Laberinto acuático de Morris (adaptado de (Rooyendaal *et al.*, 2003))

10 El laberinto acuático de Morris (LAM) es una prueba para la memoria espacial (es decir, dependiente del hipocampo) y el aprendizaje inducido (es decir, no hipocampo) en roedores. En las últimas dos décadas, muchos estudios han usado esta prueba como una medida fiable del aprendizaje dependiente del hipocampo (D'Hooge y De Deyn, 2001), incluyendo varios modelos transgénicos (Hsiao *et al.*, 1996; Hsiao, 1997).

15 El laberinto acuático es una piscina circular con agua opaca. Los ratones se entrenarán previamente nadando en una plataforma de plexiglás sumergida a 1,5 cm por debajo de la superficie del agua. La ubicación de la plataforma se seleccionará al azar para cada ratón individual a lo largo del entrenamiento. El laberinto está ubicado en una habitación que contiene varias señales visuales fuera del laberinto. Para el entrenamiento espacial, los ratones se someterán a cuatro ensayos por día durante tres días consecutivos. Antes del primer ensayo, el ratón se colocará en la plataforma durante 30 s. En cada ensayo, el ratón se colocará en el tanque en uno de los cuatro puntos de inicio designados en un orden aleatorio. Los ratones podrán encontrar y escapar sobre la plataforma sumergida. Si un animal no encuentra la plataforma dentro de los 60 s, se lo guiará manualmente a la plataforma y permanecerá allí durante 15 s.

25 La retención del entrenamiento espacial se evaluará 1,5 y 24 horas después del último ensayo de entrenamiento. Ambos ensayo de sondeo consistirán en 60 s de nado libre en la piscina con la plataforma retirada. Los ratones se controlarán mediante una cámara montada en el techo directamente encima de la piscina para su posterior análisis. Los parámetros medidos durante la prueba de sondeo incluirán (1) el tiempo utilizado en el cuadrante que contiene la plataforma durante el entrenamiento y (2) el tiempo de latencia hasta cruzar a la ubicación de la plataforma. Los datos de escape se examinarán con un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) que incluye el genotipo (transgénico frente a no transgénico) y el ensayo de sondeo (1,5 y 24 horas).

Evitación inhibitoria pasiva (EI)

35 La tarea de evitación inhibitoria se utiliza en ratones para evaluar principalmente el aprendizaje dependiente de la amígdala (Blanchard y Blanchard, 1972; Phillips y LeDoux, 1992; Holahan y White, 2002). El análisis de EI consiste en una sesión de entrenamiento seguida de una análisis a las 1,5 y 24 horas posentrenamiento. Durante la sesión de entrenamiento, se coloca un ratón en una cámara iluminada y, cuando el ratón cruce hacia el compartimiento oscuro, recibirá una descarga eléctrica en las patas (0,15 mA/1 s). Durante el ensayo, el ratón se colocará otra vez en el compartimiento con luz y se medirá el tiempo de latencia para cruzar hacia el compartimiento oscuro. Esta medida del tiempo de latencia se usará como un índice de la evitación pasiva por miedo.

**b. Marcadores bioquímicos**

45 Mediciones de A $\beta$ : Datos cuantitativos sobre los efectos del compuesto sobre diversas especies de A $\beta$  (por ejemplo, A $\beta$ 40 frente a A $\beta$ P42; A $\beta$  soluble frente a insoluble) (Oddo *et al.*, 2003). La proteína extraída del tejido cerebral de ratones tratados con compuesto se utilizará para generar extractos de proteínas solubles e insolubles y se analizará mediante ELISA de tipo sándwich. Se realizarán transferencias de Western para medir los niveles de equilibrio de la holoproteína APP, los fragmentos C99/C83 y de sAPP $\beta$ , para determinar los efectos del compuesto en estos biomarcadores. Se analizarán las rutas enzimáticas que conducen a la producción de A $\beta$ , así como las enzimas que se sabe que degradan A $\beta$ .

Hiperfosforilación de tau: Debido a que los ratones 3xTg-EA acumulan inclusiones neuronales inmunorreactivas de tau argirofílicas y filamentosas en la corteza y el hipocampo con el aumento de la edad (Oddo *et al.*, 2003), se pueden evaluar los efectos del compuesto sobre la hiperfosforilación de tau como un biomarcador funcional. Esto se logrará con la transferencia de Western cuantitativa con anticuerpos (tales como AT8, AT100 o PHF1), que reconocen específicamente la tau hiperfosforilada. Se analizarán las supuestas tau quinasas y fosfatasa para observar cómo el tratamiento podría estar afectando la fosforilación de tau.

60 **c. Inmunohistoquímica**

Para evaluar las placas y ovillos totales y también la activación microglial, los cerebros de ratones 3xTg-EA se fijarán con paraformaldehído y se cortarán a 55  $\mu$ M. Utilizando diversos anticuerpos contra diversas formas de A $\beta$  (1-40, 1-42 y oligomérica) y formas fosforiladas de tau, se puede visualizar las placas y los ovillos en cuanto a la ubicación y la gravedad dentro del cerebro. Además, se teñirá con anticuerpos contra CD45 en cuanto a la activación microglial, para observar si las placas y los ovillos todavía inician una respuesta inmunitaria. También se analizarán los cambios

en las conexiones sinápticas (PSD-95, sinaptofisina, etc.) y la pérdida neuronal (NeuN, Fluorojade).

Total de animales necesarios: 180 (con un mínimo de 10-15 animales en cada grupo).

**5 Ejemplo 3**

En el Ejemplo 3, se obtendrá la seguridad y eficacia de una vacuna anti-A tau, una vacuna anti-A $\beta$  y una combinación de vacunas anti-A y anti-A $\beta$ . La vacuna anti-A tau comprenderá un péptido inmunogénico de la SEQ ID NO: 116 (H2N-VDDALINSTKIYSYFPSVGPGLIDMVD-OH) y alumbre. La vacuna anti-A $\beta$  comprenderá un péptido inmunogénico de la SEQ ID NO: 117 (H2N-DAEFGPSLVDDALINSTKIYSYFPSV-OH) y alumbre. La vacuna de combinación comprenderá una mezcla de los péptidos inmunogénicos de las SEQ ID NO: 116 y 117, y alumbre. En estas vacunas, el alumbre se utilizará como adyuvante y los péptidos inmunogénicos se utilizarán como agentes activos.

Cada vacuna se administrará a un grupo de ratones LaFerla (es decir, ratones transgénicos que expresan 3 mutaciones importantes para la patología del Alzheimer (PS1<sub>M146V</sub>,  $\beta$ APP<sub>Swe</sub>, y tau<sub>P301L</sub>)). Además, habrá un grupo de control de ratones que no recibirán ninguna vacuna que contenga péptidos de la SEQ ID NO: 116 o la SEQ ID NO: 117. La "vacuna" administrada al grupo de control comprenderá alumbre.

Los estudios conductuales se realizarán a los 9 y 15 meses, para obtener las funciones cognitivas.

Los niveles sanguíneos de A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42,  $\Delta$ Tau, htau40, IgG, IgM y los perfiles de citocinas de la sangre se medirán de 6 meses a 9 meses después de la administración inicial y, después, a los 12 meses, 15 meses y 18 meses después de la administración.

La obtención de imágenes de placas amiloides mediante AV-45-PET (Poisnel *et al.*, AAICD, 2011) se realizarán a los 6 meses, 12 meses y 18 meses, para obtener los niveles de patología amiloide.

El metabolismo cerebral será obtenido mediante FDG-PEG (análisis con la función de entrada tomada del corazón del animal) a los 6 meses, 12 meses y 18 meses, para obtener la eficacia clínica.

Se obtendrán imágenes por RM a los 6 meses, 12 meses y 18 meses, para obtener el grado de inflamación, la anatomía, para detectar el desarrollo de microhemorragias y/o de edemas angiogénicos, de atrofia cerebral, y/o para seguir la evolución de las placas individuales.

Se obtendrá el transporte axónico a los 6 y 18 meses mediante RM, para obtener el nivel de la patología de Tau y A $\beta$ .

Se obtendrán imágenes de las placas por RM a los 6 y 18 meses, utilizando gadolinio.

Tres ratones de cada grupo, incluyendo de un grupo de control, se sacrificarán a los 3 meses, 9 meses, 12 meses y 15 meses, para obtener biomarcadores de las patologías amiloide y de tau. Todos los ratones se sacrificarán a los 18 meses, para obtener biomarcadores de la patologías amiloide y de tau.

Los datos generados se analizarán y, preferentemente, se confirmará la eficacia y seguridad de las vacunas administradas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Intellect Neurosciences Inc.  
Chain, Daniel G.

<120> TRATAMIENTO DE TAUOPATÍAS

<130> 662,1004

<150> 61/438.083

<151> 31-01-2011

<160> 117

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

ES 2 714 692 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HTAU40

5

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
130 135 140

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

ES 2 714 692 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
 385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser

ES 2 714 692 T3

405

410

415

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

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 435 440

<210> 2  
 <211> 410  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Tau 2N3R humana

10

<400> 2

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
 65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
 85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
 100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
 115 120 125

Ser Lys Ser Leu Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
 130 135 140

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

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

ES 2 714 692 T3

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Val Gln Ile 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

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  
 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 Ala His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly  
 370 375 380

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> 3  
 <211> 412  
 <212> PRT

ES 2 714 692 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tau 1N4R humana

5

<400> 3

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Gly 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

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 Leu Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys  
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Leu 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

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  
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

ES 2 714 692 T3

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 Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser  
245 250 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Leu Asp Asn Ile Leu His Val Pro  
260 265 270

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  
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

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  
385 390 395 400

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
405 410

<210> 4  
<211> 383  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau ON4R humana

10 <400> 4

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
1 5 10 15



ES 2 714 692 T3

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Leu 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  
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

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  
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 Ala 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

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Leu 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  
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

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His  
260 265 270

ES 2 714 692 T3

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  
 290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe  
 305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Leu 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  
 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

<210> 5  
 <211> 381  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Tau 1N3R humana

10

<400> 5

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
 20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
 35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
 50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu 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

ES 2 714 692 T3

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  
 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

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  
 195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu  
 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  
 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

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  
 325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser  
 340 345 350

ES 2 714 692 T3

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
 355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu  
 370 375 380

<210> 6  
 <211> 352  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Tau ON3R humana

<400> 6

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 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

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  
 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  
 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

ES 2 714 692 T3

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 Val Tyr Lys Pro Val  
 210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His  
 225 230 235 240

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

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Gly 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  
 305 310 315 320

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

<210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Tau3-13

10

<400> 7

Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp  
 1 5 10

15

<210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Tau4-13

ES 2 714 692 T3

<400> 8

Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp  
1 5 10

5 <210> 9  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Tau5-13

<400> 9

Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp  
1 5

15 <210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau6-13

25 <400> 10

Glu Phe Glu Val Met Glu Asp  
1 5

30 <210> 11  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Tau7-13

<400> 11

Phe Glu Val Met Glu Asp  
1 5

40 <210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau8-13

45 <400> 12

Glu Val Met Glu Asp

1 5

55 <210> 13  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 714 692 T3

<223> Tau9-13

<400> 13

5 Val Met Glu Asp  
1

<210> 14  
<211> 3  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau10-13

15 <400> 14

Met Glu Asp  
1

<210> 15  
<211> 12  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Tau14-25

<400> 15

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp  
1 5 10

30 <210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau14-24

<400> 16

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys  
1 5 10

<210> 17  
<211> 7  
45 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Tau14-23

<400> 17

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu  
1 5

55 <210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 714 692 T3

<223> Tau14-22  
<400> 18

5 His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly Asp  
1 5

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau14-21

15 <400> 19

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu Gly  
1 5

<210> 20  
<211> 7  
<212> PRT  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Tau14-20

<400> 20

His Ala Gly Thr Tyr Gly Leu  
1 5

30 <210> 21  
<211> 6  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau14-19

<400> 21

40 His Ala Gly Thr Tyr Gly  
1 5

<210> 22  
<211> 5  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau14-18

50 <400> 22

His Ala Gly Thr Tyr  
1 5

55 <210> 23  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial



ES 2 714 692 T3

<220>  
<223> Tau14-17

5 <400> 23  
His Ala Gly Thr  
1

<210> 24  
<211> 11  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Tau392-402 de htau40

15 <400> 24  
Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp  
1 5 10

20 <210> 25  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> tau392-401

<400> 25  
Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly  
1 5 10

30 <210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau392-400

40 <400> 26  
Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser  
1 5

<210> 27  
45 <211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau392-399

50 <400> 27  
Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val  
1 5

55 <210> 28  
<211> 7  
<212> PRT  
60 <213> Secuencia artificial

ES 2 714 692 T3

<220>  
<223> tau392-398

5 <400> 28

Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val  
1 5

<210> 29  
<211> 6  
10 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> 392-397

15 <400> 29

Ile Val Tyr Lys Ser Pro  
1 5

20 <210> 30  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> tau392-396

<400> 30

Ile Val Tyr Lys Ser

30 1 5

<210> 31  
<211> 4  
35 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau392-395

40 <400> 31

Ile Val Tyr Lys  
1

<210> 32  
45 <211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> tau392-394

<400> 32

Ile Val Tyr  
1

55 <210> 33  
<211> 11  
<212> PRT

ES 2 714 692 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> tau392-402  
 5 <400> 33  
  
                   Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser  
                   1                  5                  10  
  
 10 <210> 34  
     <211> 10  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
     <223> tau392-401  
  
     <400> 34  
  
                   Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val  
 20                  1                  5                  10  
  
     <210> 35  
     <211> 9  
     <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
     <223> tau392-400  
  
 30 <400> 35  
  
                   Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu  
                   1                  5  
  
 35 <210> 36  
     <211> 8  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
 40 <223> tau392-399  
  
     <400> 36  
  
                   Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp  
                   1                  5  
  
 45 <210> 37  
     <211> 7  
     <212> PRT  
     <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
     <223> tau392-398  
  
     <400> 37  
  
 55 <210> 38  
     <211> 6  
     <212> PRT  
 60

ES 2 714 692 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> tau392-397  
 5 <400> 38  
  
 Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
 1 5  
  
 10 <210> 39  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> tau396-396  
  
 <400> 39  
  
 Pro Gln Leu Ala Thr  
  
 20 1 5  
  
 <210> 40  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> tau392-395  
  
 30 <400> 40  
  
 Pro Gln Leu Ala  
 1  
  
 35 <210> 41  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> 392-394  
  
 <400> 41  
  
 Pro Gln Leu  
 1  
  
 45 <210> 42  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Tau392-402  
  
 <400> 42  
  
 55 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu  
 1 5 10  
  
 <210> 43

ES 2 714 692 T3

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> tau392-401  
 <400> 43  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp  
 10 1 5  
 <210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> tau392-400  
 20 <400> 44  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala  
 1 5  
 <210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> tau392-399  
 <400> 45  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
 35 1 5  
 <210> 46  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> tau392-398  
 <400> 46  
 45 Ser Pro Gln Leu Ala Thr  
 1 5  
 <210> 47  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> tau392-397  
 55 <400> 47  
 Ser Pro Gln Leu Ala  
 1 5  
 60 <210> 48

ES 2 714 692 T3

<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> tau392-396  
  
<400> 48

Ser Pro Gln Leu

10 1  
  
<210> 49  
<211> 3  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau392-395

20 <400> 49

Ser Pro Gln  
1

<210> 50  
25 <211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> tau391-399  
  
<400> 50

Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
1 5

35 <210> 51  
<211> 11  
<212> PRT  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau381-391 de htau40

<400> 51

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5 10

<210> 52  
50 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau382-391

55 <400> 52

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5 10

# ES 2 714 692 T3

<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> tau383-391

10

<400> 53

Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5

<210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> tau384-391

20

<400> 54

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5

25

<210> 55  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> tau381-391

<400> 55

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5

35

<210> 56  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> 386-391

45

<400> 56

Thr Asp His Gly Ala Glu  
1 5

50

<210> 57  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55

<220>  
<223> tau387-391

<400> 57

# ES 2 714 692 T3

Asp His Gly Ala Glu

1

5

5 <210> 58  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> tau388-391  
<400> 58

His Gly Ala Glu

1

15 <210> 59  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> tau389-391  
<400> 59

Gly Ala Glu

1

25 <210> 60  
<211> 11  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau381-391  
35 <400> 60

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser  
1 5 10

40 <210> 61  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> tau381-391  
<400> 61

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser  
1 5 10

50 <210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau383-391



ES 2 714 692 T3

<400> 62

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser  
1 5

5 <210> 63  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> tau381-391

<400> 63

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser  
1 5

15  
  
20 <210> 64  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau385-391

25 <400> 64

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser  
1 5

30 <210> 65  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> tau386-391

<400> 65

Ile Asp Met Val Asp Ser  
1 5

40 <210> 66  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> 387-391

50 <400> 66

Asp Met Val Asp Ser

1 5

55 <210> 67  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 714 692 T3

<223> tau388-391

<400> 67

5 Met Val Asp Ser  
1

<210> 68  
<211> 3  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> tau389-391

15 <400> 68

Val Asp Ser  
1

<210> 69  
20 <211> 11  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> tau381-391

<400> 69

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val  
1 5 10

30 <210> 70  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> tau382-391

<400> 70

40 Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val  
1 5 10

<210> 71  
45 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> tau383-391

<400> 71

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val  
1 5

55 <210> 72  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>

# ES 2 714 692 T3

```

<223> tau384-391
<400> 72
                    Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val
5                    1                    5
<210> 73
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> tau385-391
15 <400> 73
                    Thr Gly Ser Ile Asp Met Val
                    1                    5
<210> 74
<211> 6
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> tau386-391
<400> 74
                    Gly Ser Ile Asp Met Val
                    1                    5
30 <210> 75
<211> 5
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> tau387-391
40 <400> 75
                    Ser Ile Asp Met Val
                    1                    5
<210> 76
<211> 3
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
50 <223> 389-391
<400> 76
                    Asp Met Val
                    1
55 <210> 77
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

ES 2 714 692 T3

<220>  
 <223> tau389-391

5 <400> 77

Asp Met Val  
1

10 <210> 78  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> tau410-421

<400> 78

Asn Val Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
1 5 10

20 <210> 79  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> tau411-421

<400> 79

30 Val Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
1 5 10

35 <210> 80  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> tau412-421

<400> 80

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
1 5

45 <210> 81  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> tau413-421

<400> 81

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
1 5

55 <210> 82  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 714 692 T3

<220>  
 <223> tau414-421  
 5 <400> 82  
  
 Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
 1 5  
  
 <210> 83  
 10 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 15 <223> tau415-421  
  
 <400> 83  
  
 Ser Ile Asp Met Val Asp  
 1 5  
 20  
 <210> 84  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> tau416-421  
  
 <400> 84  
 30  
 Ile Asp Met Val Asp  
  
 1 5  
  
 <210> 85  
 <211> 4  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> tau417-421  
 40  
 <400> 85  
  
 Asp Met Val Asp  
 1  
  
 45 <210> 86  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Péptido inmunizante de TauC3  
  
 <400> 86  
  
 Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp  
 1 5 10  
 55  
 <210> 87  
 <211> 10

ES 2 714 692 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> tau422-432  
  
 <400> 87  
  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu  
 1 5 10  
 10  
 <210> 88  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> tau422-431  
  
 <400> 88  
 20  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp  
 1 5  
  
 <210> 89  
 <211> 8  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> tau422-430  
 30  
 <400> 89  
  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala  
 1 5  
 35  
 <210> 90  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> tau422-429  
  
 <400> 90  
  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu  
 1 5  
 45  
 <210> 91  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> tau422-428  
 55  
 <400> 91  
  
 Ser Pro Gln Leu Ala Thr  
 1 5  
 60  
 <210> 92  
 <211> 5

ES 2 714 692 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> tau422-427

<400> 92

10 Ser Pro Gln Leu Ala  
1 5

<210> 93  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> tau422-426

20 <400> 93

Ser Pro Gln Leu

1

25 <210> 94  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> tau422-424

<400> 94

Ser Pro Gln  
1

35 <210> 95  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> toxina tetánica bacteriana

40 <400> 95

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10

45 <210> 96  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> toxina tetánica bacteriana

50 <400> 96

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10

55 <210> 97  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Virus de la Hepatitis B

<400> 97

ES 2 714 692 T3

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Phe Gln Ser Leu Asp  
 1 5 10 15  
 <210> 98  
 <211> 14  
 5 <212> PRT  
 <213> toxina pertúsica bacteriana  
 <400> 98  
 Val Arg Val His Val Ser Lys Glu Glu Gln Tyr Tyr Asp Tyr  
 1 5 10  
 <210> 99  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> toxina tetánica bacteriana  
 <400> 99  
 Lys Lys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
 1 5 10 15  
 <210> 100  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 25 <213> toxina tetánica bacteriana  
 <400> 100  
 Lys Lys Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys  
 1 5 10 15  
 <210> 101  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 30 <213> toxina pertúsica bacteriana  
 <400> 101  
 Tyr Met Ser Gly Leu Ala Val Arg Val His Val Ser Lys Glu Glu  
 1 5 10 15  
 <210> 102  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 40 <213> Toxina tetánica bacteriana  
 <400> 102  
 Tyr Asp Pro Asn Tyr Leu Arg Thr Asp Ser Asp Lys Asp Arg Phe Leu  
 1 5 10 15  
 <210> 103  
 <211> 24  
 50 <212> PRT  
 <213> toxina pertúsica bacteriana  
 <400> 103



ES 2 714 692 T3

Gly Ala Tyr Ala Arg Cys Pro Asn Gly Thr Arg Ala Leu Thr Val Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Arg Gly Asn Ala Glu Leu  
 20

5 <210> 104  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Virus del sarampión

<400> 104

10 Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val  
 1 5 10 15

15 <210> 105  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> virus del sarampión

<400> 105

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

20 Thr Glu Ser Tyr  
 20

25 <210> 106  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Toxina tetánica bacteriana

<400> 106

30 Trp Val Arg Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr Asn Glu Ser Ser Gln Lys  
 1 5 10 15

35 <210> 107  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Toxina tetánica bacteriana

<400> 107

40 Asp Val Ser Thr Ile Val Pro Tyr Ile Gly Pro Ala Leu Asn His Val  
 1 5 10 15

45 <210> 108  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> *Clamidia trachomatis*

<400> 108

Ala Leu Asn Ile Trp Asp Arg Phe Asp Val Phe Cys Thr Leu Gly Ala  
 1 5 10 15

Thr Thr Tyr Leu Lys Glu Asn Ser  
 20

ES 2 714 692 T3

<210> 109  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Toxina diftérica bacteriana  
 5  
 <400> 109  
 Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Val Ala Ala Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Leu Pro Gly Ile Gly Cys  
 20  
 10 <210> 110  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Toxina diftérica bacteriana  
 15 <400> 110  
 Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala  
 20 25 30  
 Thr Asn Phe Val Glu Ser Cys  
 35  
 20 <210> 111  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> *Plasmodium falciparum*  
 25 <400> 111  
 Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe  
 1 5 10 15  
 Asn Val Val Asn Ser  
 20  
 30 <210> 112  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Schistom mansoni*  
 <400> 112  
 Lys Trp Phe Lys Thr Asn Ala Pro Asn Gly Val Asp Glu Lys Ile Arg  
 1 5 10 15  
 35  
 40 <210> 113  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*  
 <400> 113  
 Gly Leu Gln Gly Lys Ile Ala Asp Ala Val Lys Ala Lys Gly  
 1 5 10

ES 2 714 692 T3

<210> 114  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*  
 5  
 <400> 114  
 Gly Leu Ala Ala Gly Leu Val Gly Met Ala Ala Pro Ala Met Val Glu  
 1 5 10 15  
 Asp Val Asn  
 10  
 <210> 115  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*  
 15  
 <400> 115  
 Ser Thr Glu Thr Gly Asn Gln His His Tyr Gln Thr Arg Val Val Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Ala Asn Lys  
 20  
 <210> 116  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> anti péptido delta tau  
 25  
 <400> 116  
 Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Lys Ile Tyr Ser Tyr Phe Pro  
 1 5 10 15  
 Ser Val Gly Pro Ser Leu Ile Asp Met Val Asp  
 20 25  
 30  
 <210> 117  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> anti-péptide Ab  
 <400> 117  
 Asp Ala Glu Phe Gly Pro Ser Leu Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Ile Tyr Ser Tyr Phe Pro Ser Val  
 20 25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo específico para la proteína tau truncada preovillo soluble, no mostrando dicho anticuerpo unión y/o reactividad para la proteína tau normal, para su uso en el tratamiento o la prevención de la EA, en donde el uso desacelera, reduce o previene la acumulación, la agregación y/o la polimerización de la tau truncada, en donde
- 10 la proteína tau truncada es tau1-421 ( $\Delta$ Tau), o un fragmento C-terminal de la misma, el fragmento C-terminal de la misma es tau411-421, tau412-421, tau413-421, tau414-421, tau415-421, tau416-421, tau417-421 o tau418-421, la proteína tau normal es hTau40, y el anticuerpo reconoce específicamente el fragmento C-terminal en una tau escindida por caspasa, pero no reconoce la misma secuencia en la proteína tau normal.
- 15 2. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es TauC3.
3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento inmunogénico de la tau truncada comprende o consiste en una secuencia de las SEQ ID NO: 83-86 o 116.
- 20 4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se une a un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 412-421, o a un fragmento del mismo, de  $\Delta$  tau y no reconoce la secuencia del péptido sintético cuando está presente internamente en htau40.
- 25 5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 30 6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho anticuerpo se une al neopéptido creado por la escisión de htau en Asp<sub>421</sub> con una constante de equilibrio KD de  $1 \times 10^{-9}$  M a  $1 \times 10^{-11}$  M, según se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial utilizando péptido capturado en un chip de estreptavidina.