



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 146**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03763764 .2**

86 Fecha de presentación : **09.07.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1521831**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2005**

54 Título: **Animales transgénicos que expresan la proteína tau truncada de la enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **12.07.2002 AT A 1053/2002**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2008

73 Titular/es: **Axon Neuroscience Forschungs- und
Entwicklungs GmbH
Rennweg 95B / Ebene 4
A-1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es: **Kontsekova, Eva y
Filipcik, Peter**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

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

Animales transgénicos que expresan la proteína tau truncada de la enfermedad de Alzheimer.

5 Las enfermedades neurodegenerativas representan un grupo heterogéneo de desórdenes neurológicos genéticos y adquiridos, que resultan en un deterioro progresivo cognitivo y motor con inicio a mediados o finales de la vida (1). La causa más común de demencia es la enfermedad de Alzheimer. En menos de un 5% de los casos de enfermedad de Alzheimer están involucrados factores genéticos, el resto de los casos son esporádicos.

10 La proteína tau es la proteína expresada en el sistema nervioso central y desempeña un papel crítico en la arquitectura neuronal estabilizando la red microtubular intracelular. Un deterioro del papel fisiológico de la proteína tau, ya sea por truncamiento, hiperfosforilación o por alteraciones en el balance entre las seis isoformas tau naturales, conlleva a la formación de ovillos neurofibrilares (NFT), neuritas distróficas e hilos del neuropilo. Estas estructuras representan las características distintivas ultraestructurales de la enfermedad de Alzheimer (AD). La subunidad proteica principal de estas estructuras es la proteína tau asociada a microtúbulos (2,3). La cantidad de NFT encontrados en autopsias de pacientes con AD se correlaciona con los síntomas clínicos, incluyendo el declive intelectual. Por lo tanto, la proteína tau desempeña un papel crítico en la patología de AD. El descubrimiento reciente de cosegregación de mutaciones específicas en el gen tau con la enfermedad de demencia frontotemporal con Parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17) ha confirmado que ciertas anomalías en la proteína tau pueden ser una causa principal de neurodegeneración y demencia en los individuos afectados (4,5). Sin embargo, no existe un modelo experimental que se pudiera proponer directamente los detalles del papel de la proteína tau en la patogénesis de AD.

25 Modelos transgénicos recientes de AD están basados en la expresión de proteínas asociadas con FAD (APP, PS1, ApoE, etc.), ya sean mutadas o no. Estos incluyen animales humanizados en uno o en múltiples genes. Sin embargo, ninguno de estos modelos reúne ambas características distintivas de AD, usualmente no muestran patología neurofibrilar y ninguno de ellos incluye la posibilidad de investigación de la función de los factores de riesgo medioambientales, que desempeñan un papel importante en el desarrollo de AD.

30 Los modelos animales disponibles actualmente que muestran algunos cambios neurofibrilares están basados únicamente en la expresión transgénica de tau mutada derivada de la demencia frontotemporal vinculada al cromosoma 17 (FTDP17). Un ejemplo típico de este grupo es el ratón transgénico JNPL3 (6). Otra prueba sobre el papel de tau mutada ha sido publicada recientemente por Goedert y Spillantini (7).

35 En otro modelo transgénico animal fue investigada la sobreexpresión de proteína tau con cuatro regiones repetidas. Se informó de una axonopatía prominente en el cerebro y médula espinal y se demostró que una sobreexpresión de la isoforma de la proteína tau con cuatro regiones repetidas es suficiente para alterar la fisiología de las neuronas. En el modelo, fueron documentadas dilataciones axonales con acumulación de neurofilamentos en las neuronas del sistema nervioso central, sin embargo, sin formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales (8).

40 El ratón transgénico fue también producido para examinar la función celular normal de tau y su papel en las patogénesis. El ratón transgénico sobreexpresa un transgén genómico de tau y también un transgén de ADNc de tau. La comparación de los dos modelos muestra que la distribución de tau es similar en ambas líneas transgénicas. Fueron encontradas inflamaciones axonales inmunorreactivas con tau en la espina dorsal de los ratones con ADNc, lo que correlaciona con una anomalía en las extremidades posteriores, mientras que en los ratones genómicos no fue observada ninguna neuropatología (9).

50 A pesar de la ventaja de la rata como modelo experimental en neurobiología en comparación con ratones, es sorprendente que no se haya producido ningún modelo transgénico de tau para la patología neurofibrilar. En general, es considerablemente menor la cantidad de modelos de ratas transgénicas de neurodegeneración producidos hasta ahora. Ninguno de ellos recapitula la patología tau, que es típica de AD.

55 Czech C y otros (12) describieron un modelo de rata transgénica que comprende mutaciones en el gen codificado para la presenilina 1 (SP1). PS1 es considerada una causa para la mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer familiar con inicio temprano, sin embargo, el modelo publicado no muestra suficientes signos de patología asociada a AD. Echeverría V y Cuello AC. (13) comentan sobre el papel de la acumulación intracelular de amiloide beta y el posible papel neuropatológico de la acumulación intracelular de amiloide beta en la enfermedad de Alzheimer. Ellos presentan observaciones recientes de un modelo de rata transgénica con un fenotipo de acumulación intracelular de fragmentos A-beta en neuronas del hipocampo y de la corteza, sin embargo, sin formación de placa y NFT. Por lo tanto, para ratas, que es el segundo animal más utilizado en estudios transgénicos, se aplica lo mismo que para ratones: no existe una rata transgénica descrita en la literatura científica que pudiera expresar la proteína tau truncada y que muestre formación de NFT.

65 Hasta ahora no existe un modelo experimental disponible para la investigación de la etiología de AD en relación con hipertensión u otros factores de riesgo como diabetes y dislipidemia, que están asociados a AD. El contexto genético de los animales transgénicos experimentales desempeña un papel en el desarrollo de modelos transgénicos adecuados.

Es bien conocido que AD está asociada con ciertos factores de riesgo medioambientales. Se ha demostrado en estudios epidemiológicos que los factores de riesgo de enfermedades vasculares y apoplejía están asociados con el deterioro cognitivo y la enfermedad de Alzheimer; además, la presencia de enfermedades cerebrovasculares intensifica la presencia y severidad de los síntomas clínicos de la enfermedad de Alzheimer (14). Otro vínculo entre la hipertensión y la demencia del tipo AD se indica en un Estudio Róterdam (15).

El documento WO 01/53340 A se refiere a ratones transgénicos que expresan la proteína tau humana. La proteína tau humana puede estar en las seis isoformas o varios mutantes de la misma.

El documento WO 01/65252 A también se refiere a un modelo de ratones transgénicos que expresan al menos una isoforma de la proteína tau humana.

El documento WO 01/02552 A se refiere a un modelo transgénico animal que expresa la proteína tau, aumentando o inhibiendo la hiperfosforilación de tau.

Lewis y otros (Science 293(2001): 1487-1491) dieron a conocer el cruzamiento de dos ratones transgénicos diferentes, uno teniendo una proteína tau mutante (mutante P301L) y un ratón mutante APP resultando en una progenie mutante doble.

El documento WO 96/307366 A se refiere a una prueba de identificación de agentes que modulan o inhiben la asociación tau-tau, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de tau a tubulina.

Novak y otros (EMBO J.12(1)(1993): 365-370) dan a conocer diferentes isoformas de tau.

El documento WO 01/18546 da a conocer varias formas truncadas de péptidos de tau.

Por lo tanto, es importante desarrollar un modelo experimental para AD, que pudiera imitar las principales características patológicas de la enfermedad y que simultáneamente permita la expresión de factores medioambientales asociados con la etiología de AD.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un modelo experimental que refleje lo más cercano posible las características distintivas de AD y también el sistema de ensayos para sustancias para el tratamiento, prevención y diagnóstico de AD.

La presente invención se refiere a un animal transgénico no humano que expresa ADNc que codifica para la proteína tau de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro de un animal transgénico. Estos animales muestran una actividad patológica NF en sus cerebros. La presente invención, además, se refiere a un animal transgénico, que puede ser utilizado como sistema de ensayo de selección en el proceso de identificación de sustancias que mejoren el aprendizaje y la memoria, inhiban la neurodegeneración y disminuyan la velocidad de formación de los ovillos neurofibrilares (NFT) y su eliminación del cerebro. Los animales pueden ser utilizados para la identificación de sustancias para la prevención, tratamiento y diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente tauopatías y AD. Los animales transgénicos también pueden ser utilizados para investigar la influencia de factores de riesgo asociados a AD sobre el desarrollo de AD. Otro uso de los animales se encuentra en el proceso de identificación de fármacos objetivo.

La presente invención describe la ingeniería de animales transgénicos produciendo cambios en AD inducidos por el transgén específico, asemejando la enfermedad de Alzheimer en estos animales. Esto proporciona una herramienta de investigación para el descubrimiento y desarrollo de fármacos y para el diagnóstico y para un estudio *in vivo* más a fondo del papel de las proteínas tau normales y durante la enfermedad.

La presente invención se basa en una inducción de la actividad patológica de NF en el cerebro de animales únicamente mediante la expresión de la proteína tau de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro de los animales transgénicos. Las características distintivas de AD son inducidas en animales, los que son propensos a la inducción de factores de riesgo asociados a la etiología de AD, lo que representa otra ventaja de la presente invención.

Todos los términos técnicos y científicos utilizados en la descripción de las realizaciones preferentes -salvo que se especifique lo contrario- tienen el mismo significado como es comúnmente entendido en el campo de la técnica a la que pertenece la invención. Los métodos preferentes, los procedimientos de laboratorio en el cultivo celular, genética molecular, bioquímica y química de ácidos nucleicos y los materiales son descritos en la invención, pero cualquier método y materiales similares o equivalentes pueden ser utilizados en los ensayos de la presente invención. Para los procedimientos como la preparación de ácidos nucleicos recombinantes, análisis bioquímico, cultivo celular e incorporación transgénica, como electroporación, lipofección y microinyección fueron utilizadas técnicas estándar.

El término "tau de Alzheimer" se refiere al grupo de isoformas de la proteína tau específicamente truncadas por ingeniería genética que corresponde a aquellas presentes exclusivamente en un cerebro enfermo de AD. Tau de Alzheimer es capaz de inducir actividad NF en el cerebro por sí misma o en combinación con otras moléculas. Tal como se utiliza en este documento, el término proteína tau de Alzheimer se refiere al grupo de formas truncadas de tau presente en el tejido cerebral humano enfermo de AD.

El término “transgén” es utilizado en este documento para describir al material genético, que ha sido insertado artificialmente en el genoma de una célula, particularmente una célula de mamífero, para su implantación en un animal vivo. Para países específicos, puede ser necesario excluir específicamente cierto contenido de este aspecto, tal como las células madres totipotentes humanas como tales o los procesos que conducen a dichas células, comprendidos en el Art. 6 (1) y (2) de la Directiva EC 98/44/EC.

Por “enfermedad de Alzheimer” (abreviada en este documento como “AD”) se entiende una condición asociada con la formación de ovillos neurofibrilares y placas de amiloides beta, así como al deterioro tanto del aprendizaje como de la memoria. “AD”, tal como se utiliza en este documento, se entiende que abarca tanto a AD como a las patologías del tipo AD, es decir, enfermedades del sistema nervioso central con síntomas similares a AD.

Por “actividad neurofibrilar” (abreviada en este documento como actividad “NF”) se entiende una condición asociada con la formación de ovillos neurofibrilares en el sistema nervioso central con síntomas similares a AD.

Por “síntomas similares a AD” y “fenómenos asociados con AD” se entiende un evento estructural, molecular o funcional asociado con AD, particularmente un evento que es fácilmente evaluable en un modelo animal. Dichos eventos incluyen, sin constituir limitación, patologías neurofibrilares, déficit de aprendizaje y memoria y otras características asociada a AD.

Por “animal transgénico” se entiende a un animal no humano, usualmente un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster, etc.) que tiene una secuencia de ácido nucleico no endógeno (es decir, heterólogo) presente como un elemento extracromosomal en una parte de sus células o integrado de manera estable en la línea germinal del ADN (es decir, en la secuencia genómica de la mayoría o de todas sus células). Un ácido nucleico heterólogo es introducido en la línea germinal de dichos animales transgénicos mediante manipulación genética, por ejemplo, de embriones del animal hospedero.

Por “construcción” se entiende una secuencia de ácido nucleico recombinante, generalmente secuencias de ADN recombinante, promotor operable unido a un tejido específico o general, que es generado con el propósito de la expresión de una secuencia o secuencias de nucleótidos específicos, en células de mamífero, o que va a ser utilizado en la construcción de otras secuencias de nucleótidos recombinantes.

La presente invención da a conocer la estructura, secuencia y método de generación de construcciones de ADN utilizadas para la preparación de animales transgénicos, que están caracterizadas por los siguientes aspectos:

Un animal transgénico no humano, cuyas células germinales y/o somáticas comprenden una construcción de ADN que contiene una región que codifica que conlleva a la expresión de moléculas tau truncadas en los terminales N- y C-, en el que

- la región que codifica está truncada al menos 30 nucleótidos río abajo del codón de inicio y truncada al menos 30 nucleótidos río arriba del codón de parada de la longitud total de la secuencia de ADNc tau que codifica para la proteína tau con 4 repeticiones y con 3 repeticiones, respectivamente,
- el núcleo tau truncado de manera mínima abarca un fragmento de proteína que es codificado por SEQ ID No.9,
- dicha construcción de ADN codifica para una proteína, que tiene una actividad que produce una patología neurofibrilar (NF) cuando es expresada en células cerebrales de dicho animal.

Esta actividad que produce una patología NF puede ser cuantificada mediante el conteo de los ovillos neurofibrilares por la región seleccionada de cerebro, por ejemplo, utilizando el análisis estereológico. Alternativamente, pueden ser utilizadas pruebas de neurocomportamiento para una evaluación confiable de los resultados cognitivos en el aprendizaje de tareas dirigidas a la memoria.

Construcciones de ADN tau específicamente preferibles, según la presente invención comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID No. 1 a la 14. Las secuencias son representadas en la Figura 1.

En una realización preferente de la presente invención, dicha construcción de ADN representa un grupo de ADNc doblemente truncado en los terminales N- y C-, que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos: (Derivados de tau de 4 repeticiones (tau 43) son identificados como R4 y derivados de tau de 3 repeticiones (tau 44) son identificados como R3). La numeración utilizada en este documento se deriva del ADNc tau de tamaño completo descrito por Goedert y otros (24):

ES 2 304 146 T3

SEQ ID NO: 1 (91-1059, R4)

ATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGAAGCAGGCATTG-
 GAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGT-
 CAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAG
 ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
 GATTCCAGCAAAAACCCGCCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
 CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCC
 GTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTA CTCCAC-
 CCAAGTCGCGCTCTTCCGCCAAGAGCCGCCCTGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCT-
 GAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTG
 CAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATA-
 TCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT-
 GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAA
 TCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCAC-
 CCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGC-
 CAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCT
 CCACGGCATCTCAGCAATGTC

SEQ ID NO: 2 (205-999, R4)

ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
 GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGC-
 CACCAGGATTCCAGCAAAAACCCGCCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAA
 TCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCAC-
 CCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTA CTCCAC-
 CCAAGTCGCGCTCTTCCGCCAAGAGCCGCCCTGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAA
 TGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGT-
 GCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATA-
 TCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGAC
 CTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG-
 GAAGTAAAATCTGAGAAGCT-

TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTG-
 GCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGC-
 CAAGACAGACCACGGGGCGGAG

ES 2 304 146 T3

SEQ ID NO: 3 (277-999,R4)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
 GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
 CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGC-
 CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
 GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGCCCCCGTGC-
 CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
 CGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGT-
 GTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAAC-
 CAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAG-
 GAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACA-
 GAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAG-
 GAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGAC-
 CACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 4 (205-1089,R4)

ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
 GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
 CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT-
 GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG-
 GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCCAAGAAGGTG-
 GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAGACAGC-
 CCCCCTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
 GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCT-
 TAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCG-
 GCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCT-
 CATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAATCTGAGAAGCT-
 TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTG-
 GCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGC-
 CAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGG-
 GACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGAC

ES 2 304 146 T3

SEQ ID NO: 5 (277-1089, R4)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
GATTCCAGCAAAAACCCCGCCGCTCCAAAGACACCACCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGC-

CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCCAACCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCGCTCTTCGCGCAAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCCGTGC-
CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCC
GGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGT-
GTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAATAGTCTACAAAC-
CAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGG
AGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGAT-
TGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAAC-
CCACAAGCTGACCTTCCGCGGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTAC
AAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCTCCACCG-
GCAGCATCGACATGGTAGAC

SEQ ID NO: 6 (715-999, R4)

ATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAG-
GTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGTCCCTGGACA
ATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGC-
GAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 7 (709-999, R4)

GATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAATAGTCTACAAACCAGTTGACCT-
GAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGC-
CAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGTCCC
TGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
GACCTTCCGCGGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 8 (715-954, R4)

ATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAG-
GTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACAGGAGGTGGCCAGGTG-
GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGTCCCTGGACA
ATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTG

ES 2 304 146 T3

SEQ ID NO: 9 (742-930,R4)

GTGCAAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAG--
 5 GCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAATCTGAGAAGCT~
 TGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACCTCCCTGGC
 GGAGGAAAT

SEQ ID NO: 10 (91-966,R3)

15 ATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGAAGCAGGCATTG--
 GAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGT--
 CAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG--
 20 GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC--
 CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCGCCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT--
 GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG--
 25 GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG--
 GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGC--
 CCCCCTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT--
 GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT--
 30 GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG--
 GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG--
 GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT--
 35 GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGC--
 CAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTC

SEQ ID NO: 11 (205-906,R3)

45 ATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG--
 GTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC--
 CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCGCCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT--
 GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG--
 50 GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG--
 GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGC--
 CCCCCTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT--
 GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT--
 55 GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG--
 GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTG--
 GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT~
 60 GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

ES 2 304 146 T3

SEQ ID NO: 12 (277-906, R3)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
 GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
 5 CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCCGGCAGC-
 CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
 GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCGTCAGACAGCCCCCGTGC-
 10 CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
 CGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGT-
 GTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCT-
 GAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCTGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCAC-
 15 CCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGC-
 CAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAG

SEQ ID NO: 13 (205-996, R3)

ATGGTCAGTAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATG-
 25 GTAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGC-
 CAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGT-
 GAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG-
 GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTG-
 30 GCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCGTCAGACAGC-
 CCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCT-
 GAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGT-
 35 GACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTG-
 GAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCTGAAGATTGGGTCCCTG-
 GACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCT-
 GACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGC-
 40 CAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCTCCACCG-
 GCAGCATCGACATGGTAGAC

SEQ ID NO: 14 (277-996, R3)

ATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAG-
 GATTCCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAAT-
 50 CAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCCGGCAGC-
 CGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTG-
 GTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCGTCAGACAGCCCCCGTGC-
 CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGC-
 55 CGGGAGGCGGGAAGGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGT-
 GTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCT-
 GAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCTGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCAC-
 CCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGC-
 60 CAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGG-
 GACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGAC

Las secuencias truncadas de tau pueden estar adaptadas a la célula hospedera específica a la que se transfiere la construcción. (uso de codones, preferencias de codones, adaptaciones homólogas (intercambio de uno o más de los codones humanos con el codón de la célula hospedero, si presentan diferencias).

Características preferentes de las construcciones:

Las secuencias de ADNc anteriores están vinculadas a secuencias reguladoras con el fin de guiar a una expresión de la proteína tau truncada en el cerebro. La modificación del gen Thy-1 (25) se realizó de tal manera que la secuencia reguladora, que dirige la expresión en las células T fue eliminada y la secuencia de ADNc truncada fue introducida entre los sitios de restricción Spe-I y Xho-. La construcción modificada fue despojada de secuencias procariotas e introducida en el pronúcleo masculino mediante microinyección. Cualquiera de los promotores funcionales o complejos promotor-potenciador puede ser utilizado para la expresión de los ADNc tau truncados descritos anteriormente.

La presente invención también da a conocer un método para la preparación y evaluación de moléculas, según la presente invención, caracterizado por las siguientes etapas:

- a) construcción de plásmidos recombinantes procariotas para la clonación, que portan secuencias de codificación para una molécula tau doblemente truncada con delecciones que cubren al menos los primeros 30 y los últimos 30 nucleótidos de moléculas de ADNc tau de tres o cuatro repeticiones,
- b) construcción de plásmidos eucariotas para la expresión y secuencias de ADNc respectivas de moléculas tau y la combinación de las mismas,
- c) crecimiento de bacterias que contienen dichos plásmidos y amplificación de los plásmidos y su extracción en altas cantidades,
- d) transfección de dicha construcción génica en células COS-7 y su análisis utilizando la técnica de "Western blot",
- e) aislamiento y purificación de la construcción génica de tal manera que son excluidas todas las secuencias procariotas y dilución de los transgenes en una solución tampón a una concentración adecuada para la microinyección (ver Ejemplo 1),
- f) verificación de la construcción génica destinada para la microinyección.

Esto se realiza mediante análisis de restricción, secuenciación génica y análisis de proteínas después de transfecciones transientes en células de mamíferos, después de lo cual se evalúa el tamaño correcto de las proteínas y su reactividad con anticuerpos monoclonales específicos (ver Ejemplo 1, Figura 2.b).

La presente invención, por lo tanto, da a conocer un animal transgénico no humano cuyas células germinales y/o somáticas comprenden la construcción de ADN que codifica para la proteína tau de Alzheimer, que puede ser utilizado como modelo animal adecuado de la enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un animal transgénico no humano en el que todas las células germinales y/o somáticas comprenden moléculas de ADNc de tau humanas truncadas. La secuencia de ADNc de tau de Alzheimer humano clonada se une a una secuencia promotora, que dirige la expresión de tau de Alzheimer en tejidos específicos o de manera ubicua.

Los animales transgénicos de la presente invención son manipulados utilizando procedimientos habituales bien conocidos de microinyección en el pronúcleo masculino de embriones de ratas de un día de fertilizados. Los transgenes pueden ser introducidos en la células embrionarias también mediante otros métodos conocidos en el estado de la técnica, que incluyen transfección, lipofección, electroporación y con la ayuda retrovirus o mediante otros medios. Los embriones que portan el transgén entonces pueden ser implantados en animales pseudopreñados.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un método para la genotipificación de animales recién nacidos. El análisis de PCR utilizando oligonucleótidos específicos que permiten una amplificación de secuencias blanco del transgén, por lo tanto, es empleado para este propósito. Los oligonucleótidos empleados para la genotipificación fueron diseñados de tal manera que el sitio de iniciación de la transcripción del transgén, que incluye el codón ATG y la secuencia Kozak, pudiera ser verificado eventualmente mediante secuenciación de ADN del producto de PCR (par iniciador A). Además, un iniciador se alinea con el promotor heterogéneo y otro iniciador se alinea con la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína tau de Alzheimer. Un criterio de diseño similar fue aplicado para el codón de parada (par iniciador B). Por lo tanto, de esta manera se le dar seguimiento a la integridad del transgén. Por lo tanto, las secuencias de los oligonucleótidos de diagnóstico son las siguientes:

Par iniciador A:

Sentido: 5'-GTGGATCTCAAGCCCTCAAG-3'

Antisentido: 5'-GATCCCCTGATTTTGGAGGT-3'

El tamaño esperado del producto de PCR es de 235 nucleótidos.

Par iniciador B:

Sentido: 5'-AAGGTGACCTCCAAGTGTGG-3'

5 Antisentido: 5'-GGTATGCATGGAGGGAGAAG-3'

El tamaño esperado del producto de PCR es de 438 nucleótidos.

10 La presencia del fragmento de PCR, por lo tanto, es específica de los animales con el transgén integrado en el genoma (ver Ejemplo 2)

Los animales fundadores pueden ser utilizados para la reproducción con animales de tipo salvaje para producir la generación de animales F1, que son heterocigóticos para el transgén. En realizaciones posteriores, estos animales heterocigóticos pueden entrecruzarse para obtener los embriones transgénicos viables cuyas células somáticas y germinales son homocigóticas para los genes que codifican para la proteína tau de Alzheimer.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer animales no humanos cuyas células germinales y somáticas expresan de manera transiente o estable dicha construcción de ADN que codifica para la proteína tau de Alzheimer y que exhiben una patología NF en el cerebro. El animal preferente de la presente invención es una rata, en la que la proteína codificada por dichas moléculas de ADN es expresada en el cerebro.

La realización más preferible de la presente invención es un animal transgénico no humano, en el que la proteína tau de Alzheimer codificada por dichas moléculas de ADN es expresada en el cerebro del animal. La expresión de tau de Alzheimer fue detectada por varios anticuerpos monoclonales como se describe en el Ejemplo 3 y se documenta en la Figura 3. La expresión de la proteína en diferentes regiones del cerebro del linaje transgénico es documentada en la Figura 4.

La presente invención, por lo tanto, da a conocer un animal transgénico no humano, en el que las moléculas de ADN que codifican para la proteína tau de Alzheimer están integradas de manera estable en el genoma de dichos animales o de lo contrario presentes en el núcleo celular para ser transcritas. Dichos animales están caracterizados por los siguientes atributos:

- los transgenes son transmitidos a las siguientes generaciones de animales según las leyes mendelianas formando un linaje transgénico (ver Ejemplo 4)
- el transgén heredado expresa proteínas truncadas en los cerebros de los animales fundadores y la progenie, como se muestra en el Ejemplo 3, Figura 4.

La presente invención, por lo tanto, da a conocer animales transgénicos no humanos que exhiben una patología neurofibrilar en el sistema nervioso central (CNS). Dichos animales están caracterizados por los siguientes atributos:

- La expresión de las proteínas tau truncadas provoca la formación de una patología neurofibrilar (Ejemplo 5)
- La PHF1 inmunorreactiva a NFT mostró que la tau endógena normal de rata participa en la formación de NFT (Ejemplo 5)
- Los ovillos neurofibrilares están presentes como inclusiones intracelulares y filamentos en las neuronas del CNS y son homólogos a NFT de cerebros humanos enfermos de AD.
- La inmunofluorescencia reveló la presencia de pequeñas estructuras en forma de varillas similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer preclínica -observada en tejido cerebral humano (ver Ejemplo 5).

En la realización preferente de la presente invención, los animales transgénicos exhibieron dicha neuropatología en forma de ovillos neurofibrilares, ovillos fantasmas e hilos del neuropilo, que son sensibles al ácido fórmico. Los ovillos neurofibrilares están compuestos de una acumulación anormal de filamentos intraneuronales. Los componentes del ovillo están constituidos por tau de Alzheimer, así como por moléculas tau normales. Dichos animales transgénicos sirven como un sistema modelo adecuado para el estudio de la enfermedad de Alzheimer y para el desarrollo de sustancias terapéuticas, preventivas y de diagnóstico.

La presente invención da a conocer un animal transgénico que desarrolla una patología NF, y que tiene un contexto genético que permite la inducción de factores de riesgo asociados con AD, representando, de esta manera, un modelo de la enfermedad para humanos.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un animal transgénico no humano, en el que el contexto genético, en el que las moléculas de ADN están integradas de manera estable en el genoma del animal espontáneamente hipertenso, o de lo contrario, presentes en el núcleo celular para ser transcritas dentro del contexto genético específico.

Otro aspecto de la presente invención es dar a conocer un modelo animal que comprende la combinación de factores genéticos y otros factores de riesgo asociados con AD como los siguientes:

- hipertensión, que es el factor de riesgo más común de AD,
- diabetes, que puede ser inducida mediante dieta (la diabetes es un factor de riesgo importante de AD),
- hipercolesterolemia, que puede ser inducida mediante dieta (otro factor de riesgo importante de AD).

Dichas situaciones patológicas pueden ser fácilmente inducidas en el modelo animal que se da a conocer. Ejemplos adecuados fueron reportados previamente en la literatura (por ejemplo, en 26, 27, 28).

Además, el modelo animal que se da a conocer es el primer modelo animal que expresa una patología neurofibrilar en el contexto genético de SHR.

Según otro aspecto, la presente invención da a conocer un animal que representa un modelo experimental de la enfermedad de Alzheimer esporádica, dicho modelo permite una evaluación del papel de los factores de riesgo asociados con el desarrollo de AD. Los factores de riesgo desempeñan un papel crítico en la inmensa mayoría de los casos de AD, por lo tanto, el modelo puede ser considerado como un modelo de AD esporádica, que representa el 90% de los casos de neurodegeneraciones de AD.

En otra realización preferente, la presente invención da a conocer un método de identificación y validación de sustancias para el tratamiento, prevención y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, para el tratamiento y la prevención de tauopatías, preferiblemente AD, para el desarrollo de marcadores de diagnóstico y sondas para la detección de tauopatías, preferiblemente AD, y de sustancias para el tratamiento de hipertensión, diabetes, dislipidemia y hipercolesterolemia en combinación con tauopatías, preferiblemente AD, que comprende:

- evaluación de sustancias mediante:
 - detección de cambios de una patología neurofibrilar en dichos animales
 - medición de cambios neurocomportamentales en animales transgénicos
 - medición del nivel cognitivo de los animales transgénicos
 - medición bioquímica de marcadores de AD específicos en tejido animal y fluidos corporales.

La presente invención, por lo tanto, da a conocer un ensayo *in vivo* para evaluar la eficacia de sustancias o terapias, en particular para la reducción de NFT, o terapias de prevención. Los animales pueden ser utilizados para la identificación de sustancias o terapias para las enfermedades neurodegenerativas, en particular tauopatías, preferiblemente AD y otras enfermedades neurodegenerativas acompañadas por la formación de ovillos neurofibrilares.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un sistema modelo que consiste en animales transgénicos, células y ensayos, que son útiles en el estudio de la etiología y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los ensayos son también útiles para la identificación de sustancias que inhiben la formación de patologías neurofibrilares y otros efectos terapéuticos de las sustancias.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer una línea celular totipotente no humana que comprende una construcción que codifica para tau truncada, como se mencionó anteriormente.

Los animales transgénicos de la presente invención y las células animales derivadas de los mismos son usadas para la identificación de compuestos con un efecto potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer utilizando metodologías estándar. El compuesto es administrado a los animales o introducido en el medio de cultivo durante un período de tiempo y en varias dosis, después los animales o las líneas celulares son examinados en cuanto a alteraciones en la histopatología y a la expresión de tau de Alzheimer respectivamente. Además, la capacidad para realizar pruebas neurocomportamentales a los animales transgénicos permite hacer un seguimiento de la función cognitiva seguido de un tratamiento con agentes terapéuticos potenciales. La identificación de compuestos permite la selección de agentes específicos para la prevención o tratamiento o diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Muchas variantes de métodos de identificación son conocidas por un experto en la materia y pueden ser aplicadas dentro del alcance de la presente invención.

El modelo transgénico animal de la presente invención puede también ser utilizado para desentrañar la cascada molecular de eventos que conllevan a la neurodegeneración y a la enfermedad de Alzheimer, de tal manera que pueden ser identificados blancos terapéuticos.

Otro aspecto de la invención es dar a conocer un ensayo *in vitro* basado en líneas celulares derivadas de un animal transgénico o línea celular derivada de un embrión de rata transgénica de la presente invención, en el que dicho ensayo se emplea como herramienta para la identificación y validación para el descubrimiento y desarrollo del diagnóstico de Alzheimer y marcadores. Dicho ensayo *in vitro* está basado en líneas celulares y puede ser también empleado como herramienta para la identificación y validación para el descubrimiento de fármacos terapéuticos y preventivos anti-Alzheimer.

Los siguientes ejemplos son presentados a manera de ilustración y, debido a que otras realizaciones serán obvias para un experto en la materia, lo siguiente no puede ser interpretado como una limitación del alcance de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Esquema del ADNc de la proteína tau de Alzheimer empleado para la ingeniería de las construcciones de expresión génica, que fueron utilizadas en la producción de los animales transgénicos de la presente invención.

Figura 2

Preparación y verificación de las construcciones génicas utilizadas en la producción de los animales transgénicos. La construcción de los animales transgénicos fue realizada mediante microinyección pronuclear de las construcciones génicas clonadas, que contienen la secuencia que codifica para la tau de Alzheimer. Las construcciones génicas fueron verificadas mediante análisis de restricción y PCR utilizando iniciadores específicos del transgén (panel A, gel de agarosa del amplificado de PCR y fragmento de ADN) así como mediante secuenciación de ADN para controlar las mutaciones potenciales. La verificación fue seguida de la purificación de las construcciones génicas (panel B, gel de agarosa del fragmento de transgén puro) y transfecciones transientes en células de mamíferos (panel C, verificación por "Western blot" de la expresión de la proteína). Después que los ensayos se completaron, las construcciones fueron despojadas de secuencias procariotas e inyectadas en embriones de rata de un día de edad. La parte inferior del diagrama de flujo muestra un procedimiento simplificado de producción de los animales transgénicos.

Figura 3

Genotipificación de los animales transgénicos fundadores y de la generación F1 de los animales transgénicos. El panel "A" muestra los controles para el experimento de genotipificación (+C, control positivo; NAC, control negativo de la amplificación; NTC, control negativo de la plantilla). El panel "B" muestra los resultados de la genotipificación por PCR. La muestra número 12 representa un animal positivo al transgén. El panel "C" esboza los experimentos de reproducción realizados para confirmar los animales fundadores. Además, el panel muestra la línea transgénica de la presente invención que ha transmitido el transgén a las siguientes generaciones según las leyes de Mendel.

Figura 4

Expresión de la proteína tau de Alzheimer en el cerebro de ratas transgénicas. El panel izquierdo representa un análisis "Western blot" y el panel derecho presenta la cantidad total de proteína aplicadas por carril. La proteína tau de Alzheimer migra a un tamaño de 35 kD (carril 1, flecha), detectada por el anticuerpo monoclonal pan-tau DC25. Para el "Western blot" fue empleada la técnica de ECL, y fue observada una señal específica después de 1 minuto de exposición. Fueron aplicados 7,5 μ g de proteínas totales extraídos de lisados de cerebro de animales transgénicos (carril 1), mientras que fueron aplicados 25 μ g de proteínas de animales controles tipo salvajes. M, marcador de peso molecular.

Figura 5

Expresión de la proteína tau de Alzheimer en diferentes regiones del cerebro de ratas transgénicas. Análisis "Western blot" de lisados de proteínas totales de regiones del cerebro de ratas transgénicas. Carril 1, lisado completo de cerebro de un animal fundador (generación F0) -10 μ g de proteínas; carril 2, lisado total de cerebro de un animal transgénico de la generación F2; carriles 3 a 6, lisados de proteínas de animales transgénicos de la generación F2: 3-hipocampo, 4-área subcortical, 5-corteza cerebral, 6-médula espinal y médula; carriles 7 y 8 representan lisados de cerebro de controles no transgénicos compañeros de camada de la generación F2.: 7-corteza, 8-cerebelo (la proteína total aplicada por los carriles 2 a 8 fue de 20 μ g).

Figura 6

Teñido con plata de secciones cerebrales de animales transgénicos y animales no transgénicos controles tipo salvajes. Fueron detectadas inclusiones intracelulares y filamentos neurofibrilares en las neuronas del CNS de ratas trans-

génicas, (paneles B y C, animal transgénico). Ratas tipo salvaje no mostraron estas estructuras en el área homóloga del cerebro (A, control tipo salvaje). Aumento: 200x (A y B), 400x (C).

Figura 7

Detección de ovillos neurofibrilares utilizando el anticuerpo monoclonal pan-tau DC25 en el sistema nervioso central de animales transgénicos. El mAb DC25 reconoce NFTs en neuronas de pacientes con AD. Las estructuras equivalentes son reconocidas en el cerebro de ratas transgénicas (paneles B y D). Ratas del tipo salvaje no mostraron ninguna estructura similar en el área homóloga del cerebro, (A, C). Aumento: 100x (A, B), 200x (C, D).

Figura 8

Detección de ovillos neurofibrilares mediante el anticuerpo monoclonal PHF-1 en el sistema nervioso central de animales transgénicos. PHF-1 es un marcador específico para la fosforilación de tau. La inmunoreactividad con este anticuerpo muestra que la expresión de tau de Alzheimer involucra tau endógena en el proceso de formación de NFTs. Además, el tñido por inmunofluorescencia muestra pequeñas estructuras en forma de varillas similares a aquellas observadas en tejidos cerebrales de la enfermedad de Alzheimer preclínica. Aumento: 100x (A), 200x (B), 1000x (C, D).

Figura 9

Cultivo de células neuronales como sistema de ensayo de identificación para la caracterización de compuestos terapéuticos y de fármacos candidatos. Cultivos primarios de neuronas de ratas transgénicas y no transgénicas pueden ser utilizados con estos propósitos después del cultivo *in vitro* y el efecto de los fármacos candidatos sobre el transporte mitocondrial puede ser evaluado mediante videomicroscopía. Neuronas corticales (Cx) e hipocámpicas (Hipp) aplicadas con tinte vital (por ejemplo, Mito-trek) se muestran transcurridos 3 días de cultivo *in vitro* (3DIV). Son visualizadas las mitocondrias (MT).

Figura 10

Características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer, recapituladas en los animales transgénicos de la presente invención. La patología neurofibrilar mostrada es una de las principales características distintivas de la enfermedad de Alzheimer. La figura 10 muestra una comparación de los ovillos neurofibrilares detectados por la técnica de plata de Gallyas (A, C) y también mediante inmunohistoquímica (E) en el cerebro humano enfermo con AD, con las estructuras patológicas equivalentes observadas en los animales transgénicos de la presente invención. El tñido inmunohistoquímico fue realizado con el anticuerpo monoclonal 7.51, que reconoce el epítpe genérico de tau en la región repetida en tándem (29).

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño de construcciones génicas que contienen secuencias de ADN que codifican para la proteína tau de Alzheimer - gen humano de tau truncada; ingeniería y verificación de construcciones génicas para la expresión ubicua o en tejidos específicos en animales transgénicos

La construcción de los vectores de expresión de tau de Alzheimer consiste en procedimientos que incluyen:

- diseño de la secuencia de codificación, especialmente supresiones y truncamientos, se muestran en 1
- estas porciones del gen tau fueron amplificadas mediante PCR con la ayuda de ADN polimerasa con actividad exonucleasa y los oligonucleótidos fueron dotados con secuencias de restricción adecuadas, de tal manera que estos pueden ser clonados bajo promotores generales o específicos de tejido en un vector de expresión eucariota, el clonaje fue realizado utilizando procedimientos estándar en cepas de bacterias comunes
- la verificación de los genes clonados fue realizada para chequear la direccionalidad de los genes insertados, que fue confirmada mediante digestiones de restricción y/o análisis PCR (Figura 2A). Además, las construcciones fueron parcialmente secuenciadas para excluir las posibles formas mutadas
- purificación de los fragmentos destinados a la microinyección (Figura 2B)
- verificación de la expresión de proteínas utilizando transfecciones del transgén a células de mamífero, principalmente células de glioma de rata COS-7 y C6, y análisis de la expresión de proteínas en células eucariotas mediante el método de "western blot" (Figura 2C).

Todos los métodos están descritos en un manual: Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (14).

Ejemplo 2

Producción de rata transgénica

La construcción génica clonada que contiene la secuencia de codificación de tau de Alzheimer fue inyectada en el pronúcleo masculino de embriones de un día de edad. Los huevos fertilizados fueron extraídos de las hembras donantes SHR en experimentos separados utilizando técnicas de rutina (15). Luego de la microinyección de ADN, los cigotos fueron cultivados *in vitro* en una incubadora de CO₂ durante alrededor de 12 horas e implantados en el oviducto de madres adoptivas pseudopreñadas. Los fundadores fueron identificados mediante PCR de la secuencia blanco específica del transgén del ADN genómico. Para determinar los genotipos de tau, fue purificado ADN genómico tomado de aproximadamente 0,5 cm de la cola de cada rata. Fue utilizado el análisis por PCR para identificar la descendencia que contenía el transgén. Los oligonucleótidos para el diagnóstico de identificación por PCR fueron diseñados de tal manera que la integridad del transgén pudiera ser fácilmente determinada. Para la determinación del número de copias del transgén integradas en el genoma fue utilizado un análisis de PCR en tiempo real.

Por ejemplo, la línea Tg #318 contenía 4 copias del transgén, lo que fue determinado por PCR en tiempo real utilizando el método de Sybre Green y la máquina de PCR de BioRad.

Ejemplo 3

Genotipificación de animales nacidos luego de la implantación de embriones en madres adoptivas, identificación de los animales transgénicos y evaluación de la transmisión del transgén a generaciones posteriores

Consejos sobre el ADN extraído de la cola: el ADN genómico fue extraído mediante el kit de tejido Dneasy, Qiagen.

Genotipificación: la amplificación específica de los transgenes que codifican para las formas de tau doble truncadas fue realizada en DNA genómico derivado de la generación parental de los animales transgénicos y se muestra en las figuras 3A y 3B. Análisis posteriores del ADN genómico de la generación F1 revelaron que los transgenes son heredables ya que también fueron detectados en la descendencia de la generación parental. Los transgenes que codifican para tau de Alzheimer, por lo tanto, son fijados en el ADN cromosomal de los animales. La genotipificación fue realizada con dos controles positivos (ADN genómico positivo plasmídico y TG) y dos controles negativos (ADN genómico heterólogo control negativo de la amplificación; control negativo de la plantilla para el control de los reactivos químicos), como se muestra en la figura 3A.

Análisis de la expresión de transgenes: la expresión del ARNm derivado de los transgenes fue evaluada mediante análisis de RT-PCR, aplicando generalmente métodos bien conocidos que incluyen el RT-PCR y la electroforesis en gel de agarosa. El ARN fue extraído de tejido congelado instantáneamente de animales transgénicos y sometido a transcripción inversa seguida de amplificación específica del ADNc.

Reproducción de ratas y generación de ratas homocigóticas y heterocigóticas

Las ratas positivas al transgén fueron cruzadas con ratas SHR tipo salvaje. La transmisión de la línea germinal fue lograda en varias líneas. En este ejemplo se muestra la línea Tg #318. Ratas transgénicas hembras y machos, que contenían cada una cuatro copias del gen de la proteína tau humana truncada, fueron apareadas entre ellas y con ratas SHR tipo salvaje para expandir la colonia transgénica. En la descendencia fueron observadas relaciones de división mendelianas del transgén (Figura 3C).

Los animales transgénicos de la presente invención pueden ser utilizados para el cruzamiento con animales transgénicos que sobreexpresan la APP humana que contiene la mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) o PS1 (13). La rata resultante expresará tanto APP como PS1 con o sin mutación FAD sobre un antecedente genético de hipertensión. El efecto de PS1 y APP sobre la formación de NFT puede ser estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*. Específicamente, el comienzo y la severidad de las patologías relacionadas con AD pueden ser examinadas por medio de la inmunohistoquímica.

Ejemplo 4

Expresión de la proteína tau de Alzheimer en el cerebro de ratas transgénicas

La expresión de proteínas fue realizada utilizando el análisis "western blot" empleando anticuerpos monoclonales específicos para la proteína tau. Fueron analizados tejidos cerebrales de rata que fueron genéticamente positivos al transgén y fueron capaces de transmitir el transgén a las siguientes generaciones. Los experimentos fueron controlados mediante análisis simultáneo de extractos cerebrales de ratas de la misma edad negativas al transgén y compañeros de camada negativos al transgén.

Preparación de la muestra de tejido: aproximadamente 2 mg de tejido cerebral recién aislado fueron homogeneizados mecánicamente en 30 μ l de solución tampón de lisis de Hunt modificada (20 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Igepal CA630, 0,5% Triton X-100), que contenía la mezcla inhibidora de proteasas Complete-EDTA free (Roche). Fueron añadidos 170 μ l de solución tampón de lisis, el homogenizado fue triturado con jeringa y aguja (22G) y congelado en nitrógeno líquido. Después de una descongelación lenta en hielo, los restos de la lisis fueron sometidos a tratamiento con ultrasonido y centrifugados 15 minutos, 10000 g a +4°C. El contenido de proteína de las muestras fue determinado mediante el ensayo Bradford utilizando un espectrofotómetro Beckman.

PAGE y transferencia Western ("Western blot"). Las proteínas fueron separadas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% con 0,1% (p/V) de SDS. La electroforesis fue realizada en una solución tampón Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS). La separación de las proteínas fue seguida por una transferencia semi-seca. Fue utilizado el sistema de solución tampón Tris-glicina-isopropanol (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% isopropanol). Las proteínas tau fueron teñidas con anticuerpos monoclonales anti-tau DC25 que reconocen a las proteínas tau igualmente que mAb 7.51 (29) y también con mAb Tau-1 (21). La señal positiva fue determinada utilizando un anticuerpo anti-ratón HRP y el método ECL. La eficiencia del procedimiento de transferencia fue controlada mediante el método de Ponceau. El análisis de proteínas reveló la expresión específica de la proteína tau de Alzheimer en el extracto de proteínas totales de los cerebros de las ratas transgénicas (figura 4) y también la expresión de la proteína tau de Alzheimer en diferentes regiones cerebrales de las ratas transgénicas (figura 5).

Ejemplo 5

Análisis de inmunohistoquímico del cerebro de ratas transgénicas

Para realizar el análisis de inmunohistoquímico de ratas transgénicas se utilizaron varios anticuerpos monoclonales específicos para la proteína tau y Alzheimer. Una breve descripción de los anticuerpos monoclonales empleados en estos estudios incluye PHF 1, que reconoce el epítipo fosforilado Ser 396 - Ser 404, mAb DC 25 reconoce el epítipo independiente de fosfato Lys 347 - Ile 353; mAb AT 8 reconoce el epítipo fosforilado Ser 198 - Ser 202; mAb Tau 1 reconoce el epítipo no fosforilado, mAb Tau 5 reconoce el epítipo independiente de fosfato. (15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)

Microscopía óptica e inmunofluorescencia

Los tejidos fueron preparados y cortados de la siguiente manera. Los animales transgénicos y controles fueron anestesiados con éter e inmediatamente perfundidos intracardialmente con paraformaldehído al 4% tamponado, los cerebros fueron extraídos, crioprottegidos con sacarosa al 20%, congelados rápidamente y cortados mediante criostato a un grosor de 50 μ m. Algunos cortes fueron tratados brevemente con ácido fórmico al 70% antes del procedimiento de tñido. Los cortes de tejido cerebral de rata fueron incubados con H₂O₂ al 1% en PBS y los sitios de enlace no específicos fueron bloqueados con la incubación en un medio de bloqueo (PBS, Triton 0,1%, suero normal de caballo 5%). El inmunoteñido se realizó utilizando los anticuerpos mencionados anteriormente, y después incubados con un anticuerpo de caballo anti-ratón biotinilado, seguido de un complejo avidina-biotina y visualizados con una solución de VIP y DAB. Los cortes de tejido fueron montados en portaobjetos cubiertos de gelatina, secados, tratados con alcoholes de alta calidad, xileno y se colocaron los cubreobjetos con Entellan.

Teñido con plata

El método de tñido con plata de Gallyas que fue descrito anteriormente (23) fue adaptado para la libre flotación de los cortes de 50 μ m, con viraje en oro.

Teñido inmunofluorescente

Para el marcaje inmunofluorescente indirecto, los cortes fueron pretratados con NaHBO₄ al 1% durante 30 minutos para reducir la autofluorescencia del tejido. Posteriormente fueron teñidos con anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche, incubados con un anticuerpo anti-ratón en caballo biotinilado, seguido de estreptavidina-Alexa 488 conjugada.

La comparación de la patología NF como la vista en cerebros de pacientes que sufren AD con aquellas observadas en el cerebro de los animales transgénicos de la presente invención se representa en la Figura 10.

Ejemplo 6

Sistema de ensayo de identificación y para el desarrollo de nuevos fármacos y fármacos candidatos para el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer

Los animales transgénicos de la presente invención pueden ser utilizados como fuente de células para el cultivo de células. Tanto los animales como las células pueden ser utilizados en los ensayos de la presente invención. Por ejemplo, las células del tejido cerebral que expresan el gen tau truncado pueden ser cultivadas utilizando técnicas

estándares de cultivo. Los animales y las células cultivadas pueden ser utilizadas tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* para el estudio del papel de los fármacos candidatos en la arquitectura celular, la división celular, y la apoptosis, así como en la morfología las neuronas primarias cultivadas, brotes de neuritas, ramificación de axones, elongación de los axones en cultivos primarios y también para la investigación del movimiento de los orgánulos (Figura 9). También pueden ser empleados como sistema de prueba para los efectos neurotróficos de sustancias de prueba.

Un estudio puede ser diseñado para examinar los cambios cuantitativos y cualitativos en la interacción de tau y tubulina y también en la interacción con el tráfico en los orgánulos que puede ser modulado mediante sustancias de prueba.

Un estudio también puede ser diseñado para examinar los compuestos que modulan la expresión o la actividad de proteínas del citoesqueleto en el proceso de construcción de las conexiones sinápticas.

Un estudio también puede ser diseñado para examinar los compuestos que pueden afectar la formación de NFT o la interacción proteína-proteína, que pudieran eventualmente conllevar a ralentizar, inhibir o eliminar la formación de NFT y esto pudiera ser un ensayo útil para la identificación de sustancias con potencial terapéutico para las tauopatías u otras enfermedades neurodegenerativas, preferiblemente AD. El efecto de los compuestos puede ser evaluado en cultivos celulares y también *in vivo* en los animales mediante análisis neuropatológico, neurofisiológico y comportacional. Son conocidas muchas variaciones de los métodos de identificación por los expertos en la materia y pueden ser aplicadas dentro del alcance de la presente invención.

Estos ejemplos describen aspectos particulares y realizaciones de la presente invención con fines ilustrativos y no limitan el alcance de la presente invención como se enumeran en las reivindicaciones más adelante.

Referencias

1. Martin, J.B., (1999) *N. Engl. J. Med.* 340, 1970-1980.
2. Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988a) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4884-4888.
3. Wischik CM, Novak M, Trogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jake R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A (1988b) *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4506-4510.
4. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chackraverty S, Isaacs A, Grover A (1998) *Nature* 393, 702-705.
5. Spillantini NG, Murrel JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7737-7741.
6. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E.: *Science* 2001 Aug 24; 293 (5534): 1487-1491.
7. Goedert M, Spillantini MG.: *Biochem Soc Symp* 2001; 67: 59-71.
8. Spittaels, K., C. Van den Haute, et al.: *Am J Pathol* (1999), 155 (6): 2153-65.
9. Duff, K., H. Knight, et al.: *Neurobiol Dis* (2000) 7 (2): 87-98.
10. Czech C, Lesort M, Tremp G, Terro F, Blanchard V, Schombert B, Carpentier N, Dreisler S, Bonici B, Takashima A, Moussaoui S, Hugon J, Pradier L.: *Neuroscience* (1998) Nov; 87 (2): 325-36.
11. Echeverria V and Cuellar AC.: *Mol Neurobiol* (2002) Oct-Dec; 26(2-3): 299-316.
12. Breteler, MMB.: *Neurobiology of Aging* 21 (2000) 153-160.
13. in't Veld B.A., A. Ruitenberga, A. Hofmana, B.H.Ch. Strickera, M.M.B. Bretelera,: *Neurobiology of Aging* (2001) 407-412.
14. Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
15. Hogan, B. et al. *Manipulating the Mouse Embryo, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
16. Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM.: *Neuron* (1993) 10: 1089-99.
17. Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al.: *EMBO J* (1992) Apr; 11 (4): 1593-7.

18. **Braak E, Braak H, Mandelkow EM:** *Acta Neuropathol (Berl).* (1994); 87(6): 554-67.

19. **Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E.:** *Neurosci Lett* (1995) Apr 21; 189(3): 167-9.

20. **Szendrei GI, Lee VM, Otvos L jr.:** *J Neurosci Res* (1993) Feb 1; 34(2): 243-9.

21. **Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI.** *J Cell Biol* (1985) Oct; 101(4): 1371-8.

22. **LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI.:** *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) Oct 24; 92 (22): 10369-73.

23. **Gallyas, F.:** *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* (1971) 19, 1-8.

24. **Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA** (1989) *Neuron* 4, 519.

25. **Gordon JW, Chesa PG, Nishimura H, Rettig WJ, Maccari JE, Endo T, Seravalli E, Seki T, Silver J.:** *Cell.* 1987 Jul 31; 50(3):445-52.

26. **Damiano PF, Roson MI, Armando I, Nowicki S, Dascal E, Cuniberti L, Albornoz LE, de la Riva JJ.** Potential role of glycerol leading to rat fructose hipertensión. *Hypertension* 1999 Oct; 34 (4Pt 2): 1007-11.

27. **Jackson B, Fabris B, Paxton D, Franze L, Johnston CI.** High salt diet ameriolates effects of angiotension converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1990 Mar; 17(3); 229-34.

28. **Turley SD, Hansen CT.** Rates of sterol synthesis in the liver and extrahepatic tissues of the SHR/N-corpulent rat, an animal with hiperlipidemia and insulin-independent diabetes. *J Lipid Res.* 1986 May; 27 (5); 486-96.

29. **Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM:** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Jul 1; 88(13): 5837-41.

REIVINDICACIONES

1. Animal transgénico no humano cuyas células germinales y/o somáticas comprenden una construcción de ADN que contiene una región que codifica, la que conlleva a la expresión de una molécula tau truncada en los terminales N- y C-, en el que

- la región que codifica está truncada, al menos, 30 nucleótidos más abajo del codón de inicio y truncada, al menos, 30 nucleótidos río arriba del codón de parada de la longitud total de la secuencia de ADNc tau que codifica para la proteína tau con 4 repeticiones y con 3 repeticiones, respectivamente,
- el núcleo tau truncado de manera mínima abarca un fragmento de proteína que es codificado por SEQ ID No.9,
- dicha construcción de ADN codifica para una proteína, que tiene actividad que produce una patología neurofibrilar (NF) cuando es expresada en células cerebrales de dicho animal.

2. Animal transgénico no humano, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque sus células somáticas y germinales expresan de manera transiente o estable dicha construcción de ADN, exhibiendo de esta manera una patología NF en el cerebro.

3. Animal transgénico no humano, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína codificada por dichas moléculas de ADN es expresada en el cerebro.

4. Animal transgénico no humano, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho animal es una rata.

5. Método para la genotipificación de animales transgénicos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, usando oligonucleótidos específicos para tau truncada transgénica, como se definió en la reivindicación 1.

6. Animal transgénico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que desarrollan patologías NF y que tienen un contexto genético que permite la inducción de factores de riesgo asociados con AD, representando de esta manera un modelo de la enfermedad para humanos.

7. Animal transgénico no humano de la reivindicación 6, que representa un modelo animal de AD y permite la inducción de hipertensión como un factor de riesgo de AD.

8. Animal transgénico no humano de la reivindicación 6, que representa un modelo animal de AD y permite la inducción de diabetes como un factor de riesgo de AD.

9. Animal transgénico no humano de la reivindicación 6, que representa un modelo animal de AD y permite la inducción de hipercolesterolemia como un factor de riesgo de AD.

10. Método de identificación y validación de sustancias para el tratamiento, prevención y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, para el tratamiento y prevención de tauopatías, preferiblemente AD, para el desarrollo de marcadores de diagnóstico y sondas para la detección de tauopatías, preferiblemente AD y para sustancias para el tratamiento de hipertensión, diabetes, dislipidemia y hipercolesterolemia en combinación con tauopatías, preferiblemente AD, que comprende:

- evaluación de sustancias mediante:
 - detección de cambios de la patología neurofibrilar en un animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9,
 - medición de cambios neurocomportamentales en dicho animal,
 - medición del nivel cognitivo en dicho animal.

11. Método, según la reivindicación 10, de identificación de nuevos fármacos blanco en tauopatías y procesos de neurodegeneración relacionados, preferiblemente AD.

12. Uso del animal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 9, como ensayo *in vivo* para probar la eficacia de sustancias o terapias, en particular terapias para reducir la patología neurofibrilar.

13. Uso, según la reivindicación 12, en el que dichas sustancias o terapias son para enfermedades neurodegenerativas, en particular tauopatías, preferiblemente AD y otras enfermedades neurodegenerativas acompañadas de patologías neurofibrilares.

ES 2 304 146 T3

14. Línea celular, que comprende una construcción como se definió en la reivindicación 1, cuya línea celular no es una línea celular totipotente humana.

15. Línea celular, según la reivindicación 14, **caracterizada** porque la línea celular es una línea celular de rata derivada de un embrión de rata transgénico.

16. Ensayo *in vitro*, que comprende una línea celular según la reivindicación 14 ó 15, en el que dicho ensayo es empleado como herramienta para la identificación y validación para el descubrimiento de compuestos terapéuticos preventivos y de diagnóstico y marcadores para la enfermedad de Alzheimer.

SEQ ID NO:	1				R1	R2	R3	R4		1149	<i>tau 43</i>
1	91									1059	
2		205								999	
3		277								999	
4		205								1089	
5		277								1089	
6					715					999	
7					709					999	
8					715					954	
9					742					930	
SEQ ID NO:	1				R1	R3	R4			1056	<i>tau 44</i>
10	91									966	
11		205								906	
12		277								906	
13		205								996	
14		277								996	

Numeración de las SEQ ID NO: 1-4 y 9-11 según la isoforma R4 más corta.

Numeración de las SEQ ID NO: 5-8 según la isoforma R3 más corta.

Fig.1

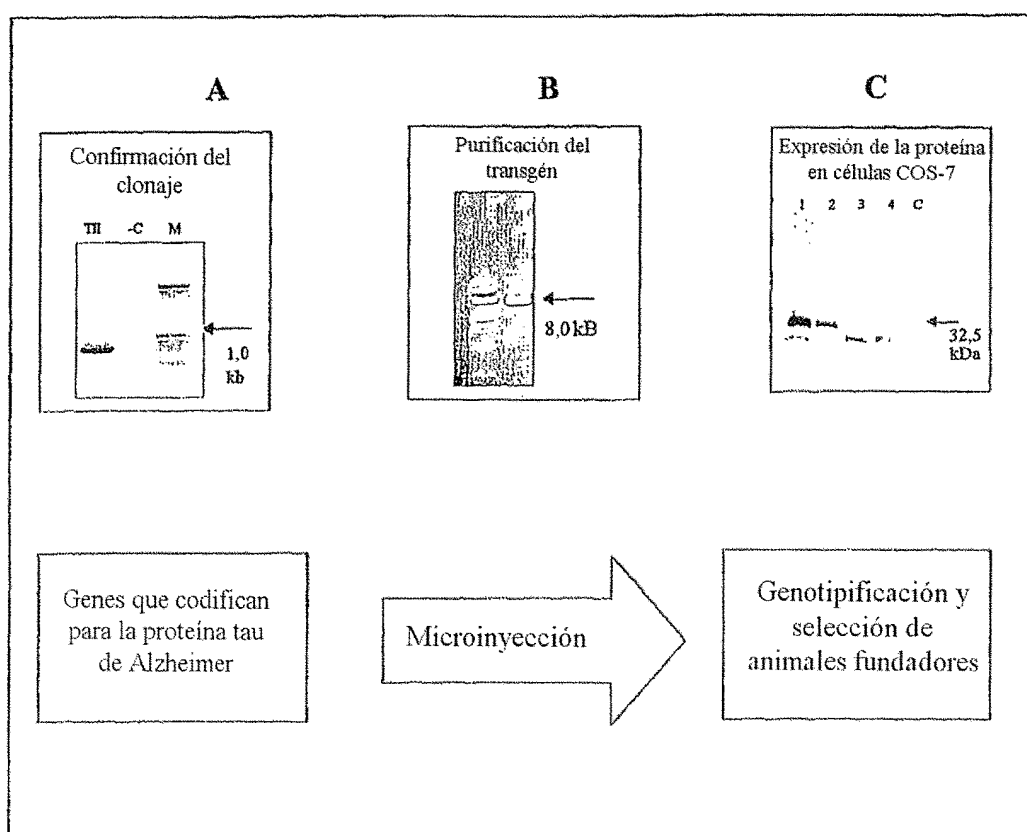


Fig.2

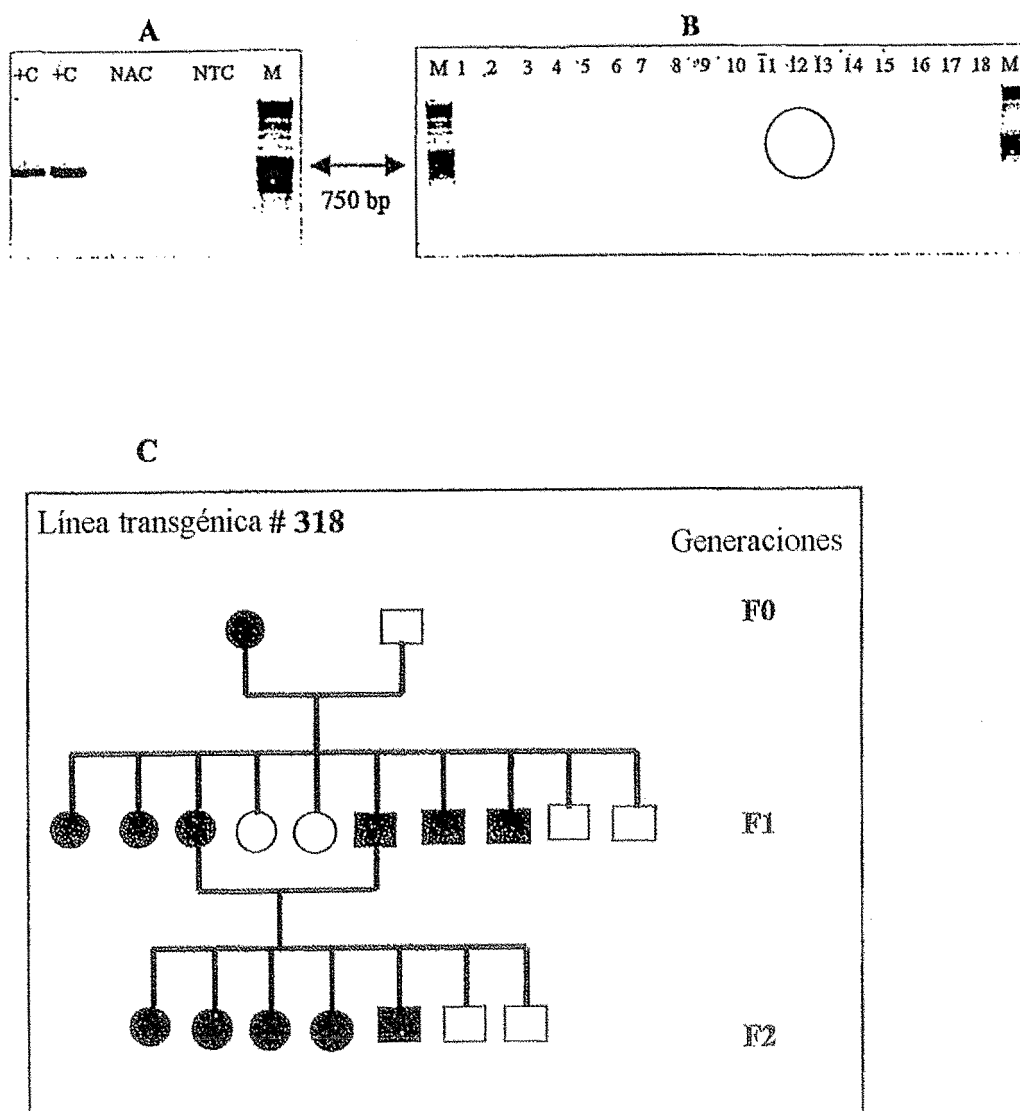


Fig.3

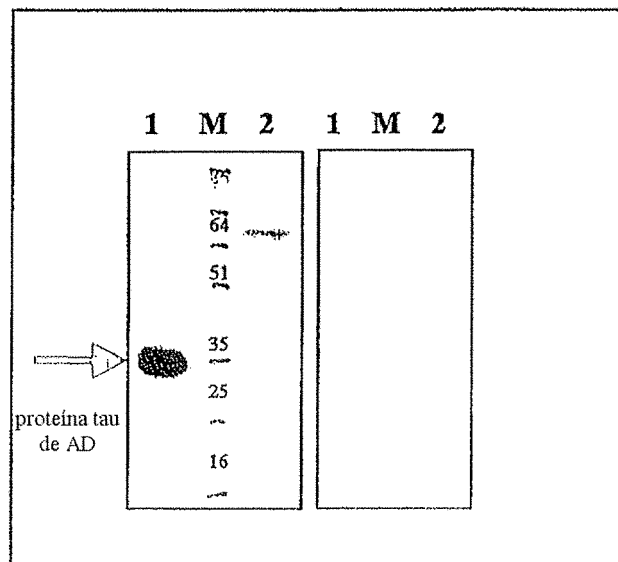


Fig.4

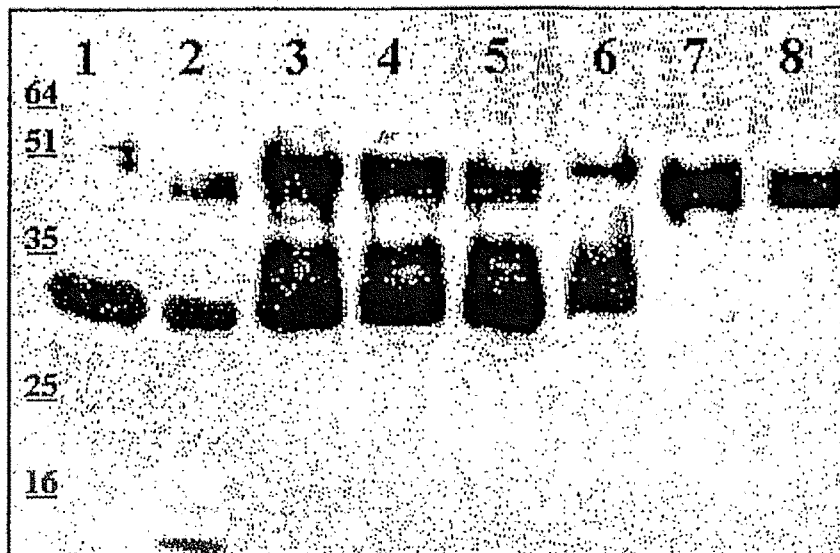


Fig.5

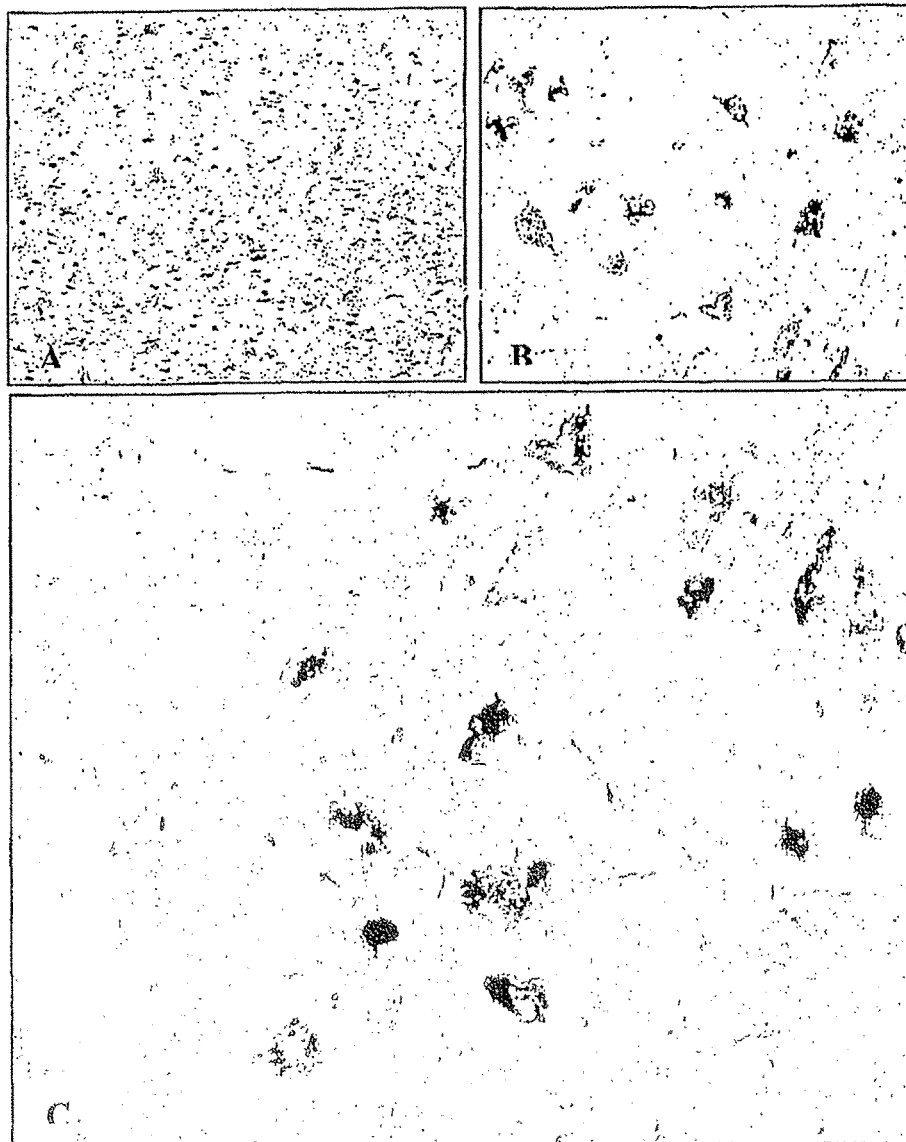


Fig.6

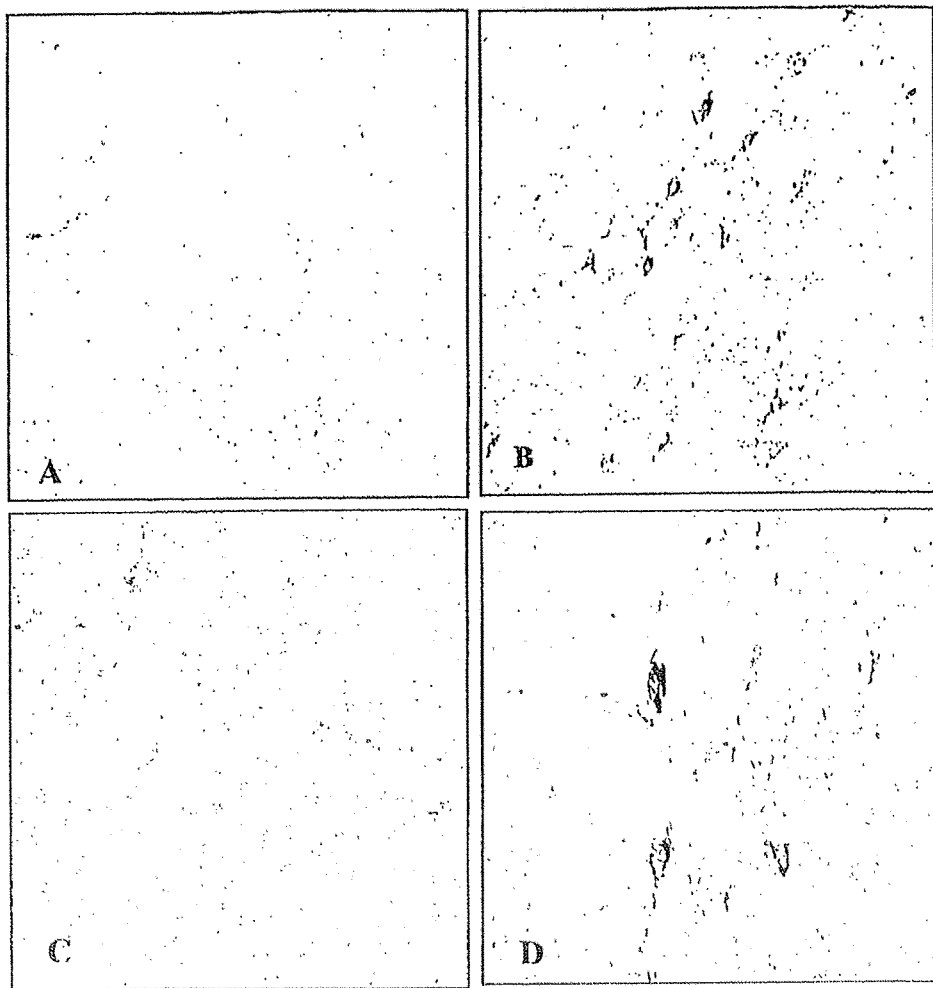


Fig.7

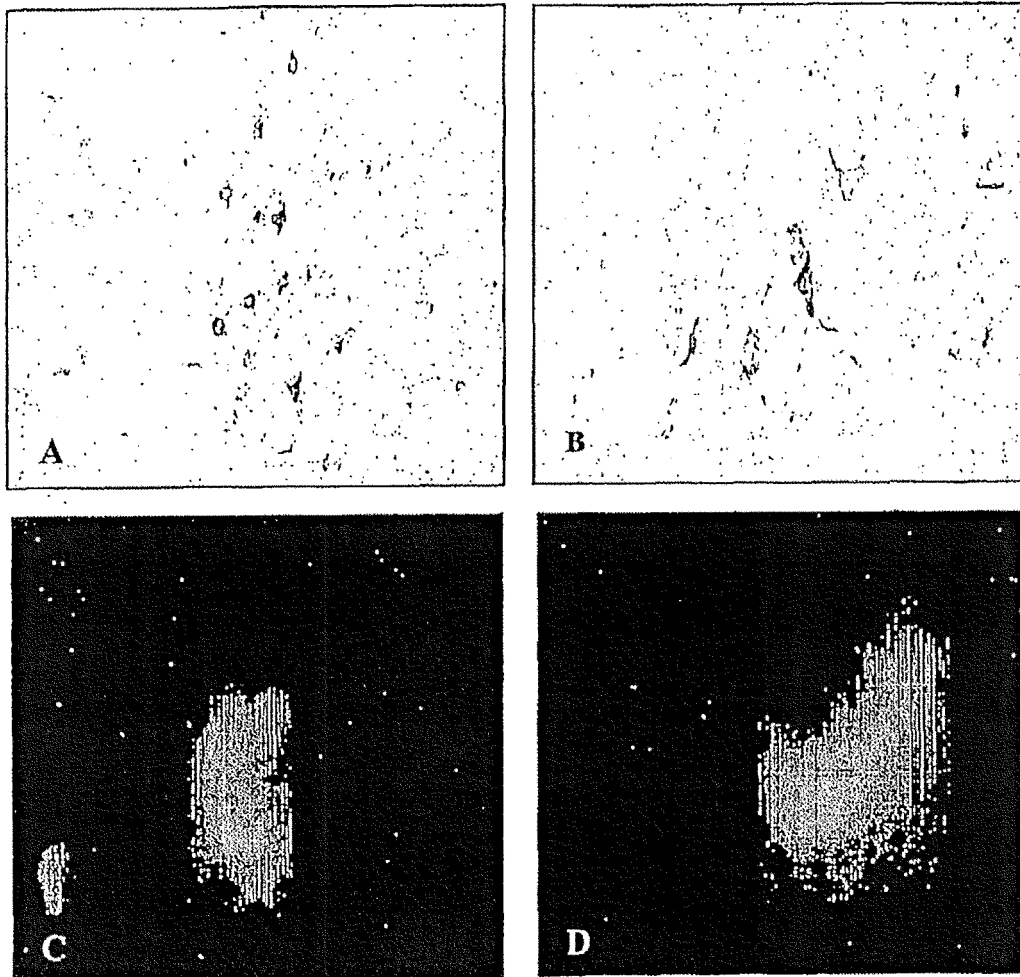


Fig.8

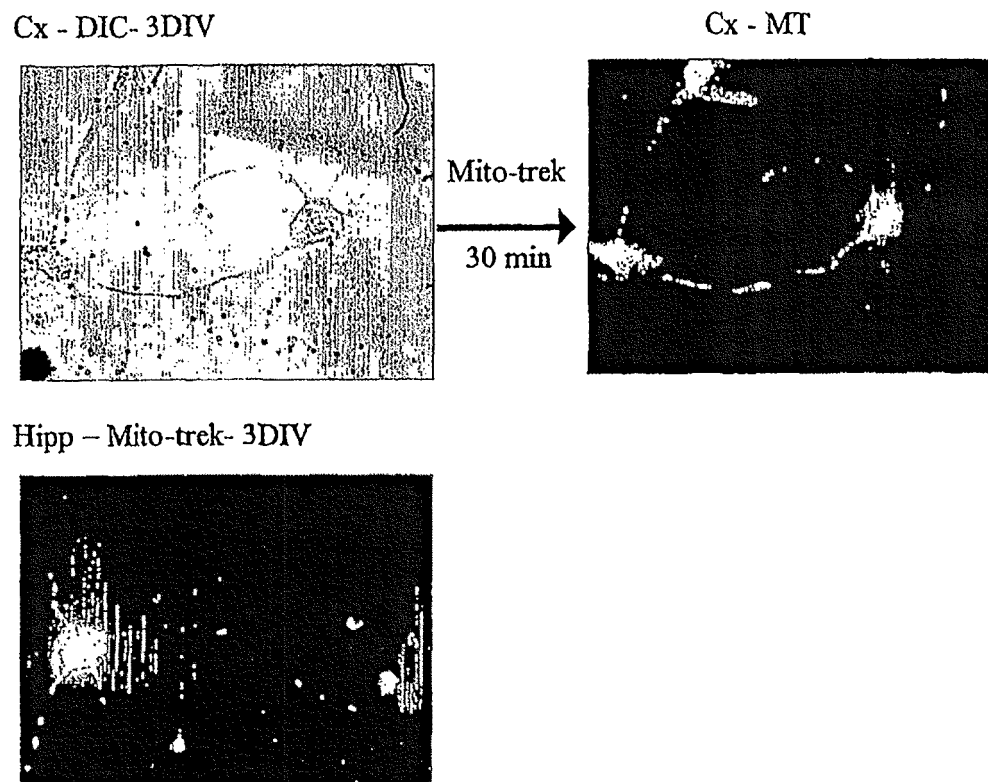
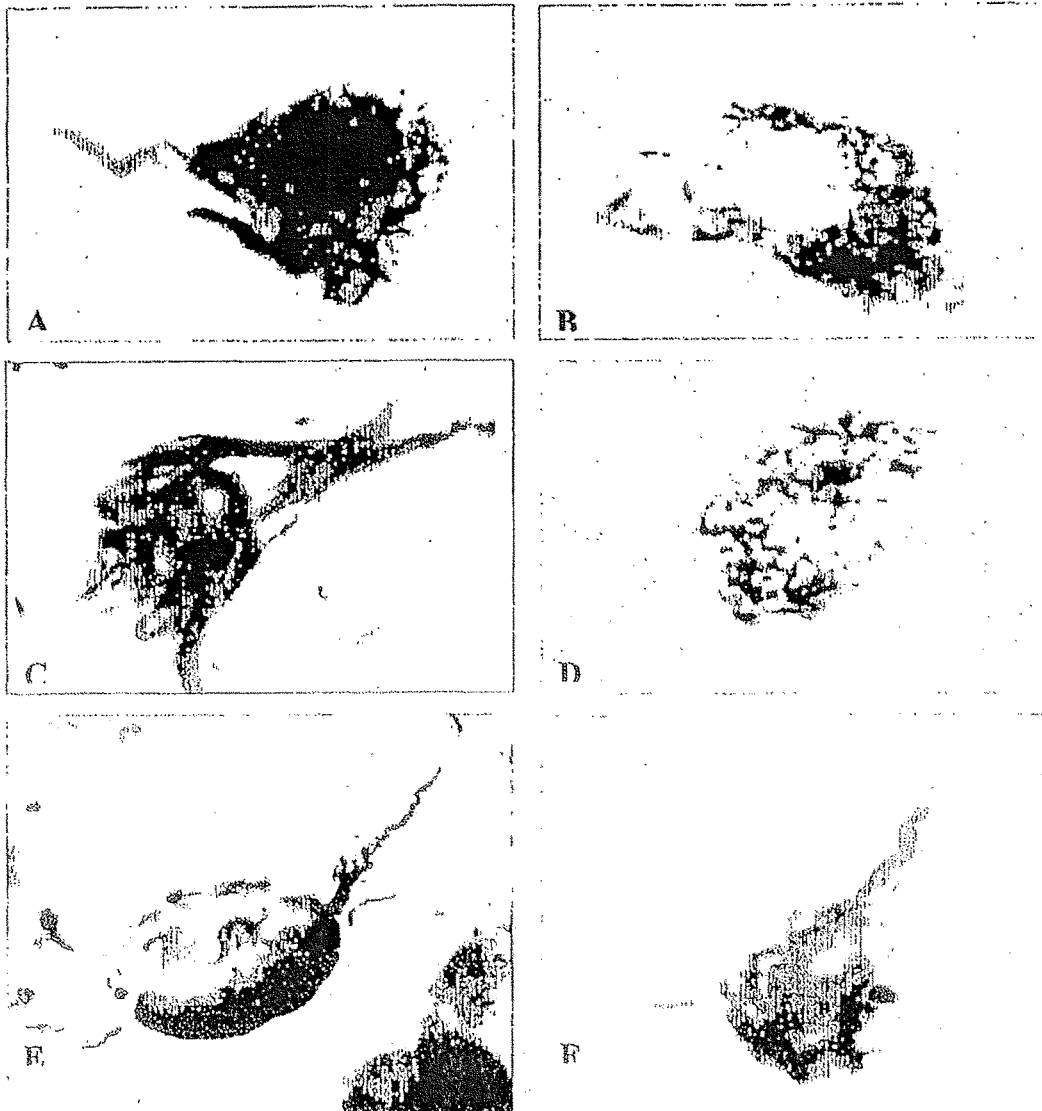


Fig. 9

Fig. 10

Tejido cerebral humano, autopsia de
un paciente con AD

Tejido cerebral de rata transgénica
TG Nr. 318



ES 2 304 146 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Axon Neuroscience Forschungs- und Entwicklungs GmbH
 <120> Animal Transgénico Que Expresa La Proteína Tau De Alzheimer
 <130> R 41446
 <150> A 1053/2002
 <151> 2002-07-12
 <160> 15
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 969
 <212> ADN
 <213> humano
 <400> 1

```

atgcaccaag accaagaggg tgacacggac gctggcctga aagctgaaga agcaggcatt      60
ggagacaccc ccagcctgga agacgaagct gctggtcacg tgaccaagc tcgcatggtc      120
agtaaaagca aagacgggac tggaaagcat gacaaaaaag ccaagggggc tgatggtaaa      180
acgaagatcg ccacaccgcg gggagcagcc cctccaggcc agaagggcca ggccaacgcc      240
accaggattc cagcaaaaac cccgccgct ccaaagacac caccagctc tggatgaacct      300
ccaaaatcag gggatcgag cggtacagc agccccggct cccaggcac tccgggcagc      360
cgctcccgca ccccgctcct tccaacccca cccaccggg agccaagaa ggtggcagt      420
gtccgtactc cacccaagtc gccgtcttcc gccaaagacc gcctgcagac agcccccgct      480
cccatgccag acctgaagaa tgtcaagtcc aagatcggct cactgagaa cctgaagcac      540
cagccgggag gcgggaaggt gcagataatt aataagaagc tggatcttag caacgtccag      600
tccaagtgtg gctcaaagga taatatcaaa cagctcccg gagggggcag tgtgcaata      660
gtctacaaac cagttgacct gagcaagggt acctccaagt gtggctcatt aggcaacatc      720
catcataaac caggaggtgg ccagggtgaa gtaaaatctg agaagcttga ctcaaggac      780
agagtccagt cgaagattgg gtccctggac aatatacccc acgtccctgg cggaggaaat      840
aaaaagattg aaacccacaa gctgaccttc cgcgagaacg ccaaagccaa gacagaccac      900
ggggcggaga tcgtgtacaa gtgcgcagtg gtgtctgggg acacgtctcc acggcatctc      960
agcaatgtc                                     969
    
```

<210> 2
 <211> 795
 <212> ADN
 <213> humano

ES 2 304 146 T3

<400> 2

	atggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat	60
5	ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagccctc caggccagaa gggccaggcc	120
	aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctccaa agacaccacc cagctctggg	180
10	gaacctccaa aatcagggga tgcagcggc tacagcagcc cgggctccc aggcactccc	240
	ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaagggtg	300
15	gcagtggtec gtactccacc caagtgcgcg tcttcggcca agagccgcct gcagacagcc	360
	cccgtagcca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg	420
	aagcaccagc cgggaggcgg gaagggtgcg ataattaata agaagctgga tcttagcaac	480
20	gtccagtcca agtgtggctc aaaggataat atcaaacacg tcccgggagg cggcagtggtg	540
	caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc aaggtagcct ccaagtggtg ctcataggg	600
25	aacatccatc ataaaccagg aggtggccag gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc	660
	aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc ctggacaata tcaccacgt ccctggcgga	720
	ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg accttccgcg agaacgccaa agccaagaca	780
30	gaccacgggg cggag	795

<210> 3

35 <211> 723

<212> ADN

<213> humano

40 <400> 3

	atcgccacac cgcgggggagc agccctcca ggccagaagg gccaggccaa cgccaccagg	60
45	attccagcaa aaaccccgcc cgctccaaag acaccacca gctctggtga acctccaaaa	120
	tcaggggatc gcagcggcta cagcagcccc ggtccccag gcactcccgg cagccgctcc	180
	cgcaccccggt ccttccaac cccaccacc cgggagccca agaagggtggc agtgggtcgt	240
50	actccacca agtcgcgctc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccatg	300
	ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg	360
55	ggaggcgggga aggtgcagat aattaataag aagctggatc ttagcaacgt ccagtccaag	420
	tgtggctcaa aggataatat caaacacgtc cggggaggcg gcagtgtgca aatagtctac	480
	aaaccagttg acctgagcaa ggtgacctcc aagtgtggct cattaggcaa catccatcat	540
60	aaaccaggag gtggccagggt ggaagtaaaa tctgagaagc ttgacttcaa ggacagagtc	600
	cagtcgaaga ttgggtccct ggacaatatc acccacgtcc ctggcggagg aaataaaaag	660
65	attgaaacc acaagctgac cttccgcgag aacgccaaag ccaagacaga ccacggggcg	720
	gag	723

ES 2 304 146 T3

<210> 4

<211> 885

<212> ADN

5 <213> humano

<400> 4

```

10      atgggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat      60
      ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagccctc caggccagaa gggccaggcc      120
15      aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctccaa agacaccacc cagctctggt      180
      gaacctcaa aatcaggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggctcccc aggcactccc      240
      ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaagggtg      300
20      gcagtgggtcc gtactccacc caagtcgccc tcttcgcca agagccgct gcagacagcc      360
      ccgtgccca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg      420
25      aagcaccagc cgggaggcgg gaaggtgcag ataattaata agaagctgga tcttagcaac      480
      gtccagtcca agtgtggctc aaaggataat atcaaacacg tcccgaggagg cggcagtgtg      540
      caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc aaggtgacct ccaagtgtgg ctcattaggc      600
30      aacatccatc ataaaccagg aggtggccag gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc      660
      aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc ctggacaata tcaccacgt ccctggcgga      720
35      ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg acctccgcg agaacgcaa agccaagaca      780
      gaccaogggg cggagatcgt gtacaagtcg ccagtgggtg ctggggacac gtctccacgg      840
40      catctcagca atgtctcctc caccggcagc atcgacatgg tagac      885

```

<210> 5

45 <211> 813

<212> ADN

<213> humano

50

55

60

65

ES 2 304 146 T3

<400> 5

5	atcgccacac cgcggggagc agccctcca ggccagaagg gccaggccaa cgccaccagg	60
	attccagcaa aaaccccgcc cgctccaaag acaccacca gctctggtga acctccaaaa	120
	tcaggggatc gcagcggtta cagcagcccc ggctccccag gcaactccgg cagccgctcc	180
10	cgcaccccggt cccttccaac cccaccacc cgggagccca agaagggtggc agtgggtccgt	240
	actccacca agtcgccgtc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccatg	300
15	ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaactgaa gcaccagccg	360
	ggaggcggga aggtgcagat aattaataag aagctggatc ttagcaacgt ccagtccaag	420
	tgtggctcaa aggataatat caaacacgtc ccgggaggcg gcagtgtgca aatagtctac	480
20	aaaccagttg acctgagcaa ggtgacctcc aagtgtggct cattaggcaa catccatcat	540
	aaaccaggag gtggccagggt ggaagtaaaa tctgagaagc ttgacttcaa ggacagagtc	600
25	cagtcgaaga ttgggtccct ggacaatatc acccacgtcc ctggcggagg aaataaaaag	660
30	attgaaaccc acaagctgac cttccgagag aacgccaaag ccaagacaga ccacggggcg	720
	gagatcgtgt acaagtcgcc agtgggtgtct ggggacacgt ctccacggca tctcagcaat	780
	gtctctctcca ccggcagcat cgacatggta gac	813

35

<210> 6

<211> 285

40 <212> ADN

<213> humano

<400> 6

45

50

55

atcaaacacg tcccgggagg cggcagtggt caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc	60
aaggtgacct ccaagtgtgg ctcattaggc aacatccatc ataaaccagg aggtggccag	120
gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc	180
ctggacaata tcaccacgt ccctggcgga ggaaataaaa agattgaaac ccacaagctg	240
acottccgcy agaacgcaa agccaagaca gaccacgggg cggag	285

<210> 7

<211> 297

60 <212> ADN

<213> humano

65

ES 2 304 146 T3

<400> 7

5	gataatatca aacacgtccg gggaggcggc agtgtgcaaa tagtctacaa accagttgac	60
	ctgagcaagg tgacctccaa gtgtgggtca ttaggcaaca tccatcataa accaggaggt	120
	ggccagggtg aagtaaaatc tgagaagctt gacttcaagg acagagtcca gtcgaagatt	180
10	gggtccctgg acaatatcac ccacgtccct ggaggaggaa ataaaaagat tgaaaccac	240
	aagctgacct tccgagagaa cgccaaagcc aagacagacc acggggcgga g	291

15

<210> 8

<211> 240

<212> ADN

20 <213> humano

<400> 8

25	atcaaacacg tcccgggagg cggcagtggt caaatagtct acaaaccagt tgacctgagc	60
	aagggtgacct ccaagtgtgg ctcattaggc aacatccatc ataaaccagg aggtggccag	120
30	gtggaagtaa aatctgagaa gcttgacttc aaggacagag tccagtcgaa gattgggtcc	180
	ctggacaata tcacccacgt ccctggcgga ggaataaaa agattgaaac ccacaagctg	240

35

<210> 9

<211> 189

<212> ADN

<213> humano

40

<400> 9

45	gtgcaaatag tctacaaacc agttgacctg agcaagggtg cctccaagtg tggctcatta	60
	ggcaacatcc atcataaacc aggaggtggc cagggtggaag taaaatctga gaagcttgac	120
50	ttcaaggaca gagtccagtc gaagattggg tccctggaca atatcaccga cgtccctggc	180
	ggaggaaat	189

55

<210> 10

<211> 876

<212> ADN

60 <213> humano

65

ES 2 304 146 T3

<400> 10

	atgcaccaag accaagaggg tgacacggac gctggcctga aagctgaaga agcaggcatt	60
5	ggagacacccc ccagcctgga agacgaagct gctgggtcacg tgaccaaga tcgcatggtc	120
	agtaaaagca aagacgggac tggaaagcagat gacaaaaaag ccaagggggc tgatggtaaa	180
10	acgaagatcg ccacaccgcg gggagcagcc cctccaggcc agaagggcca ggccaacgcc	240
	accaggattc cagcaaaaac cccgcccgt ccaaagacac caccagctc tgggtgaacct	300
	ccaaaatcag gggatcgag cgggtacagc agccccgggt cccaggcac tccgggcagc	360
15	cgtccccga ccccgccct tccaacccca cccaccggg agcccaagaa ggtggcagt	420
	gtccgtactc caccgaagtc gccgtcttcc gccaaagagc gcctgcagac agccccgtg	480
20	cccatgccag acctgaagaa tgtcaagtcc aagatcggct ccactgagaa cctgaagcac	540
	cagccgggag gcgggaaggt gcaaatagtc tacaaccag ttgacctgag caaggtgacc	600
	tccaagtgtg gtcattagg caacatccat cataaaccag gaggtggcca ggtggaagta	660
25	aaatctgaga agcttgactt caaggacaga gtccagtcga agattgggtc cctggacaat	720
	atcaccacg tccctggcgg aggaaataaa aagattgaaa cccacaagct gaccttcgc	780
30	gagaacgcca aagccaagac agaccacggg gcggagatcg tgtacaagtc gccagtgggtg	840
	tctggggaca cgtctccacg gcattctcagc aatgtc	876

35 <210> 11

<211> 702

<212> ADN

<213> humano

40

<400> 11

	atggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat	60
45	ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagccctc caggccagaa gggccaggcc	120
	aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctcca agacaccacc cagctctggt	180
50	gaacctccaa aatcagggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggtcccc aggcactccc	240
	ggcagccgt cccgcacccc gtcccttcca accccaccca cccgggagcc caagaagggtg	300
	gcagtgggtc gtactccacc caagtgcgcg tcttccgcca agagccgcct gcagacagcc	360
55	cccggtccca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg	420
	aagcaccagc cgggagggcg gaaggtgcaa atagtctaca aaccagttga cctgagcaag	480
60	gtgacctcca agtgtgggtc attaggcaac atccatcata aaccaggagg tggccagggtg	540
	gaagtaaaat ctgagaagct tgacttcaag gacagagtcc agtcgaagat tgggtccctg	600
	gacaatatca cccacgtccc tggcggagga aataaaaaga ttgaaaccca caagctgacc	660
65	ttccgcgaga acgccaaagc caagacagac cccggggcgg ag	702

ES 2 304 146 T3

<210> 12

<211> 630

<212> ADN

5 <213> humano

<400> 12

10	atcgccacac cgcggggagc agcccccca gcccagaagg gccaggccaa cgccaccagg	60
	attccagcaa aaaccccgcg cgctccaaag acaccacca gctctggtga acctccaaaa	120
	tcaggggatc gcagcggcta cagcagcccc ggctccccag gcaactcccg cagccgctcc	180
15	cgcaccccggt cccttccaac cccaccacc cgggagccca agaagggtggc agtgggtccgt	240
	actccacca agtcgcgctc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccattg	300
	ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg	360
20	ggaggcgggga aggtgcaaatt agtctacaaa ccagttgacc tgagcaagggt gacctccaag	420
	tgtggctcat taggcaacat ccatacataa ccaggagggtg gccagggtgga agtaaaatct	480
25	gagaagcttg acttcaagga cagagtcacg tcgaagattg ggtccctgga caatatcacc	540
	cacgtccctg gcggaggaaa taaaagatt gaaaccaca agctgaacctt ccgcgagaac	600
	gccaaagcca agacagacca cggggcggag	630

30

<210> 13

<211> 792

35 <212> ADN

<213> humano

<400> 13

40	atgggtcagta aaagcaaaga cgggactgga agcgatgaca aaaaagccaa gggggctgat	60
	ggtaaaacga agatcgccac accgcgggga gcagccctc caggccagaa gggccaggcc	120
45	aacgccacca ggattccagc aaaaaccccg cccgctcaa agacaccacc cagctctggt	180
	gaacctcaa aatcagggga tcgcagcggc tacagcagcc ccggctccc aggcactccc	240
	ggcagccgct cccgcacccc gtcccttcca accccacca cccgggagcc caagaagggtg	300
50	gcagtgggtc gtaactccacc caagtgcgg tcttcggcca agagccgcct gcagacagcc	360
	cccggtccca tgccagacct gaagaatgtc aagtccaaga tcggctccac tgagaacctg	420
55	aagcaccagc cgggaggcgg gaagggtcaa atagtctaca aaccagttga cctgagcaag	480
	gtgacctcca agtgtggctc attaggcaac atccatcata aaccaggagg tggccagggtg	540
	gaagtaaaat ctgagaagct tgacttcaag gacagagtc agtcgaagat tgggtccctg	600
60	gacaatatca cccacgtccc tggcggagga aataaaaaga ttgaaacca caagctgacc	660
	ttccgcgaga acgcaaagc caagacagac caccggggcg agatcgtgta caagtcgcca	720
65	gtgggtgtctg gggacacgtc tccacggcat ctgagcaatg tctcctccac cggcagcatc	780
	gacatggtag ac	792

ES 2 304 146 T3

<210> 14

<211> 720

<212> ADN

5 <213> humano

<400> 14

```

10      atcgccacac cgcgggggagc agccccctcca ggccagaagg gccaggccaa cgccaccagg      60
      attccagcaa aaaccccgcc cgctccaaag acaccaccca gctctgggtga acctccaaaa      120
15      tcaggggatc gcagcggcta cagcagcccc ggctccccag gcaactccgg cagccgctcc      180
      cgcaccccggt cccttccaac cccacccacc cgggagccca agaagggtggc agtgggtccgt      240
      actccacca agtcgccgtc ttccgccaag agccgcctgc agacagcccc cgtgcccattg      300
20      ccagacctga agaattgtcaa gtccaagatc ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg      360
      ggaggcggga aggtgcaaatt agtctacaaa ccagttgacc tgagcaaggt gacctccaag      420
25      tgtggctcat taggcaacat ccatcataaa ccaggagggtg gccagggtgga agtaaaatct      480
      gagaagcttg acttcaagga cagagtccag tcgaagattg ggtccctgga caatatcacc      540
      cacgtccctg gcggaggaaa taaaagatt gaaaccacaca agctgacctt ccgcgagaac      600
30      gccaaagcca agacagacca cggggcggag atcgtgtaca agtcgccagt ggtgtctggg      660
      gacacgtctc cacggcatct cagcaatgtc tcctccaccg gcagcatcga catggtagac      720

```

35 <210> 15

<211> 2946

<212> ADN

40 <213> humano

<400> 15

```

45      aatgtcccgga attcccagcc tcaccacccc ttctcagtaa tgacctggt tgggtgcagg      60
      aggtacctac tccatactga gggtgaaatt aagggaaggc aaagtccagg cacaagagtg      120
      ggaccccgagc ctctcactct cagttccact catccaactg ggacctcac cacgaatctc      180
50      atgatctgat tcggttccct gtctcctcct cccgtcacag atgtgagcca gggcactgct      240
      cagctgtgac cctaggtggt tctgccttgt tgacatggag agagcccttt cccctgagaa      300
55      ggccctggccc cttoctgtgc tgagcccaca gcagcaggct ggggtgtcttg gttgtcagtg      360

```

60

65

ES 2 304 146 T3

	gtggcaccag gatggaaggg caaggcacc accgagggcc cacagtcccg ctgtccccc	420
	cttgcaccct agcttgtagc tgccaacctc ccagacagcc cagcccgtg ctcagctcca	480
5	catgcatagt atcagccctc cacaccgac aaaggggaac acaccctt ggaaatgggt	540
	cttttcccc agtcccagct ggaagccatg ctgtctgttc tgctggagca gctgaacata	600
10	tacatagatg ttgccctgcc ctcccctct gcacctgtt gagttgtagt tggatttgtc	660
	tgtttatgct tggattcacc agagtgacta tgatagtga aagaaaaaa aaaaaaaa	720
	aggacgcatg tatcttgaaa tgcttgtaa gaggtttcta acccaccctc acgaggtgtc	780
15	tctcaccccc aactgggac tctgtgggc tggtgtgtgc caccctgtg gggcctcca	840
	agttttgaaa ggttttctc agcacctggg acccaacaga gaccagcttc tagcagctaa	900
	ggagggcgtt cagctgtgac gaaggcctga agcacaggat taggactgaa gcgatgatgt	960
20	ccccttccct acttcccctt ggggctccct gtgtcagggc acagactagg tcttgtggct	1020
	ggtctggctt gggcgcgag gatggttctc tctggctata gcccgagtc tcatggcagt	1080
25	cccaaaggag gcttacaact cctgcatcac aagaaaaag aagccactgc cagctggggg	1140
	gatctgcagc tcccagaagc tccgtgagcc tcagccacce ctcagactgg gttcctctcc	1200
	aagctcgccc tctggagggg cagcgagcc tcccaccaag ggccctgcga ccacagcagg	1260
30	gattgggatg aattgcctgt cctggatctg ctctagaggc ccaagctgcc tgcctgagga	1320
	aggatgactt gacaagtcag gagacactgt tcccaaagcc ttgaccagag cacctcagcc	1380
	cgtgacctt gcacaaactc catctgtgc catgagaaaa ggggaagcgc ctttgcaaaa	1440
35	cattgctgcc taaagaaact cagcagcctc aggcccaatt ctgccacttc tggtttgggt	1500
	acagttaaag gcaacctga gggacttggc agtagaaatc cagggcctcc cctggggctg	1560
40	gcagcttcgt gtgcagctag agctttacct gaaaggaagt ctctgggccc agaactctcc	1620
	accaagagcc tccctgcctg tctgtgagtc ccagcaattc tccaaagttg aagggatctg	1680
	agaaggagaa ggaatgtgg ggtagatttg gtggtggtta gagatatgcc cccctcatta	1740
45	ctgccaacag ttctggctgc atttcttcac gcacctcgtt tctcttctc gaagttcttg	1800
	tgcctgtctc ttcagcacca tgggcttctc tacaaggag gctctgggat cttccccttg	1860
	tggggcaggc tcttggggcc agcctaagat catggtttag ggtgatcagt gctggcagat	1920
50	aaattgaaaa ggcacgctgg cttgtgatct taaatgagga caatccccc agggctgggc	1980
	actcctcccc tcccctcact tctcccact gcagagccag tgccttggg tgggctagat	2040
55	aggatatact gtatgcggc tcttcaagc tgctgactca ctttatcaat agttccattt	2100
	aaattgactt cagtggtag actgtatcct gtttctatt gcttgtgtg ctatgggggg	2160
	aggggggagg aatgtgtaag atagttaaca tgggcaaagg gagatcttgg ggtgcagcac	2220
60	ttaaactgcc tctgaacct tttcatgati tcaaccacat ttgctagagg gagggagcag	2280

ES 2 304 146 T3

	ccacggagtt agagggccctt ggggtttctc ttttcactg acaggctttc ccaggcagct	2340
	ggctagttca ttccctcccc agccagggtgc aggcgtagga atatggacat ctggttgctt	2400
5	tggcctgctg cctcttttca ggggtcctaa gccacaaac atgctccct aagacctgg	2460
	catccttccc tctaagccgt tggcacctct gtgccacctc tcacactggc tccagacaca	2520
10	cagcctgtgc ttttgagct gagatcactc gcttcaccct cctcatcttt gttctccaag	2580
	taaagccaag aggtcggggc gagggcagag gtgatcacct gcgtgtccca totacagacc	2640
	tgcagcttca taaaacttct gatttctctt cagctttgaa aagggttacc ctgggcactg	2700
15	gcctagagcc tcacctccta atagacttag ccccatgagt ttgccatgtt gagcaggact	2760
	atttctggca cttgcaagtc ccatgatttc ttcggtaatt ctgaggggtg ggggaggac	2820
20	atgaaatcat cttagcttag ctttctgtct gtgaatgtct atatagtgtt ttgtgtgttt	2880
	taacaaatga ttacactga ctgttgctgt aaaagtgaat ttggaaataa agttattact	2940
	ctgatt	2946
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		