



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 284**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 31/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00121739 .7**
96 Fecha de presentación : **25.03.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1067386**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2001**

54 Título: **Inhibición de una asociación tau-tau.**

30 Prioridad: **27.03.1995 GB 9506197**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2010

73 Titular/es: **WISTA LABORATORIES Ltd.**
51 Ayer Rajah Crescent, No. 07-01/02
Singapore 139948, SG

72 Inventor/es: **Wischik, Claude Michel;**
Harrington, Charles Robert;
Edwards, Patricia Carol;
Roth, Martin y
Klug, Aaron

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 346 284 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

Inhibición de una asociación tau-tau.

5 La presente descripción se refiere a procedimientos novedosos para la detección de sustancias capaces de modular o inhibir la asociación tau-tau patológica de proteína y la agregación patológica de neurofilamentos. Los procedimientos de la presente invención son especialmente útiles para examinar sustancias para la profilaxis y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

10 La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa única más común de demencia en la tercera edad (Livingstone (1994). *The scale of the problem*. En: *Dementia* (Eds. Burns y Levy), Chapman & Hill, London, pp. 21-35). Los individuos con la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por la demencia progresiva que se presenta con pérdida de memoria creciente, alteraciones en el juicio, percepción y habla, y deterioro global del intelecto (Roth e Iversen *Brit. Med. Bull.* volumen especial (1986)).

15 Los contrastes patológicos mayores de la enfermedad de Alzheimer son las placas seniles y las marañas neurofibrilares, ambas de las cuales contienen filamentos helicoidales emparejados (PHF), de los cuales es constituyente la proteína tau (Wischnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4506-4510 (1988)). Las placas también contienen fibras β -amiloides derivadas de una anomalía, todavía no definida, en el procesamiento de la proteína precursora amiloidea (APP; Kang *et al.*, *Nature* 325:733-736 (1987)).

20 Los estudios de la enfermedad de Alzheimer han apuntado a la pérdida de la proteína tau normal asociada a microtúbulo (Mukaetova-Landinska, *Am. J. Pathol.* 143:565-578 (1993); Wischnik *et al.*, *Neurobiol. Ageing* 16:409-417 (1995a); Lai *et al.*, *Neurobiol. Ageing* 16:433-445 (1995b)), a la acumulación de filamentos helicoidales emparejados patológicos (PHF; Mukaetova-Landinska, *loc. cit.* (1993); Harrington *et al.*, *Dementia* 5:215-228 (1994a); Harrington *et al.*, *Am. J. Pathol.* 145:1472-1484 (1994b); Wischnik *et al.*, *loc. cit.* (1995a)), y la pérdida de sinapsis en el córtex frontal medio (Terry *et al.*, *Ann. Neurol.* 30:572-580 (1991)) como marcadores discriminantes fuertes del deterioro intelectual. En la enfermedad de Alzheimer, la pérdida de sinapsis (Terry *et al.*, *loc. cit.*) y la pérdida de células piramidales (Bondareff *et al.*, *Arch. Gen. Psychiatry* 50:350-356 (1993)) están correlacionadas ambas con medidas morfológicas de la patología neurofibrilar reactiva a la tau, y esto se correlaciona, a nivel molecular, con una redistribución prácticamente completa del "pool" de proteína tau, de la forma soluble a la forma polimerizada (PHF) (Mukaetova-Landinska, *loc. cit.* (1993); Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)). Una posible explicación para estos cambios es que la redistribución patológica de la proteína tau en PHF causa un fallo en el transporte axonal en circuitos de asociación cortico-cortical, a través de la incapacidad de mantener la tubulina axonal en el estado polimerizado dentro de las células piramidales (Wischnik *et al.*, *loc. cit.* (1995); Wischnik *et al.*, *Neurobiol. Ageing*, en prensa; Wischnik *et al.*, *Structure, biochemistry and molecular pathogenesis of paired helical filaments in Alzheimer's disease*. Eds. A. Goate y F. Ashall, en prensa; Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)). Un fallo resultante del transporte de constituyentes sinápticos desde el soma de proyección hasta el neocórtex de asociación distante conduciría a la pérdida sináptica y al deterioro intelectual. Otros factores incluyen la toxicidad directa de la acumulación de PHF en células piramidales (Bondareff *et al.*, *Arch. Gen. Psychiat.* 50:350-356 (1993); *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 53:158-164 (1994)), y la posible toxicidad directa de la acumulación truncada de tau, que perjudica la función celular (Mena *et al.*, *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 50:474-490 (1991)).

35 Aunque los estudios de la patogénesis molecular en sistemas modelo ha enfatizado el papel neurotóxico de la acumulación de β -amiloidea (revisada en Harrington y Wischnik, *Molecular Pathobiology of Alzheimer's disease*. En: *Dementia* (Eds. Burns y Levy), Chapman & Hill, London, pp. 211-238), la evidencia que une la deposición de β -amiloidea con el deterioro intelectual en humanos es débil. Es más probable que el procesamiento alterado de la APP sea sólo uno de los varios factores posibles que podrían iniciar el procesamiento alterado de la proteína tau. Otros factores iniciadores incluyen procesos desconocidos asociados con la apoE4 (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1994)), la trisomía del cromosoma 21 (Mukaetova-Ladinska *et al.*, *Dev. Brain. Dysfunct.* 7:311-329 (1994)), y factores medioambientales tales como la exposición prolongada a niveles subtóxicos de aluminio (Harrington *et al.*, *Lancet* 343:993-997 (1994c)). Distintos factores etiológicos son capaces de iniciar un patrón común de alteración en el procesamiento de la proteína tau, los cuales incluyen: la truncamiento C-terminal en el Glu-391, la formación de polímeros de tau PHF, la pérdida de tau soluble, y la acumulación de especies de tau anormalmente fosforiladas (Wischnik *et al.*, *Int. Rev. Psychiat.* en prensa (1996)).

45 El fragmento de la proteína tau asociada a microtúbulo que se ha observado es un constituyente integral de la estructura nuclear resistente a las proteasas del PHF, es un fragmento de 93/95 residuos de aminoácidos derivado del dominio de unión a microtúbulo de la tau (Wischnik *et al.*, *loc. cit.* (1988); Kondo *et al.*, *Neuron* 1:827-834 (1988); Jakes *et al.*, *EMBO J.* 10:2725-2729 (1991); Novak *et al.*, *EMBO J.* 12:365-370 (1993)). La proteína tau existe en 6 isoformas de 352-411 residuos de aminoácidos en el cerebro adulto (Goedert *et al.*, *Neuron* 3:519-526 (1989)). En general, la estructura de la molécula de tau consiste en un extenso dominio N-terminal de 252 residuos, el cual se proyecta a partir del microtúbulo, una región de repetición en tándem de 93-125 residuos, consistente en 3 ó 4 repeticiones en tándem, y la cual es el dominio de unión al microtúbulo, y una cola C-terminal de 64 residuos. Cada repetición en tándem está compuesta de un segmento de unión a tubulina de 19 residuos, y un segmento de engarce de 12 residuos (Burtner y Kischner, *J. Cell. Biol.* 115:717-730 (1991); Figura 1). El constituyente mayoritario de tau que se puede extraer a partir de preparaciones enriquecidas en el núcleo de PHF resistente a proteasas es un fragmento de 12 kDa derivado de ambas, las isoformas de 3 y 4 repeticiones, pero restringido al equivalente a 3 repeticiones en tándem,

con independencia de la isoforma (Jakes *et al.*, *loc. cit.*; Figura 2). Los límites N- y C-terminal del fragmento definen la extensión precisa de la unidad de tau del núcleo del PHF resistente a proteasas. Tiene la fase desplazada 14/16 residuos con respecto a la organización unidor/engarce de la molécula normal definida por Butner y Kirschner (*loc. cit.*, Figura 1), y está truncada de forma C-terminal en el Glu-391, o en una posición homóloga en la tercera repetición de la isoforma de 4 repeticiones (Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993); Figura 3). Hay disponible un anticuerpo monoclonal (mAb 423) que reconoce específicamente este punto de truncamiento C-terminal, y los estudios histológicos usando este anticuerpo han mostrado la presencia de proteína tau truncada C-terminalmente en el Glu-391 en todas las etapas de degeneración neurofibrilar (Mena *et al.*, *Acta Neuropathol.* 89:50-56 (1995); Mena *et al.*, *Acta Neuropathol.*, en prensa). Por tanto, la proteólisis anormal es una posible modificación post-traducción implicada en el ensamblaje del PHF.

Se han desarrollado procedimientos que permiten la discriminación entre los diversos “pooles” de tau que se hallan en los tejidos cerebrales en AD: tau soluble normal, tau fosforilada, y PHF resistentes a proteasas (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1990), (1991), (1994a)). Estos procedimientos se han desplegado en estudios de AD grave y del Síndrome de Down (Mukaetova-Ladinska *et al.*, *loc. cit.* (1993; 1995)), en casos verificados prospectivamente en las primeras etapas de la AD (Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1995a); Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)), y en casos con otros diagnósticos neuropatológicos, incluyendo la demencia senil del tipo cuerpo de Lewy y la enfermedad de Parkinson (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1994a), (1994b)). El contenido global de PHF en el tejido cerebral distingue sin ambigüedades entre pacientes con o sin demencia del tipo Alzheimer. Hay, en conjunto, una diferencia de 19 veces en el contenido de PHF, y en el córtex temporal la diferencia alcanza las 40 veces. El sitio principal de la acumulación de PHF es, tal como se esperaba a partir de los estudios histológicos, y no difiere de los controles envejecidos en términos de acumulación tanto de PHF resistentes a proteasa o de especies de tau fosforiladas (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1994a), (1994b)). Más aún, el genotipado de la apolipoproteína E de los casos de cuerpo de Lewy cortical mostró que la frecuencia del alelo E4 estaba incrementada en un alcance similar al observado en AD. Por tanto, la presencia del alelo E4 no puede ser la única causa de la patología de tau característica de AD, puesto que no se observó en los caso de cuerpo de Lewy (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1994b)).

Un parámetro extra que distingue casos con o sin AD es la cantidad de proteína tau soluble normal. Aunque los niveles de tau son superiores en la materia blanca respecto la materia gris, tal como se espera para una proteína asociada al microtúbulo axonal, la cantidad hallada en la materia gris también refleja la inervación axonal aferente. En AD, hay una pérdida sustancial de proteína tau soluble normal, la cual afecta todas las regiones del cerebro uniformemente (Mukaetova-Ladinska *et al.*, *loc. cit.* (1993)). No se conoce la base molecular de esta declive uniforme, y no puede explicarse mediante mRNA de tau reducido (Goedert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4051-4055 (1988)). El efecto neto de los dos procesos, de acumulación de PHF y pérdida de tau soluble, es un redistribución anatómica del pool de proteína tau, desde predominante en la materia blanca hasta predominante en la materia gris, y desde predominante en el frontal hasta predominante en el temporo-parietal.

La extensión global de la redistribución de la proteína tau en AD puede apreciarse a partir de los datos mostrados en la Figura 4, en donde se comparan los pooles totales de tau libre y tau unida a PHF. Mientras que en los controles el 97% del pool de proteína tau está en la fase soluble, en AD el 83% del pool de proteína tau se halla en la fase insoluble, casi totalmente en una forma truncada y polimerizada en PHF (Mukaetova-Ladinska *et al.*, *loc. cit.* (1993)). Un estudio de la etapa temprana de la AD, en casos prospectivamente verificados mediante el instrumento de diagnóstico CAMDEX (Roth *et al.*, *Brit. J. Psych.* 149:698-709 (1986)) y gradados *post mortem* mediante el criterio de tinción de Braak y Braak *Acta Neuropathol.* 82:239-259 (1991), demostró que la pérdida de tau soluble está directamente relacionada con el recuento de marañas y el alcance de la acumulación de PHF (Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)).

Aunque la tau anormalmente fosforilada se ha considerado como posible precursor de PHF (Lee *et al.*, *Science* 251:675-678 (1991); Goedert *et al.* en *Microtubules* (Eds. Hyams y Lloyd) pp. 183-200, John Wiley & Sons, N.Y. (1994)), se ha encontrado la tau normal fosforilada en muchos de los sitios previamente considerados como anormalmente fosforilados en la proteína tau asociada a PHF (Matsuo *et al.*, *Neuron* 13:989-1002 (1994)). En el estudio de la etapa temprana de la AD, primero se observaron las especies de tau hiperfosforilada insoluble después de que hubiera ocurrido la redistribución apreciable de la tau en PHF (Lai *et al.*, (1995); Figura 5). No hubo evidencia de acumulación selectiva de especies fosforiladas antes de la aparición de PHF o de marañas neurofibrilares (Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)). De igual forma, no hubo evidencia de que la tau fosforilada se añada al pool total unido a PHF durante la progresión de la patología (Lai *et al.*, (1995)). La fosforilación de la proteína, en tanto cuanto es normal, parece ser un proceso secundario que afecta aproximadamente el 5% de PHF, en cualquiera etapa de la patología (Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1995a), (1995c)).

Los estudios de la etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer también mostraron que la velocidad de transferencia de tau soluble al PHF es geométrica con respecto al nivel de PHF, con un incremento progresivo en la velocidad de incorporación a niveles ambiente de PHF superiores (Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995); Figura 6B). Más aún, la velocidad observada de pérdida de tau soluble con la progresión de la patología no es suficiente para justificar totalmente la velocidad de acumulación de PHF observada. Progresivamente se induce más síntesis de nueva tau a medida que el nivel ambiente de tau soluble cae por debajo de 580 pmoles/g, y esto también alimenta el ensamblaje de PHF (Figura 6A). La velocidad de ensamblaje de PHF no está determinada, por tanto, por el estado o concentración del precursor soluble, el cual parece ser enteramente normal incluso en AD (Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1995a), (1995b)). Más bien, la velocidad de transferencia de tau soluble a los PHF está determinada por el nivel ambiente de PHF-tau, sugiriendo que

la modificación post-traduccion crítica responsable del ensamblaje del PHF ocurre en el momento de incorporación de la tau en el PHF.

Una explicación probable para estos hallazgos es que la proteína tau sufre un cambio conformacional en el momento de incorporación en el PHF, el cual está asociado con el desplazamiento de fase de media repetición en la región de repetición en tándem que ha sido previamente documentado (Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993)). Este cambio conformacional podría exponer un sitio de captura con elevada afinidad por la tau, el cual permite la captura y modificación conformacional inducida de otra molécula de tau, y así sucesivamente. El cambio conformacional crítico en la proteína tau, el cual determina la velocidad de ensamblaje del PHF, no tendría que ser entonces una modificación química de la tau soluble, sino un cambio conformacional inducido, el cual se produce por la unión de la proteína tau a un sustrato patológico. El proceso podría ser iniciado por proteínas que fueran tau, tales como un producto del metabolismo de la APP (Caputo *et al.*, *Brain Res.* 597:227-232 (1992)), una proteína mitocondrial modificada (Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8739-8746 (1994)), etc. Una vez que se hubiera iniciado la captura de la tau, el proceso podría continuar siempre y cuando la velocidad de captura de otras tau excediera la velocidad de degradación del complejo patológico de tau. La degradación podría estar limitada por el hecho de que el complejo de tau, que es el núcleo del PHF, es resistente a las proteasas (Wischnik *et al.*, *loc. cit.* (1988); Jakes *et al.*, *loc. cit.*). Un proceso tal, una “amilosis de proteína tau”, podría iniciarse y progresar geoméricamente sin que interviniera ninguna modificación química de la proteína tau soluble, tal como se ha supuesto comúnmente.

La Figura 7 ilustra esquemáticamente la transformación de la proteína tau en los PHF de la enfermedad de Alzheimer. El constituyente mayoritario de la proteína del núcleo del PHF es una forma de la proteína tau que está truncada a un fragmento de 93 residuos, el cual abarca una versión con fase desplazada de la región de repetición en tándem de la molécula de tau, la cual funciona normalmente como el dominio de unión a microtúbulos. El ensamblaje del PHF puede concebirse como que ocurre a resultas de una secuencia de sucesos repetitiva en la cual la unión tau-tau patológica juega un papel central. Esta unión de la tau libre está favorecida a una concentración fisiológica sólo en el caso asimétrico en el que una molécula de tau ya ha sufrido la captura patológica (por ejemplo, a un producto del metabolismo de la APP (Caputo *et al.*, *Neurobiol. Ageing.* 13:267-274 (1992)), o a una proteína mitocondrial modificada (Jancsik *et al.*, *Cell Motif. Cytoskel.* 14:372-381 (1989); Wallace, *loc. cit.* (1994)), y la unión de otras tau está potenciada por el procesamiento proteolítico parcial de las especies capturadas, que sólo deja la unidad de tau truncada. Una vez que una unidad de longitud completa o truncada se une a una molécula de longitud completa, el procesamiento proteolítico parcial del complejo patológico resulta en la producción de un dímero de unidades tau nucleares, con pérdida de los dominios N- y C-terminales de la(s) molécula(s) previa(s) intacta(s). Los límites del procesamiento proteolítico están determinados por la región de asociación tau-tau, la cual corresponde precisamente a la unidad mínima de tau resistente a las proteasas que hemos descrito (Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993); ver Figuras 16 y 17). No obstante, el resultado final de esta proteólisis parcial es reproducir la unidad nuclear de la tau, la cual es capaz de capturar una molécula de tau de longitud completa. Este proceso puede repetirse indefinidamente. Requiere dos etapas claves para continuar hasta el punto de agotamiento del pool disponible de proteína tau. El primero es la captura repetida de tau de longitud completa por parte de la unidad truncada, el segundo es la truncamiento de la tau de longitud completa unida para reproducir la unidad nuclear.

Hasta ahora, no hay procedimientos fiables para la medición de la asociación tau-tau patológica, y no se ha descrito sustancia alguna capaz de modular o inhibir la asociación tau-tau.

Las soluciones a los problemas técnicos anterior se describen en la presente invención.

En consecuencia, la presente invención describe procedimientos para la detección de agentes capaces de modular o inhibir la asociación tau-tau patológica, que comprenden poner en contacto:

- a) una proteína tau, o un derivado de la misma que contiene el fragmento nuclear de la tau, con
- b) un agente sospechoso capaz de modular o inhibir la asociación tau-tau, y con
- c) una proteína tau marcada, o un derivado marcado de la misma capaz de unirse a la proteína tau de la etapa a), o con una proteína tau, o un derivado de la misma que es distinta de la proteína tau de la etapa a) y también es capaz de unirse a la proteína tau de la etapa a), y
- d) detectar la unión tau-tau.

La modificación de la tau, que es responsable de su polimerización en PHF, se propaga mediante un cambio conformacional físico en vez de cualquier modificación química post-traduccion de la tau. Sorprendentemente, es posible transferir esta modificación, la cual es inducida *in vivo* en el momento de la captura patológica de la tau, al procedimiento *in vitro* según el proceso anterior, mediante unión inicial de la tau a una fase sólida. La tau aislada del cerebro de la rata neonata fue totalmente incapaz de unirse a la unidad nuclear de tau del PHF (Figura 14; POTr). Pero la tau neonatal que se había unido previamente, de forma pasiva, a una matriz sólida, fue inducida a unirse a proteína tau de longitud completa y sin modificar con una elevada afinidad, idéntica a la demostrada con la unidad tau nuclear (Figuras 15 y 16). Por tanto, el factor crítico requerido para convertir un especie de tau incapaz de unirse patológicamente, en una especie capaz de capturar una molécula de tau extra con elevada afinidad, es el cambio conformacional inducido por la unión pasiva de la tau neonatal del sustrato de la fase sólida. Esto demostró que la exposición del sitio de captura

ES 2 346 284 T3

de tau con elevada afinidad podía inducirse físicamente mediante el cambio conformacional que ocurre a partir de la unión de la tau a un sustrato apropiado, y que no requiere ninguna otra modificación química.

5 De acuerdo con la descripción que se hace aquí, la unión patológica que se reproduce *in vitro* tiene ciertas propiedades críticas idénticas a aquéllas observadas en el cerebro humano. Esto es, en particular, que la proteína tau de longitud completa unida a una unidad de tau nuclear que termina en la Ala-390 (Figura 1, SEQ. ID. N° 4), y que carece por tanto del Glu-391 necesario para el reconocimiento por parte del anticuerpo monoclonal 423, podría hacerse reaccionar con el mAb 423 después del tratamiento del complejo de tau unida con la proteasa de espectro amplio, Pronasa, de una forma que depende cuantitativamente del alcance de la digestión con Pronasa (Figura 16). Podría
10 demostrarse que la pérdida dependiente de digestión de la inmunoreactividad N-terminal de la tau sucede en paralelo con la adquisición de la inmunoreactividad con el mAb 423 característica del PHF nuclear (Figura 16). Por tanto, el requisito esencial para la creación de la unidad de tau aislada procedente del núcleo del PHF, y producida en el cerebro en la enfermedad de Alzheimer, es la interacción patológica tau-tau, la cual se ha reproducido *in vitro*.

15 Más aún, los ciclos repetitivos de unión de tau de longitud completa a la unidad de tau nuclear que terminaba en Ala-390, seguidos por el tratamiento con Pronasa, a continuación con la unión de tau de longitud completa y más digestión con Pronasa, y así sucesivamente hasta cuatro ciclos, estuvieron asociados con la acumulación progresiva de tau truncada terminalmente en C en el Glu-391 (Figura 17), y con la capacidad progresivamente potenciada de unir más tau de longitud completa después de cada ciclo (Figura 18). Esto demostró que el papel esencial de la proteólisis,
20 en el modelo descrito en la Figura 7, es impedir la saturación, y de ese modo facilita la transformación progresiva ilimitada de tau soluble en las unidades tau truncadas del núcleo de PHF.

Habiendo mostrado que todas las etapas ilustradas en la Figura 7 podrían reproducirse *in vitro*, y que el requisito crítico para la progresión del proceso era la elevada afinidad de la etapa de captura de la tau, es posible demostrar el uso
25 de un ensayo de unión para encontrar compuestos capaces de bloquear la interacción tau-tau de elevada afinidad. La inhibición competitiva del 20% pudo demostrarse cuando los compuestos inhibidores más potentes estaban presentes en una proporción molar de 1:1 con respecto a la tau, y se encontró que la inhibición ulterior era aproximadamente lineal en el rango de proporción molar de hasta 10:1 (Figura 19).

30 Puesto que la región de repeticiones en tándem funciona como un todo, es inesperado que fuera posible demostrar la inhibición competitiva selectiva de la unión tau-tau patológica sin interferir con la unión normal de la tau a la tubulina a través de la misma región de la molécula. Un procedimiento para determinar cualquier posible interferencia, por ejemplo, la unión de tau o de un derivado de la misma a moléculas de tubulina, comprende poner en contacto una preparación de tubulina despolimerizada, o preparación de microtúbulos estabilizados con taxol, con un agente,
35 sospechoso de ser capaz de modular o inhibir la asociación tau-tau patológica, y un compuesto de tau mencionado en la etapa c) anterior, seguido por la detección de la unión tau-tubulina.

El término “proteína tau” se refiere a cualquier proteína de la familia de proteínas tau, mencionada más arriba, y derivados de la misma. Las proteínas tau se caracterizan como una familia entre un gran número de familias de proteínas, las cuales se co-purifican con microtúbulos durante ciclos repetidos de ensamblaje y desensamblaje (Shelanski
40 *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:765-768 (1973)), y conocidas como proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). La familia tau se caracteriza además por la presencia de un segmento N-terminal característico, el cual es compartido por todos los miembros de la familia, secuencias de 50 aminoácidos insertadas en el segmento N-terminal, las cuales son reguladas desarrolladamente en el cerebro, una región de repetición en tándem característica consistente de 3 ó 4
45 repeticiones en tándem de 31-32 aminoácidos, y una cola C-terminal (Figura 2).

En una realización preferida, la proteína tau comprende la secuencia de aminoácidos de la Figura 21 (SEQ. ID. N° 5), denominada como “T40” (Goedert *et al.*, *Neuron* 3:519-526 (1989)), o fragmentos de la misma, y que comprende la forma de la proteína tau que tiene 2 insertos N-terminales y 4 repeticiones en tándem.

50 El término “fragmento nuclear de tau” se define en su forma más elemental como el fragmento de tau que comprende una secuencia de proteína tau truncada, derivada de la región de repetición en tándem, la cual, en las condiciones apropiadas, es capaz de unirse con elevada afinidad a la región de repetición en tándem de otra proteína tau. Ordinariamente, las proteínas tau preferidas, los derivados de la proteína tau, y los fragmentos nucleares de la proteína tau,
55 tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia de aminoácidos con la correspondiente secuencia de aminoácidos de la proteína tau humana (Figura 21, SEQ. ID. N° 5), preferiblemente al menos el 80%, y más preferiblemente al menos el 90%, y se caracterizan en que son capaces de unirse al fragmento nuclear de la tau humana. Una realización particularmente ventajosa del procedimiento de ensayo comprende el fragmento nuclear de la tau, con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 22 (SEQ. ID. N° 6; Novak *et al.*, (1993)). Este péptido recombinante de tau expresado por *E. coli in vitro*, corresponde a las especies aisladas a partir de las preparaciones de núcleo de PHF resistente a la proteasa (Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1988); Jakes *et al.*, *loc. cit.* (1991)). El término “fragmento nuclear de tau” también incluye derivados del mismo, tal como se describe más abajo y se menciona en las Figuras 25 y 26 (SEQ. ID. N° 9 y 10).

65 Los términos “derivado de la proteína tau” y “derivado del fragmento nuclear de tau” comprenden fragmentos de proteínas tau que existen de forma natural o no natural, y proteínas relacionadas que comprenden al menos secuencias de aminoácidos parciales que se parecen a la región de repetición en tándem de las proteínas tau, es decir, proteínas en las que se han remplazado o suprimido uno o más aminoácidos de la tau natural o sus fragmentos sin merma de

la actividad de unión. Son ejemplo de proteínas que existen naturalmente con similitud de secuencia en la región de repetición en tándem las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP2; Figuras 25 y 26; SEQ. ID. N° 9 y 10; Kindler y Garner, *Mol. Brain Res.* 26: 218-224 (1994)). Tales análogos podrían producirse mediante procedimientos conocidos en la química de péptidos o mediante tecnología de ADN recombinante.

Los términos “derivado de la proteína tau” y “derivado del fragmento nuclear de tau” comprenden derivados, que podrían prepararse a partir de los grupos funcionales que hay como cadenas laterales en los residuos o en los grupos N- o C-terminales, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Estos derivados podrían incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilos mediante reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acil de los grupos aminos libres de los residuos aminoácidos formados con grupos acilo (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilos carbocíclicos), o derivados O-acilo de los grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los residuos serilos o treonilos) formados con grupos acilo.

El fragmento de tau del núcleo de PHF podría aislarse a partir de tejidos cerebrales de AD mediante el procedimiento descrito en Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1988); (1995a)). El procedimiento depende de una serie de etapas de centrifugación diferencial realizadas en condiciones de tampón y densidad determinadas empíricamente, llevándose a cabo la etapa crítica de centrifugación final en un gradiente de densidad continuo de sacarosa que oscila entre 1,05 y 1,18 en densidad, y en la presencia de 10 µg/ml de Pronasa, para producir una fracción de núcleo de PHF, resistente a la proteasa, en la interficie con un cojín de cloruro de cesio de elevada densidad. La proteína tau puede liberarse a partir del núcleo de PHF como una preparación esencialmente pura en el sobrenadante de pH 5,5 (acetato amónico, 50 mM) obtenido después de tratar la preparación de PHF con ácido fórmico concentrado, de liofilizarla, y sonicarla en tampón de pH 5,5.

La tau soluble normal puede aislarse bien a partir de ADN, tejidos cerebrales humanos control, o a partir de tejidos cerebrales de animales con un retraso *post mortem* de menos de 3 horas. Las proteínas de los microtúbulos se obtienen mediante tres ciclos de ensamblaje-desensamblaje dependiente de la temperatura, de acuerdo con Shelanski *et al.* (*loc. cit.*, 1973). La proteína tau se purifica a partir de la fracción termoestable mediante filtración en gel (Herzog y Weber, *Eur. J. Biochem.* 92:1-8 (1978)). Alternativamente, la proteína tau puede aislarse mediante el procedimiento de Lindway y Cole (*J. Biol. Chem.* 259:12241-12245 (1984)), basado en la solubilidad de la proteína tau en ácido perclórico al 2,5%.

La producción de proteínas tau y fragmentos puede conseguirse además mediante tecnología de ADN recombinante convencional, la cual se halla dentro de los conocimientos del especialista en la técnica. Tales técnicas se explican con más detalle en la literatura, ver, por ejemplo, Sambrook, Eritsch y Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), N.Y. y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publish Association y Wiley Interscience.

Además, las moléculas de ADN y los fragmentos de las mismas que codifican proteínas tau completas o parciales, podrían obtenerse con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores que codifican las porciones 3' y 5' de las moléculas de ADN relevantes podrían sintetizarse para la proteína tau de interés, y pueden utilizarse para amplificar los miembros individuales de la familia de la proteína tau.

La preparación de proteínas de tubulina o fragmentos de la misma es conocida en la técnica, y es descrita, por ejemplo, por Slobada *et al.*, en *Cell Mobility*, (Eds. R. Goldman, T. Pollard, y J. Rosenbaum), Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1171-1212 (1976)).

Las secuencias de ADN y las moléculas de ADN podrían expresarse usando una amplia variedad de combinaciones huésped/vector. Por ejemplo, los vectores de expresión útiles podrían consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico, y sintético. Son ejemplos de tales vectores los vectores virales, tales como los varios conocidos derivados del SV40, vectores bacterianos, tales como plásmidos procedentes de *E. coli*, ADN de fagos, tales como los numerosos derivados del fago λ, M13 y otros fagos filamentosos de ADN de hebra única, así como vectores útiles en levaduras, tales como los derivados del plásmido 2µ, vectores útiles en células eucariotas, más preferiblemente vectores útiles en células animales, tales como aquéllos que contienen SV40, secuencias de ADN derivadas de adenovirus y/o retrovirus.

Tal como se usa en ésta, el término “secuencia de ADN” se refiere a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ADN mayor, el cual se ha derivado a partir de ADN aislado, al menos una vez, en forma sustancialmente pura, es decir, libre de materiales contaminantes endógenos, y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación, y recuperación de la secuencia, y sus secuencias nucleotídicas componentes, mediante procedimientos bioquímicos estándares, por ejemplo, usando un vector de clonación. Tales secuencias se proporcionan preferiblemente en forma de un marco de lectura abierto y no interrumpido por secuencias no traducidas internas, o intrones, los cuales están típicamente presentes en genes eucariotas. No obstante, será evidente que también podría usarse el ADN genómico que contiene las secuencias relevantes. Las secuencias de ADN no traducido podrían estar presentes en posición 5' ó 3' respecto del marco de lectura abierto, en donde no interfieren con la manipulación o expresión de las regiones codificantes.

Tal como se usan en ésta, los términos “vector de expresión” y “plásmido de expresión” se refieren a un plásmido que comprende una unidad de transcripción, que comprende un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos

que tienen un papel regulador en la expresión de genes, por ejemplo, promotores o potenciadores, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe en mRNA y se traduce a proteína, y (3) secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción y traducción. Los elementos estructurales que se pretenden usar en varios sistemas de expresión eucariotas preferiblemente incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de la proteína traducida por parte de una célula huésped. Alternativamente, allí donde la proteína se expresa sin una secuencia líder o de transporte, ella podría incluir un residuo N-terminal de metionina. Este residuo podría, opcionalmente, cortarse subsiguientemente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La célula huésped usada para la expresión de secuencias de ADN podría seleccionarse a partir de una variedad de huéspedes conocidos. Son ejemplo de tales huéspedes las células procariotas y eucariotas. Un elevado número de tales huéspedes están disponibles a partir de varios depósitos, tales como la *American Type Culture Collection* (ATCC) o la *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen* (DSM). Son ejemplos de huéspedes celulares procariotas las cepas bacterianas, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, y otras. Los huéspedes preferidos son células de mamíferos comercialmente disponibles, tales como células 3T3 de ratón, líneas celulares de neuroblastoma, tales como la NIE-115, N2A, PC-12, o la línea celular COS de riñón de mono verde africano transformada por SV40, etc.

La proteína tau producida mediante fermentación de los huéspedes procariotas y eucariotas, transformados con las secuencias de ADN de esta invención, pueden purificarse hasta su homogeneidad esencial mediante procedimientos conocidos, tales como, por ejemplo, mediante centrifugación a diferentes velocidades, mediante precipitación con sulfato amónico, mediante diálisis (a presión normal o con presión reducida), mediante enfoque isoelectrico preparativo, mediante electroforesis preparativa en gel, o mediante varios procedimientos cromatográficos, tales como filtración en gel, cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa y cromatografía de afinidad (por ejemplo, sobre Sepharose® Blue CL-6B, o sobre anticuerpos monoclonales unidos al portador).

De acuerdo con la presente descripción, una proteína tau, o un fragmento de la misma que contiene el fragmento núcleo de tau, se incuba con una proteína tau, junto con un agente sospechoso de ser capaz de modular o inhibir la asociación tau-tau patológica. El alcance de la unión tau-tau, la cual se correlaciona con la capacidad de inhibición del agente, podría detectarse mediante varios procedimientos.

En un procedimiento preferido, la proteína tau, o un fragmento de la misma que contiene el fragmento núcleo de tau, se incuba con un derivado de tau que es distinto, preferiblemente inmunológicamente distinto, de la primera proteína tau. En este caso, la unión del derivado de tau se detecta, por ejemplo, a través de un anticuerpo poli- o monoclonal, o de un derivado del mismo. Un ejemplo para este tipo de detección es un procedimiento de ensayo para la detección de unión tau-tau caracterizado porque se incuba una proteína tau truncada, correspondiente al fragmento nuclear, junto con una sustancia de ensayo, y o una proteína de longitud completa, o un fragmento de proteína tau truncada que simula la unidad tau del núcleo de PHF en la fase acuosa (Figuras 8 y 10).

En este caso, la unión tau-tau puede detectarse inmunológicamente, de una forma convencional, usando un anticuerpo que reconoce el segmento N-terminal de la proteína tau de longitud completa, o, por ejemplo, un anticuerpo tal como el mAb 423, el cual reconoce el fragmento de tau nuclear truncado en Glu-391. De forma ventajosa, el anticuerpo monoclonal porta, en sí mismo, un marcador o un grupo para el acoplamiento directo o indirecto con un marcador, tal como se ilustra en ésta más adelante. También puede usarse un anti-suero policlonal, el cual se genera inyectando el antígeno tau correspondiente en un animal, preferiblemente un conejo, y recuperando el anti-suero mediante purificación de inmuno-afinidad, en la cual el anticuerpo policlonal se pasa a través de una columna a la cual está unido el antígeno, y eluyendo el anticuerpo policlonal de una forma convencional.

Una realización particularmente ventajosa del procedimiento de la presente descripción comprende el uso de un anticuerpo dirigido contra un segmento específico humano entre Gly-16 y Gln-26, cerca del extremo N-terminal de la proteína tau. El uso de este tipo de anticuerpo hace posible medir la unión de tau humana recombinante de longitud completa a isoformas de tau de longitud completa derivadas de otras especies animales, por ejemplo, de ratas, en varias etapas del desarrollo. La unión de la tau truncada puede detectarse usando un anticuerpo tal como el mAb 423 para detectar un fragmento tau nuclear truncado que termina en Glu-391, que se une a un fragmento similar que termina en Ala-390 y no es reconocido por el mAb 423 (Figura 8).

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos podrían usarse en cualquier sistema de inmunoensayo conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a: radioinmunoensayos, ensayos en "sandwich", ensayos de inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, etc.

Es particularmente preferida la siguiente configuración para los ensayos de unión tau-tau (Figura 10): un fragmento tau, preferiblemente un fragmento de tau recombinante, correspondiente a la unidad tau truncada del núcleo del PHF, se une a una fase sólida, por ejemplo, una placa convencional de ELISA, en condiciones de tampón que se ha observado que no favorecen la asociación tau-tau. La proteína tau truncada se une preferiblemente de forma pasiva a la fase sólida, puesto que se ha hallado que expone el sitio de unión tau-tau de elevada afinidad de dentro de la región de repetición en tándem. La fase sólida es usualmente poli(vinilcloruro), pero podría ser otros polímeros tales como celulosa, poli(acrilamida), nilón, poliestireno, o polipropileno. Los soportes sólidos podrían presentarse en forma de tubos, cuentas, discos o microplacas, o cualesquiera otras superficies apropiadas para realizar el ensayo, y las cuales,

a partir de la unión pasiva de la proteína tau, exponen el sitio de captura de tau de elevada afinidad. A continuación de la unión, se lava el complejo fase sólida-anticuerpo en la preparación para la muestra de ensayo.

5 Sorprendentemente, pudieron determinarse las condiciones de tampón apropiadas para la unión de la unidad tau truncada del núcleo del PHF a un sustrato sólido sin auto-asociación, y sin afectar el sitio de captura de tau con elevada afinidad dentro de la región de repetición en tándem. Se estableció un sistema de ensayo, tal como se muestra en la Figura 8, en el cual la unidad tau nuclear truncada en Ala-390 se unía primero a la matriz de fase sólida. A continuación, se incubaba la unidad truncada que terminaba en Glu-391. Sólo pudo detectarse ésta última como inmunoreactividad con mAb 423. La Figura 9 demuestra la especificidad del ensayo, ya que la inmunoreactividad con el mAb 423 se observa sólo en la condición en que se espera la unión tau-tau. Se encontró que un tampón alcalino (carbonato sódico, tris, etc.), preferiblemente a pH 9-10, por ejemplo, tampón de carbonato sódico (50 mM, pH 9,6), estaba asociado con una auto-asociación despreciable de las unidades tau nucleares (Figura 9). Por tanto, el recubrimiento con la unidad tau nuclear para la unión pasiva a la matriz de fase sólida se realizó en este tampón. Si se desea, puede depositarse una preparación de tubulina despolimerizada o una preparación de microtúbulos en el mismo tampón de la unión pasiva, para la determinación de la unión tau-tubulina. Los agentes apropiados para bloquear el exceso de sitios de unión son el extracto de leche, la albúmina de suero bovino, la gelatina, etc. Después de transferir la unidad tau nuclear unida a la fase sólida a condiciones de tampón fisiológicas, y de incubar con tau de longitud completa en el formato de ensayo de unión estándar (Figura 10), fue posible demostrar la captura con afinidad extremadamente elevada de proteína tau de longitud completa. No se observó unión alguna de la tau de longitud completa sin recubrimiento de la fase sólida con la unidad de tau nuclear. Cuando estaban presentes ambas especies, se observó que la unión dependía de la concentración de ambas especies. Se encontró que cuando o bien la especie de la fase sólida o la de la fase acuosa estaban saturadas, la constante de unión para la otra especie era 8-25 mM, dependiendo de la isoforma de tau concreta medida (Figura 11). Las condiciones de tampón para la unión tau-tau deberían comprender concentraciones salinas apropiadas y valores de pH apropiados (Figuras 12 y 13). Las concentraciones de sal para la unión tau-tau deberían ser preferiblemente de 50 a 400 mM de cloruro sódico, más preferiblemente de 100 a 200 mM de cloruro sódico, o una sal o mezcla de sales correspondiente con una fuerza iónica comparable, por ejemplo, PBS (cloruro sódico 137 mM, fosfato dihidrógeno de potasio 1,47 mM, fosfato hidrógeno de potasio 8,1 mM, cloruro potásico 2,68 mM). El rango de pH debería comprender valores de pH de pH 4 a pH 10, y más preferiblemente de pH 5 a pH 8. Con objeto de saturar el exceso de sitios de unión y para evitar la unión no específica, podría incubarse la fase sólida con un agente bloqueador, por ejemplo, extracto de leche, albúmina de suero bovino, o, preferiblemente, gelatina. Después de transferir de la unidad tau nuclear unida pasivamente a condiciones tamponantes fisiológicas, fue posible demostrar la captura con extremadamente alta afinidad de la proteína tau de longitud completa ($K_d = 8-25$ nM, dependiendo de la especie concreta de tau ensayada).

35 Se añadió una fase líquida, que contenía una proteína tau capaz de unirse a la proteína tau de la fase sólida, junto con la sustancia de ensayo, a la proteína tau de la fase sólida, durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión. El complejo de tau unida se lava otra vez en la preparación para la adición del anticuerpo, el cual detecta selectivamente la especie de tau unida secundariamente, pero no la especie de la fase sólida inicial. El anticuerpo está unido a una molécula informadora, cuya señal visible se usa para indicar la unión de la segunda especie de proteína tau.

Alternativamente, la detección de la unión podría realizarse con un segundo anticuerpo capaz de unirse a un primer anticuerpo, no marcado, específico para tau. En este caso, el segundo anticuerpo está unido a una molécula informadora.

45 Por "molécula informadora", tal como se usa en la presente invención, se quiere indicar una molécula que, por su naturaleza química, proporciona una señal analíticamente detectable, la cual permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. La detección debe ser al menos relativamente cuantificable, para permitir la determinación de la cantidad de antígeno en la muestra, esta podría calcularse en términos absolutos, o podría darse en comparación con un estándar (o series de estándares) que contienen una nivel normal conocido de antígeno.

Las moléculas informadoras más comúnmente usadas en este tipo de ensayos son o enzimas o fluoróforos. En el caso de un inmunoensayo con enzima, un enzima está conjugado con el segundo anticuerpo, a menudo por medio de glutaraldehído o peryodato. No obstante, tal como será fácilmente reconocido, existen una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes, la cuales son bien conocidas por cualquier especialista en la técnica. Los enzimas comúnmente usados son la peroxidasa de rábano silvestre, la oxidasa de glucosa, la β -galactosidasa, y la fosfatasa alcalina, entre otros.

Los sustratos a usar con los enzimas específicos se eligen generalmente para la producción a partir de la hidrólisis por parte del enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, el fosfato de p-nitrofenilo es apropiado para su uso con conjugados de la fosfatasa alcalina; para conjugados de peroxidasa, se usan comúnmente 1,2-fenilendiamina o tetrametilbencidina. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, los cuales rinden un producto fluorescente, en vez de los sustratos cromogénicos mencionados más arriba. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al complejo de proteína tau-tau correspondiente y se deja unir al complejo, a continuación se lava el exceso de reactivo. A continuación se añade una solución que contiene el sustrato apropiado, peróxido de hidrógeno, al complejo terciario del anticuerpo-antígeno-complejo marcado. El sustrato reacciona con el enzima unido al anticuerpo rindiendo una señal visual cualitativa, la cual se puede además cuantificar, usualmente

espectrofotométricamente, para obtener una evaluación de la cantidad de antígeno que está presente en la muestra de suero.

Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína o rodamina, podrían unirse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda determinada, el anticuerpo marcado con fluorocromo absorbe energía lumínica, induciéndose un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de luz a un longitud de onda superior característica. La emisión aparece como un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Como en el inmunoensayo de enzima (EIA), se deja unir el anticuerpo fluorescentemente marcado con el primer complejo anticuerpo-tau-péptido. Después de lavar el reactivo no unido, el complejo terciario restante se expone entonces a luz con la longitud de onda apropiada, y la fluorescencia observada indica la presencia del antígeno.

En otra realización preferida, la segunda especie de proteína tau, que se añade en fase líquida junto con la sustancia de ensayo, podría estar unida a una molécula informadora tal como se mencionó más arriba. La segunda especie de tau podría modificarse directamente (por ejemplo, marcada con una marca radioactiva o enzimáticamente detectable) o conjugarse (por ejemplo, a un fluoróforo) en un dominio de la molécula, por ejemplo el segmento N-terminal, el cual se sabe que no está implicado en el sitio de unión tau-tau de alta afinidad, y, por tanto, funcionar por sí misma como el ligando en el ensayo de unión tau-tau y como la molécula informadora.

En el Ejemplo 1 se describe una realización particularmente preferida de la presente descripción.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos usados en el procedimiento de la presente descripción pueden producirse mediante técnicas convencionales, es decir, pueden prepararse anticuerpos monoclonales, los cuales son selectivos para epítomos de tau, mediante el procedimiento de Köhler y Milstein. Los anticuerpos monoclonales apropiados para los epítomos de tau pueden modificarse mediante procedimientos conocidos para proporcionar realizaciones de fragmentos Fab o fragmentos (Fab')₂ quiméricos, humanizados o anticuerpos de cadena única.

A continuación se presentan los ejemplos de anticuerpos monoclonales que son útiles, tanto para medir la afinidad de unión en la interacción tau-tau, como para demostrar la relación inmunoquímica entre la unión demostrada *in vitro* y la que ocurre en el cerebro humano.

Los anticuerpos monoclonales que reconocen un epítipo N-terminal o C-terminal de tau permiten medir la unión entre especies de tau truncadas y de longitud completa. Son especialmente útiles los anticuerpos que reconocen epítomos específicos de humanos. Un anticuerpo monoclonal (denominado AK 499) reconoce un epítipo específico de humanos ubicado en la región entre Gly-16 y Gln-26 de tau, y, por tanto, permite también la medición de la unión entre especie de tau de longitud completa, siempre y cuando una se derive de una fuente no humana (Lai, *The role of abnormal phosphorylation of tau protein in the development of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease*. Tesis doctoral, Universidad de Cambridge, 1995). El anticuerpo 342 reconoce un epítipo de tau genérico y no específico de especie ubicado entre la Ser-208 y la Asn-265 (Figura 21, SEQ. ID. N° 4), el cual es parcialmente tapado en el curso de la interacción tau-tau (Lai, *loc. cit.*).

Otros anticuerpos útiles ya han sido descritos: el anticuerpo 423 reconoce la tau truncada C-terminalmente en el Glu-391 (Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993)). Esta truncamiento ocurre naturalmente en el curso del ensamblaje del PHF en la enfermedad de Alzheimer (Mena *et al.*, *loc. cit.* (1995), (1996); Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993); Mena *et al.*, *loc. cit.* (1991)). La misma truncamiento C-terminal puede demostrarse *in vitro* después de la unión de tau de longitud completa a un fragmento de tau truncada que termina en la Ala-390, el cual no es reconocido por el mAb 423 (Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993)), seguida por digestión con la proteasa de amplio espectro Pronasa (Figura 16). En esta configuración, la única fuente posible de inmunoreactividad con el mAb 423 procede de la digestión de la tau de longitud completa unida, y puede mostrarse que ésta incrementa de forma dependiente con la concentración con Pronasa creciente (Figura 16). Esto demuestra que la conformación molecular de la interacción de unión tau-tau generada *in vitro* se corresponde precisamente con la que ocurre en el cerebro, y, por tanto, que la inhibición selectiva de la unión demostrada *in vitro* puede generalizarse al cerebro humano.

El anticuerpo 7.51 reconoce un epítipo genérico de tau ubicado en la antepenúltima repetición de la tau (Novak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5837-5841 (1991)), la cual es obstruida cuando la tau se une en una configuración inmunoquímica similar al PHF, pero puede ser expuesta después de su tratamiento con ácido fórmico (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1990), (1991); Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1995a)). La tau soluble normal, o la tau unida a microtúbulos, puede detectarse con mAb 7.51 sin tratamiento con ácido fórmico (Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1991); Wischik *et al.*, *loc. cit.* (1995a)). La unión de tau de longitud completa en el ensayo de unión tau-tau está asociada con la obstrucción parcial del epítipo del mAb 7.51.

Se identificaron fenotiazinas que producen una inhibición de la unión con una Ki de 98-108 mM (Figura 19). La inhibición del 20% puede demostrarse en una proporción molar de 1:1 con respecto a la tau, y la inhibición ulterior es aproximadamente lineal en el rango hasta la proporción molar 10:1. Estos hallazgos son consistentes con las siguientes suposiciones: la unión tau-tau está determinada por un número finito de sitios de unión saturables y por tanto es específica; no hay cooperación, es decir, la unión de una molécula de tau no influencia la unión de otra molécula de tau en el sitio en el que ocurre la inhibición; la unión es reversible y está en un estado de equilibrio dinámico en el que la unión está determinada sólo por la concentración y afinidad de unión.

Dado que la región de repetición en tándem de la tau funciona normalmente como el dominio de unión de la tubulina, y que la misma región de la molécula contiene también el sitio de captura de alta afinidad de la tau responsable del ensamblaje del PHF, sólo sería posible concebir una intervención farmacéutica para prevenir la unión patológica de la tau si pudiera demostrarse una diferencia molecular más sutil entre los dos tipos de unión, lo que permitiría la inhibición selectiva de la interacción patológica tau-tau, sin inhibición de la unión normal tau-tubulina, puesto que muchos procesos celulares, incluyendo particularmente el transporte axonal de vesículas sinápticas (Okabe y Hirokawa, *Nature* 343:479-482 (1990)), dependen de la capacidad de la célula de mantener la tubulina en el estado polimerizado. Experimentos previos demostraron diferencias inmunoquímicas (obstrucción del epítipo del mAb 7.51 en la interacción tau-tau, pero no obstrucción de la interacción tau-tubulina; Harrington *et al.*, *loc. cit.* (1991); Novak *et al.*, *loc. cit.* (1991)), y diferencias moleculares (la tau unida en una configuración similar al PHF muestra un desplazamiento de fase de 14/16 aminoácidos con respecto a la organización segmento de unión a tubulina/segmento de enlace del dominio de unión a tubulina, la cual puede demostrarse mediante digestión proteolítica de los sitios N- y C-terminal característicos; Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993); Figura 3). Sorprendentemente, estas diferencias podrían proporcionar también una base para la discriminación farmacéutica usando moléculas pequeñas dentro de clases farmacéuticas bien establecidas. En particular, se ensayaron los efectos de las fenotiazinas, las cuales se observó inhiben la asociación patológica tau-tau, sobre la inhibición de la unión normal tau-tubulina. Esencialmente, no se pudo demostrar inhibición de la unión hasta una proporción molar de 1000:1 con respecto de la tau (Figura 20). No obstante, se observó que la hiperfosforilación de la tau, la cual se ha observado que inhibe la interacción de unión tau-tubulina, también produce una inhibición comparable en este ensayo de unión tau-tubulina (Lai, *loc. cit.*). Por tanto, los compuestos, proporcionados por la presente invención, que inhiben la asociación patológica tau-tau no inhiben la asociación normal de la tau a la tubulina. Esto representa un descubrimiento crítico de la presente invención, puesto que demuestra la posibilidad técnica de descubrir compuestos, sobre la base del sistema de examen descrito en ésta, los cuales pueden distinguir farmacéuticamente entre la unión patológica de la región de repetición en tándem en el PHF y la unión normal del tándem de la región de repetición en tándem en la interacción tau-tubulina.

La única proteína asociada a microtúbulo identificada hasta la fecha en el núcleo del PHF es la proteína tau. No obstante, los PHF se ensamblan en el compartimento somatodendrítico, en donde la proteína predominante asociada a microtúbulos es la MAP2 (Matus, A., en *Microtubules*, Eds. Hyams y Lloys, pp. 155-166, John Wiley & Sons, N.Y.). Las isoformas de MAP2 son casi idénticas a la proteína tau en la región de repetición en tándem, pero difieren sustancialmente tanto en la secuencia como en el alcance del dominio N-terminal (Figuras 25 y 26, SEQ. ID. N° 9 y 10). Tal como se muestra en el Ejemplo 3, la agregación de la región de repetición en tándem no es selectiva para la secuencia específica de aminoácidos del núcleo de la tau, y la actividad inhibidora de los inhibidores de fenotiazina, tales como la tionina, no depende de secuencias únicas de la tau.

Además, la presente descripción también se refiere a los correspondientes procedimientos *in vivo*. Estos procedimientos se refieren al examen en busca de agentes que modulen o inhiban la asociación patológica tau-tau caracterizados por poner en contacto una línea celular transfectada bien con una proteína tau, o un derivado de la misma que contiene el fragmento nuclear de la tau, o con un vector capaz de expresar una proteína tau, o un derivado de la misma que contiene el fragmento nuclear de la tau, con un agente sospechoso de ser capaz de modular o inhibir la asociación tau-tau seguida por la detección de la viabilidad de la línea celular y/o la morfología de la línea celular.

Los Ejemplos 4 y 5 revelan que los fibroblastos son totalmente viables cuando expresan la proteína tau de longitud completa transgénica, y la distribución citoesquelética de la proteína tau de longitud completa transgénica no se ve alterada por el cultivo de las células con un inhibidor potente de la unión tau-tau. La fenotiazina tionina no parece tener una toxicidad intrínseca sustancial. Por los fibroblastos o no son viables o exhiben grandes anomalías morfológicas cuando expresan la unidad tau nuclear transgénica del PHF. La frecuencia de los transfectados viables y el nivel de expresión de la tau trucada incrementan de forma dependiente a la dosis cultivando las células en tionina a continuación de la transfección. Los transfectados viables que expresan la tau trucada dependen de la tionina, y revierte a las formas anormales con baja viabilidad a partir de su supresión.

Estos hallazgos corroboran, por tanto, en un sistema celular no neuronal, los hallazgos principales de la presente invención, en concreto: que niveles elevados de la tau del núcleo de PHF dentro de la célula son tóxicos; que esta toxicidad puede invertirse mediante compuestos que son inhibidores selectivos de la interacción de unión patológica tau-tau; y que tales compuestos no alteran la unión normal de la tau a la tubulina *in vivo*. Estos hallazgos son generalizables a otros modelos experimentales, incluyendo sistemas de transfección inducible y la transfección directa de células con proteína tau trucada.

Aunque los resultados anteriores apoyan el uso de inhibidores de la unión tau-tau para revertir la toxicidad de la unidad de tau trucada, es deseable establecer modelos neuronales de estos procesos. En general, las líneas celulares de neuroblastomas sufren cambios citoesqueléticos complejos en el curso de su diferenciación, los cuales dependen de un equilibrio entre los desarrollos de la red de microtúbulos y un desarrollo correspondientes de la red de neurofilamentos. Se cree que las proteínas de peso molecular elevado asociadas a microtúbulos (MAP1A, MAP1B) proporcionan puentes entrecruzados entre estos sistemas citoesqueléticos (Schoenfield *et al.*, *J. Neurosci.* 9:1712-1730 (1989)). Se sabe que la interferencia directa con el sistema de microtúbulos con agentes despolimerizantes (Wisniewski y Terry, *Lab. Invest.* 17:577-587 (1967)) o aluminio (Langui *et al.*, *Brain Res.* 438:67-76 (1988)) resulta en el colapso de los filamentos intermedios, con formación de las marañas características en el citoplasma (Wischik y Crowther, *Br. Med. Bull.* 42:51-56 (1986)). Una agregación similar del citoesqueleto de neurofilamentos puede observarse que ocurre espontáneamente en líneas celulares de neuroblastomas que no consiguen diferenciarse. El rol de las MAP en la formación

de estos agregados no se conoce actualmente. No obstante, la formación, acentuación e inhibición de estos agregados representa marcadores indirectos de la capacidad del citoesqueleto microtubular para asociarse con, y transportar el citoesqueleto de neurofilamentos hacia neuritas recién formadas.

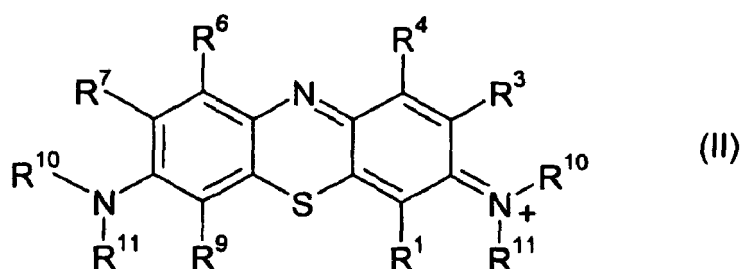
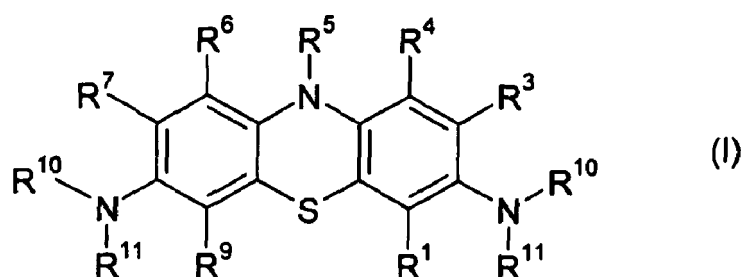
5 Los Ejemplos 6 y 7 revelan que los inhibidores de fenotiazinas, tales como la tionina, no son tóxicos para las líneas celulares neuronales en concentraciones de hasta 2 μ M, y que la tionina no interfiere con la incorporación de proteína tau transgénica en la red de microtúbulos endógena. Estas fenotiazinas son necesarias para la producción de líneas celulares neuronales viables a continuación de su transfección estable con un plásmido que expresa la tau truncada. Más aún, la expresión constitutiva de tau truncada acentúa la formación de agregados de pNFH, mientras que ésta
10 última es inhibida por la expresión de tau de longitud completa. La formación de pNFH es inhibida por fenotiazinas tales como la tionina, y la incorporación de inmunoreactividad al pNFH en los procesos neuronales es facilitada por estos compuestos.

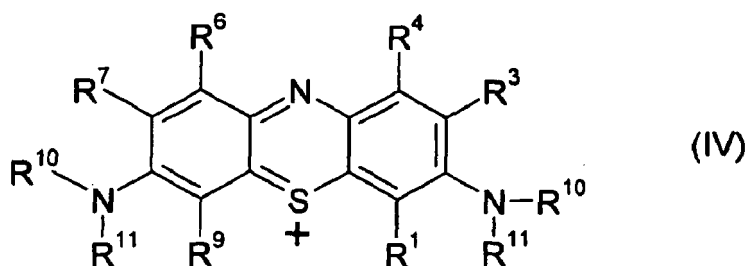
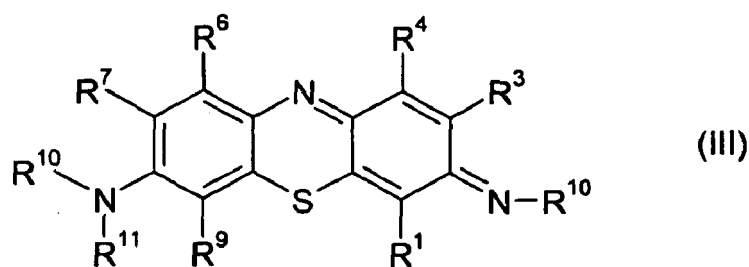
Estos hallazgos demuestran que la transfección estable de líneas celulares neuronales con tau truncada es inherentemente tóxica y, mediante la desestabilización del sistema de microtúbulos en las células supervivientes, resulta
15 en la formación de presuntos agregados de neurofilamentos que no consiguen ser transportados hacia las neuritas en desarrollo. Estos efectos pueden ser inhibidos mediante un compuesto seleccionado por su capacidad de bloquear la agregación tau-tau *in vitro*, y esta acción está mediada presumiblemente por un efecto permisivo sobre la expresión de tau endógena u otras MAP requeridas para estabilizar los microtúbulos. Las fenotiazinas como la tionina tienen también la inesperada capacidad de bloquear la agregación de neurofilamentos en las células no transfectadas, bien facilitando la diferenciación neuronal, o inhibiendo directamente la formación de agregados de neurofilamentos. Además
20 de la utilidad potencial en la prevención de la agregación de la tau en la enfermedad de Alzheimer, tales compuestos podrían tener una utilidad potencial adicional en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la agregación patológica de neurofilamentos, tales como la enfermedad neuronal motora y la enfermedad del cuerpo de Lewy. Se ha hallado que los ratones transgénicos que sobreexpresan las subunidades de los neurofilamentos desarrollan agregados de neurofilamentos selectivamente en neuronas motoras grandes, las cuales sufren degeneración, conduciendo al decaimiento muscular y debilidad (Cote *et al.*, *Cell* 73:35-46 (1993); Xu *et al.*, *Cell* 73:23-33 (1993)). Otras alteraciones neurodegenerativas, la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva, muestran la acumulación patológica de agregados de tau truncados respectivamente en *Gyrus Dentate* y en células piramidales estrelladas del neocórtex.
30 Los compuestos que se han descrito también tienen utilidad en estas alteraciones neurodegenerativas.

En consecuencia, la presente descripción se refiere especialmente al procedimiento anterior *in vivo*, en donde dicha línea celular es preferiblemente una línea celular de fibroblastos o una neuronal, más preferiblemente una línea celular de fibroblasto 3T3, una PC-12 o una NIE-115. Estas líneas celulares se transfectan preferiblemente con una proteína tau truncada, que contiene al menos la unidad tau nuclear. La expresión de la proteína tau podría estar bajo control
35 constitutivo o inducible, o las especies de proteína tau podrían transfectarse directamente.

La presente invención se refiere a compuestos, que modulan o inhiben la asociación tau-tau, que pueden obtenerse mediante cualquier procedimiento descrito más arriba.

40 En base a los resultados anteriores, la presente invención también proporciona el uso de fenotiazinas de fórmula:





en donde:

30 R_1, R_3, R_4, R_6, R_7 y R_9 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;

R_5 , cada R_{10} y cada R_{11} se seleccionan entre hidrógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;

35 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

para la utilización en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de la agregación patológica tau-tau mediante la inhibición de dicha asociación tau-tau sin inhibición de la unión normal tau-tubulina.

40 El término "alquilo" tal como se usa en ésta se refiere a grupos de cadenas lineales o ramificadas, que preferiblemente tienen de uno a ocho, más preferiblemente de uno a seis, átomos de carbono. Por ejemplo, "alquilo" podría referirse a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo, pentilo, isopentilo, tert-pentilo, hexilo, isohexilo, y similares. Los sustituyentes apropiados para los grupos alquilos sustituidos usados en la invención incluyen los grupos mercapto, tioéter, nitro, amino, ariloxi, halógeno, hidroxilo y carbonilo, así como arilo, cicloalquilo, y grupos heterocíclicos no arilos.

45

El término "alcoxi" se refiere a grupos, tal como se definen en ésta más arriba como grupos alquilo, como pudiera ser el caso, que también portan un átomo de oxígeno interpuesto entre ellos y el residuo sustrato al que están unidos.

50

El término "haloalcoxi" representa una cadena alquílica lineal o ramificada que tiene de uno a cuatro átomos de carbono con 1, 2 ó 3 átomos de halógeno unidos a ella. Los grupos haloalquilo típicos incluyen el clorometilo, el 2-bromometilo, el 1-cloroisopropilo, el 3-fluoropropilo, el 2,3-dibromobutilo, el 3-clorisobutilo, el yodo-t-butilo, el trifluorometilo, y similares.

55

El término "halógeno" representa fluoro, cloro, bromo, o yodo.

Algunos compuestos de la invención poseen uno o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos, y existen, por tanto, en formas racémicas y ópticamente activas. Se pretende que la invención abarque las formas racémicas de los compuestos, así como cualquiera de las formas activas de los mismos.

60

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables se forma entre compuestos básicos de la Fórmula (I) y ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácidos halohídricos, tales como el ácido clorhídrico y el ácido bromhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido nítrico, el ácido fosfórico, etc., o ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, etc.

65

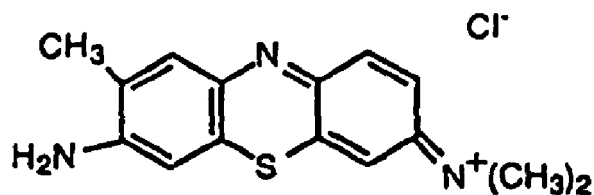
ES 2 346 284 T3

Son especialmente preferidas las siguientes fenotiazinas:

a) Azul de toluidina O,

5

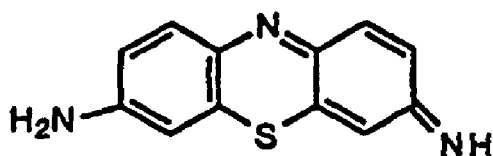
10



b) Tionina

15

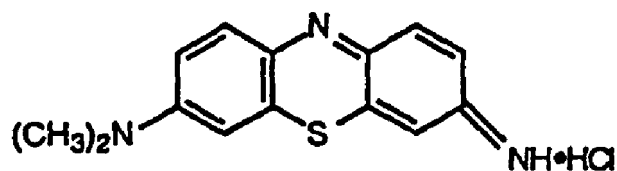
20



c) Azure A

25

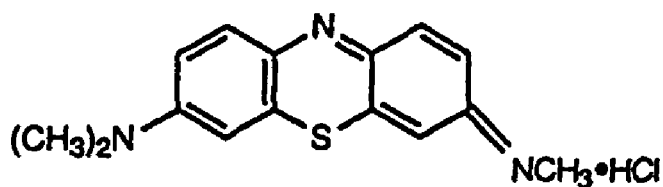
30



d) Azure B

35

40

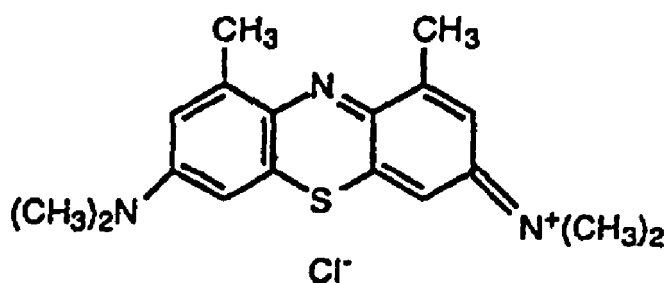


y

e) azul de 1,9-dimetil-metileno

50

55



60

Los compuestos útiles preferidos para bloquear la asociación patológica tau-tau, preferiblemente fenotiazinas (Figuras 23 y 24), están caracterizados por tener un coeficiente de unión inferior a 0,4 y carecer de inhibición en el ensayo de unión tau-tubulina, preferiblemente hasta una relación molar de 1000:1 con respecto a la concentración molar de la tau.

65

Las fenotiazinas de la presente invención son conocidas en la técnica, y podrían manufacturarse mediante el proceso referido en textos estándares (por ejemplo, *Merck Manual*, Houben-Weyl, Beilstein E III/IV 27, pp. 1214 y siguientes, *J. Heterocycl. Chem.* 21:613 (1984), etc.).

5 Los compuestos de la fórmula anterior, sus sales farmacéuticamente aceptables, u otros compuestos que se ha encontrado tienen propiedades definidas en los ensayos proporcionados, podría usarse como medicamentos después de ensayos ulteriores de su toxicidad (por ejemplo, en la forma de preparaciones farmacéuticas). El uso farmacéutico anterior del azul de metileno en un amplio rango de indicaciones médicas ha sido descrito, incluyendo el tratamiento de la metahemoglobinemia y la profilaxis de la psicosis maníaco-depresiva (Naylor, *Biol. Psychiatry* 21:915-10 920 (1986)), y la penetración del CNS a continuación de su administración sistémica ha sido descrita (Müller, *Acta Anat.* 144:39-44 (1992)). La producción de Azure A y B ocurre como productos de la degradación metabólica normal del azul de metileno (Disanto y Wagner, *J. Pharm. Sci.* 61:598-602 (1972a); Disanto y Wagner, *J. Pharm. Sci.* 61:1086-1094 (1972b)). La administración de compuestos farmacéuticos puede efectuarse parenteralmente, tal como oralmente (en forma de tabletas, tabletas recubiertas, grageas, cápsulas de gelatina dura y suave, soluciones, emulsiones o suspensiones), nasalmente (por ejemplo, en forma de aerosoles nasales), o rectalmente (por ejemplo, en forma de supositorios). No obstante, la administración puede efectuarse también parenteralmente, tal como intramuscular o intravenosamente (por ejemplo, en forma de soluciones de inyección).

20 Para la fabricación de tabletas, tabletas recubiertas, grageas, o cápsulas de gelatina dura, los compuestos de la FORMULA I, y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, pueden procesarse con excipientes farmacéuticamente inertes, inorgánicos u orgánicos. Por ejemplos, pueden usarse, la lactosa, el almidón de maíz o derivados del mismo, el talco, el ácido esteárico o sales del mismo, etc., como tales excipientes para tabletas, grageas y cápsulas de gelatina dura.

25 Los excipientes apropiados para cápsulas de gelatina suave son, por ejemplo, aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semi-sólidos y líquidos.

Los excipientes apropiados para la fabricación de soluciones y jarabes son, por ejemplo, agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido, glucosa, etc.

30 Los excipientes apropiados para soluciones de inyección son, por ejemplo, el agua, los alcoholes, los polioles, el glicerol, los aceites vegetales, etc.

35 Los excipientes apropiados para supositorios son, por ejemplo, los aceites naturales o solidificados, las ceras, las grasas, los polioles semi-líquidos o líquidos.

Más aún, las preparaciones farmacéuticas pueden contener agentes conservantes, solubilizantes, sustancias que incrementan la viscosidad, agentes estabilizantes, agentes humectantes, agentes emulsivos, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes saboreadores, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes de recubrimiento, o antioxidantes. Ellos pueden contener también todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas.

40 De acuerdo con la invención, los compuestos de la fórmula anterior y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden utilizarse en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer, mediante la inhibición de la asociación patológica tau-tau. La dosificación puede variar dentro de amplios límites y, por supuesto, se ajustará a los requisitos individuales en cada caso concreto. En general, en el caso de administración oral debería ser suficiente una dosis diaria de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 70 mg, preferiblemente de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 300 mg, dividida preferiblemente en 1-3 dosis unidad, las cuales pueden, por ejemplo, ser de la misma cantidad. No obstante, se apreciará que el límite superior dad más arriba pueda excederse cuando se encuentre que es indicado.

50 La invención puede entenderse mejor cuando se lee conjuntamente con las figuras que la acompañan:

Figura 1: Representación de la unión de la proteína tau a microtúbulos (modificada a partir de Butner y Kirschner, *loc. cit.*).

55 Figura 2: Representación esquemática de las isoformas de la proteína tau, con las secuencias de aminoácidos y cADN correspondientes mostradas en la Figura 21. El dominio N-terminal de 252 residuos contiene uno o dos insertos que totalizan 58 residuos extras ("1", "2"), seguidos por una región de repeticiones en tándem de 93-125 residuos que contiene 3 ó 4 repeticiones, y una cola C-terminal de 64 residuos. Los fragmentos tau aislados a partir de preparaciones enriquecidas de núcleo de PHF resistente a proteasa se denominan "F5.5", y consisten en una mezcla de especies derivadas de ambas, las isoformas de 3 y 4 repeticiones, pero abarcando 93-95 residuos, el equivalente a 3 repeticiones, desplazados en fase 14-16 residuos con respecto a la organización normal del tándem de la región de repetición en tándem. Todas las especies F5.5 y la tau normal son reconocidas por el mAb 7.51, pero el mAb 423 reconoce sólo aquellos fragmentos de F5.5 que terminan en Glu-391. También se muestran las posiciones de los epítotos para los mAb 499, AT8 y 342.

65 Figura 3: Análisis de la secuencia N-terminal del fragmento F5.5 de 12 kDa liberado a partir de las preparaciones de núcleo de PHF, revelado por la presencia de 6 péptidos distintos, los cuales pueden agruparse en 3 pares derivados de isoformas de 3-repeticiones (A: repeticiones 1-3; SEQ. ID. N° 1) o 4-repeticiones (B: repeticiones 1-3; SEQ. ID.

ES 2 346 284 T3

Nº 2, o C: repeticiones 2-4; SEQ. ID. Nº 3) (Jakes *et al.*, *loc. cit.*). La inmunoreactividad con el mAb423 sirve para definir un extremo C-terminal en el Glu-391 (mostrado por flechas, Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993)). Los extremos N- y C-terminales sirven por tanto para definir una fase de la región de repetición en tándem dentro del núcleo del PHF, el cual está desplazado 14-16 residuos con respecto a las repeticiones con homología de secuencia. Esta unidad mínima de tau del núcleo de PHF resistente a la proteasa tiene 93/95 residuos de longitud, lo que equivale precisamente a 3 repeticiones. Los extremos de esta unidad están también fuera de fase con respecto a los dominios de unión a tubulina propuestos por Butner y Kirschner (*loc. cit.*), los cuales se muestran subrayados.

Figura 4: Contenido total de proteína tau en controles y en la enfermedad de Alzheimer. La tau soluble normal (blanco) es la forma predominante encontrada en controles, mientras que en la enfermedad de Alzheimer, la forma predominante de tau es la polimerizada en PHF (negra).

Figura 5: Cambios en la tau soluble, tau fosforilada, y recuento de marañas, durante las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)). La acumulación de tau unida a PHF se muestra en el eje horizontal. Ésta está acompañada por una pérdida relativa en tau soluble normal. La primera aparición de tau fosforilada está estrechamente unida a la primera aparición de marañas. No obstante, ambas aparecen sólo después de que haya ocurrido una redistribución sustancial de la tau, de soluble a fases polimerizadas.

Figura 6: Velocidades calculadas de transferencia de síntesis de tau nueva al pool de tau soluble (a), y de tau soluble al pool unido a PHF (b) en las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Lai *et al.*, *loc. cit.* (1995)). A medida que el nivel de tau soluble cae por debajo de los 580 pmoles/g, progresivamente se requiere más síntesis de tau nueva para mantener el ritmo con la velocidad de producción de PHF, y ésta parece estar regulada en una forma de realimentación negativa con respecto al nivel ambiente de tau soluble (a). La velocidad de transferencia de tau soluble en PHF es geométrica con respecto al nivel ambiente de PHF-tau (b).

Figura 7: Escenario hipotético para la transformación de la proteína tau en PHF en la enfermedad de Alzheimer. Una vez la tau ha sido inmovilizada y truncada, se expone un sitio de captura patológica de la tau con alta afinidad. Cuando se captura una molécula extra de tau, solo es posible la degradación proteolítica parcial, puesto que la región de asociación tau-tau de elevada afinidad está protegida de la proteólisis, dejando un sitio extra de captura de tau con elevada afinidad disponible para la captura de una molécula extra de tau. La redistribución de los pool de proteína tau de las fases soluble a truncada y unidad a PHF es autocatalítica, mediada por la captura repetitiva de tau con elevada afinidad y la proteólisis parcial.

Figura 8: Configuración del ensayo de unión a tau en el que se mide la unión de dos unidades truncadas. Primero se recubre la placa de ELISA con la especie que termina en Ala-390 ("a") (en tampón carbonato sódico, 50 mM; pH 9,6). A continuación, se incubaba una segunda especie de tau truncada que termina en Glu-391 ("e") en varias condiciones de tampón, mostradas en la Figura 9. Sólo la especie "e" es reconocida por el mAb 423, y, por tanto, la inmunoreactividad con el mAb 423 mide solamente la tau que se une durante la segunda incubación.

Figura 9: La unión de especies "e" (0 ó 20 µg/ml) a "a" (0 ó 10 µg/ml) en solución salina normal, tamponada con fosfato ("normal"), agua destilada ("agua"), y tampón carbonato sódico ("carbonato", 50 mM, pH 9,6). El eje vertical muestra la inmunoreactividad con el mAb 423. No se detecta inmunoreactividad cuando se recubre sólo con la especie "a", puesto que el mAb 423 no reconoce "a". No se detecta inmunoreactividad cuando se incubaba "e" con recubrimiento previo con "a". Esto se debe a que las condiciones de bloqueo usadas impiden la unión no específica de "e" a la placa de ELISA. La inmunoreactividad sólo se observa en la condición en que "a" y "e" están ambas presentes, demostrando la detección específica sólo de "e", la cual se ha unido a "a". No se observa unión cuando "e" se añade en tampón carbonato sódico. Por tanto, esta condición representa la óptima para el recubrimiento inicial con "a", puesto que la auto-agregación está minimizada en esta condición.

Figura 10: Configuración estándar para la medición de la unión de tau de longitud completa ("t") a la unidad de tau nuclear truncada, que previamente se ha hallado que se une pasivamente a la fase sólida ("a"). Se recubre con un fragmento de tau recombinante ("a"), correspondiente a la unidad de tau truncada del núcleo del PHF, a varias concentraciones, una placa de ELISA en condiciones que se ha mostrado no favorecen la asociación tau-tau (Figura 9). Después del bloqueo, se recubre con tau recombinante de longitud completa ("t") en condiciones que permiten la detección selectiva de unión tau-tau. La unión se detecta mediante un anticuerpo apropiado, el cual reconoce un epítipo ubicado cerca del extremo N-terminal de la tau de longitud completa. Este anticuerpo no reconoce la "a".

Figura 11: Determinación de la Kd para la unión de la tau de longitud completa ("T40") a la unidad de tau truncada nuclear que termina en Ala-390 ("a") usando el mAb 499 para medir la tau humana de longitud completa unida. El eje horizontal sobre la gráfica superior muestra la concentración de T40 usada, y el eje vertical muestra la inmunoreactividad con mAb 499. Cada curva de unión se obtiene con una concentración de recubrimiento de "a" que se muestra. Sin "a" no hay unión, conformando la ausencia de unión no específica de T40 en las condiciones de ensayo usadas. La unión depende de ambas, la concentración de T40 y la concentración de "a". La figura inferior muestra la Kd calculada correspondiente a cada concentración de recubrimiento de "a". A medida que la concentración de "a" aumenta, las condiciones de saturación se aproximan asintóticamente, y esto representa la saturación Kd para la unión de T40 a la unidad nuclear de tau truncada, determinada en este experimento como 22,8 nM.

Figura 12: Usando el formato de ensayo estándar mostrado en la Figura 10, con la especie “a” recubriendo a 10 $\mu\text{g/ml}$ y la T40 añadida en las concentraciones mostradas (rango 0-50 $\mu\text{g/ml}$), se midió la unión a pH constante (pH 7,4), mientras que se variaba la concentración de cloruro sódico. Se observa una meseta en la proximidad de la concentración de sal fisiológica de 137 mM. La unión está reducida a concentraciones de sal moderadamente bajas o altas, aunque la unión pasa a ser más favorable a concentraciones de sal muy bajas.

Figura 13: Experimento similar al mostrado en la Figura 12, manteniendo la concentración de cloruro sódico constante a 137 mM, pero variando el pH en el rango 0-10, con unión en solución fisiológica salina normal tamponada con fosfato (“PBS”, pH 7,4) mostrada para comparación. La unión está reducida en los extremos del pH . La unión se muestra detectada por los mAb 499 y 342.

Figura 14: Conjunto típico de curvas de unión usando la unidad tau nuclear truncada “a” en la fase sólida, e incubando la tau de longitud completa, la cual ha sido fosforilada (“T40P”) o no (“T40”) *in vitro* usando el procedimiento de Biernat *et al.* (*EMBO J.* 11:1593-1597 (1992)) La K_d fue reducida en 10-veces por la fosforilación en este experimento, aunque variando sistemáticamente el estado de fosforilación en las fases acuosa y sólida, puede mostrarse que el efecto conjunto de la fosforilación es, en promedio, una inhibición de 20 veces de la unión. Aunque algunos han propuesto un estado fetal de la inhibición como importante para determinar la unión patológica tau-tau, aquí se muestra que la tau fetal de rata (“POTr”), cuando se introduce en la fase acuosa, es incapaz de unión patológica a la unidad tau nuclear.

Figura 15: En contraste con la Figura 14, a continuación de que la tau fetal se haya unido pasivamente a la fase sólida, es capaz de unir tau de longitud completa y sin fosforilar. En A se muestra un conjunto típico de curvas, variándose la concentración de tau de longitud completa (“T40”) y tau fetal (“PO Tau”) en los rangos de concentración mostrados. La K_d derivada asintóticamente se muestra en B. Al igual que con la unión de la tau de longitud completa a la unidad de tau nuclear truncada, la unión de tau de longitud completa a la tau fetal inmovilizada tiene la misma K_d de 20 nM. Por tanto, la tau fetal, la cual no se une a la tau cuando está presente en la fase acuosa (Figura 14), se convierte en una especie unidora de tau simplemente mediante unión pasiva a la fase sólida. Por tanto, la unión pasiva de la tau a una matriz sólida expone el sitio de captura con alta afinidad de tau.

Figura 16: Comparación de valores de K_d en el ensayo de unión tau-tau usando las especies mostradas en las fases acuosa o sólida. La fosforilación de tau recombinante de longitud completa usada en la fase acuosa inhibe la unión por un factor de 10-veces, y la tau fetal/recién nacida procedente de rata no se une, tal como se muestra en la Figura 14. Cuando la tau de recién nacida se usa en la fase sólida, la T40 se une con la misma afinidad que a la unidad de PHF nuclear truncada. La fosforilación de la T40 en la fase acuosa produce una inhibición de la unión de 30 veces. La hiperfosforilación de la tau de recién nacida en la fase sólida inhibe la unión en un alcance comparable, y la hiperfosforilación en ambas fases produce una inhibición de la unión de 50 veces. Por tanto, contrariamente a la hipótesis de fosforilación, la fosforilación inhibe la auto-agregación patológica de la proteína tau en todas las configuraciones del presente ensayo.

Figura 17: Digestión proteolítica del agregado de proteína tau de longitud completa. (A) Se unión tau de longitud completa (20 $\mu\text{g/ml}$) a dGA (20 $\mu\text{g/ml}$) en PBS, se lavó, y se incubó durante 5 minutos con Pronasa en agua, en las concentraciones indicadas. La inmunoreactividad se midió con los mAb 342 (\blacklozenge), 499 (\circ) y 423 (\bullet). (B) De forma similar se digirió tau de longitud completa (10 $\mu\text{g/ml}$) que se había auto-agregado en la fase sólida en ausencia de dGA, y se midió la inmunoreactividad con los mAb 342 (\blacklozenge) y 423 (\bullet). En ambos casos, la pérdida de inmunoreactividad dependiente de concentración de proteasa con ambos mAb 499 y 342 ocurrió con la adquisición de la inmunoreactividad del mAb 423. (C) Los resultados de (A) se muestran esquemáticamente. La dGA truncada, inicialmente recubierta sobre la fase sólida sombreada, se une a la tau de longitud completa con elevada afinidad a través de la interacción con la región de repetición. Ambas especies carecen del epítipo para el mAb 423 antes de su digestión. La digestión proteolítica del complejo (líneas de puntos) suprime la porción N-terminal de la molécula de tau de longitud completa, con pérdida de los epítopos para los mAb 499 y 342 ubicados, tal como se muestra. La adquisición de inmunoreactividad con el mAb 423 indica la truncamiento de la tau de longitud completa en el Glu-391. El alcance N-terminal preciso del complejo proteolíticamente estable no se conoce, pero excluye el epítipo para el mAb 342 inmediatamente adyacente a la región de repetición, e incluye el dominio de unión a tau.

Figura 18: Acumulación de tau truncada mediante captura repetida de tau. Empezando con el fragmento de tau truncado (dGA, 20 $\mu\text{g/ml}$) en la fase sólida, se unió tau humana recombinante de longitud completa (20 $\mu\text{g/ml}$), se digirió con Pronasa (1 ng/ml) durante 5 minutos, se lavó, y se incubó de nuevo la preparación con más tau de longitud completa (20 $\mu\text{g/ml}$), y se digirió otra vez. El ciclo de unión/digestión se repitió cuatro veces; la inmunoreactividad con mAb 400 se midió antes y después, y con mAb 423 sólo se midió después, de cada etapa de digestión con Pronasa. (A) La digestión del complejo con Pronasa estuvo asociada con la acumulación creciente de proteína tau, truncada en el Glu-391, en la fase sólida, a continuación de cada ciclo de digestión. (B) La unión de la tau de longitud completa se detectó por la aparición de inmunoreactividad para el extremo N-terminal de la tau (mAb 499), la cual fue enteramente abolida por la digestión con Pronasa. En el ciclo de incubación subsiguiente, la capacidad de unión se incrementó para la tau de longitud completa a una concentración constante en la fase acuosa. La inmunoreactividad creciente con el mAb 499 no puede explicarse mediante la inmunoreactividad residual restante del ciclo precedente. Por tanto, el complejo proteolíticamente estable que queda después de la digestión con Pronasa retiene la capacidad de unir más tau, y esta capacidad de unión aumenta a medida que la tau truncada se acumula en la fase sólida.

ES 2 346 284 T3

Figura 19: Unión relativa de tau-tau (eje vertical) en presencia de concentraciones crecientes de fenotiazinas inhibidoras prototipo (eje horizontal). Esta inhibición puede expresarse en términos de un modelo de inhibición competitivo estándar, con una K_i calculada de 98-108 nM. Los coeficientes de correlación para estas aproximaciones son 0,99, y son altamente estadísticamente significativos, tal como se muestra.

5

Figura 20: Inhibición selectiva de la unión tau-tau por parte de la tionina. La proteína tau truncada se usó a 489 nM en ambas, las fases acuosa y sólida de los ensayos, como en la Figura 8 (círculos rellenos). En el ensayo de tau-tubulina, se recubrió con tubulina despolimerizada a 200 nM (círculos vacíos), y se incubó la tau a 400 nM. Los datos de unión podrían describirse matemáticamente mediante un modelo estándar que supone una inhibición competitiva en el sitio de unión con elevada afinidad de tau. Los valores de K_i se calcularon usando los valores de K_d , obtenidos a partir de los correspondientes estudios de unión usando tal de longitud completa. Los puntos representan promedios de mediciones por cuadruplicado.

10

Figura 21: Secuencias nucleotídica y predicha de aminoácidos de una isoforma de proteína tau humana (SEQ. ID. N° 4). La secuencia, deducida a partir del clon de cADN httau40, difiere de tres repeticiones previamente determinada (Goedert *et al.*, *loc. cit.* (1988)) en 58 aminoácidos insertados en la región amino-terminal (subrayados), y por la repetición extra de 31 aminoácidos previamente descrita (Goedert *et al.*, *EMBO J.* 8:393-399 (1989)) (subrayada). Los nucleótidos están numerados en la dirección 5'-3'. El clon de cADN httau40 (Goedert *et al.*, *Neuron* 3:519-526 (1989b)) contiene la secuencia anterior insertada en un sitio NdeI (extremo 5') y un sitio EcoRI 3' respecto a la terminación del codón (***)

15

20

Figura 22: Secuencia de aminoácidos y cADN de la unidad tau del núcleo de PHF (SEQ. ID. N° 6; Novak *et al.*, *loc. cit.* (1993)), y cebadores (SEQ. ID. N° 7 y 8) usados en la construcción de la unidad tau nuclear preferida.

25

Figura 23: Graduación de compuestos mediante inhibición de la interacción tau-tau. La graduación se basa en la unión relativa estandarizada respecto a la observada en la ausencia del compuesto, tomada como el promedio observado a 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. En esta graduación "1" representa unión equivalente a la observada en ausencia del compuesto, mientras que "0,2" indica que la unión se redujo en un promedio del 20% a las concentraciones de compuesto de ensayo de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Por tanto, cuanto menor sea el número, más efectivo es el compuesto para inhibir la unión de e y a. Tal como puede observarse, las cinco primeras fenotiazinas tienen coeficientes de unión estandarizados de menos de 0,4. Esto es, la unión observada en el rango 1-10 $\mu\text{g/ml}$ es inferior al 40% de la observada en ausencia del compuesto.

30

Figura 24: Estructuras químicas de los compuestos ensayados con valores de unión estandarizada según la Figura 23.

35

Figura 25: Representación esquemática de la tau, MAP2 (forma adulta), MAP2C (forma juvenil), y tau de elevado peso molecular (encontrada en el sistema nervioso periférico y líneas celulares de neuroblastomas). Estas proteínas comparten similares dominios de unión a microtúbulos, pero difieren sustancialmente en su secuencia y el alcance del dominio de proyección N-terminal. Las formas juveniles de tau y MAP2 tienen sólo 3 de las repeticiones en tándem. También existe una forma de MAP2 de 4 repeticiones.

40

Figura 26: Diferencias de secuencia en la región de repetición en tándem de la tau humana (línea superior; SEQ. ID. N° 9) y MAP2 humana (línea inferior; SEQ. ID. N° 10). Las flechas verticales muestran los límites del fragmento nuclear de PHF truncado que termina en el Glu-391, y los segmentos de unión a tubulina se muestran subrayados.

45

Figura 27: El vector de expresión pIF2 es un vector de expresión eucariota basado en SV40 (pSV2neo; Sambrook *et al.*, *loc. cit.* (1989); seq id no 11 y 12, modificadas para contener un promotor de la β -globina que dirige la expresión de ADN extraño (M. N. Neuberger). Tiene un marcador de la resistencia a neomicina para selección con Geneticin.

50

Figura 28: Células T3T de fibroblasto de ratón transfectadas con PIF2::T40, expresando la proteína tau humana de longitud completa (T40), inmunomarcadas mediante mAb 7.51 (figura superior) y mAb 499 (figura inferior). Las células forman procesos delgados largos, y también se observa que la inmunoreactividad para la tau tiene una distribución citoesquelética en el pericarion.

55

Figura 29: Células T3T de fibroblasto de ratón transfectadas con PIF2::dGAE, expresando el fragmento de tau truncado del núcleo de PHF que termina en Glu-391, inmunomarcada con mAb 7.51. Líneas celulares tempranas transfectadas y cultivadas sin tionina. Las células son descaradamente anormales, multinucleadas, vacuoladas, conteniendo agregados de proteína tau en el citoplasma.

60

Figura 30: Transferencias de proteína Lipofectina/tau al interior de células 3T3 transfectadas con PIF2::T40. La supervivencia celular relativa (normalizada respecto al recuento de células después del tratamiento con Lipofectina sin proteínas) se muestra para concentraciones aproximadamente equimolares de tau de longitud completa (T40, 220 nM) y truncada (dGAE, 300 nM), sin (sin sombrear) o con (sombreada) tionina a 3,5 μM . La tau truncada es más tóxica que la tau de longitud completa ($p = 0,02$) a pesar del hecho de que, a concentraciones equimolares, la carga de proteína total es 5 veces superior en el caso de la tau de longitud completa.

65

ES 2 346 284 T3

Figura 31: (A) Reversión de la toxicidad de tau truncada. La toxicidad de la tau truncada, transferida a través de la Lipofectina al interior de células 3T3 que expresan tau de longitud completa depende de la concentración. La tionina (línea continua) revirtió significativamente la toxicidad observada en ausencia de tionina (línea discontinua) en las tres concentraciones de tau truncada. (B) Experimento similar en el que la tau de longitud completa se transfirió a través de la Lipofectina al interior de células 3T3 que expresaban la tau de longitud completa. Ambos, los efectos de toxicidad y de tionina fueron mucho menos aparentes.

Los siguientes Ejemplos se pretende que ilustren detalles de la invención, sin limitarla, por tanto, en modo alguno.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

15 *Ensayo de unión tau-tau*

El ensayo se realizó en una placa de microvaloración de PVC de 96 pocillos, con las soluciones añadidas y las lecturas tomadas respecto los pocillos individuales:

- 20 a) Se añade a cada pocillo una solución de 50 μ l de péptido de tau truncada purificado, en concentraciones variables en el rango 0-150 μ g/ml (0, 1, 5, 10, 50 μ g/ml) en tampón carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y se incuba 1 hora a 37°C.
- 25 b) Los pocillos de la placa de microvaloración se lavan 3 \times con agua, con o sin un 0,05% de Tween®.
- c) Se añade a cada pocillo una solución de 200 μ l de extracto de leche al 2% ("Marvel") preparada en solución salina tamponada con fosfato ("PBS", cloruro sódico 137 mM, fosfato dihidrógeno de potasio 1,47 mM, fosfato hidrógeno de potasio, 8,1 mM, cloruro potásico 2,68 mM), y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- 30 d) Se lava la placa como en b).
- e) Se añade a cada pocillo una solución de 50 μ l de tau recombinante de longitud completa (T40) en el mismo rango de concentraciones que más arriba en a), en gelatina al 1%, Tween® al 0,05% en PBS, y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- 35 f) Se lava la placa como en b).
- g) Se añade a cada pocillo una solución de 50 μ l de anticuerpo monoclonal 499 a una dilución de 1/2 del sobrenadante del cultivo de tejidos, con un 2% de extracto de leche ("Marvel") en PBS, y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- 40 h) Se lava la placa como en b).
- i) Se añade a cada pocillo una solución de 50 μ l de un segundo anticuerpo (IgG (H+L) anti-ratón de cabra, purificado mediante afinidad hasta el grado de transferencia, conjugado con peroxidasa de rábano silvestre -número de catálogo 170-6516 de Biorad) a una dilución de 1/1000 en PBS con 0,05% de Tween®, y se incuba durante 1 hora a 37°C.
- 45 j) Se lava la placa 3 \times con una solución de Tween® al 0,05% en agua, seguidas por un único lavado con agua.
- 50 k) La preparación de la solución de revelado del color es como sigue. Disolver 10-15 mg de 3,3',5,5'-tetra-metilbencidina (TMB, número de catalogo 784.974 de BCL) en dimetilsulfóxido, hasta una concentración final de 10 mg/ml (solución de TMB). Añadir 10 ml de acetato sódico de reserva (0,5 M, pH 5,0) a 90 ml de agua. Mientras se agitan, añadir suavemente 1 ml de solución de TMB, seguido por 10 μ l de peróxido de hidrógeno.
- 55 l) Se añaden a cada pocillo 50 μ l de una solución de TMB para desarrollar la reacción de color de la peroxidasa, la velocidad de desarrollo de la cual se lee a lo largo de 2 minutos, a 650 nm, en un lector Molecular Device Microplate usando el paquete de programas Kinetic L1 Softmax.
- 60

Ejemplo 2

Preparación de fragmentos recombinantes de tau

65 El cADN de tau se generó usando protocolos estándares (Sambrook *et al.*, *loc. cit.*) a partir de mRNA aislado de tejido cerebral de un paciente con Alzheimer cuyo tejido se obtuvo 3 horas después de su muerte. Se examinó la biblioteca de cADN con sondas oligonucleotídicas sintéticas de 17-meros derivadas a partir de la secuencia de parte de

ES 2 346 284 T3

una proteína nuclear de PHF (Goedert *et al.*, *loc. cit.* (1988)). Los clones de longitud completa de cADN se subclonaron en el sitio EcoRI de M13mp18, y se usó mutagénesis dirigida a un sitio para introducir un sitio NdeI en el contexto del codón iniciador. A continuación del corte con NdeI y EcoRI, los fragmentos de cADN resultantes se subclonaron cadena abajo respecto el promotor de la polimerasa de ARN T7 en el plásmido de expresión pRK172 cortado con NdeI/EcoRI (McLeod *et al.*, *EMBO J.* 6:729-736 (1987)). El pRK172 es un derivado del pBR322 que se propaga en *E. coli* con un número de copias muy elevado debido a la supresión de la región de control del número de copias del pBR322. El plásmido lleva un gen de la resistencia a la ampicilina para la selección de clones recombinantes.

Las construcciones que codifican formas truncadas de la tau se prepararon a partir de mRNA tal como se describe en Novak *et al.* (*loc. cit.*, 1993). Se usó el mRNA como una plantilla para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores oligonucleotídicos específicos. El cebador con sentido contenía un sitio NdeI, y el anti-sentido, un sitio EcoRI. Los fragmentos de PCR se subclonaron en el pRK172 tal como se describió más arriba. Los cebadores usados para la construcción del dGAE se indican en la Figura 22. La autenticidad de todos los fragmentos de ADN usados para la expresión se confirmó mediante la secuenciación de cadena completa de ambas hebras.

Los detalles para la construcción del cADN de la htau40 ("T40") están descrito en Goedert *et al.*, (*loc. cit.*, 1989). Esta secuencia es la forma más larga de tau hallada en el CNS, y codifica la proteína tau que contiene ambos, las 2 inserciones N-terminales de 29 aminoácidos cada una, y una repetición extra de 31 aminoácidos en el dominio de unión a tubulina. La secuencia de ADN y se secuencia de aminoácidos predicha se muestran en la Figura 21 (SEQ. ID. N° 4).

Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar *E. coli* BL21 (DE3), una cepa usada para la expresión procariota que porta una copia cromosómica del gen de la polimerasa de ARN del bacteriófago T7 bajo control del promotor lacUV5 (Studier y Moffat, *J. Mol. Biol.* 189:113-130 (1986)). Se indujeron cultivos que estaban creciendo exponencialmente con IPTG (isopropil tiogalactósido) durante 3 horas.

La purificación a gran escala (1 litro de cultivo bacteriano) de fragmentos tau se realizó tal como describieron Goedert y Jakes (*EMBO J* 9:4225-4230 (1990)) con modificaciones menores. Las células se rompieron mediante congelación rápida del precipitado de células en nitrógeno líquido. A continuación se resuspendieron los precipitados en tampón que contenía PIPES 50 mM, ditioneitol 1 mM (DTT) (pH 6,8). Las proteínas termoestables en el sobrenadante se dializaron frente PIPES/DTT, se aplicaron a continuación a una columna que contenía fosfocelulosa equilibrada en el mismo tampón. La proteína tau se eluyó con un gradiente de NaCl (0-0,5 M) en el tampón anterior. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE y ambos, tinción con Coomassie e inmunotransferencia. Aquellas fracciones que contenían tau se juntaron, se dializaron frente a MES 25 mM, DTT 1 mM (pH 6,25), y se almacenaron a -20°C a aproximadamente 5 mg/ml. Las concentraciones de proteína se midieron mediante el procedimiento de Lowry (Harrington, *loc. cit.* (1990)).

Ejemplo 3

Unión de la MAP2C fetal a tau truncada y de longitud completa

Una posible explicación de la ausencia de MAP2 en los PHF podría ser que la MAP2 es incapaz de unirse a la unidad tau nuclear del PHF debido a la diferencias de secuencias en las regiones de repetición. Esto se examinó experimentalmente usando el ensayo de unión estándar en dos configuraciones: tau truncada en la fase sólida con MAP2C fetal en la fase acuosa, y MAP2C en la fase sólida con tau de longitud completa en la fase acuosa. La unión pudo demostrarse en ambas configuraciones, la anti-tionina bloqueó la interacción de unión tau/MAP2. Por tanto, la agregación en la región de repetición en tándem no es selectiva para la tau, y la actividad inhibidora de los inhibidores de fenotiazinas tales como la tionina no depende de secuencias únicas de la tau. La razón por la que MAP2 no se encuentra en los PHF es actualmente desconocida, pero diversos factores podrían incluir la contribución del gran dominio N-terminal encontrado en la forma adulta de la MAP2, diferencias de compartimento dentro de la célula, u otras diferencias en el procesamiento de las moléculas de MAP2.

Ejemplo 4

Transfección de células 3T3 de ratón con proteína tau humana

Se transfectaron células 3T3 de fibroblastos de ratón con un vector de expresión en eucariotas (pIF2) que contenía las formas de longitud completa y truncada de la proteína tau bajo control constitutivo de un promotor de la β -globina. Este vector contiene un gen de resistencia a la neomicina como marcador seleccionable (pSV2neo; Sambrook *et al.*, *loc. cit.* (1989); modificado por M. N. Neuberger). Las células se cultivaron en mezclas de medio esencial mínimo definidas (DMEM) que contenían agentes antimicrobianos y un 10% de suero fetal bovino, a 37°C, en una atmósfera con el 5% de CO₂. Se transfectaron con ADN de plásmido, bien usando una protocolo estándar de fosfato cálcico o mediante lipofección (según el protocolo de los fabricantes; Gibco BRL). Las células que habían integrado el ADN de plásmido se seleccionaron mediante viabilidad en medio que contenía Geneticin (0,5 mg/ml; Southern y Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327 (1982)).

Los fibroblastos 3T3 transfectados establemente que expresaban la proteína tau de longitud completa se produjeron fácilmente. La expresión se pudo demostrar histológicamente usando anticuerpos anti-tau genéricos (mAb 7.51) y específicos para humanos (mAb 499) (Figura 28), y mediante inmunotransferencia de extractos celulares (no se muestra). Se produjeron dos líneas celulares viables cuando la transfección se llevó a cabo usando el mismo vector portador de la unidad tau nuclear truncada. La tau truncada pudo demostrarse dentro de estas células histológicamente, pero la morfología de estas células era enormemente anormal en comparación con aquéllas que expresaban la tau de longitud completa (Figura 29). Las anomalías incluían la incapacidad de desarrollar procesos, la formación de grandes células redondas, la agregación citoplasmática de tau, y la formación de vacuolas en el citoplasma. No obstante, estas células se mostraron inestables, y fácilmente revertían a formas incapaces de expresar la proteína tau truncada a pesar de la presencia continuada de Geneticin. La toxicidad de la proteína tau truncada podría explicarse bien por la formación de vacuolas o de agregados tau-tau tóxicos en la célula, o por la unión de tau truncada a las MAP endógenas de ratón esenciales para la célula.

15 Ejemplo 5

Cultivo de células transfectadas con tau en la presencia de inhibidores de fenotiazina

La toxicidad de la unidad de tau truncada podría revertirse en parte si los prototipos de inhibidores de fenotiazina pudieran usarse para bloquear la agregación *in vivo*. Esto sería posible sólo si los compuestos no fueran intrínsecamente tóxicos a concentraciones necesarias para bloquear la unión tau-tau. Los inhibidores con la toxicidad más baja en células 3T3 fueron la tionina y la acriflavina, y las células pudieron sobrevivir la exposición prolongada a estos compuestos a concentraciones sustancialmente en exceso de los valores de K_i (100 nM) para la inhibición de la unión tau-tau *in vitro*. En la práctica, las células 3T3 pudieron cultivarse durante varios meses en presencia de tionina 2 μM .

La influencia de la tionina sobre la interacción de unión tau-tubulina se examinó *in vivo* cultivando fibroblastos 3T3 transfectados con proteína tau de longitud completa en presencia de tionina en un rango de concentraciones. La alteración de la distribución citoesquelética normal de inmunoreactividad de la tau se observó a concentraciones en el rango 4-8 μM , comparable con la K_i conocida para la inhibición de la interacción de unión tau-tubulina *in vitro* (8 μM), pero no se observó efecto a lo largo del rango de concentración (0,5-2 μM) en el que se cultivaron rutinariamente las células 3T3 transfectadas. Estos hallazgos demuestran la posibilidad de cultivar líneas celulares transfectadas en presencia de prototipos de inhibidor sin detrimento de la viabilidad celular o de la distribución citoesquelética normal de la proteína tau de longitud completa transgénica.

Se encontró que el cultivo de células transfectadas en presencia de inhibidores de la unión tau-tau incrementaba la viabilidad de las células transfectadas con la tau truncada de forma dependiente de la dosis. El número de líneas celulares viables transfectadas con la tau truncada incrementó cuando se cultivaron las células en presencia de concentraciones más elevadas de tionina. Más aún, la intensidad de la expresión de la tau truncada, medida mediante inmunohistoquímica sobre una escala semicuantitativa, se encontró que incrementaba en función de la concentración de tionina usada después de la transfección.

La morfología de las células 3T3 y la distribución de la proteína tau truncada fue mucho menos anormal cuando se produjeron las líneas celulares en presencia de tionina. La proteína tau truncada parecía seguir la distribución de la red de microtúbulos endógena, pero la tinción de tau tenía un carácter más roto que la observada con la tau de longitud completa. Se halló que las células que expresaban niveles elevados de tau truncada formaban agregados con alteración brusca del citoplasma celular cuando se suprimía la tionina. Esto fue similar a los hallazgos iniciales para células transfectadas en ausencia de tionina.

50 Ejemplo 6

Líneas celulares neuronales no transfectadas

Las líneas celulares neuronales (N2A, NIE-115) se cultivaron en DMEM que contenía un 2% ó 10% de suero fetal bovino y un 5% de suero de caballo, sobre placas de cultivo de tejidos recubiertas con colágeno. Éstas se cultivaron a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO_2 . Los estudios inmunohistoquímicos iniciales de las líneas celulares neuronales antes de la transfección condujeron a la identificación de agregados citoplasmáticos, inmunoreactivos con el mAb 423, que se formaban en el citoplasma de células de neuroblastomas indiferenciadas (células N2A) y en células PC-12 después de un breve tratamiento con dibutilil-cAMP (db-cAMP, conocido por diferenciar células de neuroblastoma en cultivos celulares). Se observa que estas estructuras son inmunoreactivas con un anticuerpo que reconoce la proteína del neurofilamento (NFH; SMI-31, Sternberger *et al.*, PNAS 82:4274-4276 (1985)) y más raramente inmunoreactiva con un anticuerpo que reconoce la MAP1A, la cual se sabe que se une a los neurofilamentos. En el curso de la diferenciación, se observó que esta inmunoreactividad endógena con el mAb 423 se desplazaba desde el citoplasma hacia las neuritas. La inmuno-precipitación de la inmunoreactividad con el mAb 423 a partir de estas células condujo a la identificación de una especie con movilidad en gel de 230 kDa, la cual fue reconocida como la SMI-31. Estos resultados sugieren que las estructuras reconocidas por el mAb 423 en líneas celulares neuronales de roedores incluyen la proteína de neurofilamentos de elevado peso molecular en un estado agregado, pero no excluyen

la posibilidad de que también pudiera incluir MAP alteradas. Nos referimos a ellos como agregados presuntos de NFH (pNFH). La inhibición dependiente de la dosis de los agregados de pNFH en el citoplasma podrían demostrarse con tionina en células PC-12 no transfectadas.

5 Ejemplo 7

Transfección de líneas celulares neuronales con proteínas tau de longitud completa y truncadas, y efectos de los inhibidores de la agregación de tau

10

A. Células PC-12

Las células PC-12 se transfectaron con el vector pIF2 que contenía o el fragmento de tau truncado en el Glu-391 nuclear de PHF o la proteína tau de longitud completa. Como con los fibroblastos 3T3, no se produjeron líneas celulares viables transfectadas con la tau truncada a menos que se cultivaran en tionina a continuación de la transfección. Una vez estabilizadas, las líneas celulares transfectadas se analizaron en presencia o ausencia de db-cAMP y en presencia o ausencia de tionina. Se examinaron dos puntos finales: la formación de agregados de pNFH citoplasmáticos, y la distribución de la inmunoreactividad de los pNFH en las neuritas.

20 La breve incubación con db-cAMP incrementó la proporción de células que contenían agregados de neurofilamentos desde el 9% hasta el 37% ($p < 0,001$). Este efecto se observó en células transfectadas con tau truncada (10% frente al 47%, $p < 0,001$), y el efecto diferencial de la tau truncada fue por sí mismo significativo ($p = 0,005$). Por tanto, la transfección con tau truncada acentuó la formación de agregados de pNFH en respuesta al db-cAMP.

25 El efecto de la supresión de tionina después del tratamiento con db-cAMP fue doblar la frecuencia de células con agregados de pNFH (27% frente al 49%, $p = 0,05$). Estos incrementos se observaron para células transfectadas con ambas, la tau de longitud completa (16% frente al 32%) y tau truncada (36% frente al 60%). Un efecto ulterior fue la incorporación dependiente de tionina de la inmunoreactividad del pNFH en las neuritas. Esto fue particularmente evidente en células PC-12 transfectadas con la tau truncada, pero no con la tau de longitud completa o células sin transfectar (índices de pNFH-neurita de 0,49 frente a 0,04 respectivamente con y sin tionina, $p = 0,07$).

30

B. Células NIE-115

En general, los agregados de pNFH observados en el citoplasma de células N2A no ocurrieron en células NIE no transfectadas. Antes bien, la inmunoreactividad de pNFH se incorporó normalmente en las neuritas en crecimiento durante el curso de la diferenciación, aunque también se observó una etapa perinuclear-arc temprana. Las células NIE se transfectaron como más arriba con el vector pIF2, que contenía o la proteína tau de longitud completa o la truncada, y se cultivaron en presencia de tionina. A continuación se examinaron los efectos de añadir db-cAMP en presencia o ausencia de tionina.

40

Al igual que con las células PC-12, no se produjeron células NIE estables transfectadas con tau truncada en la ausencia de tionina. Aquéllas transfectadas con tau truncada produjeron una frecuencia general significativamente superior de agregados de pNFH en el citoplasma que las células transfectadas con tau de longitud completa (9% frente al 26%, $p < 0,001$), y la incubación con db-cAMP indujo agregados de pNFH en células transfectadas con tau truncada, pero no en transfectadas con tau de longitud completa (6% frente al 36%, $p < 0,001$).

45

En células transfectadas con la tau de longitud completa, la presencia de tionina no interfirió con la incorporación de proteína tau transgénica en el citoesqueleto microtubular, incluyendo el centro organizador de microtúbulos, la distribución difusa citoplasmática, y la extensión hacia las neuritas. La supresión de tionina en células transfectadas con la tau de longitud completa incremento la proporción que contenía agregados de pNFH (7% frente al 16%, $p = 0,03$). En células transfectadas con tau truncada, la supresión de tau resultó en agregados de pNFH incrementados en líneas celulares específicas (por ejemplo, NIE-ND6, 14% frente al 44%, $p = 0,07$), las cuales se caracterizaron también por la supresión de la diferenciación. Esta revisión de un fenotipo previamente observado sólo en células N2A indiferenciadas, pero no en células NIE, fue sorprendente.

55

Como con las células PC-12, la incorporación dependiente de tionina del pNFH en las neuritas se pudo demostrar después del tratamiento de ciertas células con db-cAMP (por ejemplo, NIE-ND1, índices de pNFH-neurita de 0,1 frente a 0,66, respectivamente con y sin tionina, $p = 0,01$). El transporte dependiente de tionina del pNFH hacia las neuritas pudo observarse cuantitativamente como el inverso de la relación entre inmunoreactividad NHF de los neurofilamentos citoplasmáticos y neuríticos, en células transfectadas, en presencia de tionina ($r = -0,52$ frente a $r = +0,52$ sin o con tionina: $p = 0,01$ y $0,02$ respectivamente).

60

Referencias citadas en la descripción

65

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Livingstone.** The scale of the problem. Chapman & Hall, 1994, 21-35 [0002]
- 5 • **Roth; Iversen.** *Brit. Med. Bull.*, 1986, vol. 42 [0002]
- **Wischnik et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 4506-4510 [0003]
- **APP; Kang et al.** *Nature*, 1987, vol. 325, 733-736 [0003]
- 10 • **Mukaetova-Ladinska et al.** *Am. J. Pathol.*, 1993, vol. 143, 565-578 [0004]
- **Wischnik et al.** *Neurobiol. Ageing*, 1995, vol. 16, 409-417 [0004]
- 15 • **Lai et al.** *Neurobiol. Ageing*, 1995, vol. 16, 433-445 [0004]
- **Harrington et al.** *Dementia*, 1994, vol. 5, 215-228 [0004]
- **Harrington et al.** *Am. J. Pathol.*, 1994, vol. 145, 1472-1484 [0004]
- 20 • **Terry et al.** *Ann. Neurol.*, 1991, vol. 30, 572-580 [0004]
- **Bondareff et al.** *Arch. Gen. Psychiatry*, 1993, vol. 50, 350-356 [0004]
- 25 • **Wischnik et al.** *Neurobiol. Ageing*, 1995 [0004]
- **Wischnik et al.** Structure, biochemistry and molecular pathogenesis of paired helical filaments in Alzheimer's disease. 1995 [0004]
- 30 • **Bondareff et al.** *Arch. Gen. Psychiat.*, 1993, vol. 50, 350-356 [0004]
- **J. Neuropath. Exp. Neurol.**, 1994, vol. 53, 158-164 [0004]
- **Mena et al.** *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1991, vol. 50, 474-490 [0004]
- 35 • Molecular Pathobiology of Alzheimer's disease. **Harrington; Wischnik.** *Dementia. Chapman & Hall*, 1994, 211-238 [0005]
- 40 • **Mukaetova-Ladinska et al.** *Dev. Brain Dysfunct.*, 1994, vol. 7, 311-329 [0005]
- **Harrington et al.** *Lancet*, 1994, vol. 343, 993-997 [0005]
- **Wischnik et al.** *Int. Rev. Psychiat.*, 1996 [0005]
- 45 • **Kondo et al.** *Neuron*, 1988, vol. 1, 827-834 [0006]
- **Jakes et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 2725-2729 [0006]
- **Novak et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 365-370 [0006]
- 50 • **Goedert et al.** *Neuron*, 1989, vol. 3, 519-526 [0006] [0023] [0086]
- **Butner; Kirschner.** *J. Cell Biol.*, 1991, vol. 115, 717-730 [0006]
- 55 • **Mena et al.** *Acta Neuropathol.*, 1995, vol. 89, 50-56 [0006]
- **Mena et al.** *Acta Neuropathol.*, 1996 [0006]
- **Goedert et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 4051-4055 [0008]
- 60 • **Roth et al.** *Brit. J. Psych.*, 1986, vol. 149, 698-709 [0009]
- **Braak; Braak.** *Acta Neuropathol.*, 1991, vol. 82, 239-259 [0009]
- 65 • **Lee.** *Science*, 1991, vol. 251, 675-678 [0010]
- **Goedert et al.** *Microtubules. John Wiley & Sons*, 1994, 183-200 [0010]

ES 2 346 284 T3

- **Matsuo et al.** *Neuron*, 1994, vol. 13, 989-1002 [0010]
- **Caputo et al.** *Brain Res.*, 1992, vol. 597, 227-232 [0012]
- 5 • **Wallace.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 8739-8746 [0012]
- **Caputo et al.** *Neurobiol. Ageing*, 1992, vol. 13, 267-274 [0013]
- **Jancsít et al.** *Cell Motil. Cytoskel.*, 1989, vol. 14, 372-381 [0013]
- 10 • **Shelanski et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, 765-768 [0022]
- **Kindler; Garner.** *Mol. Brain Res.*, 1994, vol. 26, 218-224 [0025]
- 15 • **Herzog; Weber.** *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 92, 1-8 [0028]
- **Lindwall; Cole.** *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, 12241-12245 [0028]
- 20 • **Sambrook; Fritsch; Maniatis.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1989 [0029]
- **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology. Green Publish. Association & Wiley Interscience* [0029]
- **Slobada et al.** *Cell Mobility. Cold Spring Laboratory*, 1976, 1171-1212 [0031]
- 25 • The role of abnormal phosphorylation of tau protein in the development of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Lai. PhD Thesis. University of Cambridge, 1995 [0054]
- **Novak et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 5837-5841 [0056]
- 30 • **Okabe; Hirokawa.** *Nature*, 1990, vol. 343, 479-482 [0058]
- **Matus, A.** *Microtubules. John Wiley and Sons*, 155-166 [0059]
- 35 • **Schoenfield et al.** *J. Neurosci.*, 1989, vol. 9, 1712-1730 [0063]
- **Wisniewski; Terry.** *Lab. Invest.*, 1967, vol. 17, 577-587 [0063]
- **Langui et al.** *Brain Res.*, 1988, vol. 438, 67-76 [0063]
- 40 • **Wischik; Crowther.** *Br. Med. Bull.*, 1986, vol. 42, 51-56 [0063]
- **Cote et al.** *Cell*, 1993, vol. 73, 35-46 [0065]
- 45 • **Xu et al.** *Cell*, 1993, vol. 73, 23-33 [0065]
- **Houben-Weyl; Beilstein E.** *Merck Manual*. vol. III/IV 2, 1214 ff [0077]
- *J. Heterocycl. Chem*, 1984, vol. 21, 613 [0077]
- 50 • **Naylor.** *Biol. Psychiatry*, 1986, vol. 21, 915-920 [0078]
- **Müller.** *Acta Anat.*, 1992, vol. 144, 39-44 [0078]
- 55 • **Disanto; Wagner.** *J. Pharm. Sci.*, 1972, vol. 61, 598-602 [0078]
- **Disanto; Wagner.** *J. Pharm. Sci.*, 1972, vol. 61, 1086-1094 [0078]
- **Biernat et al.** *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 1593-1597 [0086]
- 60 • **Goedert et al.** *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 393-399 [0086]
- **McLeod et al.** *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 729-736 [0089]
- 65 • **Studier; Moffat.** *J. Mol. Biol.*, 1986, vol. 189, 113-130 [0092]
- **Goedert; Jakes.** *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 4225-4230 [0093]

ES 2 346 284 T3

- **Southern; Berg.** *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327 [0095]
- **Sternberger et al.** *PNAS*, 1985, vol. 82, 4274-4276 [0101]

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

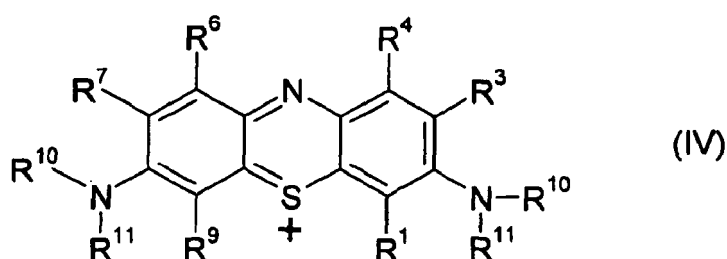
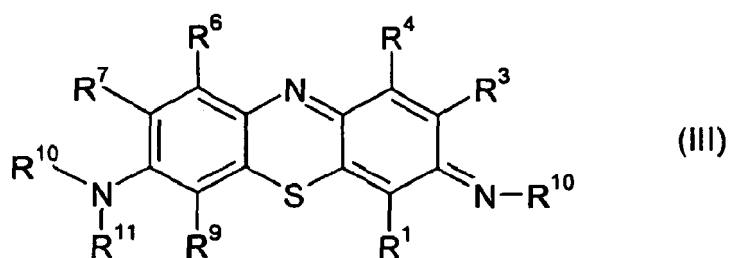
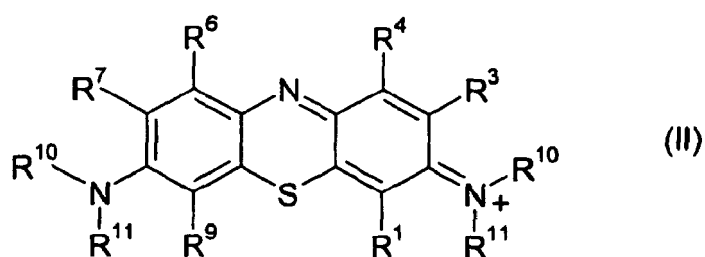
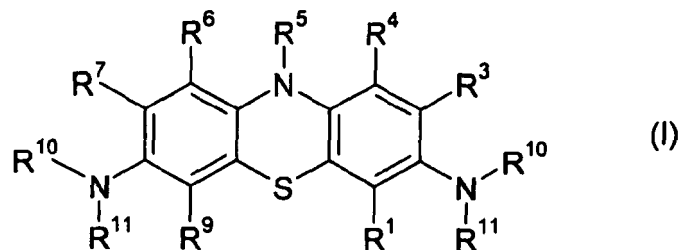
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Fenotiazina de fórmula:



55 en donde:

R_1 , R_3 , R_4 , R_6 , R_7 y R_9 se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;

60 R_5 , cada R_{10} y cada R_{11} se seleccionan entre hidrógeno, hidroxilo, carboxilo, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo o alcoxi;

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para la utilización en la profilaxis o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa de la agregación patológica tau-tau mediante la inhibición de dicha asociación tau-tau sin inhibición de la unión normal tau-tubulina.

65

ES 2 346 284 T3

2. Fenotiazina según la reivindicación 1, en donde dicha fenotiazina se selecciona del grupo donde:

R_1 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_9 , cada R_{10} y cada R_{11} se seleccionan independientemente entre $-CH_3$, $-C_2H_5$ ó $-C_3H_7$.

5 3. Fenotiazina según la reivindicación 1, en donde dicha fenotiazina tiene la fórmula (i) de más arriba.

4. Fenotiazina según la reivindicación 3, en donde R_5 es hidrógeno.

10 5. Fenotiazina según la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona entre el Azul de metileno, el Azul de Toluidina O, la tionina, el Azure A, el Azure B o el Azul de 1,9-dimetil-metileno.

6. Fenotiazina según la reivindicación 1, en donde el agente está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz en un material portador terapéuticamente inerte en una composición farmacéutica.

15 7. Azul de metileno para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

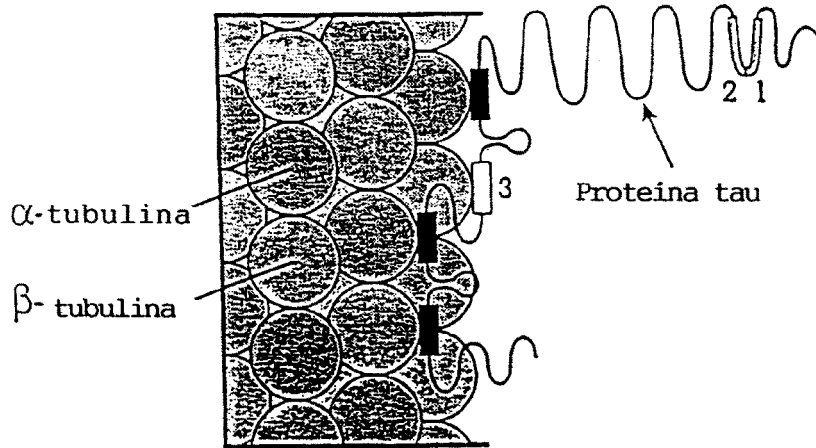


Fig. 2

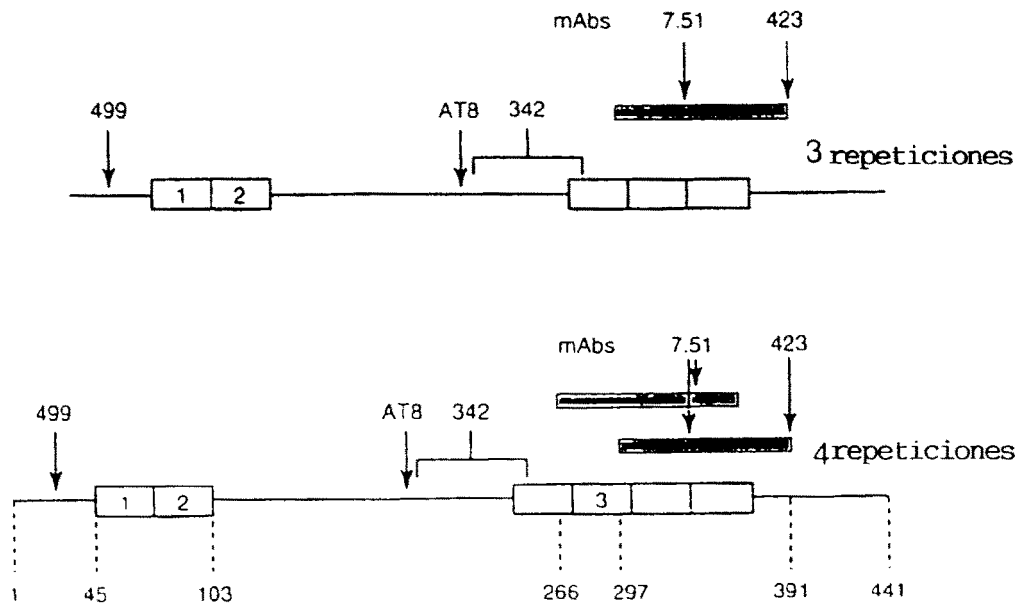


Fig. 3

A [R1,R3,R4]

↓ ↓
 L K H O P G G G K V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N
 I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N
 I T H V P G G G N K K I E T H K L t f r e n a k a k t d h g a e ↓

(SEQ ID NO: 1)

B [R1,R2,R3]

↓ ↓
 L K H O P G G G K V Q I I N K K L D L S N V Q S K C G S K D N
 I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N
 I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N?

(SEQ ID NO: 2)

C [R2,R3,R4]

↓ ↓
 I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S N V Q S K C G S K D N
 I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V Q S K I G S L D N
 I T H V P G G G N K K I E T H K L t f r e n a k a k t d h g a e ↓

(SEQ ID NO: 3)

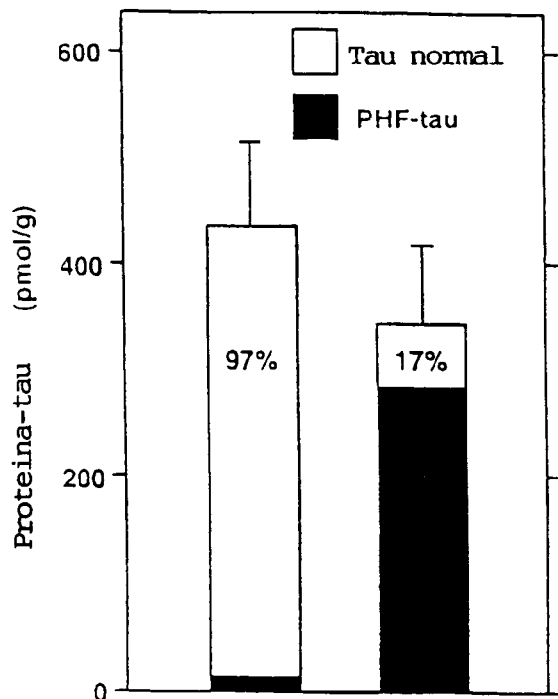


Fig. 4

Fig. 5

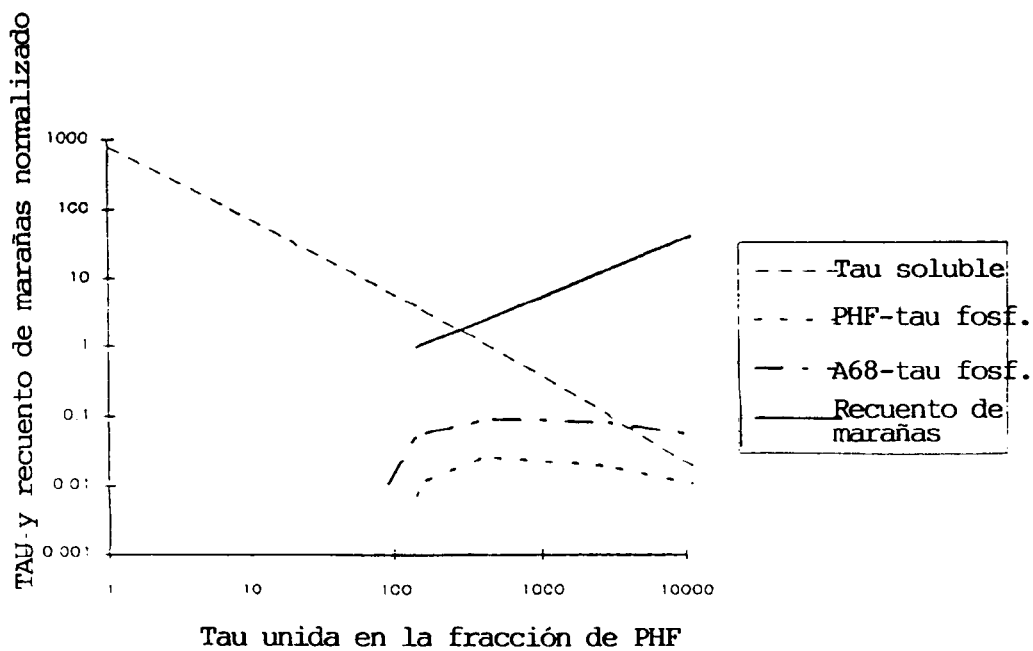


Fig. 6A

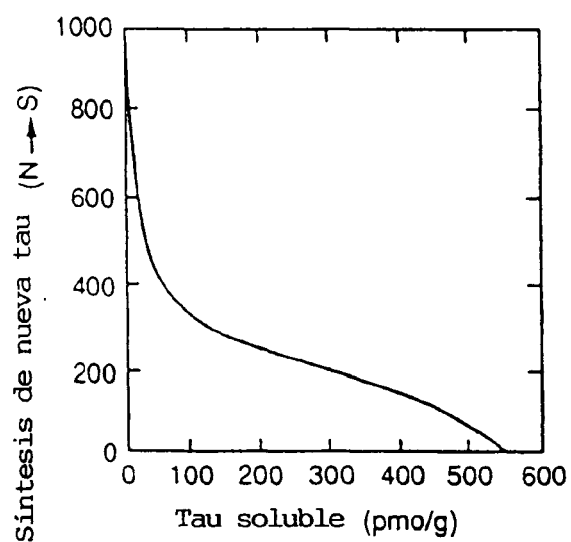


Fig. 6B

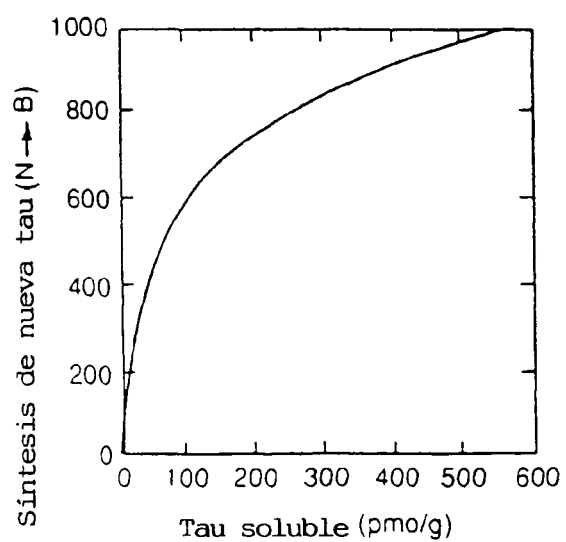


Fig. 7

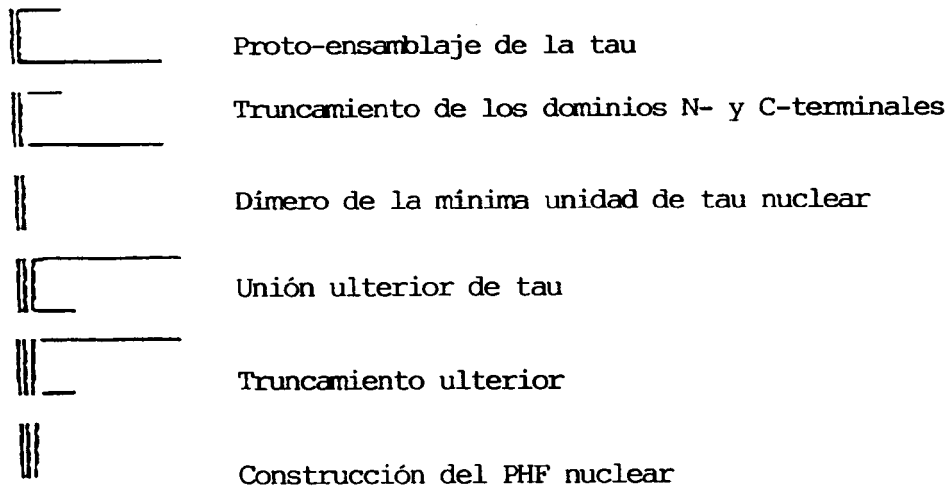


Fig. 8

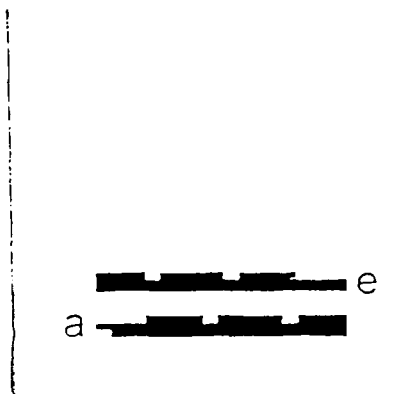


Fig. 9

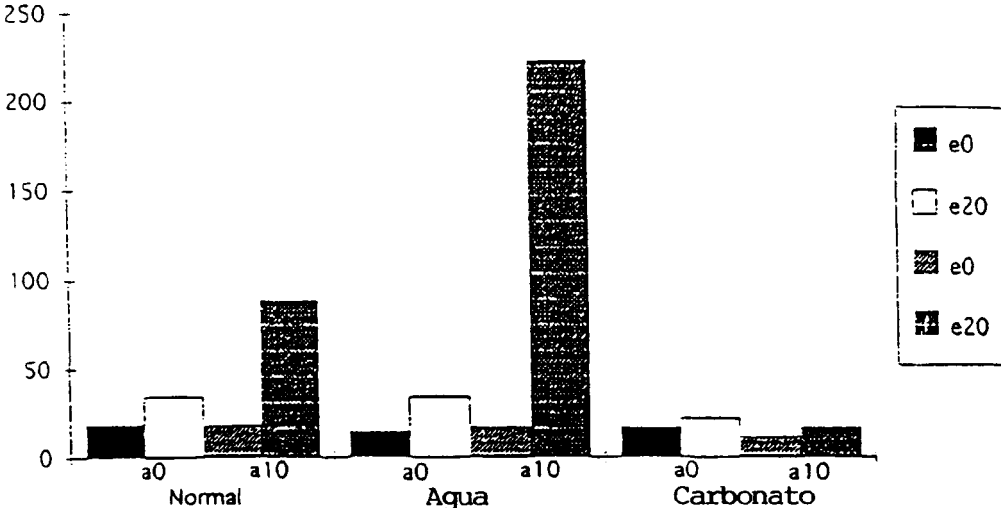


Fig. 10

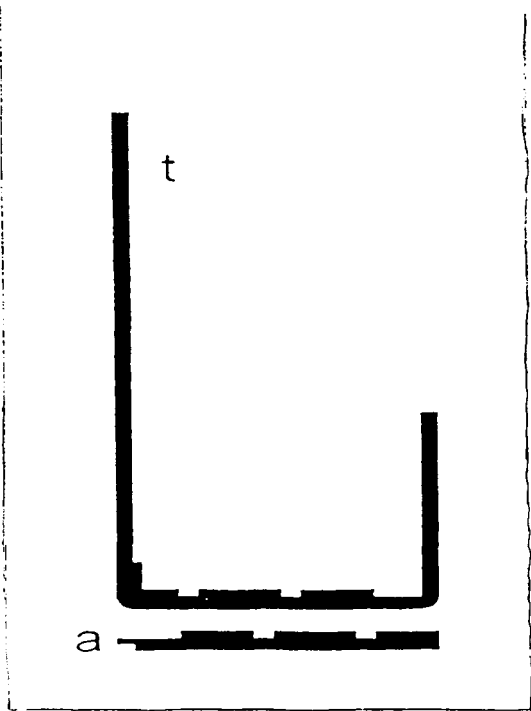


Fig. 11

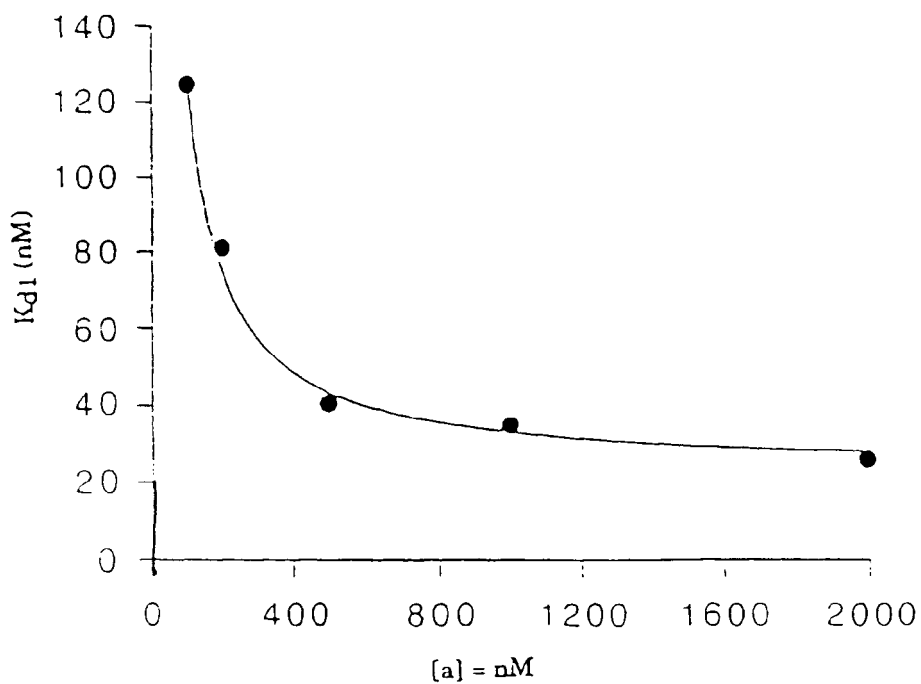
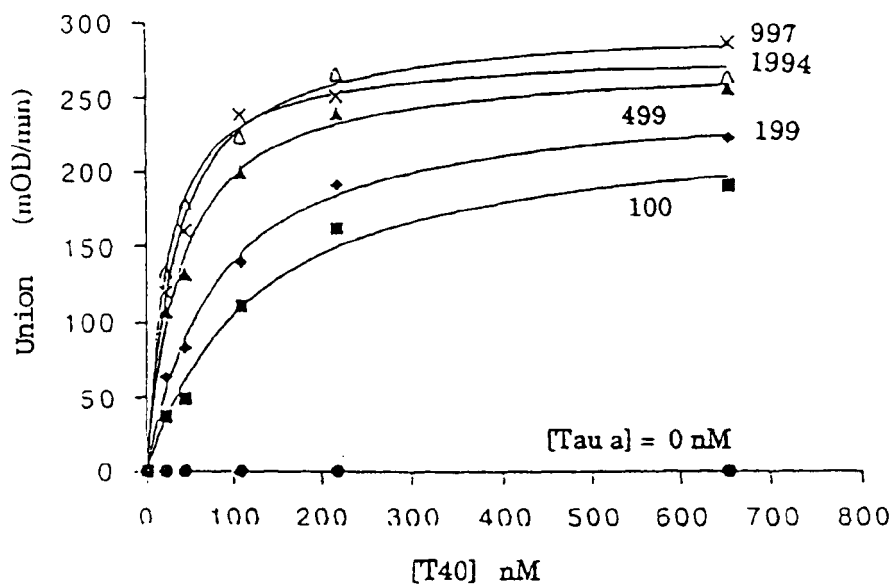


Fig. 12

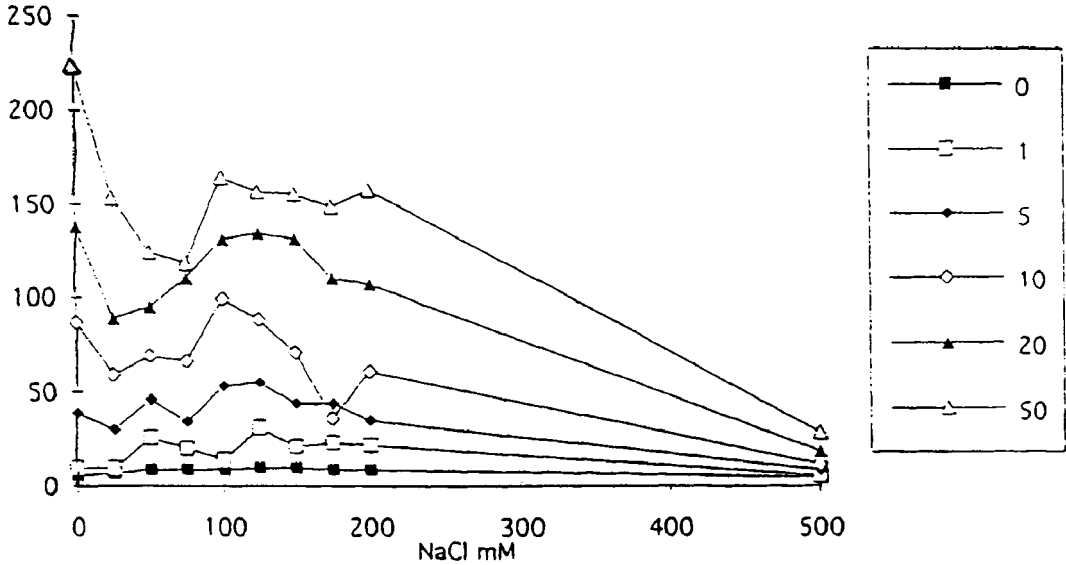


Fig. 13

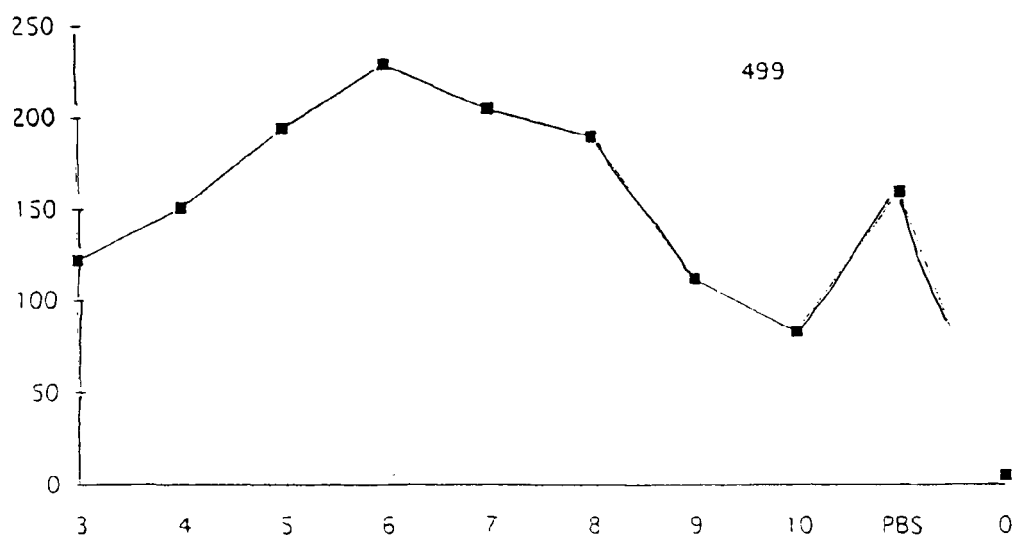
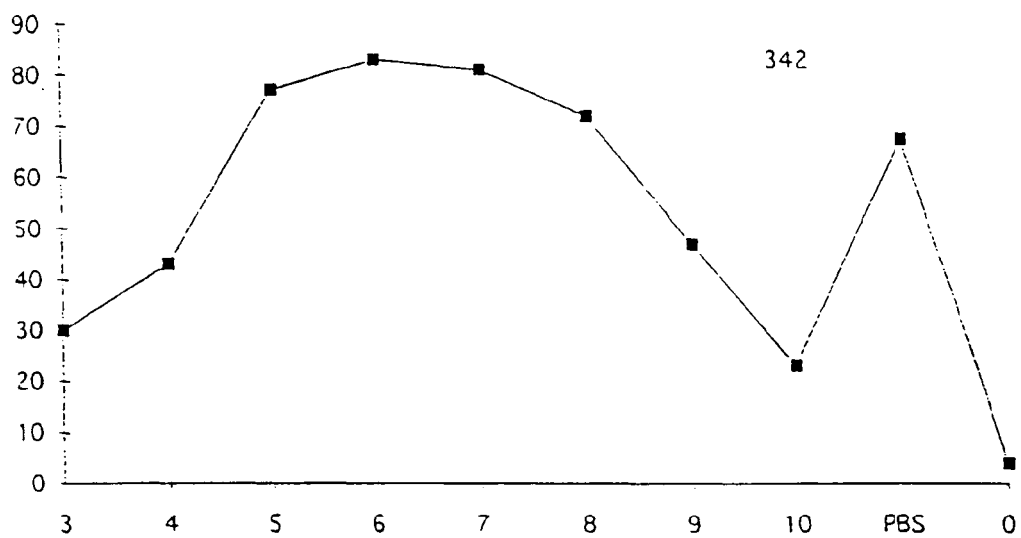


Fig. 14

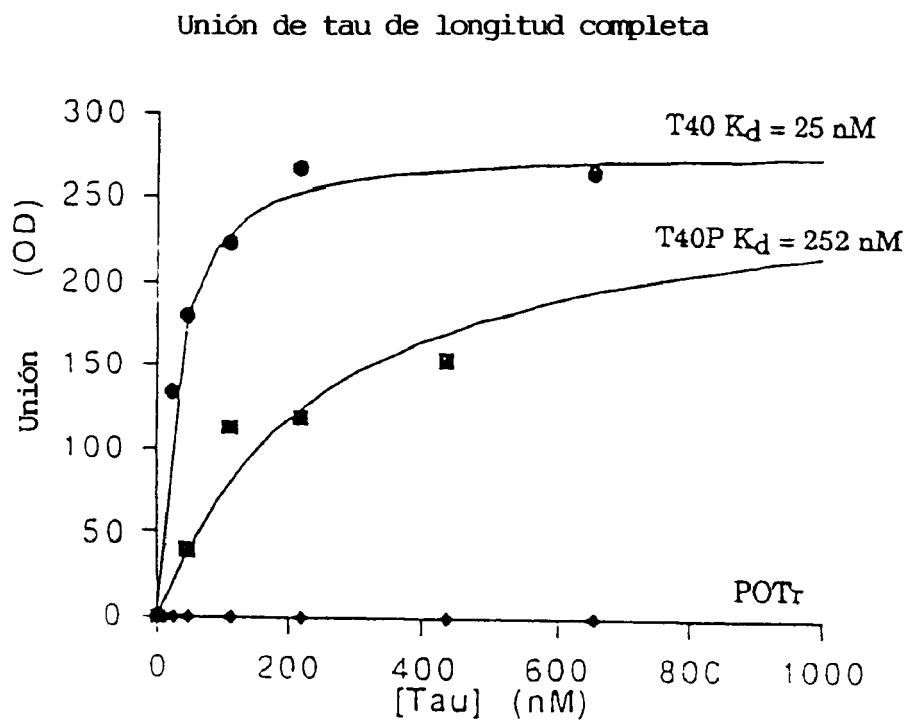


Fig. 15A

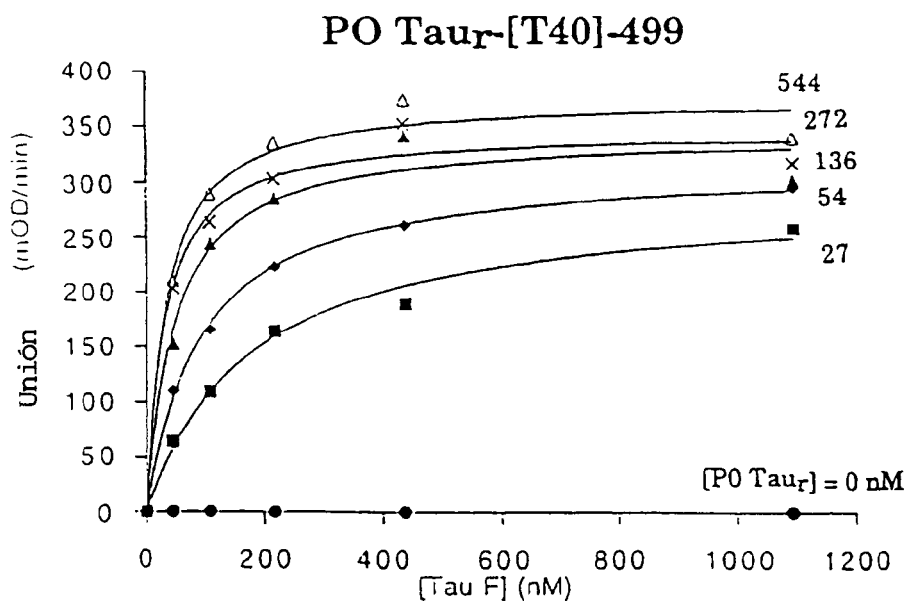


Fig. 15B

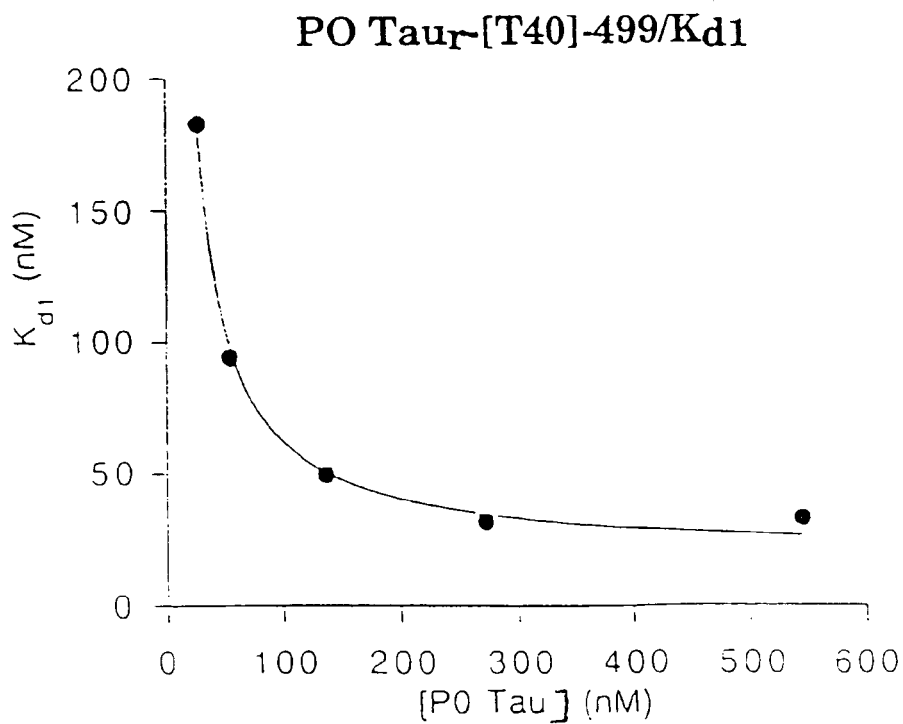


Fig. 16

Fase sólida	Fase acuosa		Reacción nacido
	I40	I40P	
dGA	25 nM	252 nM	No bin ling
Reacción nacido	19 nM	627 nM	
Reacción nacido P	754 nM	969 nM	

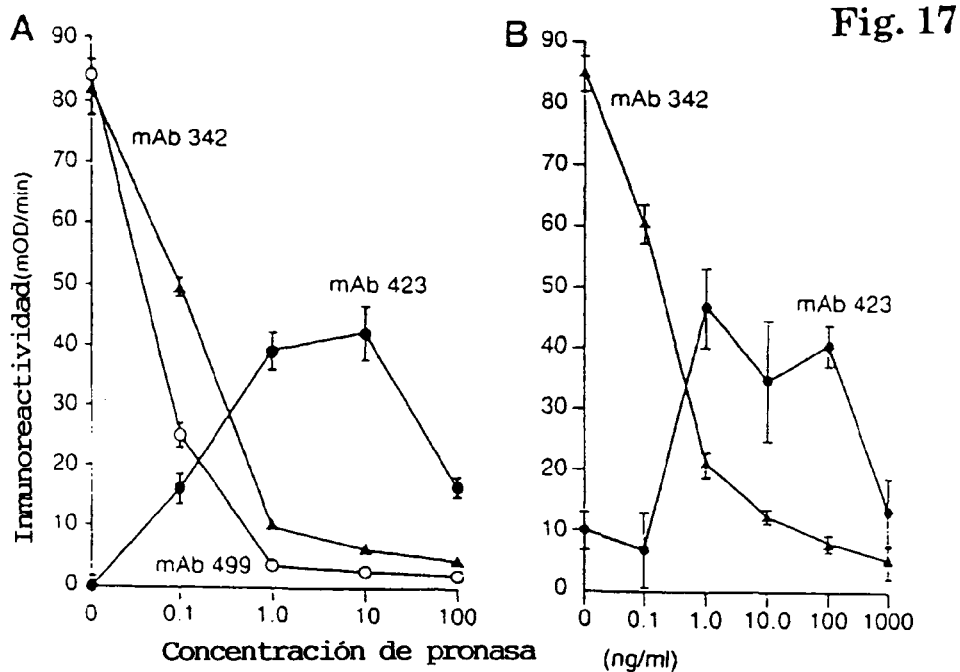
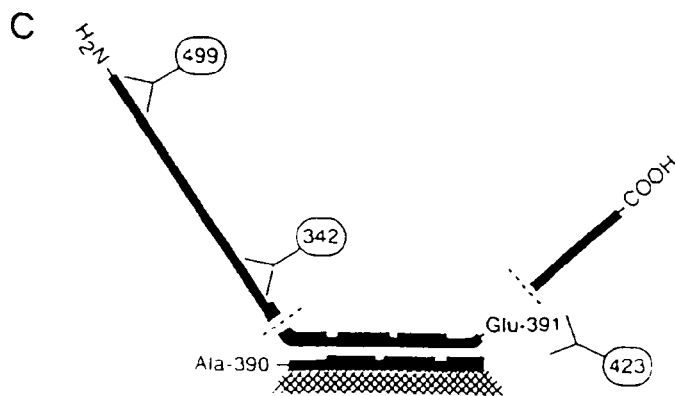


Fig. 17



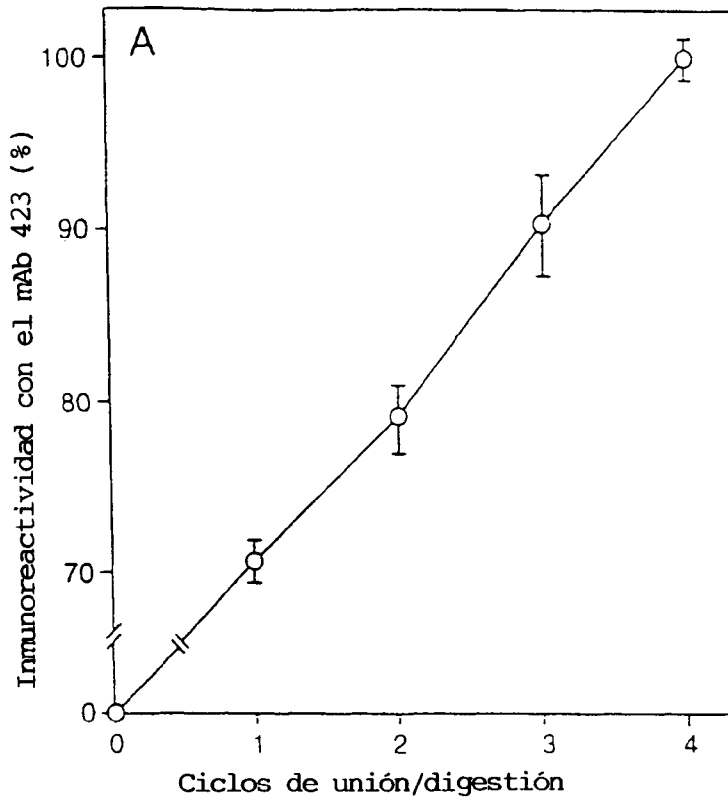
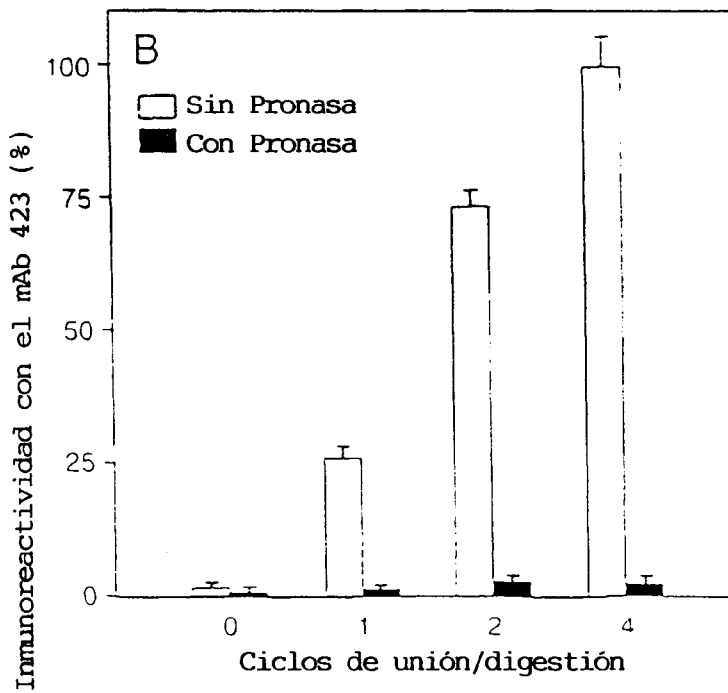


Fig. 18



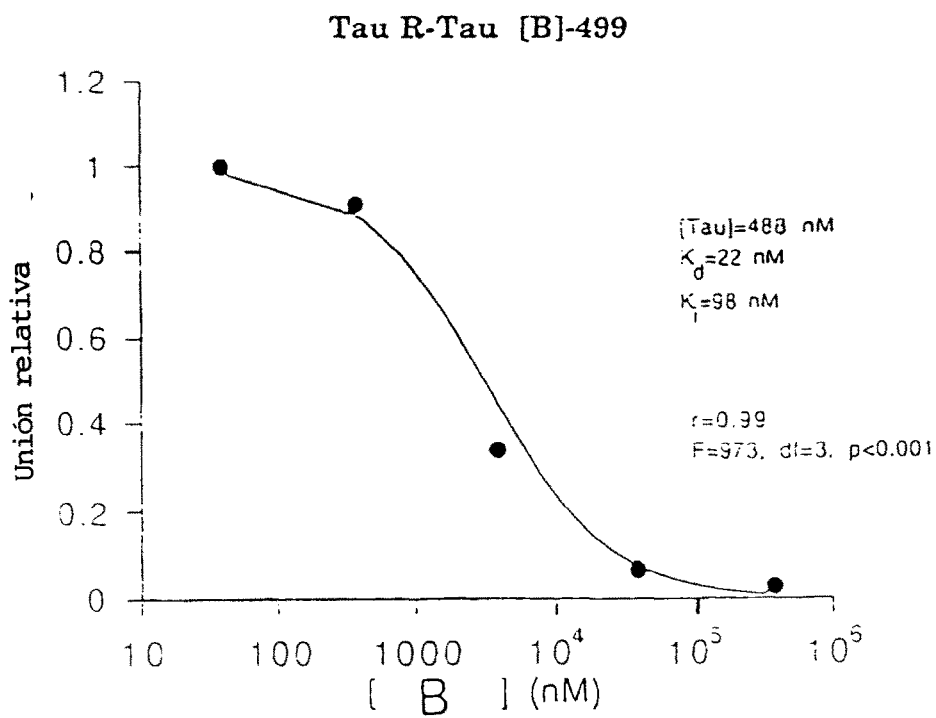
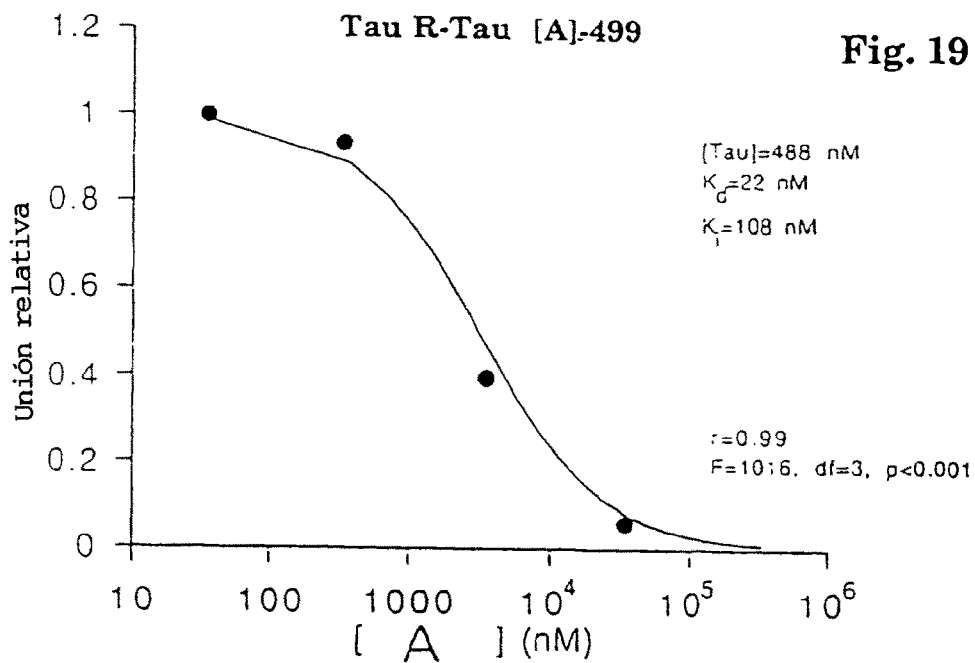


Fig. 20

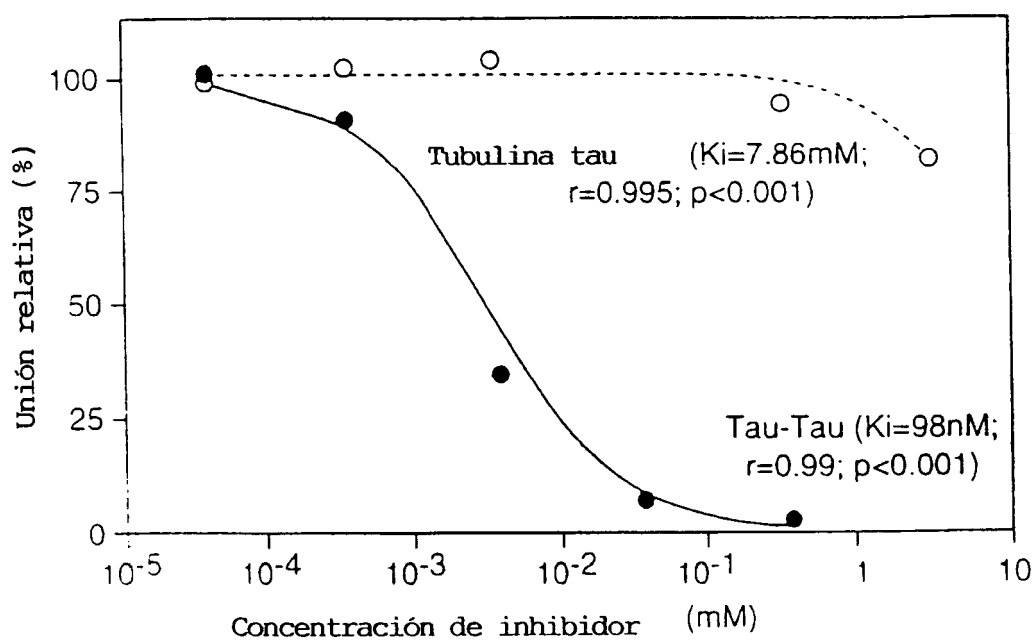


Fig. 21A

SEQ. ID. Nos. 4 y 5

```

ATG GCT GAG CCC CGC CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC GCT GGG
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
  1                   5                   10                   15

ACG TAC GGG TTG GGG GAC AGG AAA GAT CAG GGG GGC TAC ACC ATG CAC
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
  20                   25                   30

CAA GAC CAA GAG GGT GAC ACG GAC GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCC CTG
Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
  35                   40                   45

CAG ACC CCC ACT GAG GAC GGA TCT GAG GAA CCG GGC TCT GAA ACC TCT
Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
  50                   55                   60

GAT GCT AAG AGC ACT CCA ACA GCG GAA GAT GTG ACA GCA CCC TTA GTG
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
  65                   70                   75                   80

GAT GAG GGA GCT CCC GGC AAG CAG GCT GCC GCG CAG CCC CAC ACG GAG
Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Glu Pro His Thr Glu
  85                   90                   95

ATC CCA GAA GGA ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC ATT GGA GAC ACC CCC
Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
  100                  105                  110

AGC CTG GAA GAC GAA GCT GCT GGT CAC GTG ACC CAA GCT CGC ATG GTC
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Glu His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
  115                  120                  125

AGT AAA AGC AAA GAC GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA AAA GCC AAG GGG
Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
  130                  135                  140

GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CGG GGA GCA GCC CCT CCA
Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
  145                  150                  155                  160

GGC CAG AAG GGC CAG GCC AAC GCC ACC AGG ATT CCA GCA AAA ACC CCG
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
  165                  170                  175

CCC GCT CCA AAG ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA CCT CCA AAA TCA GGG
Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
  180                  185                  190

GAT CCG AGC GGC TAC AGC AGC CCC GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC AGC
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
  195                  200                  205

CGC TCC CGC ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA CCC ACC CGG GAG CCC AAG
Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
  210                  215                  220

```

Fig. 21B

AAG GTG GCA GTG GTC CGT ACT CCA CCC AAG TCG CTG TCT TCC GCC AAG
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT GGC
Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Gly
245 250 255

AAG TCC AAG ATC GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA GGC
Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC CAG
Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAG GTC CCG GGA GGC GGC
Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys Gln Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC TCC
Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

AAG TGT GGC TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC CAG
Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His Lys Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

GTG GAA GTA AAA TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG TCG
Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA AAT
Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC GTC CGC GAG AAC GCC AAA GCC
Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG TCT
Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC AGC
Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

ATT GAC ATG GTA GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG GGG
Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
420 425 430

TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT TTG TGA
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu ***
435 440

Fig.22

NdeI
 5' caTAg
 atcaaacacgtcccgggagggcggcagtggtgcaaatagctacaaaccagttgacctgagcaag
 (M)
 IleLysHisValProGlyGlyGlySerValGlnIleValTyrLysProValAspLeuSerLys
 gtgacctccaagtgtggctcattagggcaacatccatcataaaccaggaggtggccaggtggaagtaaaatct
 ValThrSerLysCysGlySerLeuGlyAsnIleHisHisLysProGlyGlyGlyGlnValGluValLysSer
 gagaagcttgacttcaaggacagagtcagtcgaagattgggtccctggacaatcacccacgtccctggc
 GluLysLeuAspPheLysAspArgValGlnSerLysIleGlySerLeuAspAsnIleThrHisValProGly
 ggaggaaataaaaagattgaaaccacacaagctgaccttccgcgagagaacgccaagccaagacagaccacggg
 GlyGlyAsnLysLysIleGluThrHisLysLeuThrPheArgGluAsnAlaLysAlaLysThrAspHisGly
 gcggag tgagaarrc...3'
 AlaGlu *** EcoRI

(SEQ ID NO: 6)

Cebadores usados
 para el dGAE (Novak et al. 1993)

a) Cebador con sentido

NdeI
 5' ..gccccgggcccccaTAgatcaaacacgtcccgggagggcggcagtggtgcaaa...3'

(SEQ ID NO: 7)

b) Cebador anti-sentido

EcoRI
 5' ..agattacagagarrcctcactccgccccgtggtctgtctcttggctttggc...3'

(SEQ ID NO: 8)

Clasificación de compuestos según su inhibición de la interacción tau-tau

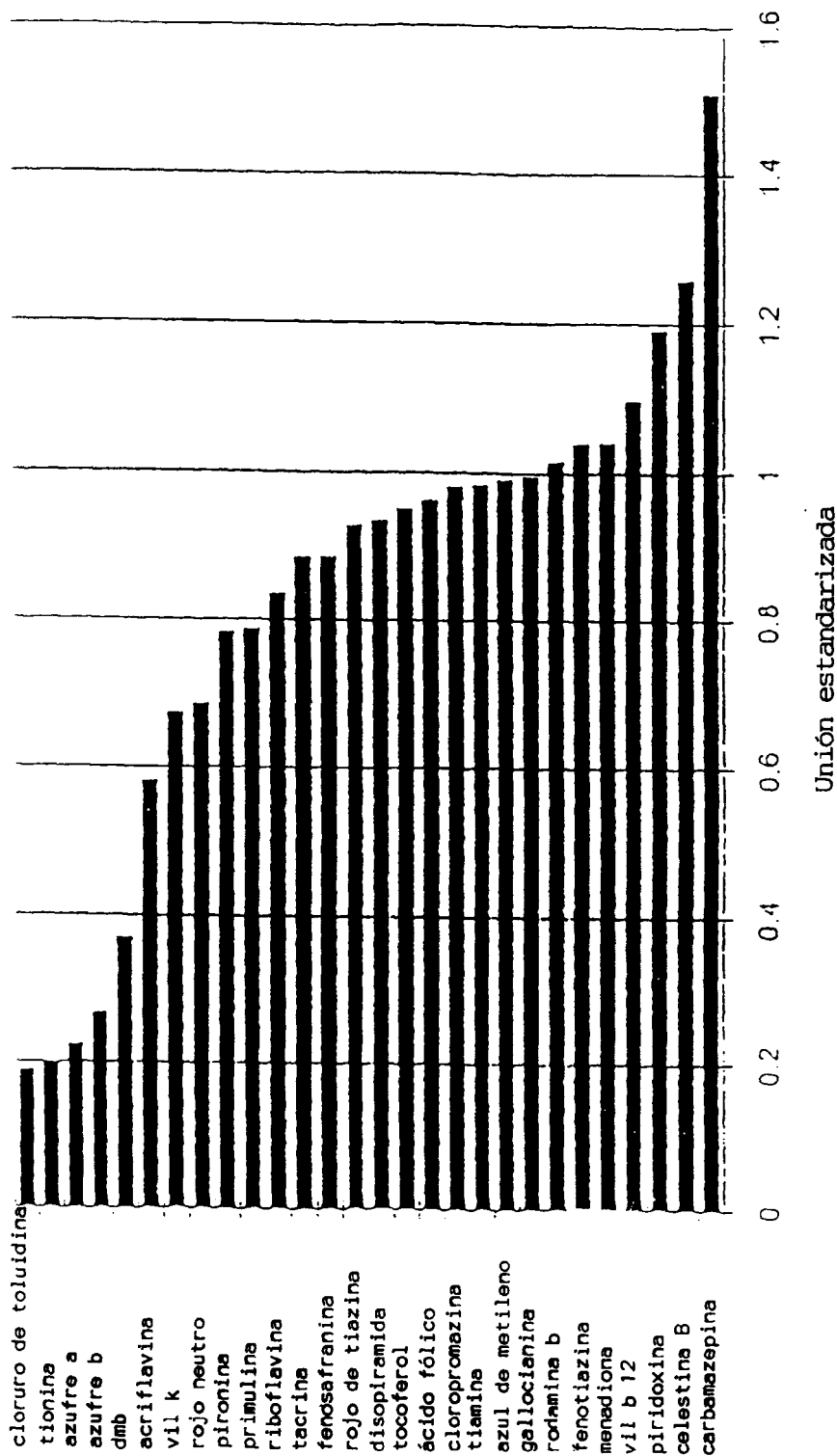
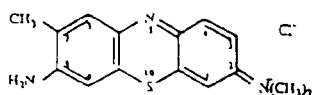


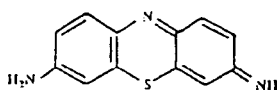
Fig. 24A

Azul de toluidina O



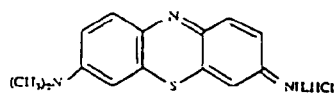
0.19

Tionina



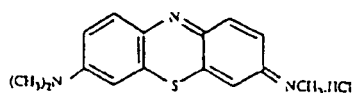
0.201

Azufre A



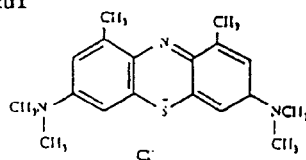
0.227

Azufre B



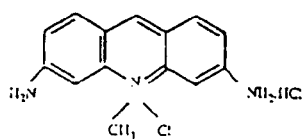
0.269

1,9-Dimetil-Metileno Azul

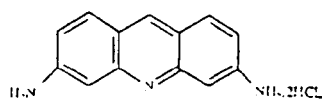


0.372

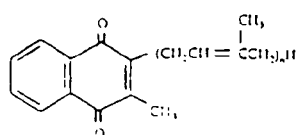
Acriflavina HCl



0.583

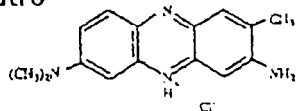


Vitamina K2



0.674

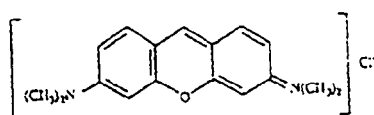
Rojo neutro



0.687

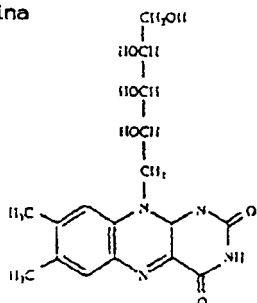
Fig. 24B

Pironina Y



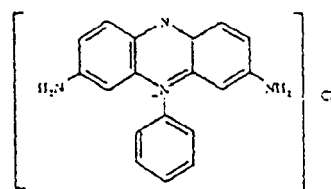
0.783

Riboflavina



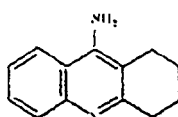
0.837

Fenosofranina



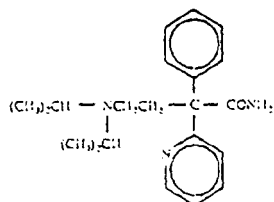
0.886

Tacrina



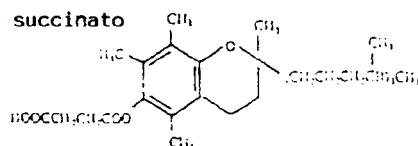
0.886

Disopiramida



0.956

α -Tocoferon ácido succinato



0.952

Acido fólico

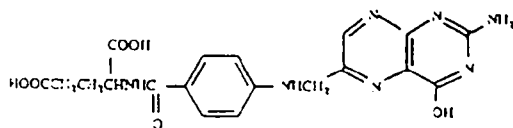
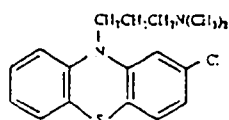


Fig. 24C

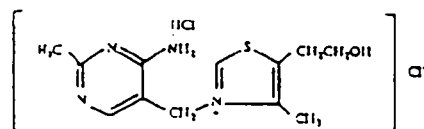
0.964

Clorpromazina



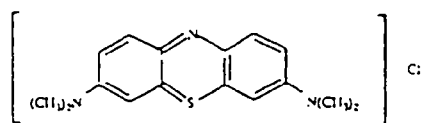
0.982

Tiamina HCl



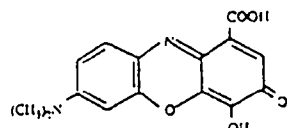
0.985

Azul de metileno



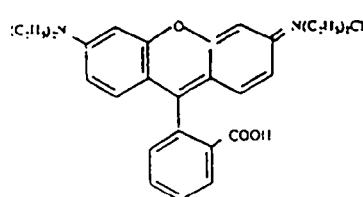
0.992

Gallocianina



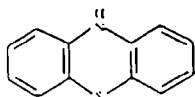
0.997

Rodamina B



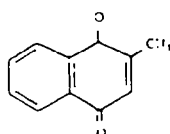
1.015

Fenotiazina



1.04

Menadiona

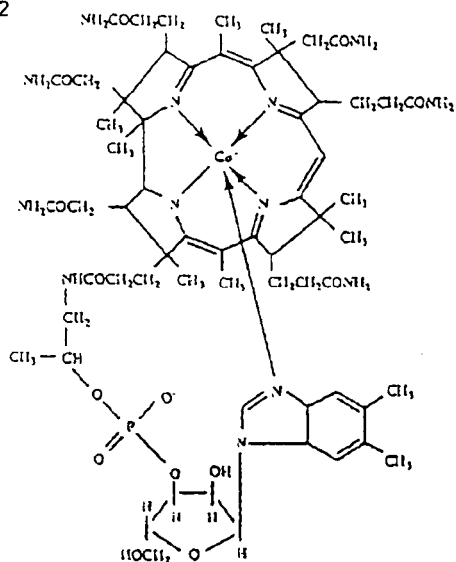


1.042

Fig. 24D

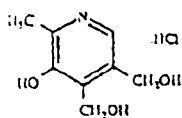
Vitamina B₁₂

1.098



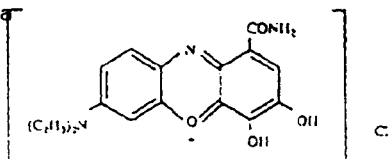
Piridoxina Hidroclorida

1.192



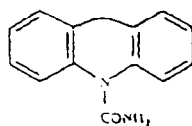
Azul de celestina

1.259



Carbamazepina

1.31



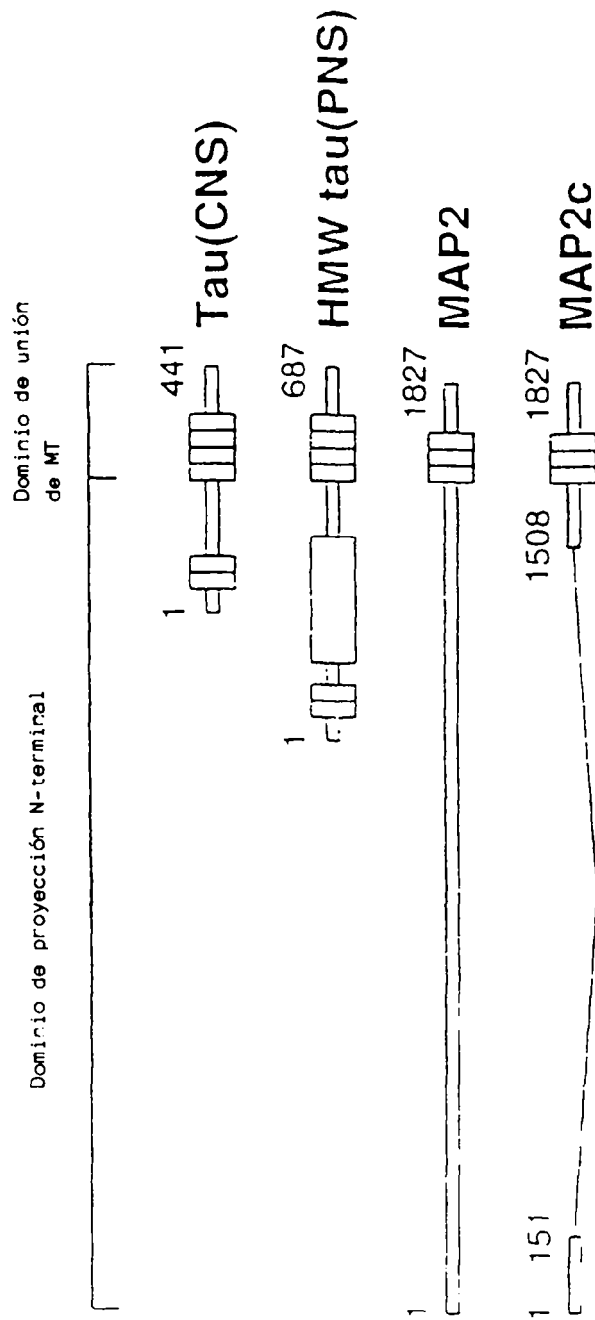


Fig. 25

Fig. 26

Tau humana (SEQ ID NO: 9) D L K N V K S K I G S T E N
 MAP2 de ratón (SEQ ID NO: 10) D

I K H O P G G G K V Q I I N K K L D L S N V O S K C G S K D N
 I Y K Q R L I F K R

I K H V P G G G S V Q I V Y K P V D L S K V T S K C G S L G N
 S A N T K I H K

338 340 342
I H H K P G G G Q V E V K S E K L D F K D R V O S K I G S L D N
 R R R K I E V E K A V
 * * *

I T H V P G G G N K K I E T H K L t f r e n a k a k t d h g a e
 A H V D S Q n H r v

Fig. 27

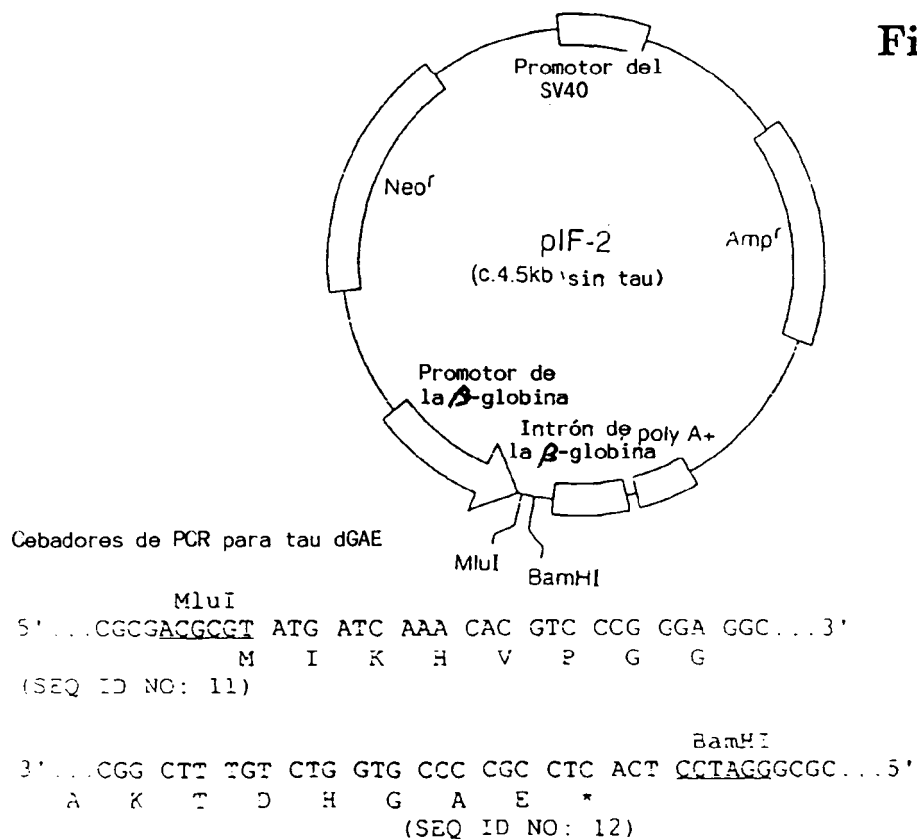


Fig. 28



Fig. 29

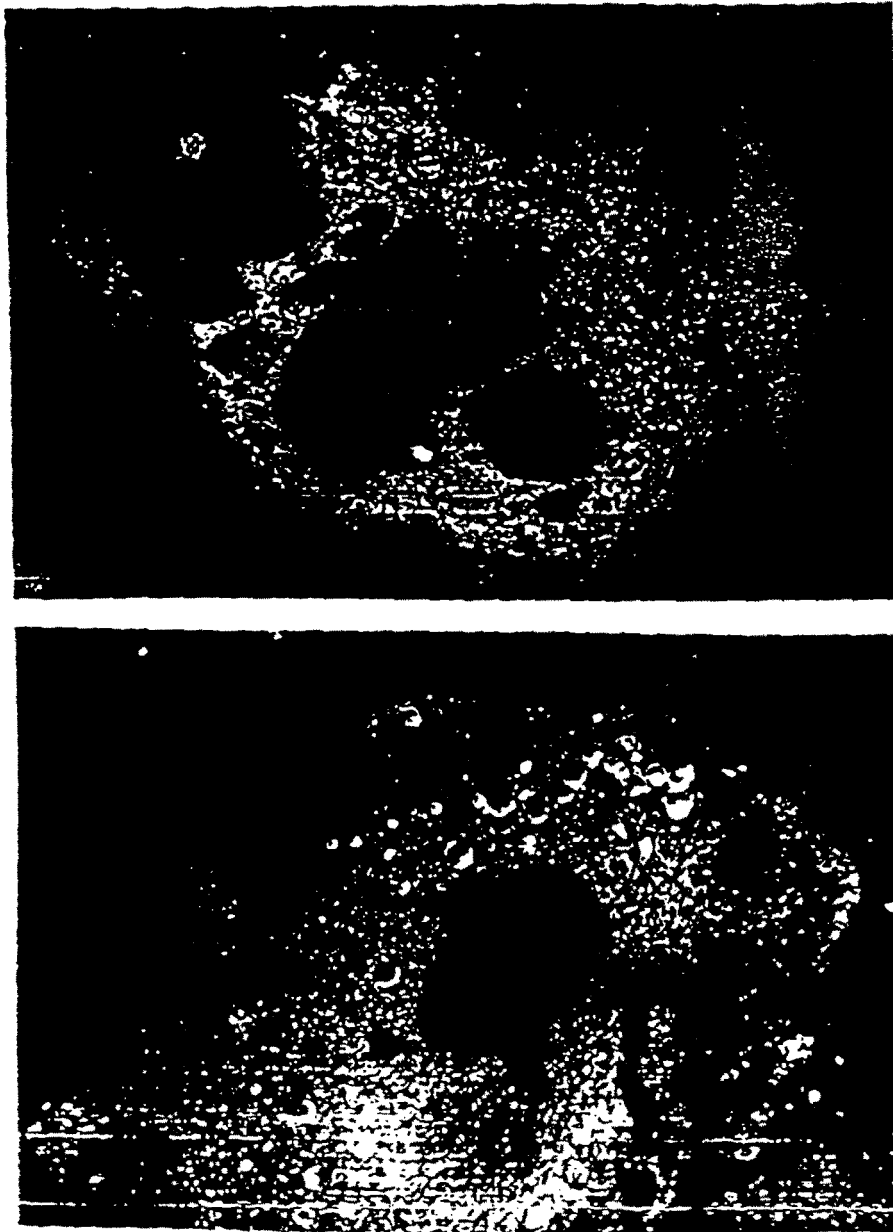
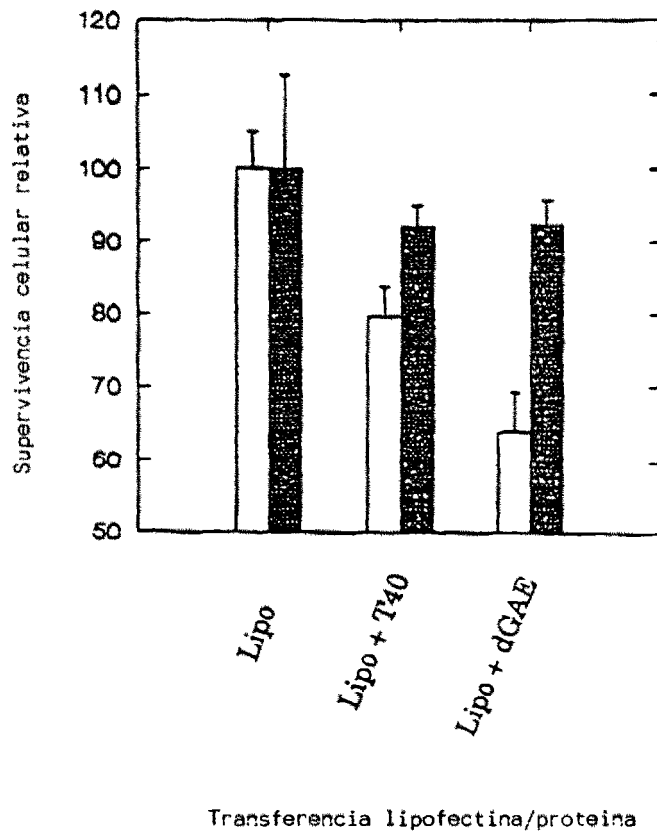


Fig. 30



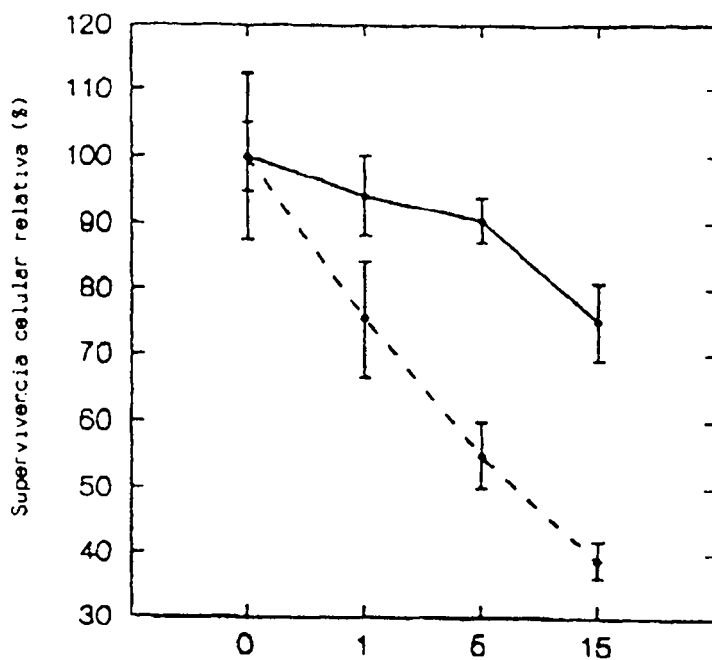


Fig. 31A

Concentración de dGAE en la mezcla de lipofectina (µg/ml)

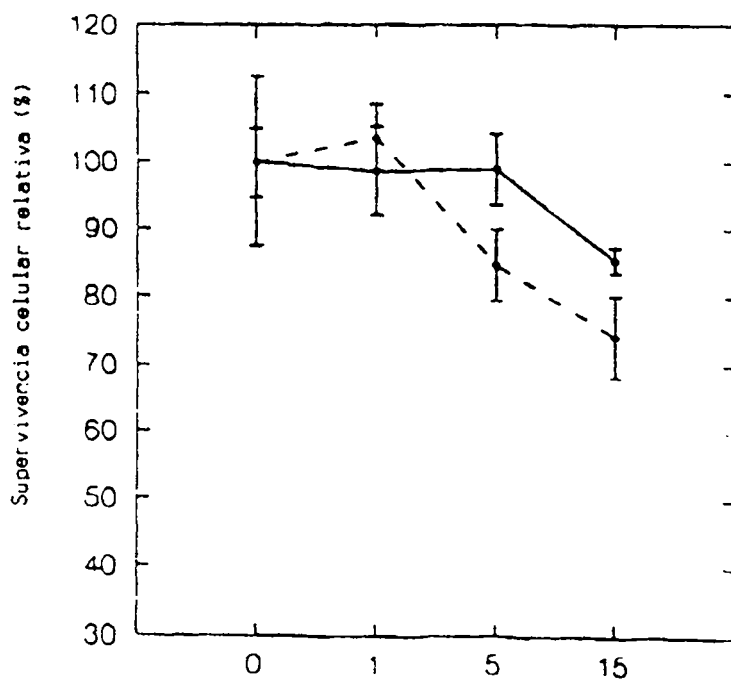


Fig. 31B

Concentración de T40 en lipofectina (µg/ml)

ES 2 346 284 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: HOFFMANN-LA ROCHE AG
 - (B) CALLE: Grenzacherstrasse 124
 - 10 (C) CIUDAD: Basilea
 - (D) ESTADO: BS
 - (E) PAIS: Suiza
 - (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): CH-4070
 - 15 (G) TELÉFONO: 061-688 51 08
 - (H) TELEFAX: 061-688 19 95
 - (I) TELEX: 962292/965542 hlr ch
- 20 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: INHIBICIÓN DE LA ASOCIACIÓN TAU-TAU
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12
- (iv) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 30 (D) PROGRAMA: PantetIn Versión #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N°: 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 35 (A) LONGITUD: 109 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) TIPO DE HEBRA:
 - 40 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 1:
- 45 Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
1 5 10 15
- 50 His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
20 25 30
- Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
35 40 45
- 55 Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
50 55 60
- 60 Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
65 70 75 80
- Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
85 90 95
- 65 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
100 105

ES 2 346 284 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 108 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 2:

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

His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
20 25 30

Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
35 40 45

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
50 55 60

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
65 70 75 80

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
85 90 95

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn
100 105

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 109 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 3:

ES 2 346 284 T3

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp asn Ile Lys
1 5 10 15

5 His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
 20 25 30

10 Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
 35 40 45

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
50 55 60

15 Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
65 70 75 80

20 Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
 85 90 95

25 Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
 100 105

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 1326 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- 45 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) UBICACIÓN: 1..1326

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 4:

50

55

60

65

ES 2 346 284 T3

ATG GCT GAG CCC CGC CAG GAG TTC GAA GTG ATG GAA GAT CAC GCT
GGG 48

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

5 1 5 10 15

ACG TAC GGG TTG GGG GAC AGG AAA GAT CAG GGG GGC TAC ACC ATG
CAC 96

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

10 20 25 30

CAA GAC CAA GAG GGT GAC ACG GAC GCT GGC CTG AAA GAA TCT CCC
CTG 144

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu

15 35 40 45

CAG ACC CCC ACT GAG GAC GGA TCT GAG GAA CCG GGC TCT GAA ACC
TCT 192

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

20 50 55 60

GAT GCT AAG AGC ACT CCA ACA GCG GAA GAT GTG ACA GCA CCC TTA
GTG 240

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

25 65 70 75 80

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 346 284 T3

5 GAT GAG GGA GCT CCC GGC AAG CAG GCT GCC GCG CAG CCC CAC ACG
 GAG 288
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95

10 ATC CCA GAA GGA ACC ACA GCT GAA GAA GCA GGC ATT GGA GAC ACC
 CCC 336
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110

15 AGC CTG GAA GAC GAA GCT GCT GGT CAC GTG ACC CAA GCT CGC ATG
 GTC 384
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125

20 AGT AAA AGC AAA GAC GGG ACT GGA AGC GAT GAC AAA AAA GCC
 AAG GGG 432
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140

25 GCT GAT GGT AAA ACG AAG ATC GCC ACA CCG CGG GGA GCA GCC CCT
 CCA 480
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160

30 GGC CAG AAG GGC CAG GCC AAC GCC ACC AGG ATT CCA GCA AAA ACC
 CCG 528
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

35 CCC GCT CCA AAG ACA CCA CCC AGC TCT GGT GAA CCT CCA AAA TCA
 GGG 576
 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190

40 GAT CGC AGC GGC TAC AGC AGC CCC GGC TCC CCA GGC ACT CCC GGC
 AGC 624
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205

45 CGC TTC CGC ACC CCG TCC CTT CCA ACC CCA CCC ACC CGG GAG CCC
 AAG 672
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220

50 AAG GTG GCA GTG GTG CGT ACT CCA CCC AAG TCG CTG TCT TCC GCC
 AAG 720
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

55 AGC CGC CTG CAG ACA GCC CCC GTG CCC ATG CCA GAC CTG AAG AAT
 GGC 768

ES 2 346 284 T3

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

5 AAG TCC AAG ATC GGC TCC ACT GAG AAC CTG AAG CAC CAG CCG GGA
 GGC 816

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 262 265 270

10 GGG AAG GTG CAG ATA ATT AAT AAG AAG CTG GAT CTT AGC AAC GTC
 CAG 864

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

15 TCC AAG TGT GGC TCA AAG GAT AAT ATC AAA CAG GTC CCG GGA GGC
 GGC 912

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

20 AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AGC AAG GTG ACC
 TCC 960

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

25 AAG TGT GGC TCA TTA GGC AAC ATC CAT CAT AAA CCA GGA GGT GGC
 CAG 1008

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

30 GTG GAA GTA AAA TCT GAG AAG CTT GAC TTC AAG GAC AGA GTC CAG
 TCG 1056

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

35 AAG ATT GGG TCC CTG GAC AAT ATC ACC CAC GTC CCT GGC GGA GGA
 AAT 1104

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

40 AAA AAG ATT GAA ACC CAC AAG CTG ACC GTC CGC GAG AAC GCC AAA
 GCC 1152

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

45 AAG ACA GAC CAC GGG GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG GTG
 TCT 1200

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

50 GGG GAC ACG TCT CCA CGG CAT CTC AGC AAT GTC TCC TCC ACC GGC
 AGC 1248

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415

65

ES 2 346 284 T3

ATT GAC ATG GTA GAC TCG CCC CAG CTC GCC ACG CTA GCT GAC GAG
GGG 1296

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

TCT GCC TCC CTG GCC AAG CAG GGT TTG TGA 1326
Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu *

435 440

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 442 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 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 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

ES 2 346 284 T3

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
 5 145 150 155 160

 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175
 10
 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
 15 195 200 205

 Arg Ser arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 20
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Leu Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240

 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Gly
 245 250 255
 25
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 30
 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 Gln Val Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 35
 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
 45
 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
 50
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Val Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 55
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400

 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 60
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Gly
 420 425 430
 65
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu *
 435 440

ES 2 346 284 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 291 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 6:

```
ATCAAACACG      TCCCGGGAGG      CGGCAGTGTG      CAAATAGTCT
ACAAACCAGT TGACCTGAGC      60
AAGGTGACCT      CCAAGTGTGG      CTCATTAGGC      AACATCCATA
AACCAGGAGG TGGCCAGGTG      120
GAAGTAAAAT      CTGAGAAGCT      TGACTIONCAAG      GACAGAGTCC
AGTCGAAGAT TGGGTCCCTG      180
GACAATATCA      CCCACGTCCC      TGGCGGAGGA      AATAAAAAGA
TTGAAACCCA CAAGCTGACC      240
TTCCGCGAGA      ACGCCAAAGC      CAAGACAGAC      CACGGGGCGG
AGTGAGAATT C          291
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 7:

```
GCCCGGGCCC CATAGATCAA ACACGTCCCG GGAGGCGGCA
GTGTGCAA      48
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 8:

```
AGATTACAGA ATTCTCACTC CGCCCCGTGG TCTGTCTTGG
CTTTGGC      47
```

ES 2 346 284 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 140 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 9:

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

His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
 20 25 30

Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 35 40 45

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
 50 55 60

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
65 70 75 80

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
 85 90 95

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
 100 105 110

Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 115 120 125

Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu
 130 135 140

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. Nº: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 140 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE HEBRA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. Nº: 10:

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

Tyr Gln Pro Lys Gly Gly Gln Val Arg Ile Leu Asn Lys Lys Ile Asp

ES 2 346 284 T3

20 25 30

5 Phe Ser Lys Val Gln Ser Arg Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
 35 40 45

 Ser Ala Gly Gly Gly Asn Val Gln Ile Val Thr Lys Lys Ile Asp Leu
 50 55 60

10 Ser His Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Lys Asn Ile Arg His Arg
65 70 75 80

15 Pro Gly Gly Gly Arg Val Lys Ile Glu Ser Val Lys Leu Asp Phe Lys
 85 90 95

 Glu Lys Val Gln Ala Lys Val Gly Ser Leu Asp Asn Ala His His Val
 100 105 110

20 Pro Gly Gly Gly Asn Val Lys Ile Asp Ser Gln Lys Leu Asn Phe Arg
 115 120 125

25 Glu His Ala Lys Ala Arg Val Asp His Gly Ala Glu
 130 135 140

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N°: 11:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 35 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 11:
 CGCGACGCGT ATGATCAAAC ACGTCCCGGG AGGC

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ. ID. N°: 12:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 50 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ. ID. N°: 12:
 CGGCTTTGTC TGGTGCCCCG CCTCACTCCT AGGGCGC
- 60
- 65