

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 590**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2021 PCT/EP2021/069138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2022 WO22008712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2021 E 21742115 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 4179320**

54 Título: **Sistema**

30 Prioridad:  
**10.07.2020 GB 202010620**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.11.2024**

73 Titular/es:  
**GTINVENT LIMITED (100.0%)  
395 King Street  
Aberdeen Scotland AB24 5RP, GB**

72 Inventor/es:  
**POLLACK, SASKIA, JULIE;  
MARSHALL, KAREN, ELIZABETH;  
SERPELL, LOUISE, CHARLOTTE;  
WISCHIK, CLAUDE, MICHEL y  
HARRINGTON, CHARLES, ROBERT**

74 Agente/Representante:  
**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 988 590 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

## Sistema

5 La presente invención proporciona un sistema para el estudio de la agregación de proteína tau en células neuronales *in vitro* que se puede utilizar para cribar agentes de eficacia terapéutica frente a agregados de proteína tau o fragmentos de la misma.

10 El ensamblaje de la proteína tau en filamentos helicoidales apareados (PHF) y filamentos rectos como agregados es una característica clave de la enfermedad de Alzheimer (AD). La agregación de tau se ha implicado en la neurodegeneración, la toxicidad celular y la propagación que acompaña a la progresión de la enfermedad. El plegamiento incorrecto, el autoensamblaje y la acumulación de proteína tau en los ovillos es una característica patológica importante compartida por las tauopatías, la más común de las cuales es la enfermedad de Alzheimer (AD). En condiciones patológicas, la agregación anormal de la proteína tau en filamentos helicoidales (PHF) en ovillos neurofibrilares (NFT) va acompañada de pérdida de la función de la proteína tau y disfunción neuronal.

15 Se ha demostrado que la tau exhibe un comportamiento similar al de los priones, incluyendo absorción celular y siembra en plantilla. Los estudios *In vitro* han demostrado que los agregados extracelulares de tau pueden ser internalizados por las neuronas para inducir el autoensamblaje de tau endógena intracelular, que se puede liberar y transferir después a neuronas vecinas o conectadas sinápticamente. En líneas celulares cultivadas, se pueden observar agregados internalizados de tau recombinante inducidos mediante heparina o agregados de tau derivados del cerebro de AD en compartimentos endosomales y estos son capaces de reclutar tau endógena y propenso a la agregación para agregar. Un hallazgo consistente en estos estudios es la colocalización de tau con endosomas y lisosomas.

20 Si bien existe un fuerte apoyo para la transmisión de agregados de tau entre neuronas y/o células gliales, se ha debatido la especie responsable de esto. Los estudios han sugerido que la competencia de siembra de tau depende del tamaño y la conformación del agregado de tau y que los oligómeros de tau actúan como especies clave para inducir la propagación en lugar de los monómeros o fibrillas más largas purificadas de ratones rTg4510. En un estudio se ha presentado que los grandes agregados de tau (>1 0meros) son las especies competentes para la semilla en ratones transgénicos P301 S tau, mientras que en otro estudio se descubrió que los trímeros de tau son la unidad mínima necesaria para la siembra conformacional y la agregación intracelular de tau en células HEK-293 humanas que expresan tau.

25 Muchos estudios han utilizado modelos animales o celulares en los que se ha sobreexpresado tau humano y/o mutante. Los estudios *in vitro* han utilizado proteínas tau de longitud completa o truncadas que requieren fibrilización inducida por heparina. Ambos enfoques tienen como objetivo superar la baja propensión a la agregación y la falta de citotoxicidad de la tau de longitud completa. Sin embargo, cada vez hay más dudas sobre la relevancia fisiológica de filamentos de tau inducidos por heparina, ya que no se autoensamblan y no reproducen las características estructurales clave de los filamentos de AD. El fragmento truncado de dominio repetido que abarca los residuos 297-391 (denominado dGAE (véase Despres et al ACS Chem. Biol., vol. 14, nº 6, págs. 1363-1379, (2019); Zhang et al Elife, vol. 8, p. e43584, (2019); Wischik et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 85, nº 12, págs. 4506-4510, (1988)) que se identificó bioquímicamente por primera vez en preparaciones de núcleo de PHF proteolíticamente estables a partir de tejidos cerebrales de AD, se superpone con la secuencia central (306-378) caracterizada por microscopía crioelectrónica por formar subunidades en forma de C ensambladas para formar una estructura combinada de hélice cruzada beta/beta. No se entiende qué inicia el proceso de agregación de tau en la EA, pero la dGAE truncada sirve para la agregación dirigida por plantillas de tau en modelos exentos de células y celulares (Harrington et al. J. Biol. Chem., vol. 290, nº 17, págs. 10862-10875, 2015), Wischik et al Proc Natl Acad Sci USA, vol. 93, nº 20, págs. 11213-11218 (1996)), y en ratones transgénicos (Melis et al. Cell. Mol. Life Sci., vol. 72, nº 11, págs. 2199-2222, (2015)). La región dGAE de tau (297-391) se ensambla espontáneamente en condiciones fisiológicas para formar filamentos similares a PHF *in vitro* en ausencia de aditivos como heparina.

30 Estudios previos que investigan las propiedades de tau aplicada por vía exógena en modelos celulares de cultivo tisular se han visto obstaculizados por el uso de modelos no neuronales o neuronales *in vitro* que sobreexpresan tau mutante o de tipo salvaje humano, a menudo utilizando fragmentos no fisiológicos o preparaciones de tau para iniciar la agregación (Falcon et al., J. Biol. Chem., vol. 290, nº 2, págs. 1049-1065, (2015); J. L. Guo and V. M. Y. Lee, J. Biol. Chem., vol. 286, nº 17, págs. 15317-15331 (2011); y Kfoury et al., J. Biol. Chem., vol. 287, nº 23, págs. 19440-19451, (2012)).

35 También se ha informado de que la tau de longitud completa y agregados de tau con diferentes estados de fosforilación tienen efectos mínimos sobre la viabilidad celular (Kumar et al., J. Biol. Chem., vol. 289, nº 29, págs. 20318-20332, (2014); Tepper et al., J. Biol. Chem., vol. 289, nº 49, págs. 34389-34407, (2014) and Kaniyappan et al., Alzheimer's Dement., vol. 13, nº 11, págs. 1270-1291, (2017)). Por ejemplo, se ha observado que los oligómeros formados a partir de una variante del fragmento tau repetido (correspondiente a tau244-372 con una delección Lys-280; Tau<sup>RDAK</sup>) son selectivamente tóxicos para espinas dendríticas sin afectar la viabilidad celular (Kaniyappan et al., Alzheimer's Dement., vol. 13, nº 11, págs. 1270-1291, (2017)).

Otros estudios han demostrado también que la toxicidad es dependiente de los fragmentos precisos de tau que se utilizan (Flach et al., J. Biol. Chem., vol. 287, nº 52, págs. 43223-43233, (2012); Lasagna-Reeves et al., Biochemistry, vol. 49, nº 47, págs. 10039-10041, (2010); y Lasagna-Reeves et al., Mol. Neurodegener., vol. 6, nº 1, p. 39, (2011)). La variación en los ensayos de toxicidad por tau se puede relacionar en parte con las diferencias en fragmentos de tau utilizados y en sus métodos de preparación.

La identificación de los inhibidores de la agregación de Tau se describe en los documentos WO 1996/030766 y WO 2002/055720. El cribado de inhibidores de filamentos helicoidales pareados de Tau se describe en el documento WO 2001/018546. Los cribados de alto rendimiento para uso en la identificación de inhibidores de la agregación de Tau se han revisado en Bulic et al (J. Med. Chem. Vol. 56, págs. 4135-4155 (2013)). Liu et al (Pharm. Pat. Anal. Vol.3 págs. 429-447 (2014)) también informan sobre varios enfoques de objetivo de Tau que utilizan varios mecanismos diferentes distintos de los inhibidores de agregación de Tau. El desarrollo clínico de los compuestos identificados se analiza en Panza et al (BioMed Research Int., Vol. 216, Article ID 3245935, (2016)). A pesar de estos informes, ninguno de los inhibidores descritos aparte de azul de metileno (MB) o LMT ((bis-hidrometanosulfonato de leuco-metiltioninio, LMTM; también conocido como LMT-X o TRx0237) han progresado a ensayos clínicos completos de fase III (Panza et al (BioMed Research Int., Vol. 216, Article ID 3245935, (2016)).

El novedoso sistema descrito en el presente documento permite estudiar *in vitro* los mecanismos moleculares de propagación de la patología de agregación de tau de una manera más fisiológica con vistas al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos. El nuevo sistema modelo descrito en el presente documento permite la investigación de la internalización, la citotoxicidad y el efecto sobre la tau endógena de la región que forma PHF de tau en células neuronales humanas en ausencia de sobreexpresión de tau mutante o factores de siembra exógenos.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la citotoxicidad de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma a una célula neuronal que comprende los pasos de:

- (a) cultivo de la célula neuronal en presencia del agente y posteriormente cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina; o
- (b) cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina y posteriormente el cultivo de la célula neuronal en presencia del agente; y
- (c) determinación de la citotoxicidad del fragmento de proteína Tau para la célula neuronal después de realizar el paso (a) o el paso (b).

El método de la invención se lleva a cabo adecuadamente *in vitro* en una población de células neuronales. Los métodos de la invención son, por lo tanto, métodos *ex vivo* para el cribado de agentes con una actividad deseada contra agregados de proteína tau o un fragmento de la misma.

La célula neuronal puede cultivarse en presencia del agente y después cultivarse adicionalmente en presencia del fragmento de proteína Tau. Alternativamente, la célula neuronal puede cultivarse en presencia del fragmento de proteína Tau y después cultivarse en presencia del agente.

Los fragmentos de proteína Tau como se han definido anteriormente se agregan de manera adecuada para formar estructuras autoensambladas, como oligómeros y/o filamentos. Los fragmentos de proteína Tau pueden tener una conformación de bobina predominantemente aleatoria y/o estas formados por formas monoméricas y dimericas solubles. Los agregados de proteína tau o un fragmento de la misma como se describen en el presente documento pueden ser cualquier forma adecuada de proteína tau. Adecuadamente, la proteína tau es una forma recombinante de proteína tau. Tales fragmentos de proteína Tau también se pueden denominar agregados de tau. Los fragmentos de proteína Tau pueden estar presentes en una preparación purificada en la que los contaminantes (fragmentos de péptidos más cortos) se eliminan de la preparación.

Los fragmentos de proteína Tau como se describen en el presente documento son capaces de autoagregarse sin fosforilación. Los fragmentos de proteína Tau descritos en el presente documento se coagregan con proteína Tau endógena. Tras la coagregación, los fragmentos de proteína Tau descritos en el presente documento y la proteína Tau endógena se acumulan conjuntamente dentro de compartimentos endosomales y/o lisosomales dentro de una célula neuronal.

Los fragmentos de proteína Tau que comprenden al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma comprenden adecuadamente una secuencia contigua de al menos 70 aminoácidos del aminoácido de SEQ ID NO: 4.

## ES 2 988 590 T3

Los fragmentos de proteína Tau como se definen anteriormente para uso según la invención pueden ser de 70 a 97 aminoácidos de longitud, opcionalmente de 71 a 97 aminoácidos de longitud. El fragmento de proteína Tau como se define anteriormente se puede seleccionar adecuadamente a partir del grupo de fragmentos de 71, 73, 94, 95, 97 aminoácidos de longitud.

Por lo tanto, el fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma se puede seleccionar a partir del grupo formado por fragmentos de proteína Tau con secuencias de aminoácidos como se describen en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma.

dGAE95 se refiere al fragmento de 95 residuos de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Ile-297 y extremo C terminal en el residuo Glu-391, como se describe en SEQ ID NO: 4 o en posiciones homólogas en otras especies (los residuos mencionados se refieren a la secuencia Tau humana o de ratón que son idénticas en esta región).

Por lo tanto, los fragmentos de proteína Tau utilizados según la invención incluyen también los fragmentos de dGAE97 (dGAE97 se refiere al fragmento de 97 residuos de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Asp-295 y extremo C terminal en el residuo Glu-391, como se describe en SEQ ID NO: 3 o en posiciones homólogas en otras especies), dGA ("dGA" se refiere al fragmento de 94 residuos de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Ile-297 y extremo C terminal en el residuo Ala-390, como se describe en SEQ ID NO: 5 o en posiciones homólogas en otras especies), dGAE73 (dGAE73 se refiere al fragmento de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Val-306 y extremo C terminal en el residuo Phe-378, como se describe en SEQ ID NO: 6 o en posiciones homólogas en otras especies) y la secuencia de aminoácidos de los residuos 308 a 378 de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Ile-308 y extremo C terminal en el residuo Phe-378, como se describe en SEQ ID NO: 7 o en posiciones homólogas en otras especies.

Todos los números de residuos de la secuencia y estructura de la proteína Tau en la presente divulgación se refieren a los residuos de SEQ ID NO:1, que es la secuencia de la isoforma de cuatro repeticiones 2N4R de proteína Tau humana (Uniprot ID P10636-8) o posiciones homólogas en otras especies o variantes de las mismas. La isoforma humana Tau 2N4R (Uniprot ID P10636-8) corresponde a aminoácidos 1-124, 376-394 y 461-758 de Tau de longitud completa, Uniprot ID P10636 o P10636-1, proporcionados como SEQ ID NO:2. SEQ ID NO: 2 se refiere a una forma más larga de Tau que se encuentra en el sistema nervioso periférico (PNS) pero no en el sistema nervioso central (CNS). Tal como se utiliza en el presente documento, las referencias a tau de "longitud completa" se refieren a SEQ ID NO: 1 (la secuencia relevante para el CNS) y no a SEQ ID NO: 2 (que no es relevante en el CNS).

SEQ ID NO: 1 (isoforma Tau-F, también conocida como Tau-4, 2N4R, 441 aminoácidos):

```
>sp|P10636-8:TAU_HUMAN Isoforma Tau-F de proteína tau asociada a microtúbulos OS = Homo sapiens OX=9606 GN=MAPT
MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDKQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTFIEDGSEEPG
SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIEFGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
HVTQARMVSKSKDGTGSDDEKAKGADGKTKIATPPGAAPPQKQGANATRIPAKIFPAPK
TPPSSGGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSPSTPSLPTFPFIREPKKVAVVRTPPKSPSSAK
SRLQTAIVVMPDLRNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVOIINKKLDLSNVQSKCGSRDNIRHV
PGGGSVQIVYKPVDSLKSVTSKCGSLGNIHEKPGGGQVEVKSEKLDLDFKDRVQSKIGSLDNI
THVPGGGNKKIETHKLIIFRENAKAKTDRGAEIVYKSPVYSGDTSERHLNSVSSSTGSDMV
DSEQLATLADEVSAASLAKQGL
```

SEQ ID NO: 2 (Tau humana de longitud completa, isoforma PNS-Tau, 758 aminoácidos);

## ES 2 988 590 T3

>sp|P10636-1|TAU\_HUMAN Proteina tau asociada a microtúbulos OS = Homo sapiens OX = 9606

GN=MAPT FE=1 SV=5

```
MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGGTDAGLKESPLQTFTEGSEEPG
SETSDAKSTPTAEDVTAFLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPGLEDEAAG
HVTQEPESGKVVQEGFLREPGPPGLSHQLMSGMPGAPLLPEGPREATRQPSGGGPEDETEG
GRHAPPELLKHQLLDLHQQEGPPLKAGGSKERPGSKKEVDEDRDVEDSSPQDSPPSKASPA
QDGRPPQTAAREATSIPGFPAEGAIPLPVDFLSKVSTEIPASEPDGSPVGRAKGQDAPLE
FTFHVEITFNVQKEQAHSEHNLGRAAFPGAPGEGPEARGPSLGEDTKEADLPEPSEKQPA
AAPRGKPVSRVPEQLKARKVSKSKDGTGSDDKKAKTSTRSSAKTLKNNRCLSPKHEFTFGSS
DPLIQPSSFAVCFEPFSSPKYVSSVTSTRGSSGAKEMKLGADGKTKIATPRGAAPFGQK
GQANATRIFAKTFPAKTFPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTEGSRRTFSLPTFPPTREF
KKVAVVRIKPKSPSAKSRLQTAPEVMPDLKNVSKIGSTENLKEQPGGGKVQIINKKLD
LSNVQSKCGSKDNKHKVPGGGSVQIVYKPVVLSKVTSSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEK
LDFKDFVQSKIGSLDNITHVEGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQGT
SPRHLSNVSSSTGSEDMVDSPLAFLADEVSASLAKQGL
```

5 dGAE97 se refiere al fragmento de 97 residuos de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Asp-295 y extremo C terminal en el residuo Glu-391, como se describe en SEQ ID NO: 3 o en posiciones homólogas en otras especies (los residuos mencionados se refieren a la secuencia Tau humana o de ratón que son idénticas en esta región). Como será evidente para la persona experta, dGAE97 también corresponde al fragmento de la isoforma PNS-Tau (P10636-1) con N-ter en Asp-612 y C-ter en Glu-708.

10 SEQ ID NO: 3 (dGAE97, humano/ratón, 97 aminoácidos):

10 DNIKHVPGGGSVQIVYKPVVLSKVTSSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDFKDRVQSKIGSLDNI  
THVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAE

15 dGAE95 se refiere al fragmento de 95 residuos de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Ile-297 y extremo C terminal en el residuo Glu-391, como se describe en SEQ ID NO: 4 o en posiciones homólogas en otras especies (los residuos mencionados se refieren a la secuencia Tau humana o de ratón que son idénticas en esta región). Como será evidente para la persona experta, dGAE95 también corresponde al fragmento de la isoforma PNS-Tau (P10636-1) con N-ter en Ile-614 y C-ter en Glu-708. Esta secuencia se puede denominar a veces simplemente "dGAE". Los residuos 297 a 391 de Tau (2N4R) también son conocidos como el fragmento predominante aislado a partir del núcleo proteolíticamente estable del filamento helicoidal apareado (PHF).

20 SEQ ID NO: 4 (dGAE95 o "dGAE", humano/ratón, 95 aminoácidos):

20 IKHVPGGGSVQIVYKPVVLSKVTSSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDFKDRVQSKIGSLDNITH  
VPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAE

25 La región dGAE de tau (297-391) se ensambla espontáneamente en condiciones fisiológicas para formar filamentos similares a PHF *in vitro* en ausencia de aditivos como heparina.

"dGA" se refiere al fragmento de 94 residuos de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Ile-297 y extremo C terminal en el residuo Ala-390, como se describe en SEQ ID NO: 5 o en posiciones homólogas en otras especies (los residuos mencionados se refieren a la secuencia Tau humana o de ratón que son idénticas en esta región).

30 SEQ ID NO: 5 (dGA, humano/ratón, 94 aminoácidos):

30 IKHVPGGGSVQIVYKPVVLSKVTSSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDFKDRVQSKIGSLDNITH  
VPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAE

35 dGAE73 se refiere al fragmento de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Val-306 y extremo C terminal en el residuo Phe-378, como se describe en SEQ ID NO: 6 o en posiciones homólogas en otras especies (los residuos mencionados se refieren a la secuencia Tau humana o de ratón que son idénticas en esta región). Este fragmento corresponde a los residuos 306-378 de la secuencia identificada por crio-EM como el núcleo de los PHF aislados del tejido cerebral de AD (Fitzpatrick et al, 2017; Nature). El núcleo se puede extender más allá de estos residuos pero está limitado por la resolución de la crio-EM. Como será evidente para la persona experta, dGAE73 también corresponde al fragmento de la isoforma PNS-Tau (P10636-1) con N-ter en Val-623 y C-ter en Phe-695.

## ES 2 988 590 T3

SEQ ID NO: 6 (dGAE73. humano/ratón, 73 aminoácidos):

VQIVYKPVDLISKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKI  
ETHKLTf

5 Un fragmento adicional del núcleo de PHF corresponde a los residuos 308 a 378 de Tau (2N4R) con extremo N terminal en el residuo Ile-308 y extremo C terminal en el residuo Phe-378, como se describe en SEQ ID NO: 7 o en posiciones homólogas en otras especies (los residuos mencionados se refieren a la secuencia Tau humana o de ratón que son idénticas en esta región).

SEQ ID NO: 7 (residuos 308 a 378 de 2N4R, humano/ratón, 71 aminoácidos):

IVYKPVDLISKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET  
HKLTF

10 Una forma preferida de la proteína tau es el fragmento dGAE de la proteína tau, correspondiente a los residuos de aminoácidos 297-391 (utilizando la numeración de 2N4R tau), adecuadamente la forma recombinante de los mismos, según SEQ ID NO: 4. Después de la purificación, dGAE existe en una conformación de bobina predominantemente aleatoria y consiste principalmente en formas solubles de monómero y dímero de dGAE.

15 Los fragmentos de Tau que se pueden utilizar según un método de la presente invención son fragmentos que comprenden al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma. Opcionalmente, la secuencia puede tener 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la misma.

20 Por lo tanto, tales secuencias se definen como poseedoras de un cierto porcentaje de identidad secuencial con una o más secuencias (con referencia a SEQ ID Nos) como se describe en el presente documento. La identidad secuencial se puede evaluar mediante cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de identidad secuencial entre secuencias, son útiles programas informáticos que realizan alineamientos de secuencias por pares o múltiples, por ejemplo se pueden utilizar EMBOSS Needle o EMBOSS stretcher (ambos Rice, P. et al., Trends Genet., 16, (6) págs. 276-277, 2000) para alineamientos de secuencias por pares, mientras que se puede utilizar Clustal Omega (Sievers F et al., Mol. Syst. Biol. 7:539, 2011) o MUSCLE (Edgar, R.C., Nucleic Acids Res. 32(5):1792-1797, 2004) para alineamientos de secuencias múltiples, aunque se puede utilizar cualquier otro programa apropiado. Ya sea que el alineamiento sea por pares o múltiple, se debe realizar globalmente (es decir, a través de la totalidad de la secuencia de referencia) en lugar de localmente.

30 Los alineamientos y los cálculos de identidad porcentual (%) se pueden determinar utilizando, por ejemplo, parámetros estándar de Clustal Omega: matriz Gonnet, penalización por abertura de hueco 6, penalización por extensión de hueco 1. Alternativamente, se pueden utilizar los parámetros estándar EMBOSS Needle: matriz BLOSUM62, penalización por apertura de hueco 10, penalización por extensión de hueco 0,5. Alternativamente se puede utilizar cualquier otro parámetro adecuado.

35 A efectos de esta solicitud, cuando haya una disputa entre valores de identidad secuencial obtenidos mediante métodos diferentes, se considerará válido el valor obtenido mediante alineamiento por pares global utilizando EMBOSS Needle con parámetros predeterminados.

40 Para uso en el método de la invención, los agregados de proteína tau o un fragmento de proteína Tau (agregados de proteína tau) se pueden diluir adecuadamente en una disolución tampón fisiológica, por ejemplo un tampón fosfato (pH fisiológico, adecuadamente pH 7,4, por ejemplo una disolución tamponada con fosfato) e incubar a temperatura fisiológica (adecuadamente a 37°C), adecuadamente con agitación antes de la administración a la célula neuronal. Las formas adecuadas de disolución salina tamponada con fosfato pueden comprender disoluciones acuosas de hidrogenofosfato de sodio y cloruro de sodio o cloruro de potasio y dihidrogenofosfato de potasio. La agitación puede ser de 500 rpm a 1000 rpm, por ejemplo 700 rpm. La agitación puede ser de 24 horas a 96 horas, por ejemplo 24, horas, 36, horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas o 96 horas.

50 Por lo tanto, en un ejemplo, una preparación adecuada de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma para uso en un método de la invención se puede preparar mediante dilución de proteína 100 µM en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) e incubar a 37°C adecuadamente con agitación, por ejemplo, agitando a una velocidad de 700 rpm durante un máximo de 72 horas antes de la administración a la célula neuronal.

55 La célula neuronal puede expresar adecuadamente la forma endógena de proteína Tau. Por ejemplo, la línea celular SH-SY5Y expresa la proteína Tau humana endógena. Por lo tanto la célula neuronal no se transfecta para expresar una proteína Tau.

60 La célula neuronal puede proceder de una línea celular neuronal, por ejemplo una línea celular de neuroblastoma, por ejemplo la línea celular SH-SY5Y. Las células pueden ser indiferenciadas y posteriormente diferenciadas en cultivo en presencia de un factor de crecimiento apropiado, por ejemplo ácido retinoico. Por lo tanto, los métodos

de la invención pueden utilizar una célula neuronal indiferenciada, por ejemplo SH-SY5Y indiferenciada. Adecuadamente, la célula neuronal es una célula neuronal diferenciada, por ejemplo SH-SY5Y diferenciada (dSH-SY5Y). Cuando las células son un tipo de célula indiferenciada, los métodos de la invención pueden incluir, por lo tanto, una etapa previa inicial en la que las células indiferenciadas se diferencian en cultivo en presencia de un factor de crecimiento. El factor de crecimiento puede ser ácido retinoico.

Adecuadamente, las células de la línea celular neuronal se pueden suministrar en un medio de cultivo, por ejemplo un medio de cultivo con bajo contenido en suero o sin suero, por ejemplo un medio de crecimiento DMEM; o disolución salina tamponada con fosfato, opcionalmente suplementada con factores de diferenciación y/o factores de crecimiento. Las células neuronales se pueden cultivar en tales medios según la presente invención.

Las células indiferenciadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y se pueden cultivar en cualquier medio de crecimiento generalmente adecuado, por ejemplo medio modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12) suplementada con 10 % de suero fetal de ternero (FCS), 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S) y 1 % de L-glutamina. Para la diferenciación, las células SH-SY5Y se pueden sembrar en placa a una densidad, por ejemplo, de 25.000 a 30.000 cm<sup>2</sup>, opcionalmente 50.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos o 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. El primer día de diferenciación, los medios se pueden sustituir adecuadamente por medios de cultivo de bajo contenido en suero (DMEM/F-12 que contiene 1 % de suero fetal de ternero (FCS), 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S) y 1 % de L-glutamina) que contiene ácido retinoico (RA) todo trans 10 µM (Sigma-Aldrich) y las células se pueden incubar durante 48 horas. El día 3 se puede repetir este proceso con RA fresco e incubar las células durante 48 horas más. El día 5, las células se pueden lavar una vez en un medio de cultivo sin suero para eliminar los restos de suero. Se puede añadir a las células medios de cultivo exentos de suero (DMEM/F-12 que contiene 1 % de P/S y 1 % de L-glutamina) que contienen 50 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (STEMCELL Technologies) e incubar durante 48 horas. Las células diferenciadas (dSH-SY5Y) están listas para uso para experimentos el día 7.

La incubación de la célula neuronal con el agente puede ser de hasta 12 horas a 72 horas, por ejemplo 12 horas, 16 horas, 20 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas o 72 horas.

Los agregados de proteína tau o un fragmento de la misma se pueden administrar a las células (sembradas en placas a una densidad de 50,000-300,000 por pocillo en una placa de 24 o 6 pocillos respectivamente) o 25.000-30.000/cm<sup>2</sup> a una concentración de 0,01µM a 100µM, por ejemplo a 1 µM, 5 µM o 10 µM.

Adecuadamente, el cultivo de la célula neuronal con el agente se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para permitir que el agente sea internalizado por la célula neuronal, por ejemplo 1-24 horas, 1 a 36 horas o 1 a 48 horas.

La administración de agregados de proteína tau o de un fragmento de la misma en el paso neuronal se lleva a cabo en condiciones que permiten que los agregados de la proteína tau o un fragmento de la misma sean internalizados por la célula neuronal, como por ejemplo de 24 a 48 horas.

La citotoxicidad con respecto a las células neuronales utilizadas según la presente invención se puede definir como porcentaje de supervivencia de células en un cultivo, incluyendo la medición del estrés oxidativo relativo, el reclutamiento endógeno de tau, el daño lisosoma/mitocondrial en las células neuronales, etc.

Una reducción de la toxicidad puede estar determinada por la viabilidad celular, la morfología celular o la distribución citoesquelética de la proteína Tau en una célula neuronal.

Como se describe en el presente documento, el agente cribado se puede añadir a la célula neuronal en un punto de tiempo diferente en relación con la administración del fragmento de proteína Tau a la célula neuronal, es decir, antes de la administración del fragmento de proteína Tau o después de la administración del fragmento de proteína Tau.

Por lo tanto, los métodos de la invención se pueden utilizar para evaluar si un agente que se está probando es capaz de prevenir o reducir la citotoxicidad del fragmento de proteína Tau como se define anteriormente. Una reducción en la citotoxicidad del fragmento de proteína Tau se puede mostrar en la reducción del porcentaje de muerte celular en un cultivo de células neuronales cultivadas con un fragmento de proteína Tau como se define anteriormente en presencia de un agente en comparación con el porcentaje de muerte celular en un cultivo de células neuronales cultivadas con un fragmento de proteína Tau como se define anteriormente en ausencia del agente.

Adecuadamente, la determinación de la inhibición de la citotoxicidad en el paso (c) puede incluir una comparación con un valor de control para la célula neuronal cuando la célula neuronal se incubaba con agregados de proteína tau o un fragmento de la misma en ausencia del agente a probar. La determinación de la citotoxicidad se puede expresar como porcentaje de células tratadas con control (células neuronales incubadas con un fragmento de proteína Tau como se define anteriormente en ausencia del agente). También se puede establecer un nivel de referencia para la toxicidad del fragmento de proteína Tau como se define anteriormente con referencia a células

tratadas con tampón, que proporcionará el nivel de toxicidad absoluta para la concentración del fragmento de proteína Tau como se define anteriormente utilizado en cualquier ensayo dado.

5 Un método adecuado para establecer si el resultado de un ensayo mostraba que un agente era capaz de prevenir o reducir la citotoxicidad sería mediante una prueba estadística, es decir, una prueba estadística para examinar el significado de las diferencias (por ejemplo prueba T no apareada). Por lo tanto, la reducción puede ser una reducción estadísticamente significativa de la citotoxicidad. Por ejemplo, un fragmento citotóxico de proteína Tau puede dar lugar al 40 %-60 % de muerte celular en un cultivo de células neuronales en comparación con un valor de control del 20 % de muerte celular para un cultivo de células neuronales en un medio de cultivo de control, por ejemplo un medio de cultivo de bajo contenido en suero o exento de suero, por ejemplo medio de crecimiento DMEM; o disolución salina tamponada con fosfato.

15 El ensayo de citotoxicidad según un método de la invención puede estar normalizado adecuadamente a los resultados obtenidos para células tratadas sin agente o con vehículo de tratamiento. Los compuestos que exhiben 50 % de inhibición con agente a una concentración adecuada de alrededor de 2  $\mu$ M o menos se pueden considerar inhibidores activos de citotoxicidad. Por lo tanto, la actividad relativa también puede compararse para diferentes agentes, también según un método de la invención, como se describe en el presente documento.

20 La citotoxicidad de cualquier sustancia se puede probar mediante un ensayo de viabilidad celular. El ensayo de viabilidad celular se puede realizar utilizando cualquier método generalmente adecuado, como por ejemplo (i) un ensayo fluorométrico; (ii) un ensayo colorimétrico; (iii) un ensayo luminométrico; o (iv) un ensayo de exclusión de colorantes.

25 Los ensayos fluorométricos para la citotoxicidad incluyen: kit de generación de imágenes de viabilidad celular ReadyProbes® (Life Technologies), resazurina, alamarBlue assay o ensayo CFDA-AM. Los ensayos colorimétricos para la citotoxicidad incluyen: ensayo MTT, ensayo MTS, ensayo XTT, ensayo WST-1, ensayo WST-8, ensayo LDH, ensayo SRB, ensayo NRU o ensayo de violeta cristal. Los ensayos luminométricos para la citotoxicidad incluyen: ensayo ATP o ensayo de viabilidad en tiempo real. Los ensayos de exclusión de colorantes para la citotoxicidad incluyen: TUNEL, caspasa-3, azul de tripano, eosina, rojo Congo, eritrosina B.

30 Los ensayos fluorométricos de viabilidad celular o citotoxicidad son fáciles de realizar con el uso de un microscopio de fluorescencia, fluorómetro, lector de microplacas de fluorescencia o citómetro de flujo, y ofrecen muchas ventajas sobre la exclusión de colorantes y los ensayos colorimétricos tradicionales. Los ensayos fluorométricos también son aplicables para líneas celulares adherentes o suspendidas y son fáciles de usar. Por lo tanto, en la evaluación del efecto de un agente de interés sobre la citotoxicidad de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma sobre células neuronales según un método de la invención puede ser preferente un ensayo fluorométrico.

35 Tal enfoque que utiliza un enfoque fluorométrico puede utilizar adecuadamente un enfoque de fluorescencia diferencial. Tras la adición de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma a una población de células neuronales, por ejemplo dGAE, la viabilidad celular se puede medir utilizando el kit de imágenes de viabilidad celular ReadyProbes® (Life Technologies). El kit contiene un reactivo NucBlue® que se puede utilizar para etiquetar todas las células (azul) y un reactivo NucGreen® para etiquetar solo células muertas (verde). Para agregados de proteína tau marcados o un fragmento de la misma, por ejemplo se puede utilizar el reactivo dGAE, NucRed® para etiquetar células muertas (rojo).

40 Las células neuronales se pueden incubar adecuadamente con los reactivos a 37°C durante 15 minutos. La fluorescencia DAPI se puede capturar utilizando un filtro de excitación G 365 y un filtro de emisión LP 420 con un dicroico FT 395. La fluorescencia verde se puede capturar utilizando un juego de filtros FITC (filtro de excitación BP 450-490, filtro de emisión BP 515-565 y dicroico FT 510).

45 La proporción de muerte celular tratada con tampón se puede cuantificar mediante conversión de las imágenes a escala de grises, seguida de ajuste manual del umbral y conversión del mismo en una imagen binaria para resaltar las células vivas teñidas con DAPI. El número de células se puede contar automáticamente. Las células muertas se pueden contar de la misma manera y la muerte celular se puede expresar como un porcentaje de células tratadas con tampón.

50 La clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) también se puede utilizar para mediciones masivas de la intensidad de fluorescencia. La cuantificación de fragmentos no etiquetados internalizados de proteína Tau se puede determinar utilizando inmunofluorescencia. Alternativamente, los fragmentos no marcados de proteína Tau se pueden medir mediante tinción con tioflavina S (TsS) o similar.

55 Un ensayo colorimétrico mide un marcador bioquímico para evaluar la actividad metabólica de una célula. Los reactivos utilizados en ensayos colorimétricos desarrollan un color en la respuesta a la viabilidad de las células, lo que permite la medición colorimétrica de la viabilidad celular a través del espectrofotómetro. Los ensayos colorimétricos son aplicables para líneas celulares adherentes o suspendidas.

Los ensayos luminométricos proporcionan una determinación rápida y sencilla de la proliferación celular y la citotoxicidad en células de mamíferos. Estos ensayos se pueden realizar en un formato conveniente de placa de microtitración de 96 pocillos y 384 pocillos y detección mediante lector de microplaca luminométrico.

El método más simple y amplio para la evaluación de la citotoxicidad es el método de exclusión de colorantes. En un método de exclusión de colorantes, las células viables excluyen colorantes, pero las células muertas no los excluyen. Se puede utilizar una variedad de tales colorantes, incluyendo eosina, rojo Congo, eritrosina B y azul de tripano.

El sistema de la invención se puede utilizar para evaluar la efectividad de un agente de interés en la alteración del efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma sobre una célula neuronal. El agente puede ser cualquier molécula o sustancia farmacéuticamente activa, incluyendo compuestos o moléculas biológicas, adecuadamente una molécula enlazante específica, como anticuerpos (por ejemplo anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales, incluyendo anticuerpos biespecíficos o fragmentos de anticuerpos como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fc, Fd, Fv, dAb, scFv, el fragmento CDR, diacuerpo o variantes o derivados de los mismos). El agente se puede administrar directamente o formular en un adyuvante, diluyente o disolución adecuados (por ejemplo una disolución tamponada fisiológicamente adecuada, como una disolución tamponada con fosfato) o formular como una formulación farmacéutica utilizando técnicas estándar conocidas en la materia.

Los métodos de la invención pueden comprender un paso de establecimiento de la actividad de un agente como un control positivo con actividad conocida. Ejemplos de compuestos de prueba conocidos con actividad inhibitoria establecida contra fragmentos de proteína Tau para uso como un control positivo pueden incluir, entre otros, azul de metileno (MB, también conocido como cloruro de metiltioninio) o LMT (bis-hidrometanosulfonato de leuco-metiltioninio, LMTM; también conocido como LMT-X o TRx0237). La actividad de un agente sometido a ensayo según la invención según un método de la invención se puede comparar con el control positivo.

Los métodos de la invención pueden comprender un paso de establecimiento de una línea base para ausencia de actividad utilizando un control negativo (sin actividad conocida). Ejemplos de controles negativos adecuados pueden incluir medio de cultivo para las células neuronales, solución salina tamponada con fosfato o similares. La actividad de un agente sometido a ensayo según la invención según un método de la invención se puede comparar con el control negativo.

Opcionalmente, el método de la invención puede comprender adicionalmente el paso de tratamiento de un sujeto con una tauopatía con dicho agente, que además incluye opcionalmente otra sustancia terapéuticamente activa adecuada para el tratamiento de una tauopatía.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un sistema para estudio de los efectos de los agentes sobre el comportamiento de agregados de proteína tau o de un fragmento de la misma, que se puede utilizar para evaluar la efectividad del agente en el tratamiento de una tauopatía o enfermedad caracterizada por la acumulación anormal de proteínas tau en células neuronales de un sujeto.

La agregación de proteína tau es un distintivo de enfermedades conocidas como "tauopatías". Se han reconocido varios trastornos de la tauopatía que presentan una patología prominente de tau en las neuronas y/o la glía y este término se ha utilizado en la técnica durante varios años. Las similitudes entre estas inclusiones patológicas y las inclusiones de tau características en enfermedades como AD indican que las características estructurales son compartidas y que la distribución topográfica de la patología es la responsable de los diferentes fenotipos clínicos observados. En particular se han obtenido previamente estructuras de microscopio crioelectrónico de Tau agregada en AD, enfermedad de Pick (un subtipo de demencia frontotemporal), encefalopatía traumática crónica (CTE) y degeneración corticobasal (CBD), y todas muestran características conformacionales comunes, lo que indica que los compuestos que tienen la capacidad de modular la agregación de Tau, por ejemplo, en PHF (como se observa en AD), también pueden modular la agregación de Tau en otras tauopatías. Además de las enfermedades específicas que se analizan a continuación, los expertos en la materia pueden identificar tauopatías mediante combinaciones de síntomas cognitivos o conductuales, además de mediante el uso de ligandos apropiados para tau agregada según se visualiza mediante PET o MRI, como las descritas en el documento WO 02/075318.

Además de la enfermedad de Alzheimer (AD), la patogénesis de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Pick y la parálisis supranuclear progresiva (PSP) parece correlacionarse con una acumulación de agregados de tau truncados patológicos en el giro dentado y las células piramidales estrelladas del neocórtex, respectivamente. Las tauopatías relevantes (o demencias asociadas a tau) incluyen demencia frontotemporal (FTD); parkinsonismo ligado a cromosoma 17 (FTDP-17); complejo desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (DDPAC); degeneración pálido-ponto-nigral (PPND); síndrome de Guam-ALS; degeneración pálido-nigro-luisiana (PNLD); degeneración corticobasal (CBD); demencia con granos argirófilos (AgD); demencia pugilística (DP), en donde, a pesar de la diferente topografía, los NFT son similares a los observados en AD (Bouras et al., 1992); encefalopatía traumática crónica (CTE), una tauopatía que incluye DP, así como conmociones

cerebrales repetidas y relacionadas con el deporte (McKee, et al., 2009). Otros se discuten en Wischik et al. 2000, para una discusión detallada - especialmente Tabla 5.1).

5 También se encuentra tau anormal en NFT en el síndrome de Down (DS) (Flament et al., 1990) y en la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) (Harrington et al., 1994). También se encuentran NFT positivos para tau en parkinsonismo postencefálico (PEP) (Charpiot et al., 1992). Se observan ovillos gliales de tau en la panencefalitis esclerosante subaguda (SSPE) (Ikeda et al., 1995). Otras tauopatías incluyen enfermedad de Niemann-Pick tipo C (NPC) (Love et al., 1995); síndrome de Sanfilippo tipo B (o mucopolisacaridosis III B, MPS III B) (Ohmi, et al., 2009); distrofias miotónicas (DM), DM1 (Sergeant, et al., 2001 y referencias citadas en el mismo) y DM2 (Maurage et al., 2005). Además, en la bibliografía existe un consenso creciente de que una patología tau también puede contribuir de manera más general a los déficits y al deterioro cognitivo, incluso en el deterioro cognitivo leve (DCL) (véase, por ejemplo, Braak, et al., 2003, Wischik et al., 2018).

15 Todas estas enfermedades, que se caracterizan principal o parcialmente por una agregación anormal de tau, se denominan aquí "tauopatías" o "enfermedades de agregación de proteína tau". En aspectos de la presente invención relacionados con tauopatías, la tauopatía se puede seleccionar de cualquier tauopatía definida en el presente documento.

20 La tauopatía se puede seleccionar a partir del grupo formado por enfermedad de Alzheimer, tauopatía primaria relacionada con la edad (PART), demencia senil con predominio de ovillos neurofibrilares, encefalopatía traumática crónica (CTE), parálisis supranuclear progresivo (PSP), degeneración corticobasal (CBD), demencia frontotemporal (FTD), demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), enfermedad de Pick, complejo desinhibición-demencia-parkinsonismo-amiotrofia (DDPAC), degeneración pálido-ponto-nigral (PPND), síndrome Guam-ALS; degeneración pálido-nigro-luisiana (PNLD), demencia con granos argirófilos (AgD), 25 síndrome de Down (DS), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), parkinsonismo postencefálico (PEP), demencia pugilística (DP), traumatismo craneoencefálico (TBI), accidente cerebrovascular, isquemia, enfermedad Lytico-bodig (complejo Parkinson-demencia de Guam), ganglioglioma, gangliocitoma, meningioangiomas, parkinsonismo postencefálico, panencefalitis esclerosante subaguda (SSPE), encefalopatía de plomo, esclerosis tuberosa, neurodegeneración asociada a pantotenato quinasa, lipofuscinosis y deterioro cognitivo leve (MCI).

30 La tauopatía puede ser la enfermedad de Alzheimer.

En el presente documento también se describe el tratamiento como medida profiláctica. El tratamiento puede ser profiláctico. El tratamiento puede ser mediante inmunización activa o inmunización pasiva.

35 Se ha demostrado que la inmunización activa con tau reduce la patología tau mediante dirección a fosfoepítomos únicos o múltiples, el extremo aminoterminal, tau normal y mutante de longitud completa o tau agregada. Las reducciones en tau patológica se consiguen con pocos efectos adversos presentados, y la respuesta inmunitaria duradera hace que la inmunización activa sea una opción prometedora. Sin embargo, la obtención de anticuerpos contra una proteína nativa siempre conlleva el riesgo de reacciones inmunitarias adversas y de una dirección perjudicial a la proteína normal.

40 La inmunización pasiva ofrece una solución potencial a los problemas de seguridad que surgen de las estrategias activas. Los pacientes no desarrollarán sus propios anticuerpos y es probable que los efectos de la inmunización sean transitorios, lo que reduce el riesgo de efectos adversos inmunológicos. La inmunización pasiva también ofrece una mayor especificidad para el epítipo al que se dirige. Los anticuerpos también podrían modificar la progresión de la enfermedad al bloquear la propagación de la patología tau.

45 Los agentes identificados mediante un método de la presente invención con efectividad terapéutica contra una tauopatía o enfermedad caracterizada por acumulación anormal de proteínas tau en células neuronales de un sujeto pueden, por lo tanto, utilizarse en el tratamiento de una tauopatía en estadio temprano y/o una tauopatía caracterizada por síntomas leves. El agente se puede utilizar en el tratamiento del deterioro cognitivo leve (MCI).

50 El agente se puede utilizar en el tratamiento de una tauopatía en un sujeto en riesgo de desarrollar una tauopatía. El sujeto en riesgo de desarrollar una tauopatía puede ser identificado por cualquier medio adecuado, como uno o más de los antecedentes médicos, exploración física, exploración neurológica, imágenes cerebrales, pruebas de estado mental (como el Mini Examen de Estado Mental (MMSE) y prueba Mini-Cog), pruebas cognitivas computarizadas (como los dispositivos Cantab Mobile, Cognigram, Cognivue, Cognision y Automated Neuropsychological Assessment Metrics (ANAM)), evaluación del estado de ánimo y pruebas genéticas. La 55 persona experta es consciente de que el diagnóstico de tauopatía no siempre es definitivo hasta la autopsia. En consecuencia, el agente se puede utilizar en el tratamiento de una tauopatía en un sujeto en riesgo de desarrollar una tauopatía. Se puede sospechar que el sujeto tiene una tauopatía. El sujeto puede tener uno o más síntomas de una tauopatía. El agente se puede utilizar para ralentizar la progresión de una tauopatía o una sospecha de tauopatía.

65

El término "cantidad terapéuticamente efectiva", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de un agente utilizada en la práctica de metodologías combinadas de la invención que es efectiva para la producción de algún efecto terapéutico deseado, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según un régimen de tratamiento deseado.

5

En este documento se describe pero no se reivindica un método de tratamiento profiláctico de una tauopatía en un sujeto, consistiendo este método en la administración a dicho sujeto de un agente identificado mediante un método de la invención.

10

El término "cantidad profilácticamente efectiva", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de un agente identificado mediante un método de la invención que es efectiva para la producción de algún efecto profiláctico deseado, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según un régimen de tratamiento deseado. "Profilaxis" en el contexto de la presente memoria descriptiva no se debe entender en el sentido de circunscribir el éxito completo, es decir, la protección completa o la prevención completa.

15

Más bien, profilaxis en el presente contexto se refiere a una medida que se administra antes de la detección de una afección sintomática con el objetivo de preservar la salud ayudando a retrasar, mitigar o evitar esa afección particular.

20

Las características preferentes del segundo y siguientes aspectos de la invención son las mismas que para el primer aspecto *mutatis mutandis*.

25

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la internalización de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma que comprende los pasos de:

(a) cultivo de la célula neuronal en presencia del agente y posteriormente cultivo de la célula neuronal con el fragmento la proteína Tau en ausencia de heparina; o;

30

(b) cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina y posteriormente el cultivo de la célula neuronal en presencia del agente; y

(c) determinación de la internalización del fragmento de proteína Tau en la célula neuronal después de realizar el paso (a) o el paso (b).

35

Tal como se describe en el presente documento, la internalización del fragmento de proteína Tau como se definió anteriormente da lugar a la producción de especies de tau insolubles (es decir, agregados), fosforilación anormal y truncamiento de la proteína tau endógena de longitud completa.

40

La inhibición de la internalización de un fragmento de proteína Tau tal como se describe en el presente documento se puede probar mediante inmunofluorescencia y/o microscopía electrónica de transmisión (TEM). Tales técnicas pueden mostrar las cantidades relativas del fragmento de proteína Tau internalizada por las células neuronales en presencia de un agente activo. También se pueden preparar controles positivos y negativos adecuados como se describe en el presente documento a fin de establecer el nivel conocido de actividad de un agente con actividad inhibitoria conocida y actividad basal en ausencia del agente, respectivamente.

45

En un método que utiliza inmunofluorescencia, los fragmentos de proteína Tau como se describen en el presente documento se pueden etiquetar con una etiqueta fluorescente detectable. El método puede utilizar un único anticuerpo (primario), unido a un fluoróforo adecuado, en donde el anticuerpo reconoce y se enlaza a un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento. Alternativamente, el método puede utilizar dos anticuerpos, en los que un primer anticuerpo (primario) reconoce específicamente y se enlaza a un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento, y un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo reconoce y se enlaza al anticuerpo primario.

50

55

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) de inmunoro utiliza partículas de oro coloidales que pueden unirse a anticuerpos que reconocen y se unen específicamente a un fragmento de proteína Tau como se define en el presente documento. Las partículas de oro coloidales se pueden unir a un anticuerpo primario que reconoce específicamente y se enlaza a un fragmento de proteína Tau como se define en el presente documento o las partículas de oro coloidales se pueden unir a un anticuerpo primario que reconoce específicamente y se enlaza a un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento.

60

La internalización de un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento también se puede probar utilizando un fragmento de proteína Tau etiquetado de manera detectable, por ejemplo un fragmento de proteína Tau con etiquetado fluorescente.

65

Por lo tanto, el paso de determinación de la inhibición de la internalización del fragmento de proteína Tau en la célula neuronal puede utilizar fotografía o TEM para visualizar la cantidad relativa de fragmento de proteína Tau internalizado en las células neuronales.

5 La inmunofluorescencia y la microscopía electrónica de transmisión (TEM) de inmunoro de células tratadas como se describe en el presente documento revela que el fragmento de proteína Tau como se define anteriormente, por ejemplo dGAE, se acumula dentro de los compartimentos endosómicos/lisosomales de las células.

10 Después de la incubación, se puede generar imágenes de las células neuronales y realizar el análisis utilizando un programa de análisis adecuado, como por ejemplo "imaged", para cuantificar la intensidad de fluorescencia dentro del cuerpo celular para proporcionar una lectura de la internalización y el análisis estadístico llevado a cabo para comparar la intensidad de fluorescencia de los controles positivos y negativos con las muestras tratadas con agente. El número de células se puede contar para expresar el nivel de internalización como intensidad de fluorescencia media por célula para tener en cuenta diferentes números de células en los campos de visión.

15 Un método adecuado para establecer si el resultado de un ensayo mostraba que un agente era capaz de inhibir la internalización de un fragmento de proteína Tau se podría llevar a cabo mediante una prueba estadística, es decir, una prueba estadística para examinar el significado de las diferencias (por ejemplo prueba T no apareada). Por lo tanto, la reducción puede ser una reducción estadísticamente significativa de la internalización. Por ejemplo, un fragmento de proteína Tau capaz de servir como inhibidor de la internalización puede dar lugar a una inhibición del 40 %-60 % de inhibición de la internalización del fragmento de proteína Tau en un cultivo de células neuronales en comparación con un valor de control del 20 % de inhibición para un cultivo celular neuronal en un medio de cultivo de control, por ejemplo medio de crecimiento DMEM.

20 El ensayo de inhibición de la internalización de un fragmento de proteína Tau según un método de la invención puede estar normalizado adecuadamente a los resultados obtenidos para células tratadas sin agente o con vehículo de tratamiento. Los compuestos que exhiben 50 % de inhibición con agente a una concentración adecuada de alrededor de 2  $\mu$ M o menos se pueden considerar inhibidores activos de internalización. Por lo tanto, la actividad relativa también puede compararse para diferentes agentes, también según un método de la invención, como se describe en el presente documento.

25 Los métodos de la invención pueden comprender un paso de establecimiento de la actividad de un agente como un control positivo con actividad conocida. Ejemplos de compuestos de prueba conocidos con actividad inhibitoria establecida contra fragmentos de proteína Tau para uso como un control positivo pueden incluir, entre otros, azul de metileno (MB, también conocido como cloruro de metiltioninio) o LMT (bis-hidrometanosulfonato de leuco-metiltioninio, LMTM; también conocido como LMT-X o TRx0237). La actividad de un agente sometido a ensayo según la invención según un método de la invención se puede comparar con el control positivo.

30 Los métodos de la invención pueden comprender un paso de establecimiento de una línea base para ausencia de actividad utilizando un control negativo (sin actividad conocida). Ejemplos de controles negativos adecuados pueden incluir medio de cultivo para las células neuronales, solución salina tamponada con fosfato o similares. La actividad de un agente sometido a ensayo según la invención según un método de la invención se puede comparar con el control negativo.

35 Opcionalmente, el método descrito en el presente documento puede comprender adicionalmente el paso que no forma parte de la invención de tratamiento de un sujeto con una tauopatía con dicho agente, que además incluye opcionalmente otra sustancia terapéuticamente activa adecuada para el tratamiento de una tauopatía.

40 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de cribado de un agente efectivo en la interrupción de la interacción de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma a una proteína tau endógena que comprende los pasos de:

45 (a) cultivo de la célula neuronal en presencia del agente y posteriormente cultivo de la célula neuronal con el fragmento la proteína Tau en ausencia de heparina; o;

(b) cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina y posteriormente el cultivo de la célula neuronal en presencia del agente; y

50 (c) determinación de la extensión de la interacción del fragmento de proteína Tau con la proteína tau endógena en la célula neuronal después de realizar el paso (a) o el paso (b).

55 La interrupción de la interacción entre el fragmento de proteína Tau y la proteína Tau endógena se puede probar adecuadamente utilizando inmunofluorescencia y/o microscopía electrónica de transmisión (TEM) de inmunoro como se describe en el presente documento.

Tal como se describe en el presente documento, la internalización del fragmento de proteína Tau como se definió anteriormente da lugar a la producción de especies de tau insolubles, fosforilación anormal y truncamiento de la proteína tau endógena de longitud completa.

5 La inmunofluorescencia y la microscopía electrónica de transmisión TEM de inmunooro de células tratadas como se describe en el presente documento revela que los agregados de proteína Tau como se definen anteriormente, por ejemplo dGAE, se acumulan dentro de los compartimentos endosómicos/lisosomales de las células. La interrupción de la interacción de un fragmento de proteína Tau con proteína Tau endógena se puede describir como inhibición de la interacción entre el fragmento de proteína Tau y la proteína Tau endógena.

10 Por lo tanto, el paso de determinación de la interrupción de la interacción entre el fragmento de proteína Tau y la proteína tau endógena en la célula neuronal puede utilizar fotografía o TEM para visualizar la interacción relativa del fragmento de proteína Tau y la proteína Tau endógena en las células neuronales.

15 Tal como se describe en el presente documento, se puede utilizar TEM de inmunofluorescencia y/o inmunooro para mostrar la interrupción relativa de la interacción entre un fragmento de proteína Tau y la proteína Tau endógena internalizada por las células neuronales en presencia de un agente activo. También se pueden preparar controles positivos y negativos adecuados como se describe en el presente documento a fin de establecer el nivel conocido de actividad de un agente con actividad inhibitoria conocida y actividad basal en ausencia del agente, respectivamente.

20 Un método adecuado para establecer si el resultado de un ensayo mostraba que un agente era capaz de interrumpir la interacción de un fragmento de proteína Tau con proteína Tau endógena se podría llevar a cabo mediante una prueba estadística, es decir, una prueba estadística para examinar el significado de las diferencias (por ejemplo prueba T no apareada). Por lo tanto, la reducción puede ser una reducción estadísticamente significativa de la interrupción de la interacción de un fragmento de Tau con proteína Tau endógena. Por ejemplo, un fragmento de proteína Tau capaz de servir como una interrupción de la interacción puede dar lugar a una inhibición del 40 %-60 % de interrupción de la interacción del fragmento de proteína Tau con proteína Tau endógena en un cultivo de células neuronales en comparación con un valor de control del 20 % de inhibición para un cultivo celular neuronal en un medio de cultivo de control, por ejemplo medio de crecimiento DMEM.

25 El ensayo de interrupción de la interacción de un fragmento de proteína Tau con proteína tau endógena según un método de la invención puede estar normalizado adecuadamente a los resultados obtenidos para células tratadas sin agente o con vehículo de tratamiento. Los compuestos que exhiben 50 % de actividad con agente a una concentración adecuada de alrededor de 2  $\mu\text{M}$  o menos se pueden considerar inhibidores activos de interacción. Por lo tanto, la actividad relativa también puede compararse para diferentes agentes, también según un método de la invención, como se describe en el presente documento.

35 Los métodos de la invención pueden comprender un paso de establecimiento de la actividad de un agente como un control positivo con actividad conocida. Ejemplos de compuestos de prueba conocidos con actividad inhibitoria establecida contra fragmentos de proteína Tau para uso como un control positivo pueden incluir, entre otros, azul de metileno (MB, también conocido como cloruro de metiltioninio) o LMT (bis-hidrometanosulfonato de leuco-metiltioninio, LMTM; también conocido como LMT-X o TRx0237). La actividad de un agente sometido a ensayo según la invención según un método de la invención se puede comparar con el control positivo.

40 Los métodos de la invención pueden comprender un paso de establecimiento de una línea base para ausencia de actividad utilizando un control negativo (sin actividad conocida). Ejemplos de controles negativos adecuados pueden incluir medio de cultivo para las células neuronales, solución salina tamponada con fosfato o similares. La actividad de un agente sometido a ensayo según la invención según un método de la invención se puede comparar con el control negativo.

45 Opcionalmente, el método descrito en el presente documento puede comprender adicionalmente el paso que no forma parte de la invención de tratamiento de un sujeto con una tauopatía con dicho agente, que además incluye opcionalmente otra sustancia terapéuticamente activa adecuada para el tratamiento de una tauopatía.

50 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la citotoxicidad de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma que comprende (i) una línea celular neuronal. (ii) un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y (iii) una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina.

55 La biblioteca de agentes puede comprender cualquier agente de interés como se describe en el presente documento, que pueda alterar el efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma como se describe en el presente documento en una célula neuronal. El agente puede ser cualquier molécula o sustancia

farmacéuticamente activa, incluyendo compuestos o moléculas biológicas, adecuadamente una molécula enlazante específica, como anticuerpos. La biblioteca puede ser una biblioteca de compuestos químicos o una biblioteca de moléculas enlazantes específicas.

5 Tal sistema de la invención se puede proporcionar en forma de un kit de partes que comprende una población de células de una línea celular neuronal; un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina. Tal sistema o kit de partes de la invención también se puede proporcionar con instrucciones de uso. Las células se pueden proporcionar en un medio de crecimiento o cultivo adecuado como se describe en el presente documento. Las células se pueden proporcionar también en un envase adecuado.

Otras características preferentes del cuarto y siguientes aspectos de la invención referidos a sistemas de la invención son como se describen anteriormente.

15 Según un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la internalización de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma que comprende (i) una línea celular neuronal. (ii) un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y (iii) una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina.

20 La biblioteca de agentes puede comprender cualquier agente de interés como se describe en el presente documento, que pueda alterar el efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma como se describe en el presente documento en una célula neuronal. El agente puede ser cualquier molécula o sustancia farmacéuticamente activa, incluyendo compuestos o moléculas biológicas, adecuadamente una molécula enlazante específica, como anticuerpos. La biblioteca puede ser una biblioteca de compuestos químicos o una biblioteca de moléculas enlazantes específicas.

25 Tal sistema de la invención se puede proporcionar en forma de un kit de partes que comprende una línea celular neuronal; un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina.

30 Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema de cribado de un agente efectivo en la interrupción de la interacción de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma con la proteína tau endógena que comprende (i) una línea celular neuronal. (ii) un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y (iii) una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina.

35 La biblioteca de agentes puede comprender cualquier agente de interés como se describe en el presente documento, que pueda alterar el efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma como se describe en el presente documento en una célula neuronal. El agente puede ser cualquier molécula o sustancia farmacéuticamente activa, incluyendo compuestos o moléculas biológicas, adecuadamente una molécula enlazante específica, como anticuerpos. La biblioteca puede ser una biblioteca de compuestos químicos o una biblioteca de moléculas enlazantes específicas.

40 Tal sistema de la invención se puede proporcionar en forma de un kit de partes que comprende una línea celular neuronal; un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina.

45 La presente divulgación describe cómo se puede explorar la absorción celular de proteína Tau soluble y fragmentos de la misma como se define en el presente documento, es decir, formas agregadas de la proteína tau, por ejemplo el fragmento de la proteína tau dGAE. Las consecuencias aguas abajo de la internalización de tau en células de neuroblastoma SH-SY5Y diferenciadas se puede examinar utilizando fluorescencia y microscopía electrónica además de análisis estructurales y bioquímicos.

50 En una realización de un método o sistema de cualquier aspecto de la invención, las células neuronales indiferenciadas se pueden sembrar en placas en una placa de múltiples pocillos a una concentración adecuada (por ejemplo 30.000 células por pocillo) y diferenciar utilizando ácido retinoico en medio sérico depletado, como se describe anteriormente, o dejar indiferenciadas. Las células se pueden tratar de una de las siguientes maneras:

(1) las células se preincubaban en presencia de un agente de interés antes de añadir fragmentos de proteína Tau como se define en el presente documento (tales fragmentos también se pueden denominar agregados tau); o (2) las células se coincubaban con un agente de interés y se administran agregados al mismo tiempo.

5 Las células se pueden incubar durante 12, 24 o 48 horas en cada estadio. Por ejemplo, las células se pueden incubar durante 24 horas significando el tiempo total de (1) 48 horas y 24 horas para (2). Por ejemplo, como se describe en el presente documento, el fragmento de proteína tau dGAE-488 (por ejemplo utilizado a una concentración de 1  $\mu$ M) se puede incubar con células durante 24 horas, lo que es suficiente para que se pueda ver la proteína tau internalizada.

10 Tras la incubación, se pueden fotografiar las células y se puede realizar análisis de imágenes utilizando un programa de software de análisis adecuado (por ejemplo imaged) para cuantificar la intensidad de fluorescencia dentro del cuerpo de la célula. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia puede proporcionar una medición de la internalización de la proteína tau.

15 El número de células se puede contar para expresar el nivel de internalización como intensidad de fluorescencia media por célula para tener en cuenta diferentes números de células en los campos de visión.

20 En una realización, un fragmento de proteína Tau, por ejemplo dGAE-488, se puede añadir a una concentración adecuada, por ejemplo alrededor de 1  $\mu$ M. Los agentes para el cribado se pueden probar inicialmente a una única concentración por ejemplo 10  $\mu$ M; aquellos agentes que muestran actividad inhibitoria se pueden probar entonces en un rango de concentraciones, por ejemplo de alrededor de 2  $\mu$ M a alrededor de 20 nM y se informa de la actividad de compuestos como la concentración a la que se observa, por ejemplo, 50 % de inhibición de actividad.

25 Las actividades medidas según un método o sistema de la invención pueden incluir, como se describe en el presente documento: (i) internalización de tau (por ejemplo como se mide mediante fluorescencia intracelular de un fragmento de proteína Tau con etiqueta detectable como se describe en el presente documento); (ii) agregación intracelular de un fragmento de proteína Tau con etiqueta detectable como se describe en el presente documento (por ejemplo medido mediante cosecha de células, lisis de las mismas y separación de fragmentos de proteína Tau etiquetados agregados mediante ultracentrifugación y medida de tau agregada (por ejemplo mediante inmunoblot con anticuerpo anti-tau); y (iii) citotoxicidad de un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento (por ejemplo medido utilizando un ensayo de citotoxicidad adecuado (por ejemplo el ensayo ReadyProbes<sup>®</sup>) para medir la muerte celular (véase, por ejemplo, la Figura 2A).

35 Las actividades pueden estar normalizadas a los resultados obtenidos para células tratadas sin agente o con vehículo de tratamiento. Adecuadamente, los compuestos que exhiben 50 % de inhibición con un agente probado a 2  $\mu$ M o menos se consideran activos. Los métodos y sistemas descritos en el presente documento también permiten comparar la actividad relativa para diferentes agentes.

40 Los resultados de los estudios descritos en el presente documento muestran que dGAE ensamblado exhibe una citotoxicidad más aguda que la forma soluble no agregada. Por el contrario, la forma soluble se internaliza con facilidad mucho mayor y, una vez dentro de la célula, puede asociarse con tau endógena dando lugar a un aumento de fosforilación y agregación de tau endógena, que se acumula en compartimentos lisosomales/endosomales de la célula. Parece que las formas oligoméricas solubles pueden propagar patología tau sin ser sumamente tóxicas. Por lo tanto, los estudios descritos en el presente documento proporcionan métodos y sistemas para la determinación de la actividad de agentes en la inhibición de la actividad de un fragmento de proteína Tau medida mediante citotoxicidad de un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento, internalización de un fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento y/o la interacción de proteína Tau endógena con una fragmento de proteína Tau como se describe en el presente documento.

50 Los resultados presentados en este documento muestran que dGAE agregado es citotóxico, mientras que dGAE soluble no fibrilar no es sumamente tóxico y es absorbido por células similares a neuronas. La internalización da lugar a la producción de especies tau insolubles, la fosforilación anormal y la truncamiento de tau de longitud completa endógena. La inmunofluorescencia y TEM de inmunoro de células tratadas revelan que dGAE se acumula dentro de compartimentos endosomales/lisosomales de células. Por lo tanto, las consecuencias aguas abajo de la internalización de fragmentos Tau son citotoxicidad, agregación en especies de tau insolubles y truncamiento/fosforilación de tau.

60 En el intervalo de 24 horas de los experimentos descritos en el presente documento, se observó un aumento de la muerte celular tras la exposición de células de neuroblastoma diferenciadas a dGAE agregado, pero se observaron diferencias mínimas en la viabilidad de células tratadas con dGAE soluble.

65 En las condiciones utilizadas aquí, dGAE parecía ser más sumamente tóxico para células de neuroblastoma diferenciadas tras las 24 h de periodo de incubación. Sin embargo, aunque el dGAE era mínimamente tóxico incluso a altas concentraciones, en su forma soluble se internalizó en células de neuroblastoma diferenciadas en 2 h de exposición. Tras la agitación, el dGAE-488 se internaliza de modo mucho más eficiente. En el presente

estudio, se observó cierta internalización utilizando preparaciones agregadas, pero estas pueden ser especies solubles o parcialmente solubles que permanecen en disolución durante la preparación de filamentos. Es probable que el dGAE-488 agitado contenga una mezcla de tamaños de ensamblajes de tau, algunos de los cuales están internalizados y algunos de los cuales no lo están. Si bien las especies exactas internalizadas aún no se han resuelto, la preparación de dGAE soluble consiste en agregados con un diámetro que oscila de 10-80 nm, lo que implica una variedad de formas oligoméricas (Fig. 1A).

Además, el tiempo que tarda dGAE en 0 h para volverse tóxica puede ser más largo que el intervalo de estos experimentos. La internalización descrita en el presente documento no requiere factores exógenos para agregación ni para absorción celular.

Los presentes estudios han investigado si tau endógena se podría reclutar y convertir en formas insolubles tras la absorción de dGAE soluble en el citoplasma. La interacción entre tau sometida a endocitosis con tau citosólica se ha investigado previamente en varios modelos celulares que han requerido la sobreexpresión de tau humana o mediante introducción de tau exógena con la ayuda de reactivos de suministro de proteínas.

Los datos presentados en este documento muestran que la incubación con formas solubles de dGAE da lugar a un aumento local de fosfo-tau endógena en células con niveles normales de tau endógena, coherente con la patología tau en AD. Utilizando dGAE-488 junto con anticuerpos que reconocen epítopos fuera del dominio de repetición para probar el estado de fosforilación de proteína tau endógena, en el presente documento se ha demostrado que hay un aumento de la fosforilación de tau endógena en T231 y S202-T205. Estos cambios van acompañados de un aumento en los niveles de proteína tau fosforilada insoluble tras la extracción secuencial, pero no en el mismo lisado. Los Western blot de lisados completos no revelaron diferencias claras en los niveles de fosfo-tau utilizando AT80 o AT180, lo que puede sugerir que los niveles generales permanecen constantes, pero los niveles de fosfo-tau locales aumentan dentro de áreas de tau insoluble/agregada como se demuestra mediante inmunofluorescencia y tras extracción secuencial. El mecanismo de inducción de agregación o fosforilación acrecentada tras la absorción de formas solubles de dGAE no es conocido en este estadio. Esta especie de tau truncada puede autoagregarse espontáneamente sin ningún requisito de fosforilación. Aquí se demuestra que dGAE se coagrega con tau endógena y que estos se acumulan conjuntamente dentro de compartimentos endosomales/lisosomales.

La presente divulgación muestra que la mayoría de dGAE que está internalizada por células se localiza en compartimentos lisosomales. Utilizando TEM de inmunoro, se ha demostrado la localización de dGAE-488 en estructuras vesiculares con un rango de tamaño que sugiere compartimentos lisosomales.

Los hallazgos de inmunofluorescencia y TEM sugieren conjuntamente la acumulación tanto de dGAE como de tau endógena dentro de los compartimentos endolisosomales. Estos hallazgos proporcionan una nueva perspectiva en la ultraestructura de células tras la internalización de una forma patológica de tau y sugiere que la vía autofágica puede estar implicada en su degradación.

Las formas fisiológicas y patológicas de tau son clarificadas por los sistemas degradativos proteasomales y autofágicos y se ha sugerido que la tau patológica se degrada preferentemente por el sistema autofágico-lisosomal. Es posible que la acumulación de tau patológico puede interferir con el funcionamiento normal de estos procesos degradativos. En AD, existe apoyo para la degradación alterada de las vacuolas autofágicas por los lisosomas, lo que sugiere que la eliminación incompleta de tau patológica podría contribuir a la disfunción neuronal. La comprensión de cómo se pueden eliminar las especies de tau acumuladas de las células puede permitir el desarrollo de enfoques terapéuticos complementarios además de la inhibición de la agregación de tau.

La facilidad con la que dGAE soluble se autoensambla e internaliza en las células neuronales permite estudiar el efecto de su autoensamblaje en un entorno celular, en particular su efecto sobre la toxicidad aguda y su influencia sobre el estado de fosforilación y la insolubilidad de la tau endógena a nivel ultraestructural. Este enfoque proporcionará una herramienta útil para facilitar el estudio de agregación de tau en ausencia de cualquier sobreexpresión de la proteína, modificación postraducciona o inductores de ensamblaje y, en última instancia, para estudiar el mecanismo de acción de los inhibidores de la agregación de tau que se dirigen a la siembra de tau y la transmisión neuronal en AD y tauopatías relacionadas.

Como se indicó anteriormente, las características preferentes del segundo y siguientes aspectos de la invención son las mismas que para el primer aspecto *mutatis mutandis*.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen con fines de referencia únicamente y no se deben interpretar como limitaciones de la invención, también se hace referencia a un número de figuras en las que:

La FIGURA 1 muestra que dGAE y dGAE-488 se autoensamblan para formar fibrillas similares estructuralmente. dGAE y dGAE-488 se incubaron a 100  $\mu$ M durante 72 h. Se tomaron alícuotas de la mezcla de ensamblaje antes (0 h) y después (72 h) de fibrilización para TEM de tinción negativa,

electroforesis en gel SDS-PAGE y espectroscopía CD. (A) Micrografías electrónicas de especies de dGAE a 0 h y 72 h de agitación. Barra de escala: 500 nm. El panel central es una mayor ampliación del cuadro blanco en el panel izquierdo (barra de escala: 200 nm). (B) Gel SDS-PAGE no reductor de dGAE y dGAE-488 mostrado como tinción de Coomassie (panel izquierdo) y fluorescencia (panel derecho). Las puntas de flecha negras apuntan a monómeros y dímeros, tetrámeros y fibrillas insolubles en el pocillo. (C) Espectros CD de toda la mezcla de ensamblaje para dGAE y dGAE-488 a 0 h y 72 h de agitación.

La FIGURA 2 muestra que la exposición a dGAE agregada pero no soluble (monómero/dímero) da lugar a un aumento de la muerte celular. Se agitó dGAE 100  $\mu$ M durante 72 h para producir fibrillas. Se añadieron especies solubles (0 h) o agregadas (72 h) (1  $\mu$ M) a las células y se incubaron durante 24 h. (A) Imágenes representativas de campo amplio tras exposición a tampón o dGAE con reactivo ReadyProbes®, que muestran los núcleos totales en azul y los núcleos de células muertas en verde. Barra de escala: 100  $\mu$ m (B) Se cuantificó el porcentaje de muerte celular para todas las condiciones. Los datos mostrados son promedio de seis campos de visión de 4-6 experimentos independientes  $\pm$  SEM. Un ANOVA de un factor muestra una diferencia significativa entre grupos ( $F = 11,26$ ,  $R^2 = 0,12$ ,  $p < 0,0001$ ). Las comparaciones múltiples de Dunnett muestran una diferencia significativa entre células tratadas solo con tampón ( $21,6 \pm 1,6$  %) y células tratadas con fibrillas de dGAE (72 h de dGAE) ( $34,0 \pm 2,9$  %) ( $p < 0,0001$ ) pero no entre células tratadas con tampón y células solubles tratadas con dGAE ( $24,1 \pm 1,2$  %).

La FIGURA 3 muestra que dGAE-488 soluble se internaliza fácilmente en células dSH-SY5Y. (A) Se añadió dGAE-488 1  $\mu$ M soluble (sin agitar) o dGAE agitado 72 h (agregado) a los medios de células dSH-SY5Y y después se fijó y visualizó mediante microscopía confocal después de 24 h de exposición. Todas las barras de escala: 20  $\mu$ m. (B) Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 488 en el cuerpo celular desde el centro de la pila z a partir de  $N = 273$  células de 6 experimentos independientes (0 h) y a partir de  $N = 120$  células (72 h) de 3 experimentos independientes. Una prueba t no apareada con corrección de Welch muestra una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de 488 entre 0 h ( $1114 \pm 66,75$  AU) y 72 h ( $474,1 \pm 95,97$  AU) ( $t = 5,475$ ,  $df = 237,7$ ,  $R^2 = 0,112$ ,  $p < 0,0001$ ). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. (C) La internalización de dGAE-488 5  $\mu$ M soluble (sin agitar) se supervisó in vivo mediante microscopía confocal desde  $t = 0$  h a  $t = 14$  h. Se pueden ver puntos 488-positivos internalizados en el cuerpo celular y neuritas a partir de 2 h después de la adición inicial de dGAE-488 (flechas blancas). Barra de escala: 50  $\mu$ m. (D) Las imágenes de mayor aumento de dGAE-488 soluble internalizada después de 24 h de exposición muestran un patrón punteado en el cuerpo celular (flecha blanca) y una mayor acumulación perinuclear (flecha roja). Barra de escala: 15  $\mu$ m. Se muestra un corte z desde el centro del cuerpo celular para todos los paneles.

La FIGURA 4 muestra que la exposición a dGAE-488 conduce a una acumulación de fosfo-tau endógena en células dSH-SY5Y. Se añadió dGAE-488 1  $\mu$ M soluble (sin agitar) a los medios de células dSH-SY5Y durante 24 h. Las células se inmunotiquetaron para tau endógena utilizando anticuerpos p-tau (Ai) AT180, (Bi) AT8 y (Ci) Tau-1 desfosforilada. Se muestra un corte z desde el centro del cuerpo celular. Las vistas ortogonales se visualizan en Ai y Bi para mostrar colocación potencial de dGAE-488 con tau endógena. Barra de escala: 20  $\mu$ m. Cada panel muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia como un porcentaje de células tratadas con tampón. (Aii) Cuantificación de fluorescencia de AT180 ( $N = 69$  células (tampón), 76 células (dGAE) de 4 experimentos independientes). Una prueba t no apareada con corrección de Welch muestra una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de AT180 entre células tratadas con dGAE ( $143,5 \pm 7,8$  %) y con tampón (100 t, 5,2 %) ( $t = 4,702$ ,  $df = 128,2$ ,  $R^2 = 0,1471$ ,  $p < 0,0001$ ). (Bii) Cuantificación de la fluorescencia de AT8.  $N = 348$  células (tampón),  $N = 338$  células (dGAE) de 3 experimentos independientes. Una prueba t no apareada con corrección de Welch muestra una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de AT8 entre células tratadas con dGAE ( $270,7 \pm 22,5$  %) y con tampón (100 t, 3,51 %) ( $t = 7,103$ ,  $df = 353,4$ ,  $R^2 = 0,1249$ ,  $p < 0,0001$ ). (Cii) Cuantificación de la fluorescencia de Tau1.  $N = 68$  células (tampón), 96 células (dGAE) de 3 experimentos independientes. Una prueba t no apareada con corrección de Welch muestra una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de Tau-1 entre células tratadas con dGAE ( $59,17 \pm 3,6$  %) y con tampón (100 t, 7,3 %) ( $t = 5,011$ ,  $df = 99,84$ ,  $R^2 = 0,201$ ,  $p < 0,0001$ ).

La FIGURA 5 muestra que la exposición a dGAE durante 24 h conduce a una acumulación de fosfo-tau endógena en la fracción insoluble en Tritón de células dSH-SY5Y. (Ai) Western blot representativo de lisado de células SH-SY5Y. Se añadió dGAE 1  $\mu$ M soluble (sin agitar) a los medios de células dSH-SY5Y. Después de 24 h se lisaron las células en tampón RIPA y se ejecutaron en SDS-PAGE. Las transferencias se probaron frente a tau total, AT180 y AT8. Se utilizó GAPDH como control de carga. (Aii) Se cuantificó la intensidad de bandas a 50-70 kDa para cada anticuerpo y se normalizó frente a GAPDH. Los valores normalizados para AT180 y AT8 se expresan como una proporción de tau total (porcentaje de tampón). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Una prueba t no apareada no muestra diferencias significativas en la inmunorreactividad de tau total ( $p = 0,3101$ ), AT180 ( $p = 0,4662$ ) o AT8 ( $p = 0,2119$ ) entre control tratado con tampón y células tratadas con dGAE. (Bi) Las células también se lisaron secuencialmente en el tampón de lisis Tritón-X 100 y se ejecutaron en SDS-PAGE. S = lisado soluble de Tritón-X 100; I = lisado insoluble de Tritón-X 100. Se utilizó el anticuerpo A T180 para detectar

tau fosforilada endógena y se utilizó GAPDH como un control de carga. B) La proporción de tau en las fracciones insoluble y soluble se cuantificó mediante densitometría y se expresó como un porcentaje de controles tratados con tampón. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes (1 repetición biológica por experimento). Una prueba t no apareada muestra una diferencia significativa en tau insoluble entre células tratadas con tampón ( $100 \pm 0$ ) y con dGAE ( $139,4 \pm 14,54$ ) ( $t = 2,709$ ,  $df = 6$ ,  $R^2 = 0,5501$ ,  $p = 0,0352$ ) y en tau soluble entre células tratadas con tampón ( $100 \pm 0$ ) y con dGAE ( $82,98 \pm 5,48$ ) ( $t = 3,106$ ,  $df = 6$ ,  $R^2 = 0,6165$ ,  $p = 0,0201$ ).

La FIGURA 6 muestra que dGAE-488 soluble internalizada se localiza en vesículas ácidas en células dSH-SY5Y. Ai) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de células expuestas a dGAE-488  $1 \mu\text{M}$  soluble (sin agitar) durante 24 h. Se etiquetaron las células con LysoTracker<sup>®</sup> para teñirlas en busca de vesículas ácidas, incluyendo lisosomas y endosomas, y se generaron imágenes en vivo. El etiquetado con dGAE-488 y LysoTracker<sup>®</sup> se localiza principalmente en el cuerpo celular (flechas blancas). Se muestra un corte z desde el centro del cuerpo celular. Barra de escala:  $50 \mu\text{m}$ . (Aii) Cuantificación de intensidad de fluorescencia de LysoTracker<sup>®</sup> como un porcentaje de células tratadas con tampón. Los datos muestran media  $\pm$  SEM agrupados de 3 experimentos independientes.  $N = 170$  células (tampón),  $N = 146$  células (dGAE). Una prueba t no apareada con corrección de Welch muestra una diferencia significativa en la intensidad de fluorescencia de LysoTracker<sup>®</sup> entre células tratadas con dGAE ( $211,9 \pm 9,89 \%$ ) y con tampón ( $100 \%$ ,  $5,23 \%$ ) ( $t = 10$ ,  $df = 222,6$ ,  $R^2 = 0,3101$ ,  $p < 0,0001$ ). Bi) Mayor aumento de una única célula etiquetada con LysoTracker<sup>®</sup> que contiene dGAE-488 internalizada. En el último panel se visualizan vistas ortogonales para mostrar la colocalización de dGAE-488 con LysoTracker<sup>®</sup>. Se muestra un corte z desde el centro del cuerpo celular. Barra de escala:  $10 \mu\text{m}$ . (Bii) Valores normalizados de intensidad de fluorescencia para 488 (verde) y LysoTracker (rojo) a lo largo de la región indicada por la línea blanca ( $20 \mu\text{m}$ ) en el último panel en (Bi). La colocalización de dGAE-488 y LysoTracker<sup>®</sup> se confirma mediante el coeficiente de correlación de Pearson entre el canal verde y el rojo. El valor promedio de Pearson R era  $0,8382 \pm 0,036$  ( $p < 0,0001$  para cada célula) ( $N = 7$  células).

La FIGURA 7 muestra que la dGAE-488 soluble internalizada se localiza en estructuras vesiculares en células dSH-SY5Y. Las células dSH-SY5Y se expusieron a dGAE-488  $1 \mu\text{M}$  soluble (sin agitar) durante 24 h y se procesaron para microscopía electrónica de inmunoro. El anticuerpo Anti-488 se utilizó para etiquetar dGAE, detectado mediante partículas de oro de  $10\text{-nm}$ . A) Micrografía electrónica que muestra la ultraestructura preservada de las células, con los compartimentos celulares etiquetados: n, núcleo; nu, nucléolo; m, mitocondria; v, estructura vesicular. Las puntas de flecha negras apuntan a estructuras vesiculares. La imagen contorneada en negro representa una imagen ampliada del área en el cuadro blanco. Barra de escala izquierda:  $5 \mu\text{m}$ . Barra de escala derecha:  $1 \mu\text{m}$ . B) Cuantificación de diámetro de vesícula. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM agrupados de 2 experimentos independientes.  $N = 34$  vesículas (tampón),  $N = 45$  vesículas (dGAE-488). Una prueba t no apareada mostró una diferencia significativa en el diámetro de vesícula entre las células tratadas con tampón ( $303,7 \pm 20,03$ ) y con dGAE ( $478,4 \pm 22,48$ ) ( $t = 5,601$ ,  $df = 77$ ,  $p < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,2895$ ). C) Micrografías electrónicas de mayor aumento de estructuras vesiculares de células tratadas con tampón y células tratadas con dGAE-488. Las puntas de flecha negras apuntan a algunos ejemplos de partículas de oro. Barra de escala:  $200 \text{ nm}$ .

La FIGURA 8 muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión de dGAE ensamblado en presencia y ausencia de anticuerpos. (A) dGAE ( $100 \mu\text{M}$ ); (B) dGAE ( $25 \mu\text{M}$ ); (C) dGAE ( $10 \mu\text{M}$ ); (D) dGAE ( $100 \mu\text{M}$ ) + s1D12 ( $25 \mu\text{M}$ ; 4:1); (E) dGAE ( $25 \mu\text{M}$ ) + s1D12 ( $25 \mu\text{M}$ ; 1:1); (F) dGAE ( $10 \mu\text{M}$ ) + s1D12 ( $2,5 \mu\text{M}$ ; 4:1); (G) dGAE ( $10 \mu\text{M}$ ) + anti-ovoalbúmina ( $2,5 \mu\text{M}$ ; 4:1); (H) s1D12 ( $25 \mu\text{M}$ ); (I) anti-ovoalbúmina ( $2,5 \mu\text{M}$ ). Solo se observan fibrillas en preparaciones en ausencia de s1D12 (A-C) o en un control de dGAE preparado en presencia de un anticuerpo IgG no tau, anti-ovoalbúmina (G). Cuando se añade s1D12 a la mezcla de ensamblaje en relaciones proteína:anticuerpo dGAE de 1:1 o 4:1 (D, E y F), no se observa formación de fibrillas. Las fibrillas también están ausentes de los controles de anticuerpo en ausencia de dGAE (H e I). Barra de escala (en I para todos los paneles),  $200 \text{ nm}$ .

La FIGURA 9 muestra espectros de CD en miligrados (mdeg) de (A) dGAE  $100 \mu\text{M}$  con (línea discontinua) y sin (línea continua) s1D12  $25 \mu\text{M}$  (relación 4:1) y anticuerpo solo (línea punteada) y (B) con los espectros de anticuerpos sustraídos. dGAE (línea continua) muestra una conformación de hoja  $\beta$  (positivo  $\sim 200 \text{ nm}$ , negativo  $\sim 220 \text{ nm}$ ) pero muestra una bobina aleatoria (negativo a  $\sim 200 \text{ nm}$ , positivo a  $\sim 220 \text{ nm}$ ) cuando se resta el espectro de s1D12 (B; línea discontinua y línea punteada), lo que indica que dGAE no se ha ensamblado en fibrillas.

La FIGURA 10 muestra fluorescencia de muestras incubadas con ThS. Se observa claramente un pico de emisión a  $483 \text{ nm}$  con dGAE  $25$  (A, 1:1) y  $100 \mu\text{M}$  (B, 4:1) (líneas continuas) que se suprime cuando se incluye s1D12 en la mezcla de ensamblaje (líneas discontinuas), lo que demuestra que solo las muestras que no incluyen s1D12 contienen fibrillas amiloides autoensambladas. Las líneas punteadas muestran que s1D12 por sí solo no contribuye a la fluorescencia.

## Materiales y métodos

Preparación de dGAE recombinante

5 Durante todo el estudio se utilizó tau truncada recombinante purificada (dGAE, correspondiente a residuos aminoácido 297 - 391 utilizando numeración de 2N4R tau). Se purificó la proteína tau recombinante 297-391 como se describió previamente en Al-Hilaly et al (J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)). Tras la purificación, dGAE existe en una conformación de bobina predominantemente aleatoria y consiste principalmente en monómero y dímero solubles como se caracterizó y se describió anteriormente en Al-Hilaly et al (J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)).

Etiquetado con Alexa Fluor® 488 de proteína tau

15 Para generar proteína tau con etiquetado fluorescente (dGAE-488), se etiquetó dGAE covalentemente con Alexa Fluor 488® (Life Technologies) mediante mezclado de 200 µl de proteína (425,2 µM) con 10 µl de éster TPF de Alexa Fluor® 113 nM y 20 µl de bicarbonato sódico 1M (pH 8,3). Se dejó incubar la muestra en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se equilibraron columnas Zeba 7K MWCO (Thermo Scientific) mediante adición de 1 ml de tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) y centrifugación a 1.000 x g durante 2 minutos a 4 °C. Se desechó el eluato y se repitió el proceso tres veces. La mezcla proteína/colorante se añadió gota a gota en la parte superior de la columna seguida inmediatamente de 40 µl de tampón fosfato y se centrifugó a 1.000 x g durante 2 minutos a 4 °C. La disolución de proteína se mantuvo en hielo y se midió la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop. La concentración de proteína se calculó utilizando el  $A_{280}$  y el coeficiente de extinción molar de dGAE ( $1.400 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), considerando la absorción de colorante en  $A_{494}$ . dGAE tiene 14 residuos de lisina, que son en su totalidad sitios potenciales en los que se puede unir el colorante 488. El grado de etiquetado se determinó mediante el  $A_{494}$  y el coeficiente de extinción molar del colorante ( $71.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). La proteína (dGAE-488) se utilizó inmediatamente para experimentos posteriores o se sometió a agitación *in vitro*.

Ensamblaje in vitro de dGAE y dGAE-488

30 El ensamblaje *in vitro* de dGAE y dGAE-488 se realizó como se describió previamente en Al-Hilaly et al (J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)) sin agente reductor. Brevemente se diluyó proteína 100 µM en tampón fosfato 10 mM (pH 7,4) y se incubó a 37 °C mientras se agitaba con una velocidad de 700 rpm en un Eppendorf ThermoMixer® durante 72 horas. Las muestras se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión de tinción negativa (TEM). Todos los experimentos se llevaron a cabo mediante el stock dGAE 100 µM en tampón fosfato.

Tinción negativa TEM

35 Se colocaron alícuotas (4 µl) de mezclas de ensamblaje de dGAE (100 µM en tampón fosfato, pH 7,4) en una rejilla recubierta de carbono de malla 400 y se incubaron durante 1 minuto. Después de eliminar la disolución excedente con papel de filtro, se lavó la rejilla con 4 µl de agua Milli-Q filtrada durante 1 minuto y se secó con papel absorbente. Las rejillas tiñeron negativamente con 4 µl de acetato de uranilo filtrado al 2 % (p/v) durante 1 minuto, se secaron con papel absorbente y se dejaron secar al aire durante al menos cinco minutos. Las rejillas se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM1400-Plus a 100 kV y se recogieron utilizando una cámara One View (Gatan) de 4k x 4k.

Espectroscopía de dicroísmo circular

45 La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) se realizó mediante un espectrómetro Jasco J715 y se recogieron espectros por triplicado a una temperatura mantenida de 21 °C. Las muestras de proteína se colocaron en cubetas de cuarzo de 0,02 mm de longitud de trayectoria (Hellma) y se escanearon de 180 a 320 nm. Los datos de CD se convirtieron a elipticidad molar ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ).

Cultivo celular y tratamiento con dGAE

55 Se cultivaron células indiferenciadas de neuroblastoma humano SH-SY5Y en medio Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12) suplementada con 10 % de suero fetal de ternero (FCS), 1 % de penicilina/estreptomocina (P/S) y 1 % de L-glutamina. Para la diferenciación, las células SH-SY5Y se pueden sembrar en placa a una densidad de 50.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos o 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Para la inmunofluorescencia se colocaron las células en cubreobjetos de Menzel-Gläser (Thermo Scientific). Para la generación de imágenes de células vivas se colocaron las células en placas de 35 mm en un cubreobjetos de 1,5 mm (Mattek). El primer día de diferenciación se reemplazaron los medios por medios de cultivo de bajo contenido en suero (DMEM/F-12 que contenía 1 % de FCS, 1 % de P/S y 1 % de L-glutamina) que contenía ácido retinoico *todo-trans* (RA) 10 µM (Sigma-Aldrich) y se incubaron las células durante 48 h. El día 3 se repitió este proceso con RA fresco y se incubaron las células durante 48 h más. El día 5 se lavaron las células una vez en medio de cultivo exento de suero para eliminar trazas de suero. Se añadió a las células medios de cultivo exentos de suero (DMEM/F-12 que contenía 1 % de P/S y 1 % de L-glutamina) que contenían

50 ng/ml de factor neurotrófico derivado del cerebro (STEMCELL Technologies) y se incubó durante 48 horas. Las células diferenciadas (dSH-SY5Y) estaban listas para uso en experimentos el día 7. Para el tratamiento con dGAE se expusieron las células a dGAE 1  $\mu$ M (soluble sin agitación o después de agitación) y se incubó durante 24 h. Todos los experimentos se realizaron utilizando células dSH-SY5Y.

5

#### Ensayo de viabilidad celular

Tras la adición de dGAE se midió la viabilidad celular mediante el kit de generación de imágenes de viabilidad celular ReadyProbes® (Life Technologies). El kit contiene un reactivo NucBlue® para etiquetar todas las células (azul) y un reactivo NucGreen® para etiquetar solo células muertas (verde). Para dGAE etiquetado se utilizó el reactivo NucRed® para etiquetar células muertas (rojo). Se añadió una gota de cada reactivo a las células en 500  $\mu$ l de medio como se describe en el protocolo del fabricante (Life Technologies). Se incubaron las células con los reactivos a 37 °C durante 15 minutos y se reemplazó el medio por una disolución de generación de imágenes de células vivas (Invitrogen™, Thermo Scientific). Se generaron imágenes de las células utilizando un microscopio Zeiss Cell Observer Axiovert 200M. La fluorescencia DAPI se capturó utilizando un filtro de excitación G 365 y un filtro de emisión LP 420 con un dicroico FT 395. La fluorescencia verde se capturó utilizando un juego de filtros FITC (filtro de excitación BP 450-490, filtro de emisión BP 515-565 y dicroico FT 510). Se utilizaron configuración de adquisición idénticas para todas las réplicas y se analizaron las imágenes utilizando FIJI. Se tomaron seis campos de visión por muestra y se analizó un promedio de 4500 células por condición. La proporción de muerte celular tratada con tampón se cuantificó mediante conversión de las imágenes a escala de grises, seguida de ajuste manual del umbral y conversión del mismo en una imagen binaria para resaltar las células vivas teñidas con DAPI. El número de células se contó automáticamente. Las células muertas se contaron de la misma manera y la muerte celular se expresó como un porcentaje de células tratadas con tampón.

#### Lisis celular y fraccionamiento

Las células se separaron del cubreobjetos mediante incubación en tripsina-EDTA al 0,25 % (Gibco™) y después se mezclaron con 5 ml de medio de cultivo. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 500 x g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en PBS helado y se centrifugó a 500 x g a 4 °C. Las células se lisaron en tampón de lisis Tritón al 1 % (Tritón X-100 al 1 % (v/v), NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 7,6) que contenía inhibidores de proteasa Halt™ (Thermo Scientific) e inhibidores de fosfatasa (Thermo Scientific) durante 15 minutos en hielo. Se centrifugaron las muestras a 16.000 x g durante 30 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante (fracción soluble en Tritón). El sedimento se resuspendió en tampón de lisis SDS (1 % de SDS (p/v), NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 7,6) que contenía inhibidores de proteasa y fosfatasa. Se centrifugaron las muestras a 16.000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante (fracción soluble en Tritón). La concentración de proteína en las fracciones solubles en Tritón se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce™ (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

#### SDS-PAGE y Western blot

En el caso de lisados celulares se mezclaron proteína soluble en Tritón (20  $\mu$ g) y un volumen igual de proteína insoluble en Tritón con tampón de muestra Laemmli (4 x) (Bio-Rad Laboratories) que contenía 5 % (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentó a 95 °C durante 5 minutos. En el caso de proteína recombinante se mezclaron 3  $\mu$ g con tampón de muestra sin agente reductor o ebullición. Se centrifugaron todas las muestras durante cinco minutos a 1000 x g y se cargaron las muestras en geles prefabricados Mini-PROTEAN® al 4-20 % (Bio-Rad Laboratories) y se ejecutaron a 120 V durante 1 h en tampón de ejecución de triglicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3) o hasta que el tampón de muestra llegó al final del gel. Para la tinción de Coomassie se lavó el gel tres veces en agua bidestilada durante cinco minutos y se tiñó con tinción de proteína Imperial™ (Thermo Scientific) durante 1 h y después se decoloró durante la noche en agua bidestilada. El gel teñido se escaneó con un escáner HP Photosmart C5280. Para western blot se transfirieron las proteínas separadas en el gel a la membrana de nitrocelulosa (0,45  $\mu$ m) a 200 mA durante 90 minutos. Las membranas se bloquearon en albúmina de suero bovino (BSA) al 5 % (p/v) en disolución salina tamponada con Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150mM) que contenía Tween-20 (TBS-T) al 0,1 % (v/v) durante 1 h de balanceo a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA al 5 % en TBS-T durante la noche a 4 °C. Se utilizaron los siguiente anticuerpos primarios y diluciones; Anti-Tau (policlonal, tau total) (Thermo Scientific) (1:2500), AT180 (anti-pT231) (Thermo Scientific) (1:1000), AT8 (anti-pS202-T205) (1:1000) (Thermo Scientific), anti-GAPDH (1:5000) (Abcam). Al día siguiente se incubaron las membranas en anticuerpo anti-ratón (HRP) con peroxidasa de rábano picante (1:5000) (Sigma-Aldrich) o anticuerpo anti-conejo HRP (1:5000) (Abcam) en BSA al 5 % en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 x 10 minutos en TBS- T entre incubaciones de anticuerpo. Las bandas de proteína se detectaron utilizando sustrato ECL (Clarity™, Bio-Rad) y las películas de rayos X se escanearon con un escáner HP Photosmart C5280. Se utilizó FIJI para cuantificar las bandas en unidades de densitometría arbitrarias. Se determinó la densidad de bandas correspondientes a tau de longitud completa (50-70 kDa) y se normalizó frente a la cantidad de GAPDH. Estos valores se utilizaron para calcular la proporción de tau total que estaba fosforilada, expresando las proporciones como porcentaje del grupo de control tratado con tampón. Para la cuantificación de la proteína insoluble y soluble en Tritón se calculó la proporción de tau en la fracción

65

insoluble y soluble utilizando las ecuaciones *insoluble/(soluble + insoluble)* o *soluble/(soluble + insoluble)*, respectivamente, y se expresó la misma como porcentaje del respectivo valor de control soluble o insoluble.

#### Inmunofluorescencia

Se aspiró el medio de cultivo celular de células dSH-SY5Y y se lavó una vez con PBS. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % (p/v) (PFA) en PBS durante 15 minutos seguido de tres lavados en PBS. Para la permeabilización se incubaron las células en Tritón X-100 al 0,25 % (v/v) en PBS durante 10 minutos. Las células se bloquearon en BSA al 2 % (p/v) (BSA) en PBS durante 1, seguido de tres lavados en PBS. Los anticuerpos primarios se diluyeron en BSA al 2 % (p/v) en PBS y se incubaron con las células durante 1 h. Los anticuerpos primarios y diluciones que se utilizaron fueron: AT180 (anti-pT231) (1:250) (Thermo Scientific), AT8 (anti-pS202-T205) (1:500) (Thermo Scientific) y Tau1 (tau desfosforilada a S195, 198, 199 y 202) (Merck Millipore). Las células se incubaron con anti-ratón de cabra Alexa Fluor® 594 (1:1000) (Invitrogen™, Thermo Scientific) diluido en BSA al 2 % (p/v) en PBS durante 1 h en la oscuridad. Las células se lavaron 3 veces en PBS entre incubaciones de anticuerpo. Las células se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando el medio de montaje Prolong Gold que contenía 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos montados se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 - 48 h antes de la generación de imágenes y se mantuvieron a 4 °C para almacenamiento a largo plazo. Se generaron imágenes de las células utilizando un microscopio confocal Leica SP8.

#### Etiquetado de orgánulos ácidos

Las células se colocaron en placas de 35 mm en un cubreobjetos de 1,5 mm (Mattek). Tras la diferenciación se añadió dGAE-488 (5 µM) a las células durante 24 h. Para el etiquetado de lisosomas y endosomas se diluyó LysoTracker® red (Life Technologies) en medio de cultivo a una concentración final de 50 nM y se incubó durante 90 minutos antes de la generación de imágenes utilizando un microscopio confocal Leica SP8.

#### Microscopía confocal

Toda la generación de imágenes de microscopía confocal se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal Leica SP8. La configuración del instrumento utilizaba canales/láseres PMT 3 y PMT Trans y se adquirieron imágenes con una lente de objetivo de inmersión en aceite HC PLAPoCs2 63 x/1,40. Las muestras se escanearon secuencialmente para evitar el sangrado espectral. Todas las imágenes se recogieron como pilas Z para todos los canales utilizando un tamaño de paso de 0,5 µm. Se tomaron cinco a diez pilas Z para cada muestra y se repitió cada experimento tres veces o más. Para supervisar la absorción en vivo de dGAE-488 se mantuvo el entorno a 37 °C con CO<sub>2</sub> y se utilizó la función de control de enfoque adaptativo para mantener planos focales constantes durante el transcurso del experimento.

#### Células de procesamiento para TEM

Se trataron células DSH-SY5Y con tampón que contenía Alexa Fluor® 488 o dGAE-488 10 µM recién preparado durante 24 h. Las células se lavaron una vez en PBS, se rasparon en un tubo y se centrifugaron a 500 × g durante 5 minutos. Se retiró el medio y se suspendieron las células en una mezcla 1:1 de medio de cultivo precalentado: PFA al 4 % (v/v) durante 15 minutos a 37 °C. Las células se centrifugaron a 500 × g durante 5 minutos y las células se resuspendieron en PFA fresco al 4 % (v/v) y glutaraldehído al 0,1 % (v/v) (GA) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) durante 3 h a temperatura ambiente. Las células fijadas se centrifugaron a 1.000 × g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se suspendió el sedimento en glicina 50 mM en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se centrifugaron a 1.000 × g durante 5 minutos y el sedimento se lavó tres veces con tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Se añadieron alrededor de 200 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 4 % (p/v) a las células y se centrifugó inmediatamente a 1.000 × g durante 10 minutos a 30 °C. El tubo se transfirió inmediatamente a 4 °C o a hielo durante 20 minutos para solidificar la agarosa. El sedimento celular incrustado en agarosa se transfirió a un nuevo tubo y se lavó 2-3 veces con tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). El sedimento se fijó posteriormente en una disolución de osmio reducida (tetróxido de osmio al 1 % (v/v), ferrocianuro de potasio al 1,5 % (p/v) en tampón cacodilato 0,1 M, pH 7,4) durante 1 h a 4 °C seguido de lavado de tres veces en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4) y tres veces en H<sub>2</sub>O bidestilada durante 5 minutos cada vez. El sedimento se deshidrató en una serie de etanol compuesta por etanol al 30, 50, 75, 90 y 95 % de etanol durante 15 minutos a 4 °C respectivamente, seguido de tres incubaciones en etanol al 100 % durante 20 a 4 °C respectivamente. Después se infiltró la muestra en una mezcla 2:1 de 100 % de etanol:resina Unicryl™ (durante 30 minutos seguida de una mezcla 1:2 de 100 % de etanol:resina Unicryl™ (BBI Solutions) durante 30 minutos. Finalmente, el sedimento se transfirió a una cápsula BEEM (Agar Scientific) y se infiltró en resina Unicryl™ completa durante la noche a 4 °C. La resina se curó utilizando fotopolimerización durante 48 h mediante iluminación desde la parte inferior de las cápsulas BEEM de una lámpara de proyección Philips tipo 6834 de 12 V, 100 W, a una distancia de 35 cm. Se tomaron secciones ultrafinas (70 nm) utilizando un cuchillo de diamante en un ultramicrotomo Leica EM UC7 equipado con un microscopio Leica M80 (Leica Microsystems) y se colocaron en rejillas de 300 mallas de níquel hexagonal de 3,05 mm (Agar Scientific Ltd) antes de proceder con el etiquetado con inmunoro.

Etiquetado con inmunoro TEM

Se utilizó un PBS modificado (pH 8,2) que contenía BSA al 1 %, 500 µl/L de Tween-20, Na-EDTA 10 mM y 0,2 g/L de NaN<sub>3</sub> (denominado PBS+) durante todos los procedimientos siguientes para todas las diluciones de anticuerpos y sondas de oro. Las secciones ultrafinas se bloquearon inicialmente con suero de cabra normal (dilución 1:10 en PBS+; Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se incubaron con anticuerpo primario anti-Alexa Fluor® 488 (1:50) (Thermo Scientific). Las secciones se lavaron tres veces en PBS+ durante 2 minutos respectivamente seguido de incubación con una sonda secundaria de IgG anti-conejo de cabra conjugada con partículas de oro de 10 nm a una dilución de 1:10 en PBS+ durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron tres veces en PBS + durante 10 minutos respectivamente y cuatro veces en agua destilada durante 5 minutos respectivamente. A continuación, las secciones delgadas marcadas con inmunoro se tiñeron posteriormente en acetato de uranilo al 2 % (p/v) durante 1 h antes de la generación de imágenes en el TEM.

Análisis de imágenes

Para todo el análisis de imágenes se utilizó el paquete de procesamiento de imágenes FIJI (<https://fiji.sc>) (J. Schindelin et al., Nat. Methods, vol. 9, nº 7, págs. 676-682, (2012)). Para la cuantificación de imágenes de fluorescencia, las imágenes se proyectaron en Z a la intensidad máxima. Se tomaron cinco a diez campos de visión de cada condición y se sometió a análisis un promedio de 50 células por condición. En primer lugar se dibujó una región de interés (el cuerpo celular) alrededor de una célula individual, excluyendo células que tenían núcleos fusionados. Se midió la intensidad integrada en el área y el valor medio de gris, así como tres selecciones alrededor de la célula sin fluorescencia (fondo). A continuación se calculó la fluorescencia celular total corregida (CTCF) utilizando la ecuación:

**CTCF = Densidad integrada - (Área de la célula seleccionada x Fluorescencia media de lecturas de fondo)**

Para la cuantificación de dGAE-488 internalizada se seleccionó y se sometió a análisis un plano focal del centro de la célula que contenía la máxima fluorescencia DAPI.

Análisis de datos

Los datos y los análisis estadístico se realizaron utilizando Microsoft Excel y GraphPad Prism 7. Todos los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM). Al comparar dos grupos se utilizó la prueba t no apareada de Student con corrección de Welch para determinar el significado estadístico. Al comparar más de dos grupos se utilizó el análisis de un factor de varianza (ANOVA) con prueba post-hoc de Dunnett para determinar diferencias entre los grupos experimentales y un grupo de control. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si  $p < 0,05$ .

Ejemplo 1: Examen de la formación de fibrillas por dGAE y dGAE-488

Se etiquetó con fluorescencia dGAE utilizando una marca Alexafluor 488 (dGAE-488) para permitir el seguimiento de la internalización de ensamblajes de dGAE y distinguir dGAE exógena de tau expresada endógenamente. En promedio, hubo 0,1 moles de colorante 488 por mol de proteína después de cada reacción de etiquetado. La marca Alexafluor etiqueta grupos amino en el extremo N terminal y en residuos de lisina y, por lo tanto, se examinan dGAE marcadas y no marcadas utilizando TEM, SDS-PAGE y espectroscopía CD para determinar si la etiqueta afecta la agregación y/o la formación de filamentos. Utilizando las condiciones no reductoras para la agregación establecidas previamente (Al-Hilaly et al., J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)), dGAE y dGAE-488 produjeron fibrillas retorcidas cortas morfológicamente similares (Figura 1A). SDS-PAGE de dGAE y dGAE-488 mostraron la presencia de la forma tanto 10/20-kDa como 12/24-kDa (monómero/dímero), predominando esta última en la preparación de dGAE no agitada a 0 h. Se ha demostrado previamente que dGAE es una bobina aleatoria a 0h y consiste principalmente en monómero y dímero soluble de SDS, aunque es probable que la disolución contenga una mezcla de especies de bajo peso molecular. Con el tiempo, la dGAE se autoensambla para formar filamentos ricos en hojas β (Al-Hilaly et al., J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)). la preparación de dGAE-488 mostró un ligero aumento de la intensidad de bandas de dímeros a las 0 h. Las micrografías electrónicas de las proteínas a las 0 h y a las 72 h muestran especies de tamaño similar tanto en las preparaciones de dGAE como en las de dGAE-488 (Figura S1), con especies redondas a las 0 h que oscilan entre 10-80 nm de diámetro (Figura S1Aii) y fibrillas a 72 h que oscilan entre 20-350 nm de longitud (Figura S1Bii). Después de la fibrilización inducida por agitación durante 72 h, hubo menos de la forma monomérica de 12-kDa para dGAE en comparación con dGAE-488, y más de ambas preparaciones se retuvieron en el pocillo de gel (Al-Hilaly et al., J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)). Los espectros de CD fueron similares para ambas preparaciones, con mínimos de intensidad similares a 198 nm (conformación de bobina predominantemente aleatoria) a 0 h y la disminución esperada en la señal de bobina aleatoria a 72 h, que acompañó a un aumento de

las estructuras de hoja  $\beta$  insolubles con un mínimo alrededor de 218 nm. Se ha demostrado previamente la señal de hoja  $\beta$  a 218 nm en el sedimento tras la centrifugación para separarlo del sobrenadante (Al-Hilaly et al., J. Mol. Biol., vol. 429, nº 23, págs. 3650-3665 (2017)). Los resultados presentados muestran que dGAE y dGAE-488 forman fibrillas similares estructural y morfológicamente.

5

#### Ejemplo 2: estudio de la inducción de la muerte celular por dGAE

Se aplicaron dGAE agregado (100  $\mu$ M agitados durante 72 h) y dGAE soluble (100  $\mu$ M 0 h, sin agitación) a una concentración de 1  $\mu$ M directamente a células dSH-SY5Y y se incubó durante 24 h. Se midió la viabilidad celular después de 24 h utilizando el ensayo ReadyProbes® para medir la muerte celular (Figura 2A). Aunque hubo cierto aumento en el porcentaje de células muertas debido a dGAE soluble en comparación con el tratamiento con tampón, esto no alcanzó significado estadístico (Figura 2B). Hubo un aumento significativo en la muerte celular tras la incubación con dGAE agregado ( $34 \pm 2,9$  %,  $p < 0,0001$ ) en comparación con control solo tampón ( $21,6 \pm 1,6$  %). El aumento de la concentración de dGAE soluble hasta 20  $\mu$ M no produjo aumento adicional en la muerte celular tras la incubación durante 24 h (Figura S2). dGAE y dGAE-488 mostraron efectos comparables sobre la muerte celular tras la incubación de células con proteína 1  $\mu$ M soluble o agregada, aunque la forma soluble de dGAE-488 era ligeramente más tóxica, pero sin diferencias después de 72 h de fibrilización. Los resultados muestran que dGAE agregado aplicado extracelularmente, pero no dGAE soluble, induce la muerte celular aguda.

10

15

20

#### Ejemplo 3: internalización de dGAE-488

Se investigó la absorción de dGAE soluble y agregado en células dSH-SY5Y para examinar si el estado de agregación afecta a la eficiencia de internalización. Se utilizó la forma de dGAE-488 etiquetado para permitir que la absorción se visualizara y se midiera una vez corregida la fluorescencia total de la célula. Se incubó dGAE-488 soluble o agregado (72h) con células dSH-SY5Y a 1  $\mu$ M durante 24 h. El análisis de microscopía confocal mostró que después de la exposición a dGAE-488 soluble se observó fluorescencia dentro de las células como tinción punteada (Figura 3A). La dGAE-488 agregado se internalizó de manera significativamente menos eficiente que la forma soluble ( $474 \pm 96$  frente a  $1.114 \pm 67$  AU por célula,  $p < 0,0001$ ; Figura 3B), y se observaron mayores acumulaciones de fluorescencia de dGAE-488 fuera de las células. La generación de imágenes de células vivas se utilizó para supervisar la internalización de dGAE-488 soluble. Parte de dGAE-488 permanece fuera de las células y aumenta su brillo y tamaño con el tiempo, lo que es coherente con un ensamblaje continuo en el medio. Se pudo detectar dGAE-488 internalizada dentro de las neuronas después de 2 horas de incubación y se descubrió que la absorción aumentaba con el tiempo (Figura 3C). A las 24 h se observaron tanto un patrón de tinción punteado distintivo como acumulaciones perinucleares más grandes (Figuras 3C y 3D). Aunque los intervalos de tiempo de la generación de imágenes de células vivas no permitieron un examen detallado del transporte intracelular, se observó que dGAE-488 internalizado se transportaba a lo largo de los procesos. Los resultados muestran que dGAE-488 etiquetado se internaliza por células dSH-SY5Y.

25

30

35

#### Ejemplo 4: cambios en la fosforilación tras la internalización de dGAE

Los resultados presentados sugieren que la incubación con dGAE agregada conduce a una muerte celular significativa tras la incubación durante solo 24 h, mientras que dGAE soluble se internaliza pero no parece ser significativamente tóxico tras 24 h de incubación. Por lo tanto, se investigó adicionalmente si la dGAE-488 soluble internalizada puede ser capaz de alterar el estado de agregación o fosforilación de tau endógena. Tras la exposición a dGAE-488 1  $\mu$ M soluble, las células se fijaron y se inmunotiquetaron utilizando anticuerpos de reconocimiento de epítomos de tau fuera de la secuencia de dGAE, lo que permitió la detección específica solo de tau endógeno (Figura 4A-C). Se examinaron las células para determinar la colocalización de dGAE-488 internalizada y tau endógena y se cuantificó la intensidad de fluorescencia de tau marcada en el cuerpo celular en células individuales para cada anticuerpo. El etiquetado con AT180 (tau fosforilada a T231; pT231) y AT8 (tau fosforilada a 202-205; pS202-pT205) estuvo ausente en gran medida en las células tratadas con tampón, pero aumentó significativamente después de la incubación con dGAE-488 soluble y algunas células mostraron colocalización de dGAE-488 con tau endógeno fosforilado (Figura 4A, B). Se ha demostrado previamente que la tau desfosforilada entre los aminoácidos 192-204 detectados mediante el anticuerpo Tau-1 se encuentra en el núcleo de células dSH-SY5Y (Maina et al., Acta Neuropath. Comm, Vol. 6 Nº 70, págs. 1-13 (2018)). Aquí se identifica el etiquetado de tau-1 en el núcleo como se esperaba, pero se ha descubierto que no hubo colocalización con dGAE-488. La cuantificación de fluorescencia Tau-1 mostró una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia en las células tratadas con dGAE-488 (Figura 4C), lo que puede indicar que la tau se fosforila. Los resultados muestran que dGAE-488 internalizada conduce a fosforilación acrecentada de tau endógena.

40

45

50

55

60

#### Ejemplo 5: efectos de la exposición de células a dGAE-488 soluble

Se realizaron Western blot de los lisados de células enteras para examinar el efecto de dGAE aplicada exógenamente sobre fosfoepítomos de tau endógena. La comparación de células incubadas con dGAE soluble con células de control tratadas con tampón no reveló cambios en los niveles de tau total ni aumentos marginales en la inmunoreactividad de AT8 o AT180 que no alcanzaron significado estadístico. Mientras que los Western blot miden los niveles totales de fosfo-tau en células, la generación de imágenes por inmunofluorescencia puede

65

subrayar la localización subcelular de cualquier aumento. Para determinar los efectos de dGAE-488 sobre la solubilidad de tau endógena en neuronas, se llevó a cabo una extracción secuencial de proteína tau de lisados celulares tras la solubilización con Tritón X-100 al 1 % y centrifugación (16.000 g durante 30 minutos). Tras la incubación con dGAE soluble durante 24 h, hubo una clara redistribución de proteína tau inmunotagueada con AT180 de las fracciones solubles de Tritón-X 100 a las fracciones insolubles de Tritón-X 100 tras la incubación con dGAE soluble en comparación con los controles tratados con tampón. La incubación de dGAE produjo una reducción de tau inmunorreactiva soluble con AT180 ( $83,0 \pm 5,5 \%$ ,  $p = 0,0201$ ) y un aumento de la forma insoluble ( $139,4 \pm 14,5\%$ ,  $p = 0,0352$ ) (Figura 5A, B). Inesperadamente, se observó una pequeña cantidad de tau en la fracción insoluble del tampón tratado con el control, pero la diferencia entre las células control y las tratadas era significativa. Además, en la fracción insoluble apareció una nueva especie de tau truncada con movilidad en gel de 20-25 kDa con epitopos localizados en la mitad N-terminal de la molécula de tau en la fracción insoluble. Esto era más intenso en las células incubadas con dGAE que en las incubadas solo con tampón. Los resultados muestran que la exposición de las células a dGAE-488 soluble conduce a un aumento de la tau endógena insoluble en tritón.

#### 15 Ejemplo 6: localización de dGAE-488 internalizada

Se observaron partículas fluorescentes punteadas intracelulares dentro del citoplasma, cerca del núcleo después de 24 h de exposición de las neuronas a dGAE-488 soluble. Este patrón de tinción era coherente con su localización en vesículas citosólicas. Por lo tanto, se examinó si la dGAE-488 internalizada se localizaba en compartimentos endosómicos/lisosomales. Se incubó dGAE-488 soluble con células durante 24 h y se tiñó con LysoTracker®, un colorante que etiqueta orgánulos ácidos (lisosomas y endosomas tardíos) durante 30 minutos y después se fijó y visualizó mediante microscopía confocal. Hubo un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de LysoTracker® en células expuestas a dGAE-488 soluble en comparación con células de control tratadas con tampón ( $211,9 \pm 9,9 \%$ ,  $p < 0,0001$ ; Figura 6Ai, Aii). La dGAE-488 internalizada mostraba una fuerte colocalización con LysoTracker® tras la cuantificación en pilas Z utilizando el coeficiente de correlación de Pearson ( $0,8382 \pm 0,036$ ,  $p < 0,0001$ ; Figura 6Bi, Bii). Los resultados muestran que la dGAE-488 internalizada está localizada en vesículas ácidas perinucleares.

#### 30 Ejemplo 7: ultraestructura de tau acumulada y dGAE-488 en células

Se utilizó TEM para examinar la ultraestructura de tau acumulada y dGAE-488 en células. Se expusieron dSH-SY5Y a dGAE-488  $10 \mu\text{M}$  soluble durante 24 h y se procesó para TEM de inmunoro utilizando un anticuerpo frente a Alexa Fluor® 488 para etiquetar dGAE-488 específicamente. Se observaron estructuras vesiculares y mitocondrias dentro de las células seccionadas, lo que confirma que el protocolo TEM preservaba la estructura celular (Figura 7A). Aunque no había estructuras fibrilares claras marcadas con anti-488 en el citoplasma, el examen a mayores aumentos reveló la presencia de partículas densamente marcadas con anti-488 dentro de las estructuras vesiculares unidas a la membrana, lo que sugiere una acumulación de proteína etiquetada con 488 en estos orgánulos (Figura 7C). También en células tratadas con vehículo pero sin etiquetado de oro estaban presentes estructuras vesiculares similares. El análisis para comparar los diámetros de los compartimentos unidos a la membrana que mostraban neuronas tratadas con células de dGAE-488 contenían vesículas de mayor diámetro que las células de control tratadas con tampón ( $448,4 \pm 22,5 \text{ nm}$  frente a  $303,7 \pm 20,0 \text{ nm}$ ,  $p < 0,0001$ ), siendo las vesículas más grandes de 700-800 nm y las más pequeñas de 200-300 nm (Figura 7B). Los resultados muestran que la dGAE-488 internalizada está empaquetada en compartimentos vesiculares.

#### 45 Ejemplo 8: prueba de los efectos de agentes sobre la acción de agregados de proteína tau en células neuronales

Se siembran células SHSY5Y en placas de 24 pocillos (30.000 células por pocillo) y se diferencian utilizando ácido retinoico en medio sérico depletado, como se ha descrito anteriormente, o se dejan indiferenciadas. Las células se tratan de una de las siguientes maneras: (1) se preincuban en presencia de un agente de interés antes de añadir agregados de tau o (2) se coincuban con un agente de interés y agregados tau administrados al mismo tiempo. Los tiempos de incubación son de 24 horas en cada etapa, lo que significa que el tiempo total es de 48 horas para (1) y de 24 horas para (2). Para que se vea la proteína internalizada es suficiente dGAE-488 ( $1 \mu\text{M}$ ) incubado con células durante 24 horas. Tras la incubación, las células se fotografían y se realiza un análisis de imágenes utilizando generación de imágenes para cuantificar la intensidad de fluorescencia dentro del cuerpo celular y proporcionar una medida de la internalización de dGAE-488. El número de células se cuenta para expresar el nivel de internalización como intensidad de fluorescencia media por célula para tener en cuenta diferentes números de células en los campos de visión. Se añaden fragmentos de dGAE-488 a  $1 \mu\text{M}$ . Los agentes para el cribado se pueden probar inicialmente a una única concentración de  $10 \mu\text{M}$ ; aquellos que muestran actividad inhibitoria se prueban entonces en un rango de concentraciones de  $2 \mu\text{M}$  a  $20 \text{ nM}$  y se informa de la actividad de compuestos como la concentración a la que se observa 50 % de inhibición de actividad. Las actividades a medir incluyen: (i) internalización de tau medida por fluorescencia intracelular; (ii) agregación intracelular de tau medida mediante cosecha de células, su lisis y la separación de tau agregada mediante ultracentrifugación y medición de tau agregada mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-tau; y (iii) citotoxicidad medida utilizando el ensayo ReadyProbes® para medir la muerte celular (Figura 2A). Todas las actividades están normalizadas a los resultados obtenidos para células tratadas sin agente o con vehículo de tratamiento. Los compuestos que exhiben una

inhibición del 50 % con agente a 2 µM o menos se consideran activos y se compara la actividad relativa con diferentes agentes.

Ejemplo 9: ensayos de inhibición de agregación de tau in vitro

5

Se diluyó la proteína dGAE en tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 (PB) con anticuerpo monoclonal s1 D12 en una relación de 4:1 proteína:Ab (dGAE 100 µM + s1D12 25 µM y dGAE 10 µM + s1D12 2,5 µM) o 1:1 (dGAE 25 µM + s1D12 25 µM).

10

"s1D12" se refiere a un anticuerpo monoclonal divulgado en la solicitud del Reino Unido nº GB2010652.2 presentada el 10 de julio de 2020, y una solicitud internacional (PCT) presentada el 9 de julio de 2021 en nombre de WisTa Laboratories Ltd. El epítipo unido por los CDR de la molécula de unión específica denominada "S1D12" en el presente documento puede estar dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 337 a 349 de SEQ ID NO: 1 o preferentemente dentro de una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 341 a 353 de SEQ ID NO: 1. El epítipo puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (VEVKSEKLDKDFKDR). S1D12 comprende CDRs VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3, en donde cada uno de tales CDRs comprende una secuencia de aminoácidos como las siguientes:

15

VHCDR1 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9 (NNAVG);

20

VHCDR2 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10 (GCSSDGTCCYNSALKS);

VHCDR3 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11 (GHYSIYGYDYLGTIDY);

25

VLCDR1 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 (SGSSSNVGGGNSVG);

VLCDR2 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13 (DTNSRPS); y

VLCDR3 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 (VTGDSTTHDDL).

30

s1D12 puede comprender:

(a) un dominio VH que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15 (QVQLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFSLNNAVGWVRQAPGKVPESLVGCSSDGTCCY YNSALKSRDLITRDTSKNQISLSLSSVTTDDAAVYYCTRGHYSIYGYDYLGTIDYWGPGLL VTVSS); y/o

35

(b) un dominio VL que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 16 (QAVLTQPSSVSGSLGQRVSITCSGSSSNVGGGNSVGWYQHLPGLKTIYDTNSRPSG VPDRFSGSRSGNTATLTINSLQAEDEGDYICVTGDSTTHDDLVLGSGTRTLTVLG);

40

o una variante humanizada de cualquiera de las mismas.

s1D12 puede comprender:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17 (QVQLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFSLNNAVGWVRQAPGKVPESLVGCSSDGTCCY YNSALKSRDLITRDTSKNQISLSLSSVTTDDAAVYYCTRGHYSIYGYDYLGTIDYWGPGLL VTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPA VLQSDLYTLSSSVTSSWPSQSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN LLGGPSVFIKDKVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPE EEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGYSYFMYSKLRVEK KNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK); y/o

50

(b) una cadena ligera que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18 (QAVLTQPSSVSGSLGQRVSITCSGSSSNVGGGNSVGWYQHLPGLKTIYDTNSRPSG VPDRFSGSRSGNTATLTINSLQAEDEGDYICVTGDSTTHDDLVLGSGTRTLTVLGGQPKSS PSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTQPSKQSNKMY MASSYLTLTARAWERHSSYSQCQVTHEGHTVEKSLSRADCS);

60

o una variante humanizada de cualquiera de las mismas.

Como control positivo, se preparó dGAE a una concentración final de 10, 25 o 100 µM en PB 10 mM. Los controles negativos consistían en dGAE con un anticuerpo IgG no tau en una relación de 4:1 (dGAE 10 µM + anti-ovoalbúmina 2,5 µM), o anticuerpo solo (s1 D12 25 o 2,5 µM y anti-ovoalbúmina 2,5 µM). Las muestras se agitaron a 700 rpm a 37 °C durante 3 días.

65

5 Se realizaron ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM), dicroísmo circular (CD) y tioflavina S (ThS) como se detalla en Al-Hilaly et. al. (2018) J. Mol. Biol. 430, 4119-4131. Brevemente, las rejillas de TEM se prepararon mediante adición de 4  $\mu$ L de muestra a una rejilla recubierta de carbono, seguido de un lavado con agua milli-Q filtrada, y después se tiñeron dos veces con acetato de uranilo al 2 %. Las rejillas se secaron al aire y después se generaron imágenes utilizando un microscopio electrónico JEOL que operaba a 80 kV.

10 Para CD, se coloraron 60  $\mu$ L de muestra en una cubeta de cuarzo de 0,1 mm y se colocaron en un espectropolarímetro JASCO. Se añadieron 100  $\mu$ L de ThS en tampón MOPS 20 mM a 50  $\mu$ L de cada muestra hasta una concentración final de 20  $\mu$ M, se mezcló bien, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se midió la intensidad de fluorescencia en un espectrofotómetro Cary Eclipse utilizando una longitud de onda de excitación de 440 nm. Las lecturas basales de PB 10 mM se restaron de las mediciones de CD y ThS.

15 Los resultados de estos tres experimentos indican que s1D12 inhibe el ensamblaje de dGAE en fibrillas in vitro.

20 En primer lugar, las fibrillas de dGAE se observaron fácilmente mediante TEM en muestras que utilizaban concentraciones tan bajas como 10  $\mu$ M; a la misma concentración en presencia de s1D12, no se presentaban fibrillas que sugirieran inhibición del ensamblaje. Las fibrillas estaban presentes cuando se utilizaban las mismas proporciones molares de dGAE:Ab con un anticuerpo no tau, lo que demuestra que el efecto inhibitorio es específico.

25 El dicroísmo circular informa sobre las características de la estructura secundaria de las proteínas en disolución. Aunque dGAE 10 y 25  $\mu$ M eran demasiado bajas en concentración para ser observadas utilizando CD, la señal está dominada por la señal característica de hoja  $\beta$  esperada de la estructura del anticuerpo. Con dGAE 100  $\mu$ M se revela una confirmación de bobina aleatoria cuando la señal CD del anticuerpo se resta de la señal de dGAE. Esto indica además que para s1D12:dGAE en una relación de 4:1, dGAE no se puede ensamblar en fibrillas ricas en hojas  $\beta$ .

30 Por último, se utilizó tioflavina S para informar sobre la presencia de fibrillas. ThS es un colorante que se une al amiloide, la estructura subyacente en fibrillas de dGAE y emite fluorescencia a una longitud de onda característica de alrededor de 483 nm cuando se excita con luz de una longitud de onda de 440 nm. Se observó claramente una señal positiva para las fibrillas de dGAE 25 y 100  $\mu$ M. Sin embargo, al incubarse con s1D12 en relaciones de 4:1 o 1:1, esta señal se eliminó, lo que respalda las observaciones anteriores de que no hay fibrillas presentes cuando dGAE se incuba con s1D12.

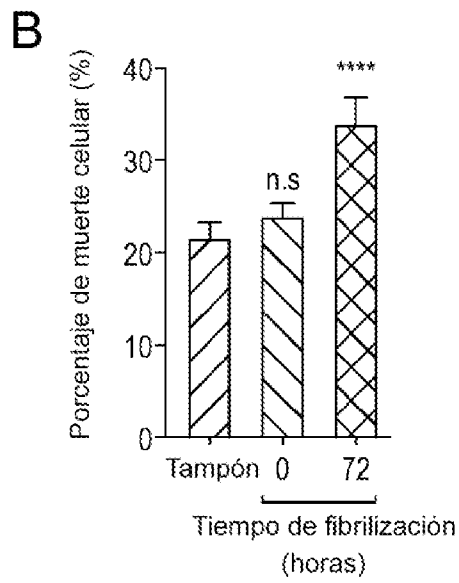
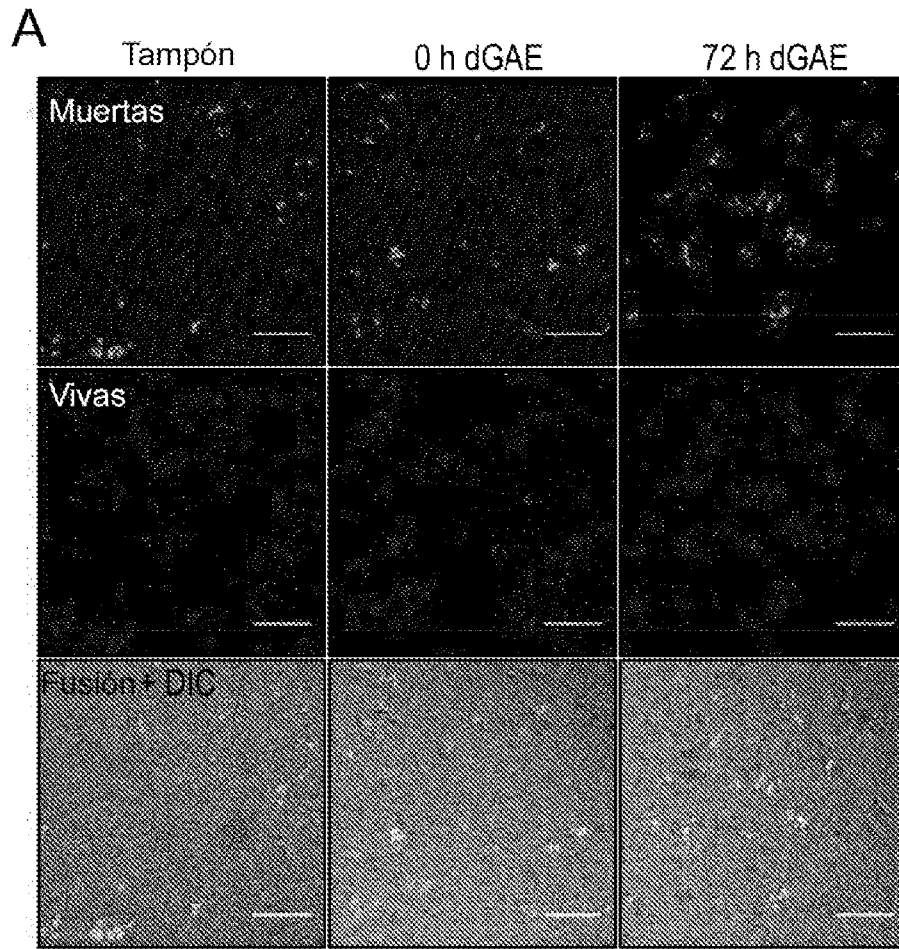
35 De forma colectiva, estos resultados proporcionan evidencia de que (i) s1D12 inhibe específicamente el ensamblaje de dGAE en fibrillas y (ii) estos ensayos se pueden utilizar para determinar la actividad inhibitoria de otros anticuerpos en la interrupción de la formación de fibrillas que son muy parecidas a los filamentos helicoidales apareados que están presentes en la patología tau característica de la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la citotoxicidad de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma a una célula neuronal que comprende los pasos de:
- 5 (a) cultivo de la célula neuronal en presencia del agente y posteriormente cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina; o
- (b) cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina y posteriormente el cultivo de la célula neuronal en presencia del agente; y
- 10 (c) determinación de la citotoxicidad del fragmento de proteína Tau para la célula neuronal después de realizar el paso (a) o el paso (b).
2. Un método de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la internalización de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma que comprende los pasos de:
- 15 (a) cultivo de la célula neuronal en presencia del agente y posteriormente cultivo de la célula neuronal con el fragmento la proteína Tau en ausencia de heparina; o;
- (b) cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina y posteriormente el cultivo de la célula neuronal en presencia del agente; y
- 20 (c) determinación de la internalización del fragmento de proteína Tau en la célula neuronal después de realizar el paso (a) o el paso (b).
3. Un método de cribado de un agente efectivo en la interrupción de la interacción de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma con la proteína tau endógena que comprende los pasos de:
- 25 (a) cultivo de la célula neuronal en presencia del agente y posteriormente cultivo de la célula neuronal con el fragmento la proteína Tau en ausencia de heparina; o;
- (b) cultivo de la célula neuronal con el fragmento de proteína Tau en ausencia de heparina y posteriormente el cultivo de la célula neuronal en presencia del agente; y
- 30 (c) determinación de la extensión de la interacción del fragmento de proteína Tau con la proteína tau endógena en la célula neuronal después de realizar el paso (a) o el paso (b).
4. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los fragmentos de proteína Tau como se definen anteriormente para uso según la invención pueden ser de 70 a 97 aminoácidos de longitud, opcionalmente de 71 a 97 aminoácidos de longitud.
- 35 5. Un método como se reivindica en la reivindicación 4, en donde el fragmento de proteína Tau se selecciona a partir del grupo de fragmentos de 71, 73, 94, 95, 97 aminoácidos de longitud.
- 40 6. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma se selecciona a partir del grupo formado por fragmentos de proteína Tau con secuencias de aminoácidos como se describen en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma.
- 45 7. Un sistema para el cribado de un agente efectivo en la inhibición de la citotoxicidad de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma que comprende (i) una línea celular neuronal; (ii) un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y (iii) una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina, y en donde los agentes son compuestos químicos o moléculas enlazantes específicas que pueden alterar el efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma en una célula neuronal.
- 50 55 8. Un sistema de cribado de un agente efectivo en la inhibición de la internalización de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma que comprende (i) una línea celular neuronal; (ii) un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y (iii) una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina, y en donde los agentes son compuestos químicos o moléculas enlazantes específicas que pueden alterar el efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma en una célula neuronal.
- 60 65 9. Un sistema de cribado de un agente efectivo en la interrupción de la interacción de un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una

- 5        secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma con la proteína tau endógena que comprende (i) una línea celular neuronal; (ii) un fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma; y (iii) una biblioteca de agentes; en donde la línea celular neuronal está exenta de heparina, y en donde los agentes son compuestos químicos o moléculas enlazantes específicas que pueden alterar el efecto de agregados de proteína tau o un fragmento de la misma en una célula neuronal.
- 10        10. Un sistema como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde los fragmentos de proteína Tau como se definen anteriormente para uso según la invención pueden ser de 70 a 97 aminoácidos de longitud, opcionalmente de 71 a 97 aminoácidos de longitud.
- 15        11. Un sistema como se reivindica en la reivindicación 10, en donde el fragmento de proteína Tau se selecciona a partir del grupo de fragmentos de 71, 73, 94, 95, 97 aminoácidos de longitud.
- 15        12. Un sistema como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el fragmento de proteína Tau que comprende al menos 70 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dGAE95 (SEQ ID NO:4) o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma se selecciona a partir del grupo formado por fragmentos de proteína Tau con secuencias de aminoácidos como se describen en SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 o una secuencia con al menos 85 % de identidad con la misma.





**FIG. 2**

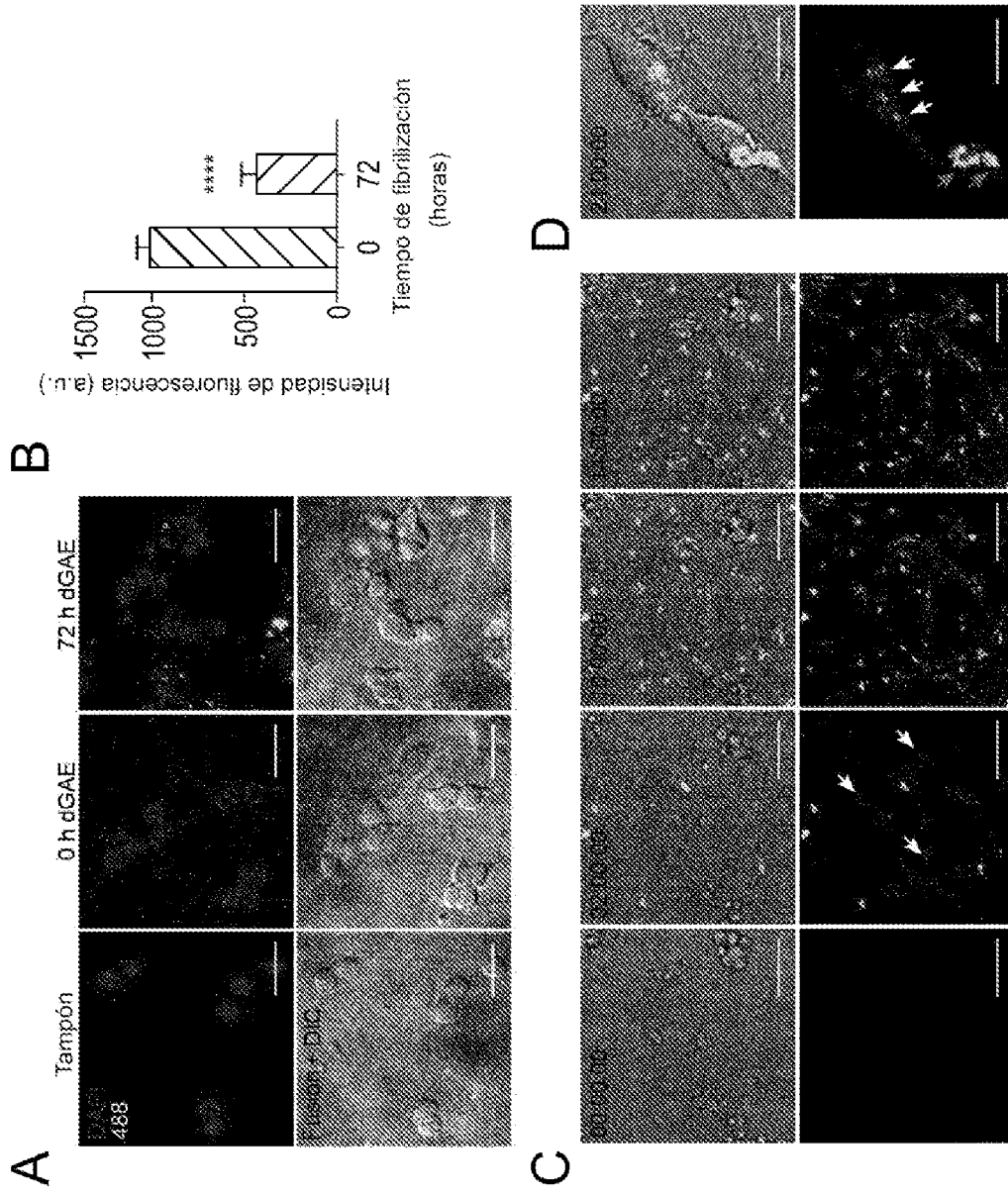


FIG. 3

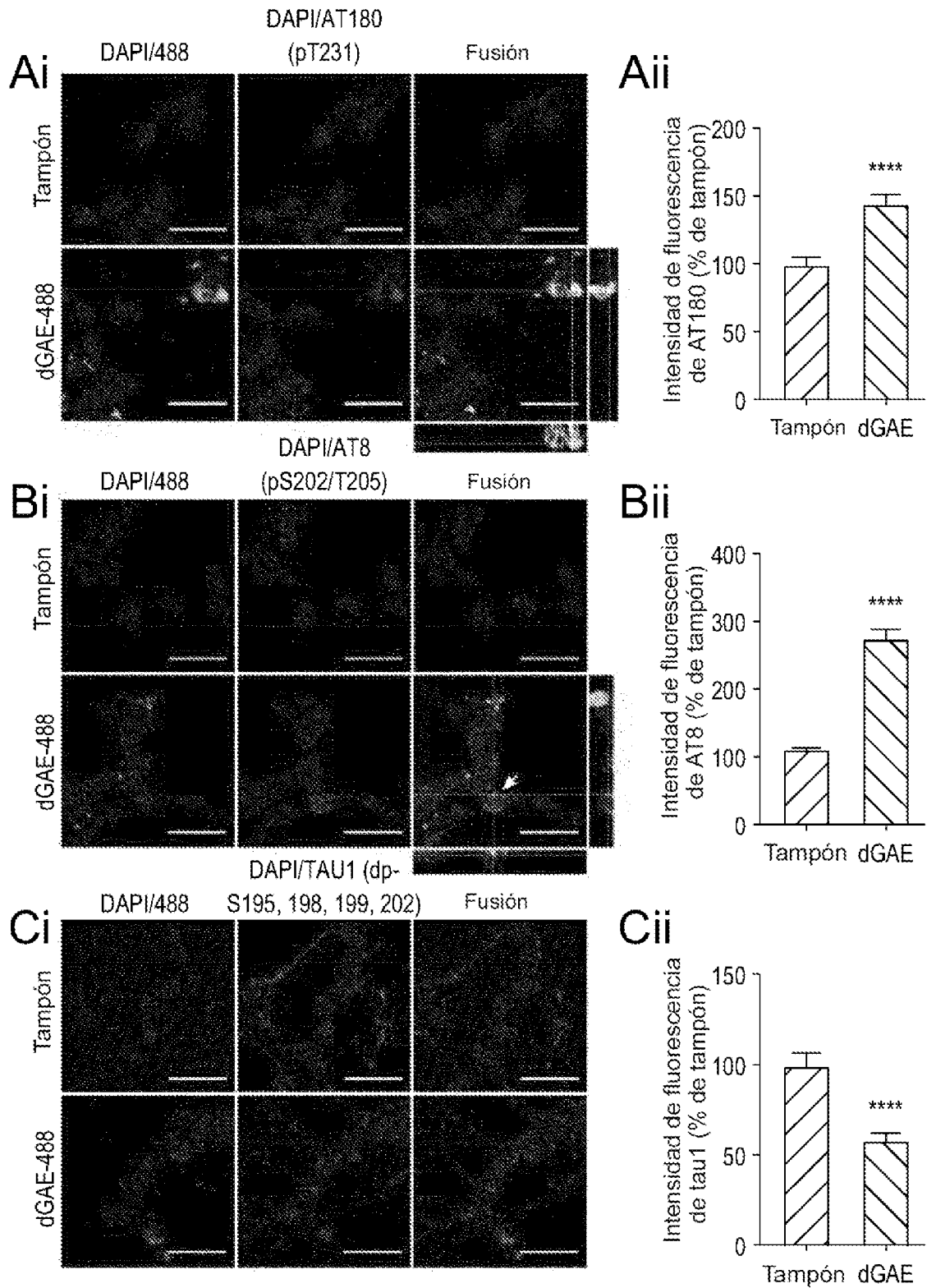


FIG. 4

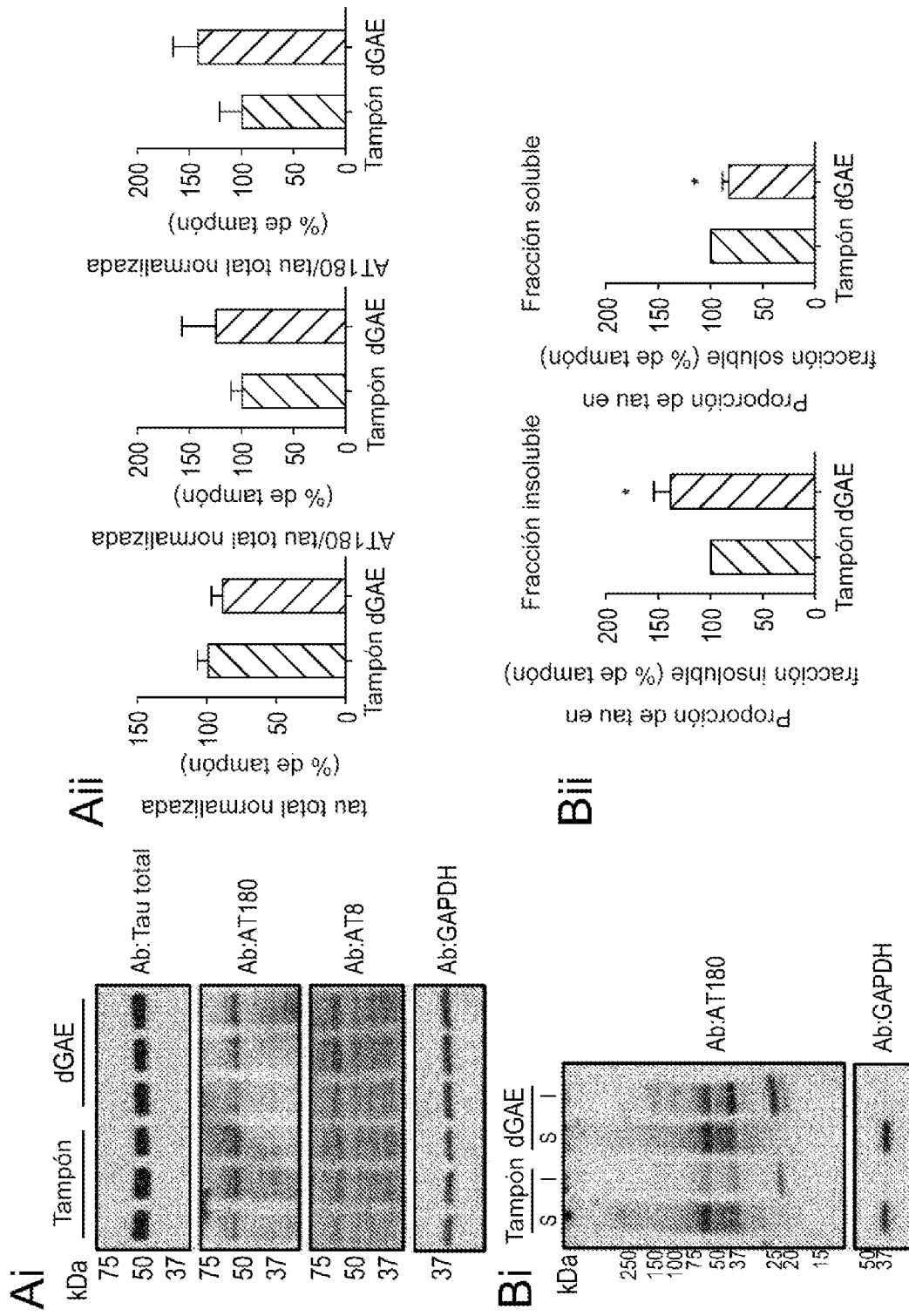


FIG. 5

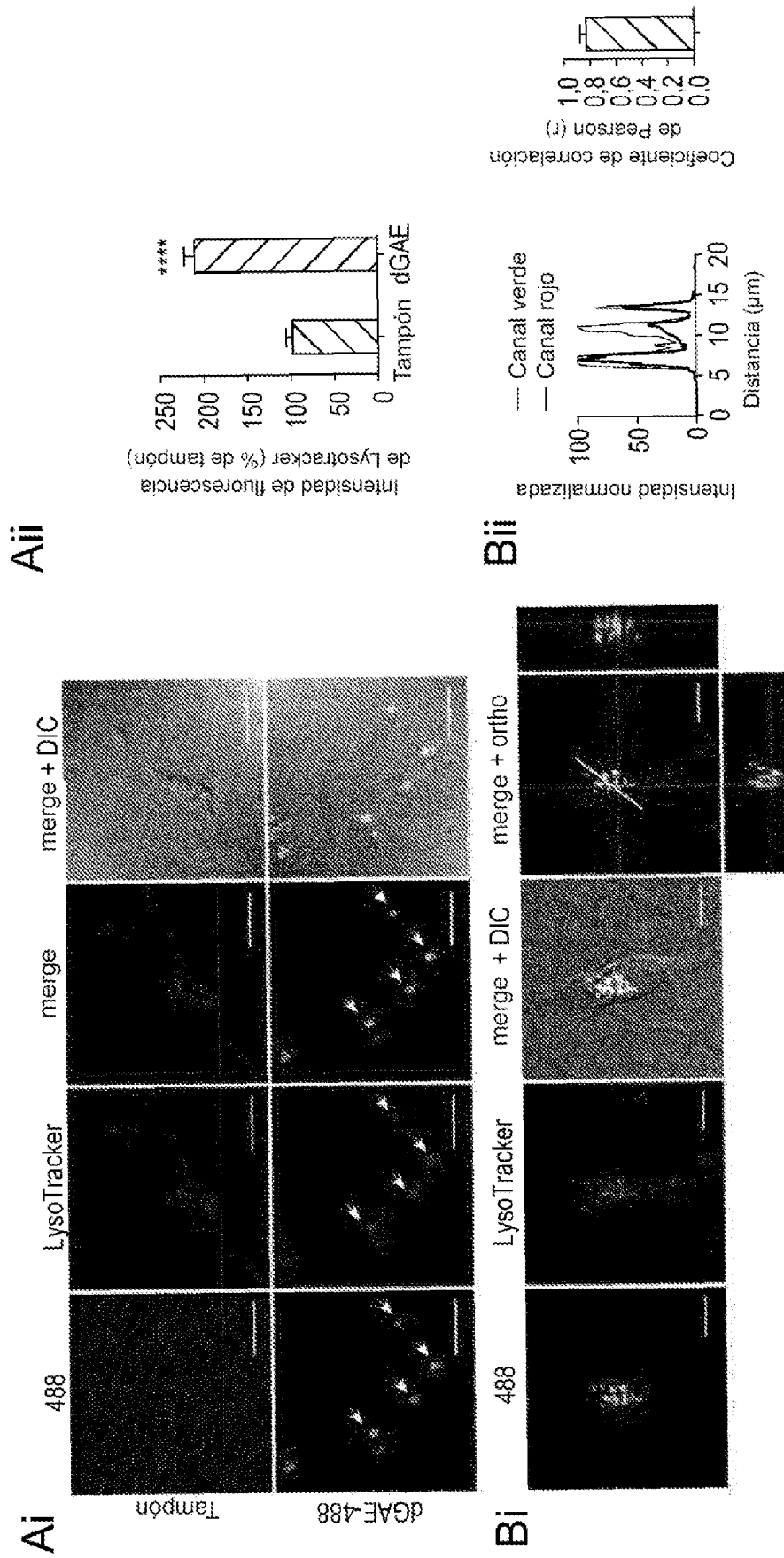


FIG. 6

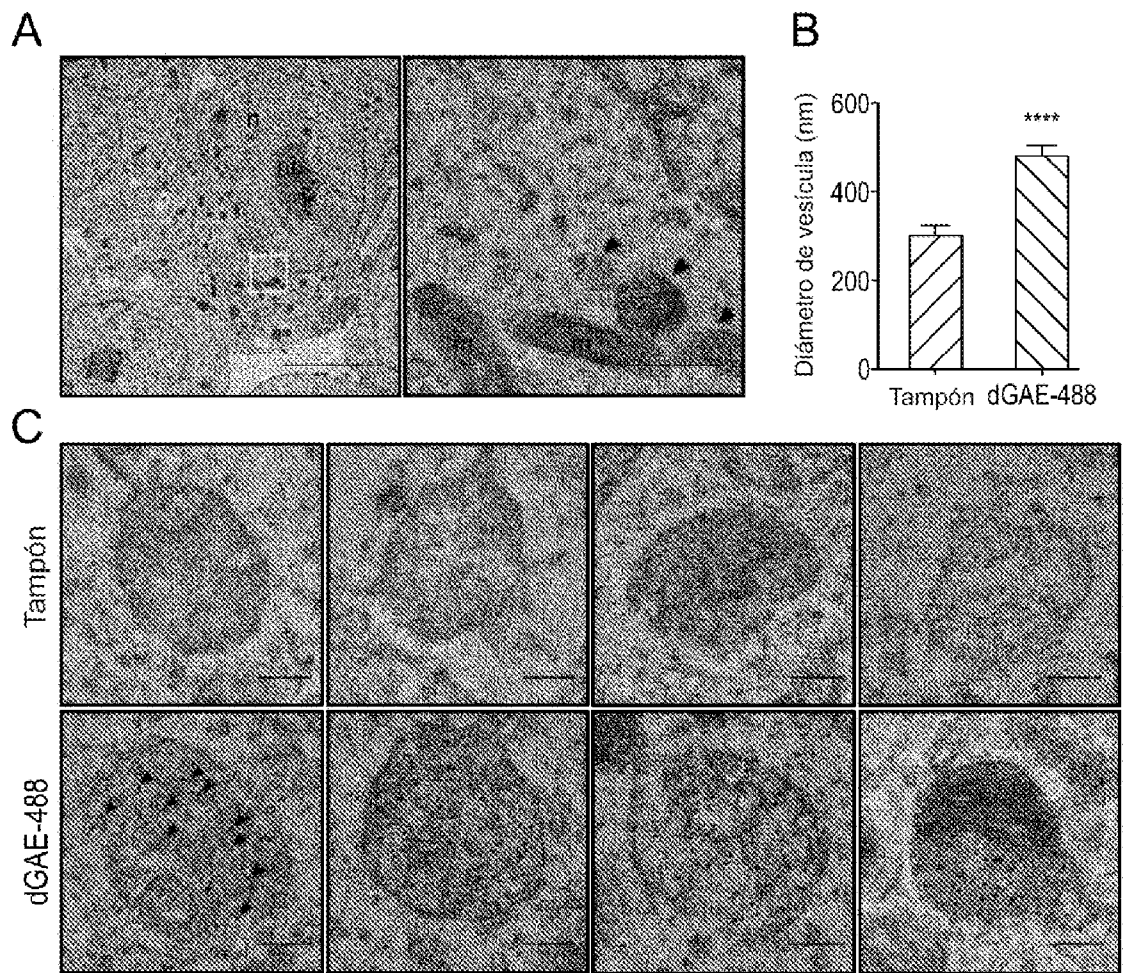


FIG. 7

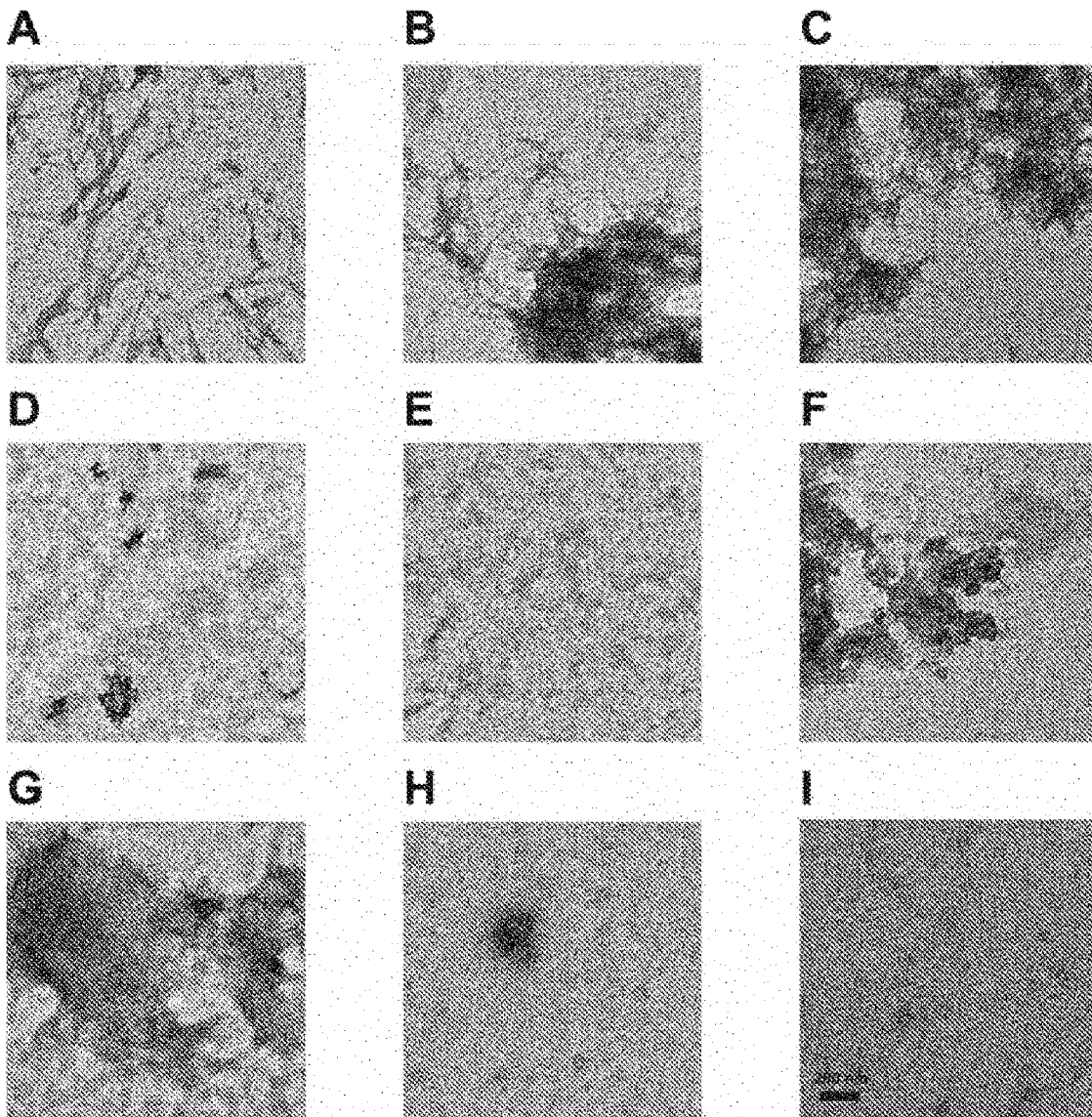


FIG. 8

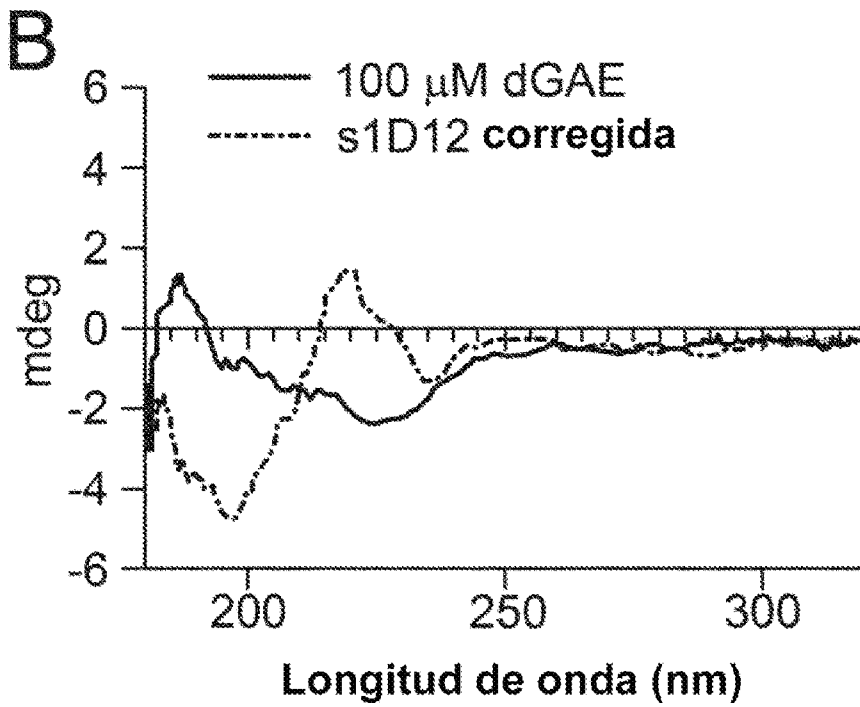
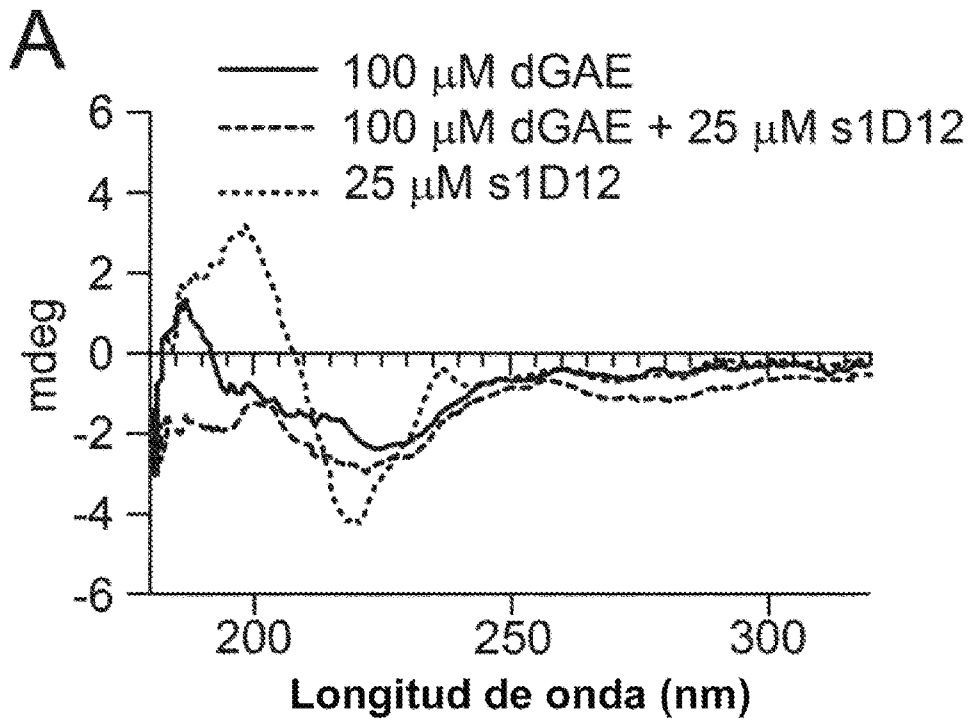


FIG. 9

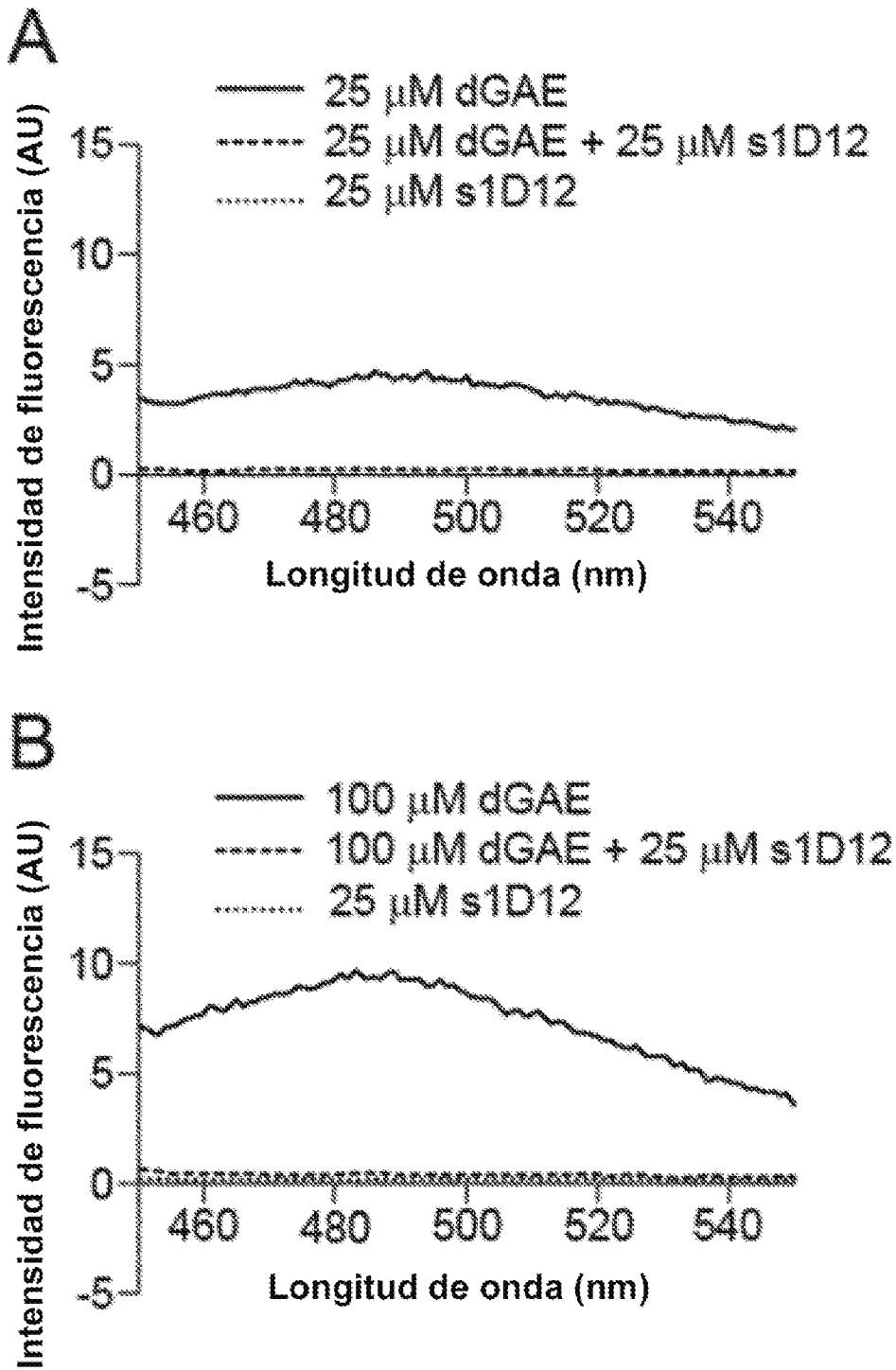


FIG. 10