

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 738 623**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 16179161 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3097925**

(54) Título: **Composición farmacéutica**

(30) Prioridad:

03.04.2009 EP 09157303

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2020

(73) Titular/es:

AC IMMUNE S.A. (50.0%)
EPFL Innovation Park, Building B
1015 Lausanne, CH y
KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN KU
LEUVEN RESEARCH & DEVELOPMENT (50.0%)

(72) Inventor/es:

PFEIFER, ANDREA;
MUHS, ANDREAS;
VAN LEUVEN, FRED y
PIHLGREN BOSCH, MARIA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 738 623 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

Composición farmacéutica

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el uso terapéutico en el tratamiento de enfermedades y trastornos provocados o asociados a marañas neurofibrilares. En particular, la invención se refiere a métodos y 5 composiciones para el uso terapéutico en el tratamiento de tauopatías que incluyen la enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés "Alzheimer's Disease").

Las marañas neurofibrilares son una característica neuropatológica principal en la AD. Se origina por la agregación de 10 proteína tau hiper-fosforilada y sus confórmeros. La AD comparte esta patología con muchas tauopatías neurodegenerativas, en particular con tipos especificados de demencia frontotemporal (FTD, del inglés "frontotemporal dementia").

La proteína Tau es una proteína libre soluble "no plegada de forma natural" que se une ávidamente a los microtúbulos (MT) para promover su ensamblaje y estabilidad. Los MTs son de importancia capital en la integridad citoesquelética de las neuronas –y por tanto para la correcta formación y funcionamiento de los circuitos neuronales, y en 15 consecuencia para el aprendizaje y la memoria. La unión de tau a MT está controlada por la fosforilación y desfosforilación dinámica, tal como se ha demostrado principalmente *in vitro* y en células no neuronales. Debido al gran número de posibles sitios de fosforilación (>80), la contribución exacta de cada uno, y la identidad de las quinasas responsables permanece mayormente sin definir *in vivo*.

En el cerebro con AD, la patología tau se desarrolla después de una patología amiloide, y por lo tanto probablemente 20 en respuesta a la misma, lo que constituye la esencia de la hipótesis de la cascada amiloide. Esto se basa y se indica en estudios con pacientes de AD y de síndrome de Down, y se corrobora en estudios con ratones transgénicos con patología amiloide y tau combinadas (Lewis et al., 2001; Oddo et al., 2004; Ribe et al., 2005; Muylraert et al., 2006; 25 2008; Terwel et al., 2008).

La coincidencia temporal de ambas patologías en pacientes de AD humanos, así como los mecanismos que unen la 25 patología amiloide con la tau, siguen siendo principalmente desconocidos, pero se propone que implican la activación de mecanismos de señalización neuronal que actúan sobre, o a través de, GSK3 y cdk5 como "quinasa-tau" principales (revisado por Muylraert et al., 2006, 2008).

La hipótesis de que la tauopatía no es un efecto secundario inocente sino un ejecutor patológico principal en la AD 30 está basada en sólidas observaciones genéticas, patológicas y experimentales que se corroboran plenamente unas a otras:

- 30 • en los casos de AD familiar de aparición temprana que son debidos a mutaciones en el precursor de proteína amiloide (APP) o presenilina, la causa patogénica obligada es la acumulación amiloide, pero invariablemente la patología comprende tauopatía colateral, idéntica a la de los casos de AD esporádicos de aparición tardía.
- 35 • la gravedad de la disfunción cognitiva y de la demencia se correlaciona con la tauopatía, no con la patología amiloide, ejemplificada lo más recientemente por varios estudios clínicos de fase 1 y 2 que incluyen la obtención de imágenes PIB-PET para amiloide e identifican muchos individuos "falsos positivos" cognitivamente normales con una elevada carga amiloide de cerebro.
- 40 • en la FTD familiar, la tauopatía está provocada por tau mutante y produce la neurodegeneración directamente, sin patología amiloide.
- en modelos experimentales de ratón los defectos cognitivos producidos por una patología amiloide son aliviados casi completamente mediante la ausencia de proteína tau (Roberson et al., 2007).

Estos argumentos combinados apoyan la hipótesis de que la proteína tau desempeña un papel fundamental en la pérdida cognitiva en la AD y en tauopatías neurodegenerativas relacionadas.

Un tratamiento emergente destacado de la AD es mediante inmunoterapia pasiva con mAbs específicos, para eliminar péptidos amiloideos y sus agregados, que se supone que son neurotóxicos o sinaptotóxicos.

45 Se prevé que una inmunoterapia dirigida contra la patología tau, tal como se propone en la presente memoria, compensa los confórmeros de proteína tau patológicos, los cuales se sabe o se postula que producen neurodegeneración. Se propone que la patología amiloide en la AD producida y los agregados intraneuronales de proteína tau hiper-fosforilada actúan sinérgicamente en la cascada cognitiva y degenerativa de eventos patológicos 50 que van desde una afección cognitiva moderada (MCI) hasta la demencia severa de la AD. La combinación de medicación dirigida contra tau con una de acción amiloide (o cualquier otra) constituirá por lo tanto el tratamiento preferido y sustancialmente más eficaz de la AD.

Otras estrategias terapéuticas dirigidas a la proteína tau son escasas y comprenden principalmente:

- inhibidores de las quinasas que se creen que aumentan la fosforilación de tau hasta niveles patológicos.
- compuestos que bloquean la agregación citoplásmica de proteína tau hiper-fosforilada.

Estas estrategias adolecen de diversas desventajas en especificidad y eficacia, un problema que comparten con los intentos de modificar el metabolismo de APP y amiloide, que enfatizan todos en la importancia de una búsqueda continua de opciones de tratamiento adicionales, que incluyen la inmunoterapia contra tau.

Prácticamente no se han destinado esfuerzos a definir –mucho menos a tratar– los confórmeros tau patológicos *in vivo*. En el ensayo clínico de fase II Aβ42, la patología de maraña no parece que fuera bien considerada o que fuera analizada con mucha profundidad (Nicoll et al., 2003, Masliah et al., 2005). Por otro lado, la inmunoterapia experimental dirigida a amiloide en un modelo de ratón preclínico con patología de tipo AD combinada también demostró un efecto sobre la patología tau, aunque los agregados de tau persistieron (Oddo et al., 2004).

10 Han surgido algunas dudas sobre la posibilidad de abordar la proteína tau intra-celular mediante inmunoterapia. Éstas han sido respondidas por el estudio experimental más reciente en un modelo de ratón de tauopatía realizado por Asuni y colaboradores (Asuni et al., 2007). Demostraron una reducción en la patología de maraña así como mejorías funcionales mediante vacunación con un fosfo-péptido derivado de proteína tau. Estos datos corroboran los informes previos de inmunoterapia aplicada a sinucleína α en un modelo de enfermedad de Parkinson (PD, del inglés “Parkinson’s Disease”) (Masliah et al., 2005) y de superóxido dismutasa en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Urushitani et al., 2007). Estas dos enfermedades son ejemplos de proteína intra-celulares que conducen a neurodegeneración, aunque a través de mecanismos aún no comprendidos totalmente. Por otro lado, la proteína tau recombinante de longitud completa producida y aislada de bacterias resulta no ser adecuada como vacuna, aunque los adyuvantes usados, es decir, de Freund completo y toxina pertussis, podrían haber contribuido al resultado negativo de dicho estudio (Rosenmann et al., 2006).

20 En el documento US 2008/050383 se describen péptidos derivados de proteína tau.

25 Existe una necesidad no satisfecha de inmunoterapias pasivas y/o activas que funcionen para contrarrestar los confórmeros de proteína patológicos los cuales se sabe –o se supone– que producen trastornos neurodegenerativos, tales como la patología amiloide en la AD producida, por ejemplo, por agregados intra-neuronales de proteína tau hiper-fosforilada que son típicos tanto para AD como para amiloides.

30 Dicha necesidad no satisfecha podría satisfacerse dentro del alcance de la presente invención proporcionando métodos de inmunización pasivos y activos que usan vacunas basadas en liposomas (Nicolau et al., 2002; Muhs et al., 2007) y mAbs basados en fosfo-péptidos que imitan los principales fosfo-epítopos patológicos de la proteína tau. Estas acciones combinadas generan nuevos mAbs específicos contra los fosfo-epítopos lineales y conformacionales, simples y complejos, de la proteína tau, que se cree que son los responsables de la sinapto- y neuro-toxicidad en las tauopatías, incluyendo la AD.

35 La presente invención proporciona nuevos métodos y péptidos antigenicos según la invención y tal como se describe en la presente memoria y fragmentos funcionales de los mismos que incluyen composiciones que comprenden dichos péptidos antigenicos o dichos fragmentos de los mismos, para provocar una respuesta inmune altamente específica, particularmente específica de conformación, en un organismo, pero particularmente dentro de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que es altamente efectiva y capaz de prevenir o aliviar tauopatías, o los síntomas asociados a las tauopatías, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en dicho grupo de trastornos neurodegenerativos.

40 En particular, la presente invención se refiere a:

1. Una construcción antigenica que comprende un fosfo-péptido, en donde el fosfo-péptido está (A) modificado a través del enlace a un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica de un liposoma, y (B) reconstituido en un liposoma de tal modo que el fosfo-péptido es presentado sobre la superficie del liposoma, en donde dicho fosfo-péptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 45 a. la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;
- b. la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;
- c. la SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;
- d. la SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción

conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;

5 e. la SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;

f. la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;

10 g. la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada;

h. la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativas de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia no modificada.

15 2. La construcción antigénica según la realización 1, en donde dicho fosfo-péptido tiene una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:

a. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 2, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 2, y en donde el residuo de aminoácido 18 (P-Tyr₁₈) de la SEQ ID NO: 2 está fosforilado;

20 b. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 3, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 3, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 3 está fosforilado;

c. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 4, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 4, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂) y 205 (P-Thr₂₀₅) de la SEQ ID NO: 4 está fosforilado;

25 d. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 5, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 5, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 396 (P-Ser₃₉₆) y 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 5 está fosforilado;

30 e. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 6, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 6, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) y 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 6 está fosforilado;

f. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 7, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 7, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 7 está fosforilado;

35 g. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 8, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 8, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 8 está fosforilado;

h. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 9, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 9, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 9 está fosforilado.

40 3. La construcción antigénica según la realización 2, en donde

a. al menos dos de los sitios de fosforilación enumerados en la reivindicación 2(b)-2(f) de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOs: 3-7 están fosforilados; o

45 b. tres o cuatro de los sitios de fosforilación enumerados en la reivindicación 2(f) de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 están fosforilados.

50 4. Una construcción antigénica que comprende un fosfo-péptido, en donde el fosfo-péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y que presenta la misma actividad inmunogénica que el fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 5, en donde el fosfo-péptido está (a) modificado a través de al menos una cadena de ácido palmítico que facilita la inserción en la capa bilipídica de un liposoma, y (b) reconstituido en el liposoma de tal modo que el fosfo-péptido se presenta sobre la superficie del liposoma.

5. La construcción antigénica según cualquiera de las realizaciones precedentes, o una combinación del mismo, para uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, particularmente para uso en el tratamiento de tauopatías, particularmente para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 5 6. Una composición farmacéutica que comprende la construcción antigénica de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4 o una combinación de las mismas, junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que además comprende un adyuvante farmacéuticamente aceptable y/o un inmunomodulador farmacéuticamente aceptable, particularmente monofosforil Lípido A.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde el fosfo-péptido está tetrapalmitoilado.
- 10 9. Una composición farmacéutica que comprende una construcción antigénica que comprende un fosfo-péptido, en donde el fosfo-péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y que presenta la misma actividad inmunogénica que el fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 5, y el fosfo-péptido está (a) modificado a través de al menos una cadena de ácido palmítico que facilita la inserción en la capa bilipídica de un liposoma, y (b) reconstituido en el liposoma de tal modo que el fosfo-péptido se presenta sobre la superficie del liposoma, en donde la composición farmacéutica comprende además al menos un vehículo, diluyente y excipiente farmacéuticamente aceptable, y un adyuvante y/o inmunomodulador farmacéuticamente aceptable.
- 15 10. La composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones 6 a 9, para uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, particularmente para el uso en el tratamiento de tauopatía, particularmente para el uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que está producido por, o se asocia a, la formación de lesiones neurofibrilares o la patología cerebral predominante en la tauopatía, particularmente para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 a. enfermedades o trastornos que presentan la co-existencia de patologías tau y amiloide, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, la demencia pugilística, el síndrome de Down, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la miositis de cuerpo de inclusión, la angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, y la lesión cerebral traumática; y
- 25 b. enfermedades o trastornos que no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, y distrofia miotónica.
- 30 11. La composición farmacéutica para uso según la realización 10 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 35 12. Un método para usar la construcción antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una combinación de las mismas, o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de
- 40 a. un trastorno neurodegenerativo;
- b. una enfermedad o trastorno que está producido por la formación de lesiones neurofibrilares, o que está asociado a las mismas, y que presentan una coexistencia de patologías tau y amiloide;
- c. enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, y lesión cerebral traumática
- 45 d. una enfermedad o trastorno que no presente una patología amiloide distintiva, que incluyen el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico o distrofia miotónica.
- 50 13. Un método para producir una composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones 6 a 9, que comprende combinar la construcción antigénica con el vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Un método para producir una construcción antigénica de cualquiera de las realizaciones 1 a 4, que comprende:

a. modificar el fosfo-péptido mediante enlace al resto lipofílico o hidrofóbico que facilite la inserción en la capa bilipídica del liposoma, y

b. reconstituir el fosfo-péptido modificado en el liposoma de tal modo que el fosfo-péptido esté presente sobre la superficie del liposoma.

- 5 La presente descripción también se refiere a los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, que incluyen partes funcionales de los mismos, y a las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos, que son resultado de la respuesta inmune altamente específica, en particular específica de conformación, en un organismo tras la administración del péptido antigénico según la invención, y tal como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional del mismo, y la composición que comprende dicho péptido antigénico o fragmento del mismo para prevenir o aliviar tauopatías, o los síntomas asociados a las tauopatías, un grupo de enfermedades o trastornos asociados a la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en este grupo de trastornos neurodegenerativos.
- 10 10

Este grupo de trastornos neurodegenerativos puede subdividirse en dos sub-categorías. En una primera categoría se incluyen enfermedades y trastornos que muestran coexistencia de patologías tau y amiloide, que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion y lesión cerebral traumática.

20 En una segunda categoría se incluyen enfermedades y trastornos sin patología amiloide distintiva, que incluyen, aunque sin limitación, el complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, la enfermedad de Niemann-Pick, tipo C, la enfermedad de Pick, la gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis.

25 25

En particular, la presente invención proporciona nuevos métodos y composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos antigénicos según la invención y tal como se describen en la presente memoria, o fragmentos funcionales de los mismos, y anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, que incluyen las partes funcionales de los mismos, obtenibles tras la administración de los péptidos antigénicos según la invención, y tal como se describe en la presente memoria, o fragmentos funcionales de los mismos, a un animal hospedante, para retener o mejorar, pero particularmente para restaurar, más particularmente para restaurar completamente, la capacidad de memoria cognitiva en un mamífero, particularmente un humano, que padece de una enfermedad o trastorno asociado a la formación de lesiones neurofibrilares.

30 30

35 35

Un objetivo de la invención es proporcionar un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado o un fragmento funcional del mismo y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido que se puede obtener a partir de una proteína tau. En particular, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un fosfo-péptido antigénico, o un fragmento funcional del mismo, que imita un fosfo-epítopo patológico principal de la proteína tau, péptido o fragmento que es modificado adicionalmente mediante la unión o reconstitución con un vehículo, una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, y un método para producir dicho péptido o fragmento funcional del mismo y una composición farmacéutica, respectivamente, para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están provocados por la formación de lesiones de neurofibrilares, o que están asociados a la misma, comprendiendo la patología cerebral predominante en la tauopatía un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que presentan coexistencia de patologías tau y amiloide que incluyen, aunque sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen, aunque sin limitación, el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, distrofia miotónica.

40 40

45 45

50 50

55 55

60 60

La descripción se refiere a un péptido antigénico o a un fragmento funcional del mismo y a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que comprende entre 5 residuos de aminoácido y 30 residuos de aminoácido, particularmente entre 10 residuos de aminoácido y 25 residuos de aminoácido, particularmente entre 12 residuos de aminoácido y 22 residuos de aminoácido, particularmente entre 14 residuos de aminoácido y 20 residuos de aminoácido, particularmente entre 16 residuos de aminoácido y 18 residuos de aminoácido, respectivamente, de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, en donde dichas

secuencias presentan un patrón de fosforilación característico que está asociado a una afección o trastorno patológicos, particularmente una afección o trastorno asociados a la formación de lesiones neurofibrilares.

La presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico, o a fragmentos de la misma, que codifican el péptido antigénico o el fragmento funcional del mismo seleccionado del grupo de secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2, y tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 2, en donde el residuo de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 18 (P-Tyr₁₈) de la SEQ ID NO: 2 está fosforilado (T1).

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácido como la mostrada en la SEQ ID NO: 2, en donde el residuo de aminoácido 18 (P-Tyr₁₈) está fosforilado (T1).

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y en la SEQ ID NO: 4, respectivamente, y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 3, en donde al menos uno, particularmente al menos 2, particularmente al menos 3, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, están fosforilados.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhiben una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente, en donde al menos uno, particularmente al menos 2, particularmente al menos 3, pero especialmente todos los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) están fosforilados.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 4, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂) y 205 (P-Thr₂₀₅) de la SEQ ID NO: 4 están fosforilados.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 4, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂) y 205 (P-Thr₂₀₅) están fosforilados.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 3, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 3 están fosforilados.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 3, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) están fosforilados.

- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 5 y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 5, en donde al menos uno, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 396 (P-Ser₃₉₆) y 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 5 están fosforilados.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 5, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido 396 (P-Ser₃₉₆) y 404 (P-Ser₄₀₄) están fosforilados.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 6 y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 6, en donde al menos uno, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) y 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 6 están fosforilados.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 6, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) y 409 (P-Ser₄₀₉) están fosforilados.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7, y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 7, en donde al menos uno, particularmente al menos 2, particularmente al menos 3, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 7 están fosforilados.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhiben una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 7, en donde al menos uno, particularmente al menos 2, particularmente al menos 3, pero especialmente todos los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) están fosforilados.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8 y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 8, en donde el residuo de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 8 está fosforilado.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 8, en donde el residuo de aminoácido 409 (P-Ser₄₀₉) está fosforilado.
- En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o dicho fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 95%, particularmente al menos un 98%, particularmente al menos un 99%, de identidad de secuencia con respecto a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 9 y que tiene la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 9, en donde el residuo de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 9 está fosforilado.

En una realización, la invención se refiere a un péptido antigénico, particularmente a un péptido antigénico modificado según la presente invención, o a un fragmento funcional del mismo, y a una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo, péptido o fragmento que exhibe una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 9, en donde el residuo de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) está fosforilado.

5 La presente descripción también comprende un péptido antigénico modificado según la presente invención, o un fragmento funcional del mismo, y una composición farmacéutica que comprende dicho péptido antigénico modificado o dicho fragmento funcional del mismo, péptido que es esencialmente idéntico a los péptidos antigénicos mencionados anteriormente, tal como se muestra en las SEQ ID Nos: 2 a 9, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dichos péptidos antigénicos de las SEQ ID Nos: 2 a 9, pero en particular un fragmento de péptido variante que es una variante modificada conservativamente de dichos fragmentos, en donde las alteraciones dan como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, particularmente de entre uno y 10 aminoácidos, más particularmente de entre uno y 6 aminoácidos, incluso más particularmente de entre uno y 4 aminoácidos, pero especialmente de entre uno y 3 aminoácidos, por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporciona aminoácidos similares son bien conocidas en la técnica y se describen más adelante en la presente memoria. La sustitución conservativa debe realizarse preferiblemente de tal modo que la carga neta total del péptido, así como la distribución de carga a lo largo de la molécula de péptido, permanezcan esencialmente inalteradas.

10 En la presente invención también se comprende un fragmento de péptido variante, particularmente un péptido antigénico variante modificado según la presente invención, y una composición farmacéutica que comprende dicho fragmento de péptido variante, péptido que es esencialmente idéntico a los fragmentos de la invención identificados anteriormente y que tiene sustancialmente la misma actividad biológica que dichos fragmentos, en donde se han eliminado uno o más residuos de aminoácido.

15 En una realización adicional, el péptido según la invención, o un fragmento funcional del mismo, es proporcionado en la forma de un polímero seleccionado del grupo que consiste en un polímero de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 30 y 50 unidades monoméricas, en donde las unidades monoméricas que constituyen dicho polímero siempre son idénticas o son unidades monoméricas diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en un péptido de acuerdo a la invención y tal como se describe en la presente memoria, particularmente un péptido como el mostrado en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, o un fragmento funcional del mismo y péptidos variantes.

20 En una realización, el péptido antigénico de acuerdo con la invención y tal como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional del mismo, es modificado a través de la unión o la reconstitución en un vehículo, particularmente un vehículo que también tenga funcionalidad como adyuvante, dando como resultado una construcción antigénica supramolecular. En una realización específica, el péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional del mismo, es modificado mediante la unión o la reconstitución en un liposoma tal como para producir una "construcción antigénica supramolecular" tal como se describe en la publicación WO 2005/081872.

25 En una realización de la invención, el péptido antigénico o un fragmento funcional del mismo es modificado adicionalmente para que exhiba una presentación única del péptido antigénico sobre la superficie del vehículo, que conduce a una exposición potenciada del antígeno y finalmente a la generación de anticuerpos que presentan un elevado grado de sensibilidad conformacional. En particular, el péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, es modificado a través de la asociación con un resto lipofílico o hidrofóbico, que facilita la inserción en la bicapa lipídica del liposoma vehículo/adyuvante inmune, particularmente con un resto lipofílico o hidrofóbico que actúa como anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma y que tiene unas dimensiones que conducen a que el péptido se posicione y se estabilice en estrecha proximidad con la superficie del liposoma.

30 En una realización de la invención, el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido, particularmente un ácido graso, un triglicérido o un fosfolípido que contiene una cadena hidrocarbonada de entre C12 y C24, pero especialmente un ácido palmítico.

35 En una realización específica de la invención, se proporciona un péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional del mismo, modificado con al menos dos moléculas de ácido palmítico unido covalentemente a los extremos N y C de dicho péptido antigénico, o de dicho fragmento funcional del mismo, y mediante reconstitución en un vehículo liposómico.

40 En una realización de la invención, los péptidos o fragmentos de los conjugados están acoplados cada uno a cuatro moléculas de ácido palmítico; por lo tanto están tetrapalmitoilados.

45 En una realización de la invención, se acoplan dos moléculas de ácido palmítico al extremo N-terminal y se acoplan dos moléculas de ácido palmítico al extremo C-terminal del péptido o fragmento.

50 En una realización adicional, la presente invención proporciona un péptido antigénico de acuerdo con la invención y tal como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional del mismo, modificado a través de la asociación a un resto lipofílico o hidrofóbico tal como, por ejemplo, ácido palmítico y reconstituido en un liposoma, en donde la preparación liposómica puede contener adicionalmente un adyuvante tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato

de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxicificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre, dando como resultado una construcción supramolecular.

5 En una realización, la invención se refiere a una construcción supramolecular de la invención y tal como se describe en la presente memoria, que comprende por molécula de vehículo uno o más péptidos antigenicos, particularmente dos o más péptidos antigenicos, según la invención y tal como se describen en la presente memoria, o un fragmento funcional de los mismos.

En una realización de la invención, dicha molécula vehículo es un liposoma.

10 En una realización de la invención, los dos o más péptidos antigenicos son péptidos iguales o diferentes, particularmente péptidos seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, o fragmentos funcionales de los mismos y péptidos variantes.

15 En una realización, la invención se refiere a una construcción supramolecular de la invención y tal como se describe en la presente memoria, que comprende por molécula de vehículo una combinación de dos o más péptidos antigenicos de la SEQ ID NO: 3 y de la SEQ ID NO: 4, o fragmentos funcionales de los mismos.

La descripción se refiere a un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a un confórmero de proteína tau patológico fosforilado, o a aquellas partes del confórmero que producen las propiedades patológicas de dicho confórmero, particularmente un fosfo-epítopo patológico de proteína tau.

20 En particular, la presente descripción proporciona un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que reconoce y se une a un confórmero de proteína tau patológico fosforilado o a las partes del confórmero que producen las propiedades patológicas de dicho confórmero, particularmente un fosfo-epítopo patológico de proteína tau, con una elevada especificidad.

25 Se describe que el anticuerpo, particularmente el anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo según la invención se une al confórmero de proteína tau patológico o a las partes del confórmero que producen las propiedades patológicas de dicho confórmero con una afinidad que es al menos un 40%, particularmente al menos un 50%, particularmente al menos un 60%, particularmente al menos un 70%, particularmente al menos un 80%, particularmente al menos un 90%, particularmente al menos un 95% y hasta un 100% mayor que la afinidad de unión para el confórmero tau no patológico no fosforilado.

Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo según la invención, que se une específicamente a marañas neurofibrilares (NFTs) y a hilos de neuropilo en cerebros con enfermedad de Alzheimer.

35 Se describen anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales o las partes funcionales de los mismos, que se unen directa y específicamente a un epítopo sobre la proteína tau, o a una combinación de epítopos, particularmente a un epítopo específico de un confórmero de proteína tau patológico fosforilado, particularmente a un fosfo-epítopo patológico de proteína tau como, por ejemplo, un epítopo como el representado por una secuencia de péptidos, o comprendido por la misma, seleccionada del grupo de secuencias proporcionadas como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, y fragmentos variantes de las mismas.

40 Se describe un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, que puede obtenerse inmunizando un animal con un péptido antigenico, particularmente una composición de péptido según la invención y tal como se ha descrito previamente en la presente memoria, particularmente una composición que comprende un péptido antigenico que comprende una secuencia de aminoácido como la proporcionada en la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9, incluyendo un fragmento funcional o un fragmento variante de las mismas.

45 Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma ACI-41-Ab1 depositada el 3 de marzo de 2010 como DSM ACC3043.

50 Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma ACI-41-Ab1 depositada el 3 de marzo de 2010 como DSM ACC3043.

Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 2B6 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3044.

- 5 Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 2B6 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3044.

Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 3A8 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3045.

- Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 3A8 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3045.

Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características

- 15 Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 4C1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3046.

20 Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 4C1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3046.

- 25 Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 5D10A3 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3047.

Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 5D10A3 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3047.

- 30 Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 6C10 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3048.

35 Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 6C10 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3048.

- Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 6H1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3049.

40 Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 6H1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3049.

- 45 Se describe un anticuerpo, particularmente a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 7C2 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM

Se describe un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo, producido mediante la línea celular de hibridoma 7C2 depositada el

- 50 El anticuerpo puede ser proporcionado en la forma de un anticuerpo químérico o un anticuerpo humanizado que aún

Examina las características de unión específicas descritas anteriormente.

Se describe una línea celular que produce un anticuerpo de la inmunidad somática descrito en la presente memoria.

- Se describe la línea celular de hibridoma 2B6 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3044.
- Se describe la línea celular de hibridoma 3A8 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3045.
- Se describe la línea celular de hibridoma 4C1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3046.
- Se describe la línea celular de hibridoma 5D10A3 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3047.
- 5 Se describe la línea celular de hibridoma 6C10 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3048.
- Se describe la línea celular de hibridoma 6H1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3049.
- Se describe la línea celular de hibridoma 7C2 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3050.
- Asimismo, también se incluyen en la presente memoria subclones y clones variantes de las líneas celulares de hibridoma específicas enumeradas anteriormente, que todavía produzcan un anticuerpo con las propiedades de unión 10 específica a tau de la presente descripción.
- En una realización específica, la invención proporciona una composición farmacéutica y un método para producir una composición farmacéutica que comprende un fragmento de péptido antígenico, particularmente un fragmento de péptido antígenico modificado mediante la unión a y/o la reconstitución en un vehículo, particularmente un vehículo liposómico, según la invención y tal como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional del mismo, 15 junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para retención o mejoría, particularmente para una restauración completa de la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece de pérdida de memoria.
- Se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que incluye cualquier anticuerpo 20 funcionalmente equivalente, o las partes funcionales del mismo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o las partes funcionales del mismo en una cantidad terapéuticamente efectiva junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- También es un objetivo de la invención proporcionar una composición farmacéutica según la invención y tal como se 25 describe en la presente memoria, y/o un método, para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están producidos por la formación de lesiones neurofibrilares, o que están asociados a la misma, la patología cerebral predominante en la tauopatía que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades o trastornos neurodegenerativos, que incluyen enfermedades o trastornos que presentan una coexistencia de patologías tau y amiloide que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que 30 no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen, aunque sin limitación, el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis 35 subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, distrofia miotónica, método que comprende la administración a un animal, particularmente a un mamífero o un humano, de una composición farmacéutica según la invención y tal como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente efectiva junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 En una realización específica la invención proporciona una composición farmacéutica según la invención y tal como se describe en la presente memoria, y/o un método, para retener o aumentar la capacidad de memoria cognitiva pero, particularmente, para restaurar completamente la capacidad de memoria cognitiva de un animal, particularmente de un mamífero o un humano, que padezca de pérdida de memoria, método que comprende la administración a un animal, particularmente a un mamífero o a un humano, de una composición farmacéutica según la invención y tal como se describe en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente efectiva junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición farmacéutica y un método para producir dicha 50 composición, así como un método para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un humano que padece una enfermedad y afección que está producida por la formación de lesiones neurofibrilares, o que está asociada a la misma, mediante la administración a dicho animal o humano de una composición farmacéutica según la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 En una realización de la invención, se proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un humano que padece de lesiones neurofibrilares que dan como resultado una tauopatía, de tal modo que se puede obtener una retención o una mejoría de los síntomas asociados a dicha

enfermedad o afección, tal como, por ejemplo, pérdida de memoria, particularmente una restauración completa de la condición original.

La composición farmacéutica que comprende un péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, tras administración a un animal, particularmente un mamífero, pero especialmente un humano, da como resultado fundamentalmente la generación de anticuerpos de los subtipos Th2 no inflamatorio, tal como, por ejemplo, el isotipo IgG1 e IgG2b y/o anticuerpos de la subclase de IgG independiente de células T, tal como, por ejemplo, IgG3 y/o no conduce a un aumento significativo de los marcadores inflamatorios del cerebro, particularmente de los marcadores de inflamación seleccionados del grupo que consiste en IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF α .

En un aspecto adicional de la invención, la composición farmacéutica que comprende un péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria puede usarse para inducir una respuesta inmune independiente de células T en el tratamiento de una enfermedad, afección o trastorno en un paciente, particularmente un paciente animal o humano, particularmente un paciente que necesite dicha respuesta independiente de células T, tal como, por ejemplo, un paciente inmuno tolerante o un paciente con células T activadas, en donde dicho péptido antigénico está modificado mediante la unión y/o la reconstitución en un vehículo, particularmente un vehículo liposómico, de tal modo que el antígeno es presentado sobre la superficie del vehículo, particularmente del liposoma.

En una realización, la composición antigénica de la invención tal como se describe en la presente memoria es efectiva como estimulante inmune.

En una realización específica de la invención, dicho péptido antigénico es presentado en una disposición altamente repetitiva sobre la superficie del liposoma. En una realización específica adicional, dicho antígeno no contiene un epítopo de célula T.

En una realización de la invención, la composición antigénica de la invención tal como se describe en la presente memoria se usa para tratar a un paciente inmuno tolerante o a un paciente con células T activadas, particularmente un paciente inmuno comprometido, particularmente un paciente que padece una enfermedad autoinmune, particularmente un paciente que padece una deficiencia de células T, particularmente una deficiencia de células T que está provocada por un agotamiento en dichos pacientes de células T CD4 y/o por una expresión reducida de CD14 y/o CD40L en las células T CD4.

Los anticuerpos de la descripción pueden usarse en un método de diagnóstico de una enfermedad o afección asociada a proteína tau en un paciente, que comprende la detección de la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o de un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína tau en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de

- 30 (a) poner la muestra o una parte o área específicas del cuerpo que se sospeche que contienen la proteína tau en contacto con dicho anticuerpo, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
- (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- (d) correlacionar la presencia o la ausencia del complejo inmunológico con la presencia o la ausencia de proteína tau en la muestra o en la parte o área corporal específica.

Se describe un método para diagnosticar una predisposición a una enfermedad o afección asociada a proteína tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmuno específica de un anticuerpo monoclonal o de un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína tau en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de

- 40 (a) poner la muestra o una parte o área específicas del cuerpo que se sospeche que contienen el antígeno tau en contacto con un anticuerpo según la invención y tal como se describe en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
- (b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno tau para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- (d) correlacionar la presencia o la ausencia del complejo inmunológico con la presencia o la ausencia de antígeno tau en la muestra o en la parte o área corporal específica,
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal.

en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente está padeciendo, o está en riesgo de desarrollar, una enfermedad o afección asociada a proteína tau.

Se describe un método para monitorizar una enfermedad residual mínima en un paciente tras el tratamiento con un anticuerpo o una composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones precedentes, en donde dicho método comprende

- (a) poner la muestra o una parte o área específicas del cuerpo que se sospeche que contienen el antígeno tau en contacto con un anticuerpo según la invención y tal como se describe previamente en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
- (b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno tau para formar un complejo inmunológico;
- 5 (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- (d) correlacionar la presencia o la ausencia del complejo inmunológico con la presencia o la ausencia de antígeno tau en la muestra o en la parte o área corporal específica,
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal.

10 en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado en comparación con un valor de control normal indica que dicho paciente sigue padeciendo una enfermedad residual mínima.

Se describe un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que esté siendo tratado con un anticuerpo o una composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones precedentes que comprende

- 15 (a) poner la muestra o una parte o área específicas del cuerpo que se sospeche que contienen el antígeno tau en contacto con un anticuerpo según la invención y tal como se describe previamente en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
- (b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno tau para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- (d) correlacionar la presencia o la ausencia del complejo inmunológico con la presencia o la ausencia de antígeno tau en la muestra o en la parte o área corporal específica,

20 (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento.

en donde una reducción de la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente tiene un potencial elevado de responder al tratamiento.

El anticuerpo puede usarse en un kit de ensayo para detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas a tau.

25 En particular, se describe un kit de ensayo para la detección y el diagnóstico de enfermedades y afecciones asociadas a proteína tau que comprende anticuerpos.

30 En particular un kit de ensayo que comprende un recipiente que contiene uno o más anticuerpos según la presente invención e instrucciones para usar los anticuerpos con el fin de unirse a antígeno tau para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de tal modo que la presencia o la ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o la ausencia de antígeno tau.

Éstos y otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes tras una revisión de la siguiente descripción detallada de la realización descrita, y de las reivindicaciones anexas.

Descripción breve de las figuras y las secuencias

35 Figura 1a: anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en ratones salvajes inmunizados con ACI-33. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en los sueros de ratones C57BL/6 salvajes que han recibido 3 inyecciones de ACI-33 en los días 0, 13 y 28, y que han sido sangrados en los días 1, 27 y 47. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

40 Figura 1b: anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en ratones TKO inmunizados con ACI-33. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en los sueros de ratones C57BL/6 salvajes que han recibido 3 inyecciones de ACI-33 en los días 0, 13 y 28, y que han sido sangrados en los días 1, 27 y 47. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

45 Figura 2a: anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones salvajes inmunizados con ACI-35. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en los sueros de ratones C57BL/6 salvajes que han recibido 5 inyecciones de ACI-35 en los días 0, 16, 30, 99 y 113, y que han sido sangrados en los días -1, 28, 42, 98 y 126. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

Figura 2b: anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones TKO inmunizados con ACI-35. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en los sueros de ratones TKO que han recibido 5 inyecciones de ACI-35 en los días 0, 16, 30, 99 y 113, y que han sido sangrados en los días -1, 28, 42, 98 y 126. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

Figura 3a: anticuerpos de IgG anti-Tau401-418 [pS404/pS409] en ratones salvajes inmunizados con ACI-36. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau401-418 [pS404/pS409] en los sueros de ratones C57BL/6 salvajes que han recibido 3 inyecciones de ACI-36 en los días 0, 13 y 28, y que han sido sangrados en los días -1, 27 y 47. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

5 Figura 3b: anticuerpos de IgG anti-Tau401-418 [pS404/pS409] en ratones TKO inmunizados con ACI-36. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau401-418 [pS404/pS409] en los sueros de ratones TKO que han recibido 3 inyecciones de ACI-36 en los días 0, 13 y 28, y que han sido sangrados en los días -1, 27 y 47. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

10 Figura 4a/4b: anticuerpos de IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214] y anti-Tau196-211 [pS202/pT205] en ratones salvajes inmunizados con ACI-41. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214] y anti-Tau196-211 [pS202/pT205] en los sueros de ratones C57BL/6 salvajes que han recibido 3 inyecciones de ACI-41 en los días 0, 20 y 35, y que han sido sangrados en los días -1, 34 y 48. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones. Se evaluaron los mismos sueros en ambos péptidos pTau.

15 Figura 4c/4d: anticuerpos de IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214] y anti-Tau196-211 [pS202/pT205] en ratones TKO inmunizados con ACI-41. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214] y anti-Tau196-211 [pS202/pT205] en los sueros de ratones TKO que han recibido 3 inyecciones de ACI-41 en los días 0, 20 y 35, y que han sido sangrados en los días -1, 34 y 48. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones. Se evaluaron los mismos sueros en ambos péptidos pTau.

20 Figura 5a: isotipos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] y anticuerpos de IgM en ratones salvajes inmunizados con ACI-33. Análisis de anti-Tau5-20 [pY18] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones C57BL/6 47 días después de la primera inmunización con ACI-33. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/3200 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

25 Figura 5b: isotipos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] y anticuerpos de IgM en ratones TKO inmunizados con ACI-33. Análisis de anti-Tau5-20 [pY18] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones TKO 47 días después de la primera inmunización con ACI-33. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/3200 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

30 Figura 6a: isotipos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] y anticuerpos de IgM en ratones salvajes inmunizados con ACI-35. Análisis de anti-Tau393-408 [pS396/pS404] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones C57BL/6 42 días después de la primera inmunización con ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2a), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) y 1/1600 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

35 Figura 6b: isotipos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] y anticuerpos de IgM en ratones TKO inmunizados con ACI-35. Análisis de anti-Tau393-408 [pS396/pS404] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones TKO 42 días después de la primera inmunización con ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/1600 (IgG2a), 1/1600 (IgG2b), 1/800 (IgG3) y 1/1600 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

40 Figura 7a: isotipos de IgG anti-Tau401-418 [pS404/S409] y anticuerpos de IgM en ratones salvajes inmunizados con ACI-36. Análisis de anti-Tau401-418 [pS404/S409] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones C57BL/6 47 días después de la primera inmunización con ACI-36. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2a), 1/400 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/400 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

45 Figura 7b: isotipos de IgG anti-Tau401-418 [pS404/S409] y anticuerpos de IgM en ratones TKO inmunizados con ACI-36. Análisis de anti-Tau401-418 [pS404/S409] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones TKO 47 días después de la primera inmunización con ACI-36. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/400 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 5 ratones.

50 Figura 8a: isotipos de IgG anti-Tau196-211 [pS202/pT205] y anticuerpos de IgM en ratones salvajes inmunizados con ACI-41. Análisis de anti-Tau196-211 [pS202/pT205] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones C57BL/6 48 días después de la primera inmunización con ACI-41. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) y 1/3200 (IgM), presentando la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

55 Figura 8b: isotipos de IgG anti-Tau196-211 [pS202/pT205] y anticuerpos de IgM en ratones TKO inmunizados con ACI-41. Análisis de anti-Tau196-211 [pS202/pT205] IgG1, 2a, 2b, 3 y anticuerpos de IgM en los sueros de ratones TKO 48 días después de la primera inmunización con ACI-41. Los resultados se expresan como D.O. a una dilución de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b), 1/1600 (IgG3) y 1/3200 (IgM), presentando la media + desviación

estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

Figura 9a/9b: sobrenadantes de hibridoma ACI-36 de matraces T25. Pantalla ELISA de TAUPIR y tau. 9a. Tinción TAUPIR de ratón biGT viejo usando sobrenadante no diluido. 9b. Análisis de los títulos de péptido anti-pTau T4.5, péptido anti-Tau T4.6, proteína anti-pTau y proteína anti-Tau de muestras de sobrenadante de clon no diluido. Los resultados se expresan como D.O.

Figura 10a/10b/10c: sobrenadantes de hibridoma ACI-41 de matraces T25. Pantalla ELISA de TAUPIR y tau. 10a. Tinción TAUPIR de ratón biGT viejo usando sobrenadante no diluido. 10b. Análisis de los títulos de péptido anti-pTau T8.5, péptido anti-Tau T8.6, proteína anti-pTau y proteína anti-Tau de muestras de sobrenadante de clon no diluido. Los resultados se expresan como D.O. 10c. Análisis de los títulos de péptido anti-pTau T9.5, péptido anti-Tau T9.6, proteína anti-pTau y proteína anti-Tau de muestras de sobrenadante de clon no diluido. Los resultados se expresan como D.O.

Figura 11: sobrenadante de hibridoma sobre placa recubierta con T8: Tau206-221 [pT212/pS214], T9: Tau196-211 [pS202/pT205] y hP-Tau. Análisis de anticuerpos anti-Tau206-221 [pT212/pS214], anti-Tau196-211 [pS202/pT205] y anti-hP-Tau de sobrenadante de clones de hibridoma. Los resultados se expresan como D.O. El mismo sobrenadante fue evaluado sin diluir en péptidos pTau y hP-Tau.

Figura 12: Manchas NFTs de anticuerpos de clon ACI-41-Ab1 (T89-F4) en cerebros humanos con AD. Secciones de cerebro de sujetos con AD (a, b y c), PSP (parálisis supranuclear progresiva) (d, e y f), y control sano (g, h e i) fueron teñidas usando AT100 (a, d y g) o ACI-41-Ab1 (T89-F4) en diluciones 1/1 (b, e y h) ó 1/30 (c, f e i).

Figura 13: Manchas NFTs de anticuerpo 5D10 en cerebros humanos con AD. Se tiñeron secciones de cerebro cortical de sujetos con AD usando anticuerpos 5D10 (a) ó AT100 (b).

Figura 14: Anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones inmunizados con ACI-35. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en el plasma de ratones C57BL/6 que recibieron 3 inyecciones de ACI-35 en los días 0, 14 y 28, y que fueron sangrados en los días -7, 7, 21, 35 y 56. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 15: Anticuerpos de isotipos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones inmunizados con AC-35. Análisis de anticuerpos anti-Tau393-408 [pS396/pS404] de IgG1, 2a, 2b y 3 en el plasma de ratones C57BL/6 35 días después de la primera inmunización con ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/1600 (IgG1), 1/3200 (IgG2a), 1/3200 (IgG2b) y 1/800 (IgG3) que muestran la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 16a: Anticuerpos de IgM anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones inmunizados con AC-35. Análisis de anticuerpos anti-Tau393-408 [pS396/pS404] de IgM en el plasma de ratones C57BL/6 35 días después de la primera inmunización con ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/6400 que muestra la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 16b: Anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 en ratones inmunizados con AC-35. Análisis de anticuerpos anti-Tau393-408 de IgG en el plasma de ratones C57BL/6 35 días después de la primera inmunización con ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/100 que muestra la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 17: Proliferación de células de bazo re-estimuladas con péptido Con A ó pTau/Tau. Análisis de la proliferación de células T específica de Tau mediante MTT en el día 56. Se agruparon los esplenocitos de 10 ratones de cada grupo y se re-estimularon con péptidos ConA, Tau393-408 [pS396/S404] ó Tau393-408.

Figura 18: Producción de citoquinas mediante ELISPOT de esplenocitos re-estimulados con péptidos Tau393-408 [pS396/S404] y Tau393-408. Análisis ELISPOT de la producción de citoquinas por células T específicas de P-Tau/Tau. Se agruparon los esplenocitos de 10 ratones de cada grupo y se re-estimularon con péptidos Tau393-408 [pS396/S404] y Tau393-408.

Figura 19: Anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en ratones inmunizados con ACI-33. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en los sueros de ratones TPLH que recibieron 5 inyecciones de ACI-33 en los días 0, 13, 28, 91 y 133, y que fueron sangrados en los días -1, 27, 41, 76, 104 y 135. Los resultados se expresan como D.I. media + desviación estándar obtenida del grupo de ratones: día -1, n = 10 ratones; días 27, 41 y 76, n = 9 ratones; 1 ratón murió debido a una pelea; día 104, n = 6, 3 ratones murieron por la patología; día 135, n = 2, 4 ratones murieron de la patología.

Figura 20: anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones inmunizados con ACI-35. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en los sueros de ratones TPLH que recibieron 5 inyecciones de ACI-35 en los días 0, 13, 27, 91 y 133 y que fueron sangrados en los días -1, 26, 40, 75, 103, 145 y 155. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida de los ratones del grupo. Días -1 y 26, n = 10 ratones; día 40, n = 9 ratones; día 75, n = 6; días 103 y 145, n = 4; día 155, n = 3. Todos los ratones murieron de la patología.

Figura 21: anticuerpos de IgG anti-Tau206-221 [pT212, pS214] en ratones inmunizados con ACI-39. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau206-221 [pT212, pS214] en los sueros de ratones TPLH que recibieron 5 inyecciones de ACI-39 en los días 0, 13, 28, 91 y 133 y que fueron sangrados en los días -1, 27, 41, 76, 104 y 135. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida de los ratones del grupo. Días -1, 27 y 41, n = 10 ratones; día 76, n = 7 ratones; día 104, n = 6; día 135, n = 2. Todos los ratones murieron de la patología.

Figura 22: anticuerpos de IgG anti-Tau196-211 [pS202, pT205] en ratones inmunizados con ACI-40. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau196-211 [pS202, pT205] en los sueros de ratones TPLH que recibieron 5 inyecciones de ACI-39 en los días 0, 13, 28, 91 y 133 y que fueron sangrados en los días -1, 27, 41, 76, 104 y 135. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida de los ratones del grupo. Días -1, 27 y 41, n = 10 ratones; día 76, n = 8 ratones; día 104, n = 6; día 135, n = 5. Todos los ratones murieron de la patología.

Figura 23: Anticuerpos de IgM y de isotipos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en ratones inmunizados con ACI-33. Análisis de anticuerpos anti-Tau5-20 [pY18] de IgG1, 2a, 2b, 3 y de IgM en el suero de ratones TPLH 41 días después de tres inmunizaciones con ACI-33. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/100 (IgG1), 1/200 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/100 (IgM) que muestran la media + desviación estándar obtenida de grupos de 9 ratones.

Figura 24: Anticuerpos de IgM y de isotipos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] en ratones inmunizados con ACI-35. Análisis de anticuerpos anti-Tau393-408 [pS396/pS404] de IgG1, 2a, 2b, 3 y de IgM en el suero de ratones TPLH 40 días después de tres inmunizaciones con ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/100 (IgM) que muestran la media + desviación estándar obtenida de grupos de 9 ratones.

Figura 25: Anticuerpos de IgM y de isotipos de IgG anti-Tau206-221 [pT212, pS214] en ratones inmunizados con ACI-39. Análisis de anticuerpos anti-Tau206-221 [pT212, pS214] de IgG1, 2a, 2b, 3 y de IgM en el suero de ratones TPLH 41 días después de tres inmunizaciones con ACI-39. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/100 (IgM) que muestran la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 26: Anticuerpos de IgM y de isotipos de IgG anti-Tau196-211 [pS202, pT205] en ratones inmunizados con ACI-39. Análisis de anticuerpos anti-Tau196-211 [pS202, pT205] de IgG1, 2a, 2b, 3 y de IgM en el suero de ratones TPLH 41 días después de tres inmunizaciones con ACI-40. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución no saturada de 1/100 (IgG1), 1/400 (IgG2a), 1/200 (IgG2b), 1/800 (IgG3) y 1/100 (IgM) que muestran la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 27: títulos de anticuerpos de IgG sobre diferentes péptidos y proteínas Tau en ratones inmunizados con ACI-33. Análisis de los títulos de anticuerpos de IgG en los sueros de los días -1 y 41 de ratones TPLH tras 3 inyecciones de ACI-33. Los resultados se expresan como D.O. que muestra la media + desviación estándar obtenida de grupos de 9 ratones.

Figura 28: títulos de anticuerpos de IgG sobre diferentes péptidos y proteínas Tau en ratones inmunizados con ACI-35. Análisis de los títulos de anticuerpos de IgG en los sueros de los días -1 y 40 de ratones TPLH tras 3 inyecciones de ACI-35. Los resultados se expresan como D.O. que muestra la media + desviación estándar obtenida de grupos de 9 ratones.

Figura 29: títulos de anticuerpos de IgG sobre diferentes péptidos y proteínas Tau en ratones inmunizados con ACI-39. Análisis de los títulos de anticuerpos de IgG en los sueros de los días -1 y 41 de ratones TPLH tras 3 inyecciones de ACI-39. Los resultados se expresan como D.O. que muestra la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 30: títulos de anticuerpos de IgG sobre diferentes péptidos y proteínas Tau en ratones inmunizados con ACI-40. Análisis de los títulos de anticuerpos de IgG en los sueros de los días -1 y 41 de ratones TPLH tras 3 inyecciones de ACI-40. Los resultados se expresan como D.O. que muestra la media + desviación estándar obtenida de grupos de 10 ratones.

Figura 31: Rotarod de ratones inmunizados con ACI-33 frente a ratones inyectados con PBS. Los ensayos rotarod se llevaron a cabo en cinco ocasiones diferentes referidas por la edad (meses) de los ratones TPLH.

Figura 32: Correlación entre los títulos de anticuerpo anti-Tau5-20 [pY18] y el ensayo rotarod. Se midió la correlación para los TPLH inyectados con ACI-33 de una edad de 7,8 meses. Los títulos de anticuerpos en suero de ratón se midieron mediante ELISA (D.O.) y el ensayo rotarod midió el tiempo que los animales permanecían sobre el aparato (tiempo).

Figura 33: Rotarod de ratones inmunizados con ACI-35 frente a ratones inyectados con PBS. Resultados de rotarod de ratones TPLH de 9,5 meses inmunizados con ACI-35 frente al grupo de control de PBS. ACI-35, n = 5; y PBS, n = 4; los otros ratones murieron debido a la patología presentada por el modelo.

Figura 34: cuantificación mediante FACS de CD3+CD4+ en ratones nude y salvajes tratados con ACI-33. Porcentaje de células "gated" durante el análisis, que fueron positivas en la tinción para CD3 y CD4, de ratones nude o salvajes o que recibieron ACI-33. Panel izquierdo: representación esquemática del análisis FACS en dos ratones de los grupos nude y salvaje. Panel derecho: cada columna representa la media y la SD para grupos de 6 ratones. Ratón nº5 y 6: ratones nude; Ratón nº7 y 8: ratones salvajes.

Figura 35: Anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en ratones nude y salvajes inmunizados con ACI-33. Análisis de anticuerpos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] en los sueros de ratones nude y salvajes que recibieron 3 inyecciones de ACI-33 en los días 0, 14 y 28, y que fueron sangrados en los días 2, 7, 21, 35 y 56. Los resultados se expresan como D.O. media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

10 Figura 36: Anticuerpos de IgM y de isótipos de IgG Anti-Tau5-20 [pY18] en ratones nude y salvajes inmunizados con ACI-33. Análisis de anticuerpos de IgM y de los isótipos Anti-Tau5-20 [pY18] IgG1, 2a, 2b, 3 en los sueros de ratones nude y salvajes 35 días después de tres inmunizaciones con ACI-33. Los resultados se expresan como D.O. de una dilución de 1/100 (IgG1), 1/100 (IgG2a), 1/100 (IgG2b), 1/100 (IgG3) y 1/100 (IgM) que muestran la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

15 Figura 37: Títulos de anticuerpos de IgG en los diferentes péptidos y proteínas Tau en ratones nude y salvajes inmunizados con ACI-33. Análisis de títulos de anticuerpos de IgG en los sueros del día 35 de ratones nude y salvajes tras 3 inyecciones de ACI-33. Los resultados se expresan como D.O. que muestra la media + desviación estándar obtenida del grupo de 6 ratones.

SEQ ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia de control T5: Tau 379-408 [pS396, pS404]

20 SEQ ID NO: 2 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 1 (T1): Tau 5-20 [pY18]

SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 8 (T8): Tau 206-221 [pT212, pS214]

SEQ ID NO: 4 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 9 (T9): Tau 196-211 [pS202, pT205]

SEQ ID NO: 5 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 3 (T3): Tau 393-408 [pS396, pS404]

SEQ ID NO: 6 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 4 (T4): Tau 401-418 [pS404, pS409]

25 SEQ ID NO: 7 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 2 (T2): Tau 200-216 [pS202, pT205 & pT212+pS214]

SEQ ID NO: 8 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 10 (T10): Tau 407-418 [pS409]

SEQ ID NO: 9 Secuencia de aminoácidos de la Secuencia 11 (T11): Tau 399-408 [pS404]

Definición de términos

30 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína", tal como se usan en la presente memoria, son intercambiables y se definen para indicar una biomolécula compuesta por aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico.

El término "péptidos" indica cadenas de aminoácidos (típicamente aminoácidos-L) cuyos carbonos alfa están unidos a través de enlaces peptídicos formados por una reacción de condensación entre el grupo carbonilo del carbono alfa de un aminoácido y el grupo amino del carbono alfa de otro aminoácido. El aminoácido terminal de un extremo de la cadena (es decir, el extremo amino) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal del otro extremo

35 de la cadena (es decir, el extremo carboxi) tiene un grupo carboxilo libre. Como tal, el término "extremo amino" (abreviado extremo N) se refiere al grupo amino alfa libre del aminoácido del extremo amino del péptido, o al grupo amino alfa (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra localización dentro del péptido. De forma similar, el término "extremo carboxi" (abreviado extremo C) se refiere al grupo carboxilo libre del aminoácido del extremo carboxi de un péptido, o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra localización dentro del péptido.

40 Los términos "fragmento" o "fragmento del mismo" tal como se usan en la presente memoria se refieren a un fragmento peptídico funcional que tiene esencialmente la misma actividad (biológica) que los péptidos definidos en la presente memoria (p.ej., tal como se muestra en las SEQ ID NOS 2 a 9, respectivamente), es decir dichos fragmentos todavía son capaces de activar una respuesta inmune altamente específica, particularmente específica de la conformación, en un organismo, pero particularmente en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que es altamente efectivo y capaz de prevenir o aliviar tauopatías, o las síntomas asociados a las tauopatías. En particular, dichos fragmentos contienen todavía el fosfo-epítopo o fosfo-epítopos patológicos específicos del péptido tau, tal como se usa y se define en la presente memoria.

45 Típicamente, los aminoácidos que constituyen un péptido se numeran por orden, comenzando en el extremo amino y numerando en dirección al extremo carboxi del péptido. Por lo tanto, cuando se dice que un aminoácido "sigue" a otro, dicho aminoácido está posicionado más cerca del extremo carboxi del péptido que el aminoácido precedente.

El término "residuo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un aminoácido que se incorpora a un péptido a través de un enlace de amida. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido natural o, a menos que se limite específicamente, puede abarcar análogos comunes de aminoácidos naturales que actúen de una forma similar a los aminoácidos naturales (es decir, miméticos de aminoácidos). Además, un mimético de enlace de amida incluye modificaciones de la cadena principal del péptido bien conocidas por los especialistas en la técnica.

La frase "que consiste esencialmente en" se usa en la presente memoria para excluir cualesquier elementos que alterarían sustancialmente las propiedades esenciales de los péptidos a los cuales se refiere la frase. Por tanto, la descripción de un péptido "que consiste esencialmente en..." excluye cualesquier sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos que alterarían sustancialmente la actividad biológica de dicho péptido.

10 Además, el especialista en la técnica reconocerá que, como se ha mencionado anteriormente, las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos (típicamente menos de un 5%, más típicamente menos de 1%) en una secuencia codificada son variaciones modificadas conservativamente en las que las alteraciones dan lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido similar químicamente. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos 15 funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Los siguientes seis grupos incluyen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas los unos de los otros:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 20 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por lo tanto, los péptidos descritos en la presente memoria no contienen materiales asociados normalmente a su entorno *in situ*. Típicamente, los péptidos inmunogénicos aislados descritos en la presente memoria son puros en al menos aproximadamente un 80%, normalmente en al menos aproximadamente un 90%, y preferiblemente en al menos aproximadamente un 95%, según se determina a través de la intensidad de banda en un gel teñido con plata.

30 La pureza o la homogeneidad de proteína pueden indicarse a través una serie de métodos bien conocidos en la técnica, tal como la electroforesis de gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización tras tinción. Para determinados fines será necesaria una alta resolución y se utiliza HPLC o un medio similar para la purificación.

Cuando los péptidos inmunogénicos tienen una longitud relativamente corta (esto es, inferior a aproximadamente 50 aminoácidos), a menudo se sintetizan usando técnicas químicas estándar de síntesis de péptidos.

35 La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia es unido a un soporte insoluble seguido de la adición secuencia del resto de aminoácidos de la secuencia es un método preferido para la síntesis química de los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria. Las técnicas de síntesis en fase sólida son conocidas por los especialistas en la técnica.

40 Alternativamente, los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria se sintetizan usando una metodología de ácidos nucleicos recombinante. Generalmente, esto implica crear una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido, colocar el ácido nucleico en una casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar el péptido en un hospedante, aislar el péptido o polipéptido expresado y, si se requiere, renaturalizar el péptido. En la bibliografía se dispone de técnicas suficientes para guiar al especialista en el uso de estos procedimientos.

45 Una vez expresados, los péptidos recombinantes pueden purificarse según procedimientos estándar, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis de gel y similares. Se prefieren composiciones sustancialmente puras, con una homogeneidad de aproximadamente 50 % a 95%, y lo más preferido es una homogeneidad de 80 % a 95 % o más para uso como agentes terapéuticos.

50 El especialista en la técnica reconocerá que después de la síntesis química, y la expresión o purificación biológica, los péptidos inmunogénicos pueden poseer una conformación sustancialmente diferente a las conformaciones nativas de los péptidos constituyentes. En este caso, a menudo es necesario desnaturalizar y reducir el péptido antiproliferativo y después hacer que el péptido se repliegue en la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar proteínas y para inducir el replegamiento son bien conocidos por los especialistas en la técnica.

La antigenicidad de la proteína purificada puede confirmarse, por ejemplo, demostrando la reacción con suero inmune,

o con antisueros producidos contra la propia proteína.

Los términos "un", "una" y "el/la" tal como se usan en la presente memoria están definidos para indicar "uno o más" e incluyen el plural a menos que el contexto sea inapropiado.

Los términos "detectar" o "detectado" tal como se usan en la presente memoria significan el uso de técnicas conocidas para la detección de moléculas biológicas, tal como métodos inmunoquímicos o histológicos, y se refieren a la determinación cualitativa o cuantitativa de la presencia o la concentración de la biomolécula investigada.

Por "aislado" se entiende una molécula biológica libre de al menos parte de los componentes con los se encuentra en su estado natural.

Los términos "anticuerpo", "anticuerpos" o "partes funcionales de los mismos", tal como se usan en la presente memoria, son términos reconocidos en la técnica y se entiende que se refieren a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, particularmente a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. La inmunoglobulina según la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Dentro del alcance de la presente invención, "anticuerpos" pretende incluir anticuerpos monoclonales, policlonales, químéricos, de cadena sencilla, biespecíficos, simianizados, humanos y humanizados, así como los fragmentos activos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen los fragmentos Fab y F(ab')₂, que incluyen los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina Fab y los fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente. Dichos fragmentos activos pueden derivarse de un anticuerpo de la presente invención a través de una serie de técnicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales purificados pueden romperse con una enzima, tal como una pepsina, y someterse a filtración de gel de HPLC. La fracción apropiada que contiene los fragmentos Fab puede recogerse entonces y concentrarse mediante filtración con membrana o similar. Para una descripción adicional de técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase por ejemplo Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982); Rousseaux et al. Methods Enzymology, 121: 663-69, Academic Press, 1986.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo diseñado que tiene sus CDRs derivadas de una inmunoglobulina donante no humana, derivando el resto de partes derivadas de inmunoglobulina de una (o más) inmunoglobulina(s) humana(s).

Un anticuerpo humanizado puede referirse además a un anticuerpo que tiene una región variable en la que una o más de sus regiones estructurales tienen aminoácidos humanos o de primate. Adicionalmente, se pueden alterar los residuos de apoyo de la estructura para preservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los especialistas en la técnica. (Véase, p.ej., Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10032 (1989); Hodgson et al., Bio/Technology, 9: 421 (1991)).

Un "anticuerpo humanizado" puede obtenerse también mediante una estrategia de ingeniería genética novedosa que permite la producción de anticuerpos policlonales de tipo humano con afinidad madurada en animales grandes, tal como, por ejemplo, conejos (<http://www.rctech.com/bioventures/therapeutic.php>).

El término "anticuerpo monoclonal" también es bien reconocido en la técnica y se refiere a un anticuerpo producido en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce únicamente un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se preparan típicamente fusionando una célula B productora de anticuerpo, normalmente de vida corta, con una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (a veces referida como "célula inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo.

El término "antígeno" se refiere a una entidad, o a un fragmento de la misma, que puede inducir una respuesta inmune en un organismo, particularmente en un animal, más particularmente en un mamífero, que incluye un humano. El término incluye inmunógenos y regiones responsables de la antigenicidad o determinantes antigenéticos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "soluble" significa parcial o completamente disuelto en una disolución acuosa.

También como se usa en la presente memoria, el término "inmunogenicidad" se refiere a sustancias que provocan o potencian la producción de anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas dirigidas contra un agente inmunogénico, y contribuyen a una respuesta inmune en humanos o animales.

Una respuesta inmune se produce cuando un individuo produce suficientes anticuerpos, células T y otras células inmunes reactivas contra las composiciones inmunogénicas administradas de la presente invención para moderar o aliviar el trastorno que va a ser tratado.

El término "hibridoma" es reconocido en la técnica y es entendido por los especialistas en la técnica para referirse a

una célula producida mediante la fusión de una célula productora de anticuerpos y una célula inmortal, p.ej. una célula de mieloma múltiple. Dicha célula híbrida es capaz de producir un suministro continuo de anticuerpos. Véase la definición de "anticuerpo monoclonal" anterior y los Ejemplos de más adelante para una descripción más detallada del método de fusión.

- 5 El término "vehículo" tal como se usa en la presente memoria significa una estructura a la que el péptido antigénico o la construcción supramolecular pueden incorporarse, o con la que pueden asociarse, presentando o exponiendo de este modo los péptidos antigénicos, o parte del péptido, al sistema inmune de un humano o animal. Cualquier partícula que se pueda usar de forma adecuada en terapia con animales o humanos tal como, por ejemplo, una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado, se puede usar como vehículo en el contexto de la presente invención.
- 10 El término "vehículo" comprende además métodos de administración en los que se pueden transportar composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares que comprende el péptido antigénico a los sitios deseados mediante mecanismos de administración. Un ejemplo de dichos sistemas de administración utiliza metales coloidales como el oro coloidal.
- 15 Las proteínas vehículo que pueden usarse en las composiciones de construcciones antigénicas supramoleculares de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, proteína de unión a maltosa "MBP"; albúmina de suero bovino "BSA"; hemocianina de lapa californiana "KLH"; ovoalbúmina; flagelina; tiroglobulina; albúmina de suero de cualquier especie; gamma globulina de cualquier especie; células singénicas; células singénicas que portan antígenos Ia; y polímeros de aminoácidos D y/o L.
- 20 En la "construcción antigénica supramolecular" según la presente invención, el liposoma puede tener una función dual en el sentido en que puede usarse como vehículo que comprende la construcción supramolecular tal como se ha descrito previamente en la presente memoria y, al mismo tiempo, actúa como adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune en el animal o humano objeto de tratamiento con la vacuna terapéutica según la invención. También debe entenderse que las composiciones de construcción antigénica supramoleculares de la presente invención pueden comprender además adyuvantes adicionales que incluyen, aunque sin limitación, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) y otros adyuvantes tales como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxicificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre, otros conservantes, diluyentes, emulsionantes, estabilizantes y otros componentes conocidos y que se usan en vacunas en la técnica anterior. Además, se puede usar cualquier sistema de adyuvante conocido en la técnica para la composición de la presente invención. Dichos adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, manzano acetilado ligado mediante enlaces β -(1,4) polidispersado ("Acemannan"), TITERMAX® (adyuvantes de copolímero de polioxetileno-polioxipropileno de CytRx Corporation), adyuvantes lipídicos modificados de Chiron Corporation, adyuvantes derivados de saponina de Cambridge Biotech, *Bordetella pertussis* muerta, el lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas, aniones poliméricos de gran tamaño como el sulfato de dextrano, y geles inorgánicos tales como alumbre, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio.
- 30 Además, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de composición antigénica/inmunogénica que, cuando se administra a un humano o un animal, provoca una respuesta inmune. El especialista en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad efectiva siguiendo procedimientos rutinarios.
- 35 Un "paciente inmunitolerante" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un paciente animal o humano que muestra una capacidad limitada de respuesta a antígenos, particularmente a antígenos no propios, pero especialmente a antígenos nuevos tales como, por ejemplo, nuevos antígenos presentes en enfermedades emergentes recientes. Esta limitación puede deberse, al menos en parte, a la edad cronológica de las células T CD4+. Además, un "paciente inmunitolerante" puede exhibir una respuesta inmune de células T CD4+ a lo largo plazo afectada frente a la exposición a antígeno, debido a defectos en la proliferación y la secreción de citoquinas de las células T de memoria durante respuestas de recuerdo.
- 40 Un "paciente con células T activadas" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un paciente animal o humano que exhibe una activación de células T y en el que una estimulación adicional de la respuesta de células T provocaría un riesgo médico.
- 45 Un "paciente inmunocomprometido" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un paciente animal o humano que tiene un sistema inmune que ha sido afectado por la edad, una enfermedad tal como VIH o cáncer, o por un tratamiento tal como, por ejemplo, el tratamiento contra enfermedades inflamatorias que incluyen, aunque sin limitación, artritis reumatoide, soriasis, lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, etc.
- 50 Dentro del alcance de la presente invención, se ha demostrado que la respuesta inducida por anticuerpo a la composición antigénica según la invención es ampliamente dependiente de células T. Se usó un modelo de ratón nude a este respecto, se vacunaron ratones nude y se midieron las respuestas de anticuerpos para evaluar la respuesta de anticuerpo A β -específica inducida por la composición antigénica según la invención en los ratones nude inmunizados. Los ratones nude portan la mutación Foxn1nu y, en consecuencia, presentan una función de células T reducida debido a la falta de un timo apropiado.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una dosis del ingrediente activo en una composición farmacéutica adecuada para curar, o al menos detener parcialmente, los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que va a ser tratado, o cualesquier complicaciones asociadas al mismo.

5 En una realización específica, la presente invención utiliza una presentación de antígeno, particularmente sobre la superficie de una molécula vehículo tal como un liposoma, que da como resultado una exposición y estabilización mejoradas de una conformación de antígeno preferida, lo que finalmente conduce a una respuesta inmune altamente específica, particularmente una respuesta inmune independiente de células T, y da como resultado la generación de anticuerpos con propiedades únicas.

10 En particular, el péptido antigénico se presenta sobre la superficie de la molécula vehículo en una disposición altamente repetitiva, particularmente una disposición repetitiva que comprende al menos 10 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 50 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 100 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 200 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 300 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 400 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo, particularmente al menos 500 unidades antigénicas repetitivas/molécula vehículo.

15 El antígeno de fosfo-péptido modificado según la invención y tal como se describe en la presente memoria, particularmente un antígeno de fosfo-péptido que imita a un fosfo-epítopo patológico principal de la proteína tau, puede sintetizarse siguiendo un método modificado publicado en Nicolau et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2332-2337. Esta estrategia implica el ensamblaje por partes de la construcción mediante síntesis de péptidos en fase sólida sobre una resina de amida usando química Fmoc/tBu estándar. Los grupos protectores ortogonales de las lisinas terminales fueron eliminados después y los grupos amino libres se acilaron con ácido palmítico.

20 La desprotección de los grupos protectores de las cadenas laterales y la liberación simultánea del péptido de la resina se alcanzó en condiciones ácidas, proporcionando el fosfopéptido tetrapalmitoilado deseado en forma de producto sin purificar.

25 El producto final puede obtener a continuación con una pureza elevada y se puede confirmar su identidad y pureza empleando métodos conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, espectrometría de masas de electropulverización y/o análisis de HPLC.

30 En una realización, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden un antígeno de fosfo-péptido según la invención y tal como se describe en la presente memoria que imita a un fosfo-péptido patológico principal de la proteína tau, péptido antigénico que es modificado de tal modo que es capaz de mantener y estabilizar una conformación definida del antígeno. Esta conformación definida conduce a la inducción de una respuesta inmune fuerte y altamente específica tras la introducción en un animal o un humano.

35 Un modo de alcanzar la formación y la estabilización de la conformación deseada del péptido antigénico es mediante la presentación del péptido antigénico unido, o incorporado o reconstituido, parcial o completamente, en un vehículo particularmente un vehículo que también actúa como adyuvante.

40 Un vehículo que puede ser contemplado dentro del alcance de la presente invención es, por ejemplo, una vesícula, un cuerpo particulado o una molécula; proteínas de membrana bacterianas, proteínas Omp enterobacterianas, nanopartículas, micelas, partículas de oro, micropartículas y/o virosomas, o cualquier otro medio que pueda servir de forma adecuada como vehículo/adyuvante para el péptido antigénico, pero, particularmente, un liposoma.

45 En una realización específica de la invención, el péptido antigénico se une, o se incorpora o se reconstituye, en el vehículo mediante interacciones débiles tales como, por ejemplo, interacciones de van der Waals, interacción hidrofóbica o electrostática, o una combinación de dos o más de dichas interacciones, de tal modo que el péptido es presentado con una conformación específica, la cual se mantiene y se estabiliza restringiendo dicho péptido antigénico en su libertad de movimiento tridimensional, de tal modo que se evitan cambios conformacionales o se restringen de forma severa.

50 Cuando se usa una vesícula, una partícula o un cuerpo particulado como vehículo/adyuvante tal como, por ejemplo, un liposoma, la composición del péptido antigénico puede seleccionarse de tal modo que la carga neta global sea idéntica a la de la superficie del vehículo/adyuvante a la cual se une el péptido. Las fuerzas de repulsión electrostática que son efectivas entre la superficie del vehículo/adyuvante y el péptido antigénico cargados de forma idéntica, pero particularmente entre la superficie del vehículo y los residuos de aminoácido que constituyen el péptido antigénico cargados de forma idéntica, y más particularmente entre la superficie del vehículo y los residuos de aminoácido que comprenden el péptido antigénico cargados de forma idéntica, pueden conducir a que el péptido antigénico se coloque en una conformación definida altamente específica y estabilizada que garantiza una elevada actividad biológica. Como resultado, el péptido antigénico es expuesto y presentado en una conformación que tiene una elevada actividad biológica en el sentido en que permite que el sistema inmune del organismo objetivo interaccione libremente con los determinantes antigenicos contenidos en la construcción antigenica en la conformación biológicamente activa, lo cual, tras administración a un animal o un humano, conduce a una respuesta inmune fuerte y específica de conformación, que da como resultado, por ejemplo, un elevado título de anticuerpos en el organismo objetivo.

- La respuesta inmune puede incrementarse adicionalmente usando un liposoma como vehículo, liposoma que puede actuar como adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune dentro del animal o humano objetivo que va a ser tratado con la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Opcionalmente, el liposoma puede, adicionalmente, contener un adyuvante adicional tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1 y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A destoxificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre.
- En una realización específica de la invención, un péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, particularmente un péptido antigénico que cuya carga neta global es negativa, se usa reconstituido en un liposoma, particularmente un liposoma cuyos constituyentes se eligen de tal modo que la carga neta global del grupo de cabeza del liposoma es negativa. En particular, el liposoma está compuesto de constituyentes seleccionados del grupo que consiste en dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPEA), dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) y colesterol y, opcionalmente, comprende además monofosforil lípido A o cualquier otro adyuvante que pueda ser usado de forma adecuada dentro del alcance de la presente invención tal como, por ejemplo, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1, y/o microcápsulas de polisacáridos y proteínas.
- En otra realización específica de la invención, se proporciona un péptido antigénico modificado según la invención y tal como se describe en la presente memoria, ligado covalentemente a una molécula de tipo ancla que es capaz de insertarse en el vehículo/adyuvante, fijando de este modo el péptido al vehículo/adyuvante y presentándolo sobre, o en estrecha proximidad a, la superficie de una molécula de vehículo/adyuvante de tal modo que las fuerzas electrostáticas se puedan hacer efectivas, tal como se ha descrito previamente en la presente memoria.
- Cuando se usan liposomas como vehículo/adyuvante, la construcción de péptido antigénico generalmente tiene una cola hidrofóbica que se inserta en la membrana del liposoma según se forma. Adicionalmente, los péptidos antigenicos se pueden modificar para contener una cola hidrofóbica de tal modo que puedan insertarse en el liposoma.
- La composición antigénica de la presente invención comprende particularmente péptidos modificados para potenciar el efecto antigénico, donde dichos péptidos pueden ser modificados mediante pegilación (usando polietilen glicol o polietilen glicol modificado), o pueden ser modificados mediante otros métodos tales como con ácido palmítico como se ha descrito previamente en la presente memoria, poli-aminoácidos (p.ej., poli-glicina, poli-histidina), polisacáridos (p.ej., ácido poligalacturónico, ácido poliláctico, poliglicolide, quitina, quitosán), polímeros sintéticos (poliamidas, poliuretanos, poliésteres) o copolímeros (p.ej., poli(ácido metacrílico) y N-(2-hidroxi)propil metacrilamida) y similares.
- En una realización específica de la invención, se proporcionan péptidos antigenicos según la invención y tal como se han descrito previamente en la presente memoria, que son modificados para contener una cola hidrofóbica de tal modo que dichos péptidos pueden insertarse en el liposoma. En particular, el fosfo-péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria imita a un fosfo-epítopo patológico principal de la proteína tau, puede modificarse con un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica del vehículo/adyuvante. Los restos lipofílicos o hidrofóbicos de la presente invención pueden ser ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, particularmente ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos, en donde la cadena principal hidrocarbonada del ácido graso tiene al menos 10 átomos de carbono, particularmente restos lipofílicos que tienen ácidos grasos con una cadena principal hidrocarbonada de al menos aproximadamente 14 átomos de carbono y hasta aproximadamente 24 átomos de carbono, siendo parte de la presente invención cada número individual de átomos de carbono dentro de dicho rango. En particular, la invención se refiere a un péptido antigénico según la invención y tal como se ha descrito previamente en la presente memoria, que es modificado para contener una cola hidrofóbica, particularmente una cola hidrofóbica que comprende restos hidrofóbicos que tienen una cadena principal hidrocarbonada de al menos 14 átomos de carbono, pero especialmente 16 átomos de carbono. Los ejemplos de restos hidrofóbicos incluyen, aunque sin limitación, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido laurico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y colesterol o 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DSPE). En una realización específica de la invención, el resto hidrofóbico es ácido palmítico.
- En una realización, el péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, se une covalentemente al resto lipofílico o hidrofóbico. En el contexto de la presente invención, la unión covalente del péptido antigénico puede estar mediada por residuos de aminoácido, que extiende las secuencias de aminoácido correspondientes a las secuencias del péptido antigénico según la invención, en particular en su(s) extremo(s), particularmente en su(s) extremo(s) N- y C-terminales, y a los cuales se acoplan los residuos de ácido graso.
- En particular, cada conjugado comprende al menos cuatro moléculas de ácido graso que contienen una cadena hidrocarbonada de entre C12 y C24, particularmente una cadena hidrocarbonada de C16, en donde las moléculas de ácido graso están unidas covalentemente en los extremos N- y C-terminales de los péptidos antigenicos. También se contemplan otras distribuciones, incluyendo dentro de la secuencia de aminoácido. Estos péptidos también se acoplan covalentemente a las moléculas de ácido graso.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender, por tanto, liposomas preparados mediante reconstitución de liposomas en presencia de péptidos antigenicos purificados o parcialmente purificados o modificados según la invención, y tal como se describe en la presente memoria. Adicionalmente, se pueden reconstituir fragmentos de péptido en liposomas. La presente invención también incluye fragmentos de péptidos antigenicos

modificados para aumentar su antigenicidad. Por ejemplo, se pueden unir o mezclar restos antigenicos y adyuvantes con el péptido. Los ejemplos de restos antigenicos y adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, derivados de dipéptido de muramilo lipofílicos, polímeros de bloque no iónicos, hidróxido de aluminio o adyuvante de fosfato de aluminio, y mezclas de los mismos.

5 Los liposomas que pueden usarse en las composiciones de la presente invención incluyen las conocidas por el especialista en la técnica. Se puede usar cualquiera de los lípidos estándar útiles en la preparación de liposomas. Se pueden usar liposomas bicapa y multicapa estándares para preparar las composiciones de la presente invención. Aunque se puede usar cualquier método de preparación de liposomas conocido por el especialista en la técnica, los liposomas más preferidos se preparan según el método de Alving et al., *Infect. Immun.* 60: 2438-2444, 1992.

10 El liposoma puede contener opcionalmente un adyuvante o un inmunomodulador, o ambos. Un inmunomodulador preferido es lípido A, particularmente un lípido A destoxicificado tal como, por ejemplo, monofosforil o difosforil lípido A.

15 Los liposomas pueden prepararse mediante la técnica de inyección de flujo cruzado, tal como se describe, por ejemplo, en Wagner et al (2002) *Journal of Liposome Research* Vol. 12(3), pág. 259 – 270. Durante la inyección de disoluciones de lípido en un sistema de tampón acuoso, los lípidos tienden a formar "precipitados", seguido de un auto- posicionamiento en vesículas. El tamaño de vesícula obtenida depende de factores tales como la concentración de lípidos, la velocidad de agitación, la velocidad de inyección y la elección de lípidos. El sistema de preparación puede consistir en un módulo de inyección de flujo cruzado, recipientes para la fase polar (p.ej., una disolución tampón de PBS), un recipiente de disolución de etanol/lípido y un dispositivo de presión, pero particularmente un dispositivo de presión de nitrógeno. A la vez que la disolución acuosa o polar es bombeada a través del módulo de inyección de flujo cruzado, la disolución de etanol/lípido es inyectada en la fase polar aplicando presiones variables.

20 En una realización, el péptido antigenico modificado según la invención y tal como se describe en la presente memoria puede por tanto ser modificado adicionalmente mediante reconstitución en liposomas que consisten en fosfolípidos y colesterol (fosfatidiletanol amina, fosfatidil glicerol, colesterol en diversas relaciones molares). Se pueden usar otros fosfolípidos. El lípido A se usa a una concentración de aproximadamente 40 µg/pmol de fosfolípidos.

25 El liposoma puede tener una función dual en el sentido en que puede usarse como un vehículo que comprende la construcción supramolecular tal como se ha descrito previamente en la presente memoria y, al mismo tiempo, actúa como adyuvante para aumentar o estimular la respuesta inmune en el animal o humano objeto de tratamiento con la vacuna terapéutica según la invención. Opcionalmente, el liposoma puede, además, contener un adyuvante adicional o un inmunomodulador, o ambos, tal como, por ejemplo, lípido A, alumbre, fosfato de calcio, interleuquina 1 y/o 30 microcápsulas de polisacáridos y proteínas, pero particularmente un lípido A, más particularmente un lípido A destoxicificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A, o alumbre.

35 En una realización específica de la invención, se usan liposomas con lípido A como adyuvante para preparar la composición farmacéutica de la invención. Se mezcla dimiristoilfosfatidil-colina, -glicerol y -colesterol, particularmente en una relación molar de 9:1:7. A continuación se añade un inmunomodulador fuerte tal como, por ejemplo, monofosforil lípido A en una concentración adecuada, particularmente en una concentración de entre 20 mg y 50 mg por mmol, más particularmente a una concentración de entre 30 mg y 40 mg por mmol de fosfolípidos. A continuación se añade el péptido antigenico modificado en una relación molar de péptido a fosfolípidos de entre 1:30 y 1:200, particularmente en una relación molar de entre 1:50 y 1:120, más particularmente de 1:100. Se eliminan los disolventes, por ejemplo mediante evaporación, y la película resultante se hidrata con disolución tamponante esterilizada, tal como por ejemplo con PBS.

40 En una realización específica de la invención, se proporciona un péptido antigenico según la invención y tal como se describe en la presente memoria mediante al menos dos moléculas de ácido palmítico unidas covalentemente a los extremos N- y C-terminales de dicho péptido antigenico, y mediante reconstitución en un vehículo liposómico.

45 La palmitoilación, aunque proporciona un anclaje para el péptido en la bicapa del liposoma, debido a la longitud relativamente reducida del resto de ácido graso C_{16:0}, hace que el péptido se presente expuesto sobre, o en estrecha proximidad, la superficie del liposoma.

50 La composición farmacéutica de la presente invención que comprende un péptido antigenico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, particularmente un fosfo-péptido que imita fosfo-epítopos patológicos principales de la proteína tau, particularmente en una cantidad farmacéuticamente efectiva, puede prepararse en la forma de una disolución líquida, o de una suspensión inyectable, o incluso en una forma sólida adecuada para solubilización previa a la inyección en el contexto de, por ejemplo, un kit para utilizar la presente composición, tal como se describe más adelante.

55 Los vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc.

La formulación de la composición farmacéutica según la invención puede conseguirse de acuerdo a la metodología estándar conocida por los especialistas en la técnica.

La composición farmacéutica de la presente invención que comprende un péptido antigénico según la invención y tal como se describe en la presente memoria, particularmente un fosfo-péptido que imita fosfo-epítopos patológicos principales de la proteína tau, particularmente en una cantidad terapéuticamente efectiva, puede administrarse a un humano o animal que padezca de una tauopatía, o de los síntomas asociados a la tauopatía, para inducir una respuesta inmune en dicho humano o animal para aliviar los síntomas asociados a la enfermedad o para restaurar una condición propia de individuos sanos que no están afectados por la enfermedad.

5 Las composiciones de la presente invención se administran a un humano o animal a través de cualesquier rutas de administración estándar apropiadas en forma sólida, líquida o de aerosol en una dosis adecuada, farmacéuticamente efectiva. En general, la composición puede administrarse por vía tópica, oral, rectal, nasal o parenteral (por ejemplo,

10 intravenosa, subcutánea o intramuscular). Adicionalmente, la composición puede incorporarse a matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, siendo dichos polímeros implantados en las proximidades de la zona de administración deseada, por ejemplo, en el sitio de un tumor. El método incluye la administración de una dosis individual, la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo predeterminados, y la administración sostenida durante un periodo de tiempo predeterminado.

15 En una realización específica de la invención, la construcción antigénica según la invención, particularmente una composición de vacuna que comprende dicha construcción antigénica en una forma farmacéuticamente aceptable, se administra en dosis repetidas, en particular de 1 a 15 dosis, más particularmente de 2 a 10 dosis, más particularmente de 3 a 5 dosis, e incluso más particularmente en 3 dosis, en intervalos de tiempo de entre 1 semana y 20 semanas, particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 10 semanas, particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 6 semanas, más particularmente en intervalos de tiempo de entre 1 y 4 semanas, e incluso más particularmente en intervalos de tiempo de entre 2 y 3 semanas. La respuesta inmune puede monitorizarse tomando muestras de suero/plasma a un tiempo adecuado tras la dosis, particularmente de 3 a 10 días después de la dosis, más particularmente de 4 a 8 días después de la dosis y más particularmente 7 días después de la dosis, y determinando la inmunogenicidad de la construcción antigénica usando metodologías conocidas, particularmente una de uso común en inmunoensayos tal como, por ejemplo, un ensayo ELISA.

20 En particular, la composición de péptido antigénico según la invención se administra mediante inyección parenteral, particularmente mediante inyección intra-peritoneal, intravenosa, subcutánea e intra-muscular.

25 Las preparaciones de administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles, acuosas o no acuosas. Los disolventes no acuosos incluyen, sin limitarse a ellos, propilen glicol, polietilen glicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los disolventes acuosos pueden seleccionarse del grupo que consiste en agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones en agua/alcohol que incluyen salino y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen rellenos fluidos y de nutrientes, rellenos de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y otros. También puede haber presentes conservantes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes, etc.

30 La dosis de la composición dependerá de la afección a tratar, de la composición particular usada, y de otros factores clínicos tales como peso, tamaño y condición del paciente, área superficial corporal, del compuesto o composición particular a administrar, de otros fármacos que se administren concurrentemente, y de la ruta de administración.

35 La composición farmacéutica según la invención puede administrarse en combinación con otras sustancias biológicamente activas y procedimientos para el tratamiento de enfermedades, particularmente enfermedades neurodegenerativas. Las otras sustancias biológicamente activas pueden formar parte de la composición que ya comprende la composición farmacéutica según la invención, en la forma de una mezcla, en donde la composición farmacéutica de la invención y la otra sustancia biológicamente activa se mezclan en o con el mismo disolvente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable, o pueden proporcionarse por separado como parte de una composición separada, que puede ser ofrecida por separado o conjuntamente en la forma de un kit de partes.

40 La composición farmacéutica según la invención puede administrarse concomitantemente con la otra sustancia o sustancias biológicamente activas, intermitentemente o secuencialmente. Por ejemplo, la composición farmacéutica según la invención puede administrarse simultáneamente con una primera sustancia biológicamente activa adicional o secuencialmente después o antes de la administración de la composición farmacéutica. Si se elige un esquema de aplicación en el que se administran más de una sustancia biológicamente activa adicional junto con la al menos una composición farmacéutica según la invención, los compuestos o sustancias puede administrarse parcialmente de forma simultánea, parcialmente de forma secuencial en diversas combinaciones.

45 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar mezclas de una composición farmacéutica según la invención y, opcionalmente, una o más sustancias biológicamente activas adicionales, así como los métodos de uso de una composición farmacéutica según la invención, o de mezclas de la misma, que incluyen composiciones que comprenden dicha composición farmacéutica o mezclas de la composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento terapéutico y/o el alivio de los efectos de las tauopatías, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la formación de lesiones neurofibrilares, la patología cerebral predominante en este grupo de trastornos neurodegenerativos, que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob,

- Demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, lesión cerebral traumática y además el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, distrofia miotónica.
- Las mezclas según la invención pueden comprender, además de una composición farmacéutica según la invención, una sustancia biológicamente activa tal como, por ejemplo, compuestos conocidos usados en la medicación de tauopatías y/o amiloidosis, un grupo de enfermedades y trastornos asociados a la proteína amiloide o de tipo amiloide tal como la proteína amiloide β implicada en la enfermedad de Alzheimer.
- En otra realización de la invención, la sustancia o compuesto biológicamente activo también puede ser un agente terapéutico que puede usarse en el tratamiento de enfermedades y trastornos que son producidos por, o que están asociados a, proteínas amiloides o de tipo amiloide, que incluyen la amiloidosis producida por amiloide β , o pueden usarse en la medicación de otros trastornos neurológicos.
- La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico mediante un mecanismo igual o similar al de la vacuna terapéutica según la invención, o mediante un mecanismo de acción no relacionado, o a través de una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.
- Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de transmisión de neuronas, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de acetilcolina esterasa, bloqueantes del canal del calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiacepina, síntesis de acetilcolina, potenciadores del almacenamiento o la liberación, agonistas de receptor post-sináptico de acetilcolina, inhibidores de monoamina oxidasa-A ó -B, antagonistas de receptor de glutamato de N-metil-D-aspartato, fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, antioxidantes y antagonistas de receptor serotonérgico.
- En particular, la mezcla según la invención puede comprender al menos otro compuesto biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en compuestos contra el estrés oxidativo, compuestos anti-apoptóticos, quelantes de metales, inhibidores de reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de secretasa, inhibidores de β - y γ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, rompedores de lámina β , moléculas anti-inflamatorias, o inhibidores de colinesterasa (ChEIs) tales como tacrina, rivastigmina, donepezil y/o galantamina, y otros fármacos y suplementos nutritivos, junto con una vacuna terapéutica según la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En una realización adicional, las mezclas según la invención pueden comprender niacina o memantina junto con una vacuna terapéutica según la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En otra realización adicional de la invención, se proporcionan mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina, para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, delirios, trastornos del pensamiento (manifestados por una incoherencia marcada, conducta desviada, tangencialidad), y un comportamiento extraño o desorganizado, así como anhedonia, falta de expresión de afecto, apatía y represión social, junto con una vacuna terapéutica según la invención y, opcionalmente, un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En una realización específica de la invención, las composiciones y mezclas según la invención y tal como se han descrito en la presente memoria comprenden la composición farmacéutica según la invención y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva.
- Otros compuestos que pueden usarse de forma adecuada en mezclas combinadas con la composición farmacéutica según la invención se describen, por ejemplo, en el documento WO 2004/058258 (véase especialmente las páginas 16 y 17) que incluyen las dianas terapéuticas de fármacos (página 36-39), ácidos alcanosulfónicos y ácido alcanosulfúrico (páginas 39-51), inhibidores de colinesterasa (páginas 51-56), antagonistas de receptor de NMDA (páginas 56-58), estrógenos (páginas 58-59), fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (páginas 60-61), antioxidantes (páginas 61-62), agonistas de receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (páginas 63-67), agentes reductores del nivel de colesterol (páginas 68-75), inhibidores de amiloide (páginas 75-77), inhibidores de la formación de amiloide (páginas 77-78), quelantes de metales (páginas 78-79), anti-psicóticos y anti-depresivos (páginas 80-82), suplementos nutricionales (páginas 83-89) y compuestos que aumentan la disponibilidad de sustancias biológicamente activas en el cerebro (ver las páginas 89-93) y profármacos (páginas 93 y 94), pero especialmente los compuestos mencionados en las páginas indicadas anteriormente.

Ejemplos**Ejemplo 1: Vacunas**

Se diseñaron ocho secuencias derivadas de la proteína fosfo-tau como antígeno para el desarrollo de vacunas. Se empleó un péptido inmunogénico usado previamente como control (Asuni *et al.*, 2007).

5 **Tabla 1. Descripción de secuencias Tau.**

DESCRIPCION	VACUNA	SECUENCIA
T5: Secuencia de control: Tau 379-408 [pS396, pS404]	ACI-37	RENAKAKTDHGAEIVYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 30) (SEQ ID NO: 1)
T1: Secuencia 1: Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	RQEFEV рMEDHAGTY(p)GL (n = 16) (SEQ ID NO: 2)
T8: Secuencia 8: Tau 206-221 [pT212, pS214]	ACI-39	PGSRSRT(p)PS(p)LPTPPTR (n = 16) (SEQ ID NO: 3)
T9: Secuencia 9: Tau 196-211 [pS202, pT205]	ACI-40	GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR (n = 16) (SEQ ID NO: 4)
T3: Secuencia 3: Tau 393-408 [pS396, pS404]	ACI-35	VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL (n = 16) (SEQ ID NO: 5)
T4: Secuencia 4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID (n = 18) (SEQ ID NO: 6)
T2: Secuencia 2: Tau 200-216 [pS202+pT205 & pT212+pS214]	ACI-34	PGS(p)PGT(p)PGSRSRT(p)PS(p)LP (n = 17) (SEQ ID NO: 7)
T10: Secuencia 10: Tau 407-418 [pS409]	ACI-42	HLS(p)NVSSTGSID (n = 12) (SEQ ID NO: 8)
T11: Secuencia 11: Tau 399-408 [pS404]	ACI-43	VSGDTS(p)PRHL (n = 10) (SEQ ID NO: 9)

Ejemplo 2: Preparación de los fosfo-péptidos tetrapalmitoilado derivado de Tau

La secuencia de péptido antigénico flanqueada por los 2 pares de lisinas se ensambló paso a paso mediante síntesis de péptidos en fase sólida sobre una resina de amida usando química estándar de Fmoc/tBu. Los grupos protectores ortogonales de las lisinas terminales fueron eliminados selectivamente entonces y los grupos amino libres fueron acilados con ácido palmitíco. La desprotección de los grupos protectores de cadena lateral y la liberación concomitante del péptido de la resina se realizó en condiciones ácidas, proporcionando el fosfopéptido tetrapalmitoilado deseado en forma de un producto sin purificar. La identidad y la pureza fueron confirmadas adicionalmente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de HPLC.

10 15 Secuencias de los fosfopéptidos tetrapalmitoilados derivados de Tau:

T1: H-K(Pal)-K(Pal)-RQEFEV рMEDHAGTY(P)GL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T2: H-K(Pal)-K(Pal)-PGS(p)PGT(p)PGSRSRT(p)PS(p)LP-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T3: H-K(Pal)-K(Pal)-VYKS(p)PVVSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T4: H-K(Pal)-K(Pal)-GDTS(p)PRHLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

20 **T8:** H-K(Pal)-K(Pal)-PGSRSRT(p)PS(p)LPTPPTR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T9: H-K(Pal)-K(Pal)-GYSSPGS(p)PGT(p)PGSRSR-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T10: H-K(Pal)-K(Pal)-HLS(p)NVSSTGSID-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

T11: H-K(Pal)-K(Pal)-VSGDTS(p)PRHL-K(Pal)-K(Pal)-NH₂

2.1. Síntesis del péptido antigénico T1

25 El aminoácido Fmoc-Lys(Mtt)-OH protegido ortogonalmente (3 eq.) se cargó manualmente en una resina de amida (resina MBHA de amida Rink, 1 eq., 0,26 mmol) en presencia de 2 eq. de DIC/HOBt en DMF. A continuación se lavó la resina con DMF (3 x 1 min). Tras eliminar el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 25% en DMF (1 x 1 min y 2 x 15 min), se acopló automáticamente el segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 eq.) usando 5 eq. de PyBOP/HOBt/DIEA en DMF (2 x 15 min). Los siguientes 16 aminoácidos que portan los grupos protectores de cadena lateral estándar Fmoc fueron incorporados automáticamente aplicando el protocolo de acoplamiento previamente

descrito. Los fosfoaminoácidos fueron introducidos como monobencil ésteres en el grupo fosfato. Cada etapa de acoplamiento vino seguida de una etapa de lavado con DMF (3 x 30 s), una etapa de eliminación de Fmoc con piperidina al 25% en DMF (3 x 3 min) y una segunda etapa de lavado con DMF (6 x 30 s). Tras el acoplamiento del Tyr(PO(OBzl)2), se usó DBU al 0,5% en DMF para la etapa de desprotección de Fmoc. El montaje de la secuencia de péptidos acabó con la adición de los últimos dos Fmoc-Lys(Mtt)-OH usando 2 eq. de PyBOP/HOBt/DIEA en DMF.

A continuación, los grupos Mtt de los residuos de lisina terminales fueron separados selectivamente en atmósfera de nitrógeno mediante el tratamiento de la resina (1 eq., 600 mg, 0,092 mmol) con 10 mL de una mezcla desgasificada de TIPS/TFA/DCM (1:1:98) durante varios ciclos de 10 minutos. La resina se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). A continuación se acopló ácido palmítico (20 eq., 473 mg, 1,85 mmol) a dichos grupos amino desprotegidos usando TBTU (20 eq., 593 mg, 1,85 mmol) y DIEA (40 eq., 643 μ L, 3,70 mmol) en DCM/DMF (1:1) (6 mL). La resina se lavó con DCM (x5) y DMF (x5). A continuación se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en DMF desgasificada (3 x 10 min) y la resina se lavó con DMF (x3) y DCM (x5). Finalmente se llevó a cabo simultáneamente la separación de la resina y las desprotecciones de cadenas laterales en atmósfera de nitrógeno con una mezcla desgasificada de TFA/TIPS/H₂O/EDT (95:1:2,5:2,5) (4 mL) durante 4,5 h. Una trituración en dietil éter frío dio lugar al producto sin purificar T1 en forma de sólido blanco (189 mg, 60% de rendimiento) con una pureza del 56% (según el análisis de HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 3427,12 [MH⁺], observado: 3426,87).

2.2. Síntesis del péptido antigénico T3

El aminoácido Fmoc-Lys(Mtt)-OH protegido ortogonalmente (3 eq.) se cargó manualmente en una resina de amida (resina MBHA de amida Rink, 1 eq., 0,4 mmol) en presencia de PyBOP/HOBt/DIEA en DMF. A continuación se lavó la resina con DMF (3 x 1 min). Tras eliminar el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 25% en DMF (1 x 1 min y 2 x 15 min), se acopló el segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 eq.) usando las mismas condiciones de carga. Los siguientes 16 aminoácidos que portan los grupos protectores de cadena lateral estándar Fmoc fueron incorporados manualmente aplicando el protocolo de acoplamiento previamente descrito. Los fosfoaminoácidos fueron introducidos como monobencil ésteres en el grupo fosfato. El tiempo de acoplamiento se determinó mediante el ensayo TNBT o el test de cloranilo después de una Prolina. Si era necesario, se llevaba a cabo un segundo acoplamiento con 2 eq. de Fmoc-aminoácido en presencia de DIC/HOBt o HATU/DIEA. Cada etapa de acoplamiento vino seguida de una etapa de lavado con DMF (3 x 1 min), una etapa de eliminación de Fmoc con un piperidina al 25% en DMF (1 x 1 min y 2 x 15 min) y una segunda etapa de lavado con DMF (7 x 1 min). Tras el acoplamiento del primer Ser(PO(OBzl)OH), se usó DBU al 0,5% en DMF para la etapa de desprotección de Fmoc. El montaje de la secuencia de péptidos acabó con la adición de los últimos dos Fmoc-Lys(Mtt)-OH.

A continuación, los grupos Mtt de los residuos de lisina terminales fueron separados selectivamente mediante el tratamiento de la resina (1 eq., 195 mg, 0,01 mmol) con 10 mL de una mezcla de TIPS/TFA/DCM (1:1:98) durante varios ciclos de 10 minutos. La resina se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). A continuación se acopló ácido palmítico (20 eq., 51 mg, 0,2 mmol) a dichos grupos amino desprotegidos usando TBTU (20 eq., 64 mg, 0,2 mmol) y DIEA (40 eq., 70 μ L, 0,4 mmol) en DCM/DMF (1:1) (2 mL). La resina se lavó con DCM (x5) y DMF (x5). A continuación se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en DMF desgasificada (3 x 10 min) y la resina se lavó con DMF (x3) y DCM (x5). Finalmente se llevó a cabo simultáneamente la separación de la resina y las desprotecciones de cadenas laterales usando una mezcla de TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (2 mL) durante 2 h. Una trituración en dietil éter frío dio lugar al producto sin purificar T3 en forma de sólido blanco (34 mg, 100% de rendimiento) con una pureza del 67% (según el análisis de HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 3365,15 [MH⁺], observado: 3369,66).

2.3. Síntesis del péptido antigénico T4

El aminoácido protegido ortogonalmente Fmoc-Lys(Mtt)-OH (exceso de 5 a 1) fue unido automáticamente a la resina de amida Tentagel R RAM (0,19 mm/g, 750 mg, 0,1425 mmol) usando DCCI y HOBt como agentes activantes en DMF. Tras eliminar el grupo Fmoc N-terminal, se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH (exceso de 5 a 1) en presencia de DCCI y HOBt. Los siguientes 16 aminoácidos que portan grupos protectores de cadena lateral estándar fueron incorporados automáticamente aplicando protocolos de acoplamiento/desprotección similares. Los fosfoaminoácidos fueron introducidos como monobencil ésteres en el grupo fosfato. Se llevaron a cabo acoplamientos dobles de 60 minutos para todos los residuos, seguido de una etapa de taponamiento con anhídrido acético. El ensamblaje de la secuencia de péptidos finalizó con la adición de los dos últimos Fmoc-Lys(Mtt)-OH.

A continuación, los grupos Mtt de los residuos de lisina terminales fueron separados selectivamente mediante el tratamiento de la resina (1 eq., 750 mg, 0,075 mmol) con 10 mL de TIPS/TFA/DCM (1:1:98) durante varios ciclos de 10 minutos. La resina se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). A continuación se acopló ácido palmítico (20 eq., 51 mg, 0,2 mmol) a dichos grupos amino desprotegidos usando TBTU (20 eq., 482 mg, 1,5 mmol) y DIEA (40 eq., 536 μ L, 3,0 mmol) en DCM/DMF (1:1) (7 mL). La resina se lavó con DCM (x5) y DMF (x5). A continuación se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en DMF (3 x 10 min) y la resina se lavó con DMF (x3) y DCM (x5). Finalmente se llevó a cabo simultáneamente la separación de la resina y las desprotecciones de las cadenas laterales usando una mezcla de TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (6 mL) durante 3,5 h. Una trituración en dietil éter frío dio lugar al producto sin purificar T4 en forma de sólido blanco (96 mg, 37% de rendimiento) con una pureza del 50% (según el análisis de

HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 3455,10 [MH⁺], observado: 3456,13).

2.4. Síntesis de antígeno peptídico T8

El aminoácido protegido ortogonalmente Fmoc-Lys(Mtt)-OH (5 eq., 781 mg, 1,25 mmol) fue unido manualmente a la resina de amida Rink PEGA (1 eq., 0,33 mmol/g, 758 g) usando DIPCDI (5 eq., 196 mL, 1,25 mmol) y HOBr (5 eq., 169 mg, 1,25 mmol) en DMF (5 mL) para dos acoplamientos de 8 h. La resina fue lavada a continuación con DMF (x 5). Tras eliminar el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en DMF (7 mL x 3 x 5 min), se acopló un segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH (10 eq., 1,56 g, 2,5 mmol) en presencia de TBTU (10 eq., 803 mg, 2,5 mmol), HOBr (1 eq., 338 mg, 2,5 mmol) y DIEA (20 eq., 871 mL, 5,0 mmol). Los siguientes 16 aminoácidos que portan grupos protectores de cadena lateral estándar fueron incorporados manualmente aplicando ciclos de acoplamiento/desprotección/lavado similares. Excepcionalmente, los fosfoaminoácidos fueron introducidos como monobencíl ésteres en el grupo fosfato (10 eq.) con TBTU (10 eq.), HOBr (5 eq.) y DIEA (15 eq.) en DMF. Se usó un tiempo de acoplamiento de 1 h durante la síntesis. El ensamblaje de la secuencia de péptidos finalizó con la adición de los dos últimos Fmoc-Lys(Mtt)-OH.

A continuación, los grupos Mtt de los residuos de lisina terminales fueron separados selectivamente mediante el tratamiento de la resina de peptidilo (1 eq., 385 mg, 0,019 mmol) con 10 mL de TIPS/TFA/DCM (1:1:98) durante varios ciclos de 10 minutos. La resina se lavó con DCM (x3) y DMF (x3). A continuación se acopló ácido palmitíco (20 eq., 968 mg, 3,8 mmol) a dichos grupos amino desprotegidos usando TBTU (20 eq., 1,21 g, 3,8 mmol) y DIEA (40 eq., 1,31 mL, 7,6 mmol) en DCM/DMF (1:1) (4 mL). La resina se lavó con DCM (x5) y DMF (x5). A continuación se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en DMF (3 x 10 min) y la resina se lavó con DMF (x3) y DCM (x5). Finalmente se llevó a cabo simultáneamente la separación de la resina y las desprotecciones de las cadenas laterales usando una mezcla de TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (4 mL) durante 3,5 h. Una trituración en dietil éter frío dio lugar al producto sin purificar T8 en forma de sólido blanco (50,2 mg, 10% de rendimiento) con una pureza del 55% (según el análisis de HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 3331,17 [MH⁺], observado: 3335,19).

2.5. Síntesis de péptido antigénico T9

El aminoácido protegido ortogonalmente Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 eq.) fue cargado manualmente en una resina de amida (resina de amida Rink MBHA, 1 eq., 0,4 mmol) en presencia de PyBOP/HOBt/DIEA en DMF. A continuación la resina se lavó con DMF (3 x 1 min). Tras eliminar el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 25% en DMF (1 x 1 min y 2 x 15 min), se acopló el segundo residuo de Fmoc-Lys(Mtt)-OH (3 eq.), usando las mismas condiciones de carga. Los siguientes 16 aminoácidos que portan grupos protectores de cadena lateral estándar fueron incorporados aplicando el protocolo de acoplamiento descrito previamente. Los fosfoaminoácidos fueron introducidos como monobencíl ésteres en el grupo fosfato. El tiempo de acoplamiento fue determinado mediante el ensayo TNBT o el ensayo de cloranilo después de una Prolina. Si era necesario, se llevó a cabo un segundo acoplamiento con 2 eq. de Fmoc-aminoácido en presencia de DIC/HOBt o HATU/DIEA. Cada etapa de acoplamiento vino seguida de una etapa de lavado con DMF (3 x 1 min), la etapa de eliminación de Fmoc con piperidina al 25% en DMF (1 x 1 min y 2 x 15 min) y una segunda etapa de lavado con DMF (7 x 1 min). Tras el acoplamiento del Thr(PO(OBzl)OH), se usó DBU al 0,5% en DMF para la etapa de desprotección de Fmoc. El ensamblaje de la secuencia de péptidos finalizó con la adición de los dos últimos Fmoc-Lys(Mtt)-OH.

A continuación, los grupos Mtt de los residuos de lisina terminales fueron separados selectivamente mediante el tratamiento de la resina (1 eq., 650 mg, 0,156 mmol) con 10 mL de TIPS/TFA/DCM (1:1:98) durante varios ciclos de 10 minutos. Tras lavar con DCM (x3) y DMF (x3), se acopló ácido palmitíco (20 eq., 1,01 g, 3,15 mmol) a dichos grupos amino desprotegidos usando TBTU (20 eq., 814 mg, 3,15 mmol) y DIEA (40 eq., 1,1 mL, 6,30 mmol) en DCM/DMF (1:1) (6 mL). La resina se lavó intensamente con DCM (x5) y DMF (x5). A continuación se eliminó el grupo Fmoc N-terminal con piperidina al 20% en DMF (3 x 10 min) y la resina se lavó nuevamente con DMF (x3) y DCM (x5). Finalmente se llevó a cabo simultáneamente la separación de la resina y las desprotecciones de las cadenas laterales usando una mezcla de TFA/TIPS/H₂O (95:2,5:2,5) (4 mL) durante 3 h. Una trituración en dietil éter frío dio lugar al producto sin purificar T9 en forma de sólido blanco (291 mg, 59% de rendimiento) con una pureza del 69% (según el análisis de HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 3172,98 [MH⁺], observado: 3172,90).

2.6. Síntesis del péptido antigénico T10

El péptido tetrapalmitoilado T10 fue preparado siguiendo un protocolo similar al del T9 (escala de síntesis de péptido: 0,25 mmol). Adicionalmente, se usó una pseudo prolina [^{psi}(Gly-Ser)] como bloque de construcción antes de la secuencia problemática Asn-Val-Ser-Ser. El producto T10 sin purificar fue obtenido en forma de sólido blanco (809 mg, rendimiento cuantitativo) con una pureza del 56% (según análisis de HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 2761,9 [MH⁺], observado: 2759,2).

2.7. Síntesis del péptido antigénico T11

El péptido tetrapalmitoilado T11 fue preparado siguiendo un protocolo similar al del T9 (escala de síntesis de péptido:

0,25 mmol). El producto T11 sin purificar fue obtenido en forma de sólido blanco (495 mg, rendimiento del 76%) con una pureza del 80% (según análisis de HPLC). La espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó la identidad del producto principal (m/z esperado: 2613,8 [MH⁺], observado: 2612,2).

Ejemplo 3: Preparación de vacuna (Proceso A)

5 El fosfopeptido tetrapalmitoilado derivado de Tau fue pesado (ver la cantidad en la tabla 2 a continuación), y se colocó en un matraz de vidrio de fondo redondo de 250 mL. A continuación se pesó dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), colesterol y el adyuvante monofosforil Lípido A (MPLA) (todos de Avanti Polar Lipids Inc. AL, EE.UU.) y se añadieron en una proporción molar de 9:1:7:0,2 respectivamente. A continuación se añadió cloroformo dando lugar a una disolución transparente con partículas finas. Tras una agitación suave durante 15
10 minutos, se eliminó el disolvente orgánico por evaporación a presión reducida a 40°C y a continuación en condiciones de alto vacío durante 3 h. La película fina resultante fue rehidratada mediante la adición de PBS estéril en una cabina laminar y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 18 h. La relación molar final de péptido / fosfolípido fue de 1:100. La suspensión liposómica fue dividida entonces en alícuotas en tubos falcon de 15 mL estériles (5 mL de producto/tubo) antes de su almacenamiento a 2-8°C. La concentración final de péptidos fue de 40 µM.

15 **Ejemplo 4: Caracterización de vacunas liposómicas de Tau**

4.1. Métodos

4.1.1. Cuantificación de péptido, DMPC y colesterol mediante HPLC

Para el análisis de las vacunas tau liposómicas (ACI-33, ACI-35, ACI-36, ACI-39, ACI-40 y ACI-41, todas preparadas según el proceso A descrito en el Ejemplo 3), se prepararon las muestras añadiendo agua (20 µL) en un vial de HPLC de vidrio, seguido de isopropanol (140 µL) y TFA (20 µL). El análisis se llevó a cabo usando una columna C3 de fase inversa Zorbax 300SB-B3 (250 x 4,6 mm, 5 µm, 300Å, Agilent) termostatizada a 75 °C, con detección a 207 y 214 nm. Los disolventes de elución fueron los siguientes: disolvente B, 95% de isopropanol, 5% de agua, 0,1% de TFA; disolvente A, 10% de acetonitrilo, 90% de agua, 0,1% de TFA. Se aplicó un gradiente desde 40% de B hasta 60% de B durante 20 minutos con un caudal de 1 mL/min. Se usaron patrones separados de péptidos tau (T1, T3, T4, T8 y T9) y DMPC/colesterol a diferentes concentraciones con fines de calibración. Para los péptidos tau, se preparó una disolución madre de 1 mg/mL en TFA/iPrOH/H₂O (1:7:2) y se diluyó en serie (1:1) desde 400 µg/mL hasta 12,5 µg/mL. Para los lípidos, se preparó una disolución madre de 8,0 mg/mL de DMPC y de 3,5 mg/mL de colesterol en un 70% de isopropanol y un 30% de agua, y se diluyó (1:5), (1:10) y (1:50) con la misma mezcla.

4.1.2. Cuantificación de MPLA mediante HPLC

30 Se cuantificó el MPLA de la vacuna liposómica tau mediante HPLC con detección UV tras derivatización del adyuvante con el cromóforo activo en UV 3,5-dinitrobenciloxiamina (DNBA). Resumidamente, se añadieron 20 µL de construcciones tau liposómicas a una disolución de DNBA en piridina (10 mg/mL, volumen total de 100 µL), se calentó a 60°C durante 3h y a continuación se eliminó la piridina mediante evaporación. La partícula resultante se resolubilizó en cloroformo/metanol (2:1, v/v) para el análisis de HPLC. Se usó MPLA (Avanti Polar Lipids) con fines de calibración a cuatro concentraciones diferentes y se derivatizó y analizó como las construcciones tau liposómicas. El análisis de HPLC se llevó a cabo usando una columna C18 de fase inversa Agilent XDB (250 x 4,6 mm, 120 Å, 5 µm), termostatizada a 50 °C, con detección a 254 nm. Los disolventes de elución fueron los siguientes: disolvente A, 95% de acetonitrilo, 5% de agua, ácido fosfórico 4,8 mM; disolvente B, 95% de isopropanol, 5% de agua, ácido fosfórico 4,8 mM. Se aplicó un gradiente desde 10% de B hasta 70% de B durante 30 minutos con un caudal de 1 mL/min.

40 4.1.3. Potencial superficial de liposoma

Se diluyeron muestras de construcción liposómica tau en una relación de 1 a 100 con PBS. Se llevó a cabo un análisis con un Zetasizer Nano (Malvern, EE.UU.) a 25 °C. La selección de la duración y del voltaje de medida se llevó a cabo en modo automático, con un voltaje aplicado típico de 50 mV. Los datos fueron transformados usando la ecuación de Smoluchowski automáticamente con el software DTS 5.0 (Malvern) para calcular el potencial zeta. Como las construcciones liposómicas tau están constituidas por una mezcla de DMPC/DMPG/Colesterol/MPLA en una relación molar de 9:1:7:0,2; la carga neta esperada será negativa.

4.1.4. Análisis conformacional mediante dicroísmo circular

Las construcciones liposómicas tau fueron diluidas (1:1) con PBS para dar lugar a una concentración final de péptido de 18 µM. Se usaron liposomas con una composición idéntica pero que carecían del péptido tau como disolución blanca para la resta de la línea base. Se adquirieron espectros de DC (dicroísmo circular) en un espectropolarímetro Jasco-815 con una cubeta de cuarzo de longitud de paso 0,1 cm (Hellma, Alemania) a 23 °C. Se tomaron medidas en el rango de longitud de onda de 195-250 nm con un ancho de banda de 1,0 nm y una resolución de 0,5 nm. Se empleó una velocidad de escaneado de 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 1 s. Los espectros del blanco (de 8 escaneados) fueron promediados y sustraídos de la media de 8 escaneados para cada espectro de muestra. El espectro obtenido ([θ]_{obs}, grados) fue suavizado tras ser convertido a elipticidad molar de residuo media ([θ], grados cm² dmol⁻¹) con la ecuación [θ] = [θ]_{obs} x (MRW/10lc), donde MRW es el peso molecular de residuo medio (MW/número

de residuos), l es la longitud de paso óptico (cm) y c es la concentración (g/cm^3).

4.1.5. Ensayo de fluorescencia ThT

Las medidas de fluorescencia ThT fueron adquiridas en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Suiza). Como procedimiento general, se diluyeron las construcciones liposómicas Tau a diferentes concentraciones con PBS (Tabla 2). Los liposomas con la misma composición pero que carecían del péptido tau fueron diluidos de forma similar para ser usados como control negativo (lote ACI-35-081015-B). A 98 μL de cada vacuna o de disolución de blanco, se añadió ThT (2 μL , 1,2 mM en agua) para obtener una concentración final de 24 μM . Tras someter brevemente a vórtice, se añadió una alícuota de cada muestra (70 μL) a una placa de microtitulación Perkin Elmer de 384 pocillos negra opaca, y se midió la emisión de fluorescencia a 485 nm después de 30 minutos de excitación a 440 nm. El ancho de banda de excitación fue de 9 nm y el ancho de banda de emisión fue de 20 nm. Se usó γ -ciclodextrina como control interno. Se realizaron diluciones 1 a 2 en PBS a partir de una disolución madre de 640 mM en PBS para obtener disoluciones de control de γ -ciclodextrina de 320, 160 y 80 mM.

Tabla 2: Muestras preparadas para el ensayo ThT

Péptido	Vacuna	Lote	Dilución	Concentración de péptido ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
T1	ACI-33	ACI-33-081031-A	1 a 2	23
		ACI-33-081031-A	1 a 3	15
		ACI-33-081031-A	1 a 4	7,7
		ACI-33-081031-A	1 a 12	3,8
T3	ACI-35	ACI-35-081015-A	1 a 2	39
		ACI-35-081015-A	1 a 3	26
		ACI-35-081015-A	1 a 4	20
		ACI-35-081015-A	1 a 12	5
T4	ACI-36	ACI-36-081110-A	1 a 2	16,5
		ACI-36-081110-A	1 a 3	11
		ACI-36-081110-A	1 a 4	8,3
		ACI-36-081110-A	1 a 12	2,1
T8	ACI-39	ACI-39-090202-A	1 a 2	24
		ACI-39-090202-A	1 a 3	16
		ACI-39-090202-A	1 a 4	12
		ACI-39-090202-A	1 a 12	4
T9	ACI-40	ACI-40-090202-A	1 a 2	30
		ACI-40-090202-A	1 a 3	20
		ACI-40-090202-A	1 a 4	15
		ACI-40-090202-A	1 a 12	5
T8+T9	ACI-41	ACI-41-081204-A	1 a 2	11,5
		ACI-41-081204-A	1 a 3	7,7
		ACI-41-081204-A	1 a 4	5,8
		ACI-41-081204-A	1 a 12	1,9
Control negativo	Control negativo	ACI-35-081015-B	1 a 2	n/a
		ACI-35-081015-B	1 a 3	n/a
		ACI-35-081015-B	1 a 4	n/a
		ACI-35-081015-B	1 a 12	n/a

15 4.2. Resultados

4.2.1. Cuantificación de péptido, DMPC y colesterol mediante HPLC

El cromatograma de HPLC a la longitud de onda de detección de 207 nm obtenido de la inyección de las muestras de

vacuna mostró la presencia de péptido tau, DMPC y colesterol (ver tabla 4). A partir de las curvas de calibrado determinadas con los patrones, se calculó la cantidad de cada componente de la vacuna. El contenido de péptido tau, DMPC y colesterol detectado en las suspensiones liposómicas tau estaba próximo al valor objetivo.

4.2.2. Cuantificación de MPLA mediante HPLC

- 5 El cromatograma de HPLC a la longitud de onda de detección de 254 nm obtenido de la inyección de las muestras de vacuna tau derivatizada con DNBA mostró la presencia de MPLA (ver tabla 4). A partir de la curva de calibrado obtenida con el patrón, se calculó la cantidad de MPLA en las vacunas liposómicas. El contenido de MPLA detectado en las suspensiones liposómicas tau estaba próximo al valor objetivo.

4.2.3. Potencial superficial de liposoma

- 10 El potencial zeta medido para las vacunas liposómicas tau se muestra en la tabla 4.

4.2.4. Análisis conformacional de péptido tau en las vacunas liposómicas mediante DC

Mediante dicroísmo circular se determinó la conformación de las vacunas liposómicas tau preparadas según la descripción. Los resultados se muestran en la tabla 3.

4.2.5. Ensayo ThT de péptido tau en las vacunas liposómicas

- 15 Los estados agregados de péptidos tau de las vacunas liposómicas (preparadas mediante el proceso A descrito anteriormente) determinados mediante un ensayo fluorimétrico ThT se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Resumen de características de las vacunas

Vacuna	Componente	Tiempo de retención	Valor objetivo (µg/mL)	Resultado (µg/mL)	Potencial superficial de liposoma (mV)	Dicroísmo circular de conformación	Ensayo ThT (agregación de péptido) Señal de fluorescencia
ACI-33	Péptido T1	19,3 min	130	46	-18,7	Conformación mixta de lámina beta y giro beta	Agregación
	Colesterol	11,2 min	1027	923			
	DMPC	10,0 min	2314	2463			
	DMPG	nd	261	nd			
	MPLA	39,8 min	135	62			
AC-35	Péptido T3	19,5 min	130	78	-19,2	Conformación de bobina aleatoria	Sin agregación
	Colesterol	11,6 min	1046	1438			
	DMPC	10,3 min	2357	nd			
	DMPG	nd	266	nd			
	MPLA	29,7 min	135	124			
ACI-36	Péptido T4	20,3 min	130	33	-17,8	Conformación de bobina aleatoria con alguna contribución de lámina beta	Agregación
	Colesterol	11,2 min	1018	1387			
	DMPC	10,0 min	2296	nd			
	DMPG	nd	259	nd			
	MPLA	29,7 min	135	83			
ACI-39	Péptido T8	19,3 min	130	48	-16,8	Conformación de lámina beta	Sin agregación
	Colesterol	11,8 min	1056	1906			
	DMPC	10,5 min	2381	4316			
	DMPG	nd	269	nd			
	MPLA	30,9 min	135	144			
ACI-40	Péptido T9	21,0 min	130	60	-14,7	Conformación de bobina aleatoria	Sin agregación
	Colesterol	11,8 min	1109	1655			
	DMPC	10,5 min	2500	2894			
	DMPG	nd	269	nd			
	MPLA	30,9 min	135	122			
ACI-41	Péptido T8+T9	18,3 min + 19,9 min	65 + 65	23 + 34	-17,3	Mezcla de conformación de bobina aleatoria y lámina beta	Sin agregación
	Colesterol	11,2 min	1109	34			
	DMPC	9,9 min	2500	1574			
	DMPG	nd	282	3829			
	MPLA	30,9 min	135	80			

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de antígenos palmitoilados en ratones salvajes y KO Tau-/-**5.1. Métodos****5.1.1. Ratones bloqueados para tau (TKO)**

El bloqueo del gen *tau* se logró usando un vector dirigido que insertó el ADNc de EGFP (proteína Fluorescente Verde Potenciada) en exón 1 del gen en-marco con el codón de inicio endógeno. Esto produjo una proteína de fusión con los primeros 31 aa de tau seguidos de EGFP (descrito por Tucker KL. et al., *Nature Neuroscience*, 2001). La eliminación del gen fue confirmada mediante ensayo de transferencia western blot de lisatos de cerebro enteros. Los niveles de proteína tau con varios anticuerpos anti-tau mostraron que todas las isoformas de tau estaban ausentes en el mutante homocigoto, con una reducción del 50% en el mutante heterocigoto. La mutación se mantuvo en un fondo de C57BL/6.

5.1.2. Preparación de la vacuna

Las vacunas se prepararon mediante el proceso A descrito en el Ejemplo 3.

5.1.3. Inmunizaciones

Los ratones C57BL/6 o KO Tau-/- (TKO) recibieron inyecciones i.p. de la vacuna (ACI-33, ACI-35, ACI-36 y ACI-41) en tres ocasiones (Esquema 1) (Tabla 4).

Para la inmunización de ACI-33, ACI-35, ACI-36 y ACI-41, se realizaron tres inmunizaciones con un intervalo de 2 semanas entre cada administración (día 0, día 13 y día 28) según el Esquema 1. Se tomaron muestras de sangre y se prepararon muestras de suero 1 día antes (día -1) de las primeras inmunizaciones, a continuación después de la segunda (día 27) y tercera (día 47) inmunizaciones. El suero fue preparado dejando que las muestras de sangre coagularan durante una noche y después tomando el sobrenadante tras centrifugación. Los títulos de anticuerpos de IgM e IgG específicos de fosfopéptido Tau y las estructuras de isotipo de IgG fueron determinadas mediante ELISA. Como control, también se determinó mediante ELISA los títulos de anticuerpos de IgG específicos de péptidos no-Tau.

Tabla 4: Inmunización de ratones

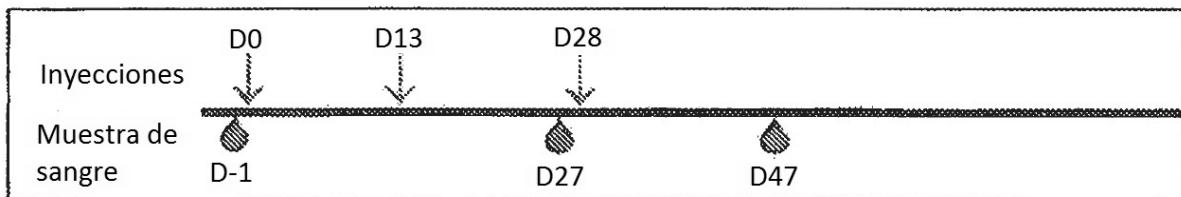
Grupo	Ratones	Edad (meses)	Nº de animales y género	Tratamiento / Volumen ^a	Lote de vacuna	Ruta de administración ^b	Nivel de dosis Cantidad de péptido µg/dosis ^c	Cantidad de MPLA µg/dosis ^c
ACI-33 (péptido T1)	Salvajes	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-33 0,2 mL	ACI-33-081031-A	i.p.	9	12
	KO	4-5	3 ♀ 3 ♂	ACI-33 0,2 mL	ACI-33-081031-A	i.p.	9	12
ACI-35 (péptido T3)	Salvajes	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-35 0,2 mL	ACI-35-081015-A	i.p.	16	23
	KO	6-8	3 ♀ 3 ♂	ACI-35 0,2 mL	ACI-35-081015-A	i.p.	16	23
ACI-36 (péptido T4)	Salvajes	6	3 ♀ 3 ♂	ACI-36 0,2 mL	ACI-35-081110-A	i.p.	7	13
	KO	4	3 ♀ 3 ♂	ACI-36 0,2 mL	ACI-35-081110-A	i.p.	7	13
ACI-41 (péptido T8+T9)	Salvajes	7	3 ♀ 3 ♂	ACI-41 0,2 mL	ACI-35-081204-A	i.p.	5	7
	KO	4	3 ♀ 3 ♂	ACI-41 0,2 mL	ACI-35-081204-A	i.p.	5	7

^a volumen teórico.

^b i.p.: *intra-peritoneal*.

^c cantidad medida determinada tras análisis.

Esquema 1: Calendario de inmunizaciones y toma de muestras de sangre para ACI-33, ACI-35, ACI-36 y ACI-41.



5.1.4. Cuantificación de anticuerpos específicos de péptido Tau.

- 5 Los anticuerpos de IgG específicos para péptidos pTau fueron determinados mediante ELISA en las 3 muestras de suero sanguíneo. Las IgG específicas de péptidos Tau fueron determinadas en los sueros de los días -1 y 47. Los anticuerpos de isotp de IgG e IgM específicos de péptidos pTau fueron determinados mediante ELISA en la muestra de suero sanguíneo del día 47. Se recubrieron placas con 10 µg/mL del correspondiente péptido Tau durante una noche a 4°C. Tras lavar cada pocillo con PBS-Tween 20 al 0,05% y bloquear con BSA al 1% en PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadieron diluciones en serie de suero a las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Tras lavar, las placas fueron incubadas con un anticuerpo total de IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) o con anticuerpos específicos de isotp (IgM anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), IgG1 anti-ratón conjugada con AP, IgG2a anti-ratón conjugada con biotina e IgG3, adquiridas en Pharmingen BD, San Diego, CA, EE.UU., e IgG2b anti-ratón conjugada con HRP de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) durante 2 horas a 37°C. Tras lavar, las placas fueron incubadas con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa para AP, o con ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzitiazolina-6-sulfónico)), el sustrato de HRP, y fueron leídas a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Se realizó una etapa suplementaria para los anticuerpos conjugados a biotina, en la que las placas fueron incubadas durante 45 minutos en estreptavidina-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) antes de la detección con ABTS. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica) en la primera dilución y en una dilución no saturada para IgG y en una D.O. no saturada para los isotp de IgG e IgM.

5.1.5. Unión de anticuerpos anti-Tau a marañas Tau en láminas de cerebro de animales transgénicos (TAUPIR)

La unión de los anticuerpos presentes en el suero de animales vacunados a marañas en láminas de cerebro se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica TAUPIR.

- 25 Las láminas de cerebro usadas procedían de un animal transgénico Tau P301L (TPLH: isoforma más larga (441 aa) de Tau humana con la mutación P301L) en etapa terminal, y de ratones biGT transgénicos dobles viejos (>15 meses) (ratones transgénicos GSK-3 cruzados con ratones TPLH).
- 30 Las secciones de cerebro se lavaron durante 5 minutos en PBS y a continuación se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en H₂O₂ al 1,5% en PBS:MeOH (1:1) para bloquear la peroxidasa endógena. Tras lavar las secciones 3 veces en PBST (PBS/Triton X-100 al 0,1%) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una disolución bloqueante de PBST + FCS (suero fetal de ternero) al 10%. La incubación con el suero que contiene los anticuerpos anti-Tau se realizó durante la noche a 4°C. El suero se diluyó en PBST/FCS al 10% usando varias diluciones diferentes desde 1/2.500 hasta 1/10.000. Las secciones se lavaron 3 veces en PBST antes de la incubación con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (adquirido en Dako, Glostrup, Dinamarca) en PBST/FCS al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de la detección, las secciones fueron lavadas 3 veces con PBST y se incubaron en Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, durante 5 minutos. La detección se llevó a cabo incubando las secciones durante 3 minutos en diaminobenzidina (DAB: 1 comprimido en 10 mL de Tris-HCl 50 mM + 3 µL de H₂O₂ al 30%) (MP Biomedicals, Solon, OH, EE.UU.). La reacción se detuvo lavando las secciones 3 veces en PBST. Las secciones fueron transferidas entonces a placas de vidrio silanizado y se secaron al aire en placas templadas a 50°C durante 2 horas. Se realizó una contra-tinción con una incubación con hematoxilina de Mayers (Fluka Chemie, Buchs, Suiza) durante 1 minuto, seguida de una etapa de lavado durante 4 minutos en agua de grifo corriente. Las secciones fueron deshidratadas mediante pasaje en baño etanol al 50%, al 70%, al 90% y dos veces en etanol al 100%, y después en xilol dos veces durante 1 minuto. Finalmente, las secciones fueron montadas con DePeX (BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra) en tiras cubreobjetos de vidrio.

45 5.1.6. Análisis de transferencia Western Blot (WB)

Mediante WB se llevó a cabo la unión de los anticuerpos presentes en el suero de animales vacunados a pTau en extracto de cerebro procedente de animales transgénicos.

- 50 La homogenización de cerebro de ratón salvaje FVB, TPLH, biGT y con Tau bloqueado (TKO) se llevó a cabo en la siguiente disolución tampón: Tris/HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 30 mM, Na₃VO₄ 0,2 mM, ácido okadaico 1 nM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Na₄P₂O₇ 5 mM, 1 comprimido de cóctel de

inhibidor de proteasa completo (CPIC) para un total de 12 mL. Para obtener un *homogenato cerebral completo* se homogenizó el cerebro sobre hielo en una semiesfera de 1 vol. / peso (mL/g) con un homogeneizador tipo Potter motorizado (tubo de vidrio / mortero de teflón) usado a 700 rpm.

5 El homogenato cerebral total se diluyó a la mitad en tampón de muestra (Tris/HCl 125 mM pH 6,8, 4% (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS), 20% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol) + 5% de beta-mercpto-etanol, después se calentó rápidamente a 95°C. Las muestras se mantuvieron 5 minutos, se diluyeron 1/4 en tampón de muestra, se calentaron de nuevo a 95°C y después se enfriaron y se giraron a 14000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos que no se habían solubilizado. Los sobrenadantes fueron recogidos y cargados en un gel de SDS-PAGE. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL) se realizó en tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,6, Glicina 190 mM, 20% de metanol). La membrana se transfirió a la disolución de bloqueo (Tween al 0,1% en TBS (Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM) + 5% de leche en polvo) antes de una incubación de una noche a 4°C con el suero de ratón diluido en la disolución de bloqueo. La incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido 1/10.000 en disolución de bloqueo se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. La detección se realizó usando los Reactivos de Detección de Western Blotting de GE Healthcare.

10

15

5.2. Resultados

5.2.1. Especificidad del anticuerpo procedente de sueros de ratones vacunados

Los sueros procedentes de ratones vacunados fueron evaluados para determinar la especificidad de sus anticuerpos en un ensayo ELISA contra pTau y péptido Tau, marañas tau en TAUPIR y pTau en Western Blot.

20 La vacuna ACI-33 indujo una respuesta de IgG anti-Tau5-20 [pY18] tras la inyección i.p. Después de 2 inmunizaciones (día 27), la respuesta de IgG permaneció estable sin aumento en la tercera inmunización (día 47) (Figura 1a: ratones salvajes, Anova de 1-sentido P<0,05 día -1 frente a día 27; P<0,001 día -1 frente a día 47, y Figura 1b: ratones TKO, Anova de 1-sentido P<0,001 día -1 frente a día 27/47).

25 La vacuna ACI-35 indujo una respuesta robusta de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] tras la inyección i.p. Después de 2 inmunizaciones (día 28), la respuesta de IgG permaneció estable (día 42, 98 y 126) sin aumento en la 3ª inmunización (día 42) y sin descenso en las muestras de sangre antes, durante y después del recuerdo (Figura 2a: ratones salvajes, Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 28/42/98/126; y Figura 2b: ratones TKO, Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 28/42/98/126).

30 La vacuna ACI-36 indujo una respuesta de IgG Tau401-418 [pS404-S409] tras la inyección i.p. Después de 2 inmunizaciones (día 27), la respuesta IgG permaneció estable sin aumento en la tercera inmunización (día 47) (Figura 3a: ratones salvajes, Anova de 1-sentido P<0,001 día -1 frente a día 27; P<0,0001 día -1 frente a día 47, y Figura 3b: ratones TKO, Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 27/47).

35 La vacuna ACI-41 indujo una respuesta de IgG robusta tras la inyección i.p. con los péptidos Tau206-221 [pT212/pS214] y Tau196-211 [pS202/pT205]. Tras 2 inmunizaciones (día 34), la respuesta de IgG permaneció estable (día 48) sin aumento después de la tercera inmunización (día 48) (Figura 4a: ratones salvajes, IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214], Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 34/48) (Figura 4b: ratones salvajes, IgG anti-Tau196-211 [pS202/pT205], Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 34/48) (Figura 4c: ratones TKO, IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214], Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 34/48) (Figura 4d: ratones TKO, IgG anti-Tau196-211 [pS202/pT205], Anova de 1-sentido P<0,0001 día -1 frente a día 34/48).

40 Los sueros de ratones vacunados fueron evaluados adicionalmente para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-tau en inmunohistoquímica TAUPIR y en Western Blot. Los datos de todas las construcciones liposómicas y de cada modelo de ratón se resumen a continuación en la tabla 5.

Tabla 5: Sinopsis de especificidad de anticuerpos procedentes de sueros de ratones vacunados

Vacuna	ratones	ELISA (positivos/ratones totales)	TAUPIR (positivos/ratones totales)	Western Blot (positivos/ratones totales)
ACI-33	Salvajes	4/6	2/6	1/6
	KO	5/6	2/6	2/6
ACI-35	Salvajes	5/6 ; 1†	5/6 ; 1†	5/6 ; 1†
	KO	6/6	3/6	6/6
ACI-36	Salvajes	5/6	4/6	1/6
	KO	5/6 ; 1†	3/6 ; 1†	1/6 ; 1†
ACI-41	Salvajes	6/6	4/6	4/6
	KO	6/6	1/6	3/6

5.2.2. Análisis de la respuesta de isótipo de ratones inmunizados salvajes C57BL/6 y Tau-/ KO (TKO)

ACI-33

La vacuna ACI-33 indujo títulos de anticuerpos en ratones salvajes para todos los isótipos, IgG2a, 2b y 3, así como para IgM, tras 3 inmunizaciones i.p. (Figura 5a, ratones salvajes). Casi no hubo IgG1 y hay una diferencia significativa entre IgG1 e IgG2b y 3 (Figura 5a; ratones salvajes; Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG1 frente a IgG3, $P<0,001$ IgG1 frente a IgG2b). La vacuna ACI-33 indujo títulos de anticuerpos en ratones TKO para todos los isótipos, IgG2a, 2b y 3, así como para IgM, tras 3 inmunizaciones i.p. (Figura 5b, ratones TKO). Casi no hubo IgG1, con una diferencia significativa entre dicha subclase y los otros isótipos de IgG (Figura 5b, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG1 frente a IgG2a/IgG3, $P<0,001$ IgG1 frente a IgG2b).

10 ACI-35

La vacuna ACI-35 indujo en ratones salvajes títulos de anticuerpos elevados para todos los isótipos de IgG, así como para IgM, después de 3 inmunizaciones i.p. (Figura 6a, ratones salvajes). La única diferencia significativa es una mayor respuesta de IgM en comparación con IgG3 (Figura 6a, ratones salvajes, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgM frente a IgG3).

15 15 La vacuna IC-35 indujo en ratones TKO títulos de anticuerpos elevados para todos los isótipos de IgG, así como para IgM, después de 3 inmunizaciones (Figura 6b, ratones TKO).

ACI-36

La vacuna IC-36 indujo en ratones salvajes títulos de anticuerpos para todos los isótipos de IgG, así como para IgM, después de 3 inmunizaciones (Figura 7a, ratones salvajes).

20 20 La vacuna IC-36 indujo en ratones TKO títulos de anticuerpos para todos los isótipos de IgG, así como para IgM, después de 3 inmunizaciones (Figura 7b, ratones TKO). Se obtuvo un nivel mayor de IgG2b, estadísticamente significativo, en comparación con IgG1 (Figura 7b; ratones TKO, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG2b frente a IgG1).

ACI-41

25 25 La vacuna IC-41 indujo en ratones salvajes títulos elevados de anticuerpo anti-Tau196-211 [pS202/pT205] para todos los isótipos de IgG, así como para IgM, después de 3 inmunizaciones (Figura 8a, ratones salvajes).

La vacuna IC-41 indujo en ratones TKO títulos elevados de anticuerpo anti-Tau196-211 [pS202/pT205] para todos los isótipos de IgG, así como para IgM, después de 3 inmunizaciones (Figura 8b, ratones TKO).

5.3. Conclusión

30 30 La vacuna Tau indujo títulos de IgG en todos los ratones. Se obtuvo una baja respuesta de anticuerpo de IgG1 en comparación con IgG2b e IgG3 en ratones inmunizados con ACI-33. En todos los ratones vacunados con tau, los títulos de anticuerpos inducidos para todos los isótipos IgG2a, 2b y 3, así como para IgM, fueron comparables.

Los anticuerpos generados a partir de ratones inmunizados con vacuna tau se unen específicamente a pTau con una unión marginal a péptidos Tau. Los anticuerpos generados también fueron capaces de reconocer marañas en cerebro de ratón transgénico Tau y pTau procedente de extracto de cerebro de ratón transgénico mediante WB.

35 35 **Ejemplo 6: Generación y cribado de hibridomas y anticuerpos**

El objetivo de este estudio fue generar y escrutar mAbs anti-Tau (anticuerpos monoclonales). Los hibridomas fueron generados mediante fusión de bazo de ratón inmunizado con vacuna tau con una línea celular de mieloma. Los hibridomas fueron evaluados para determinar su reactividad frente a proteína Tau de longitud completa tanto fosforilada como sin fosforilar, así como frente a los péptidos antigenicos Tau fosforilados y sin fosforilar usados en la preparación de las vacunas. También se realizó un cribado de hibridomas usando inmunohistoquímica en láminas de cerebro de ratón transgénico Tau.

6.1. Métodos

6.1.1 Fusión

Se usó un ratón C57BL/6 salvaje vacunado con ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) y ACI-35 para la producción de hibridomas. 45 El ratón fue inyectado con la vacuna ACI-33 en el día 0 y nuevamente en el día 4, y la fusión se llevó a cabo en el día 7. Se fusionaron 173×10^6 (ACI-33) esplenocitos procedentes del ratón inmunizado con células de mieloma SP2-O-Ag14 en una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

Se usó un ratón C57BL/6 salvaje vacunado con ACI-36 (Tau401-418 [pS404/S409]) para la producción de hibridomas. El ratón fue inyectado con la vacuna ACI-36 en el día 0 y nuevamente en el día 4, y la fusión se llevó a cabo en el día

7. Se fusionaron 84×10^6 esplenocitos procedentes del ratón inmunizado con células de mieloma SP2-O-Ag14 en una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

5 Se usó un ratón C57BL/6 salvaje vacunado con ACI-41 (mezcla de Tau206-211 [pT212/pS214] y Tau196-211 [pS202/pT205]) para la producción de hibridomas. El ratón fue inyectado con la vacuna ACI-41 en el día 0 y nuevamente en el día 4, y la fusión se llevó a cabo en el día 8. Se fusionaron 162×10^6 esplenocitos procedentes del ratón inmunizado con células de mieloma SP2-O-Ag14 en una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma.

Las tres fusiones dieron como resultado 8 x placas de 96 pocillos y los clones fueron nombrados según la placa (1-8) y la fila (A-G) y finalmente la columna (1-12).

6.1.2. Método de cribado para seleccionar clones

10 Las 8 x placas de 96 pocillos fueron escrutadas en primer lugar dos veces para la expresión de IgG. Los clones de expresión positiva fueron transferidos a continuación a placas de 24 pocillos y los sobrenadantes celulares (=clones) de las células en crecimiento fueron evaluados en un cribado ELISA de Tau y en un cribado de inmunohistoquímica TAUPIR. Los sobrenadantes positivos en ELISA y/o TAUPIR fueron transferidos a matraces T25 y los clones volvieron a ser escrutados en función de la expresión de IgG, el cribado ELISA de Tau y el TAUPIR.

15 6.1.3. Cribado de IgG

20 Se recubrieron placas ELISA con 50 μ L/pocillo de anticuerpo de IgG anti-ratón (CER Groupe, Marloie, Bélgica) en tampón de recubrimiento durante 16 h a 4°C. Tras lavar las placas con PBS/Tween se aplicaron 100 μ L/pocillo de una disolución bloqueante durante 1h a temperatura ambiente. Se incubaron 50 μ L de sobrenadante de hibridoma sin diluir durante 1h a temperatura ambiente. Tras una etapa de lavado, se aplicó una mezcla de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-ratón conjugadas a peroxidasa de rábano (HRP) (Ab Serotec, Raleigh, NC, EE.UU.) sobre las placas durante 1h a temperatura ambiente. Tras un lavado final, se llevó a cabo la detección con TMB (3-3',5,5'-tetrametilbenzidina), el sustrato de fosfatasa para HRP, y las placas fueron leídas a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica).

6.1.4. Cribado ELISA de hibridomas Tau

25 El cribado ELISA de hibridomas se llevó a cabo con los péptidos pTau (ACI-33, T1.5: Tau5-20 [pY18]; ACI-36, T4.5: Tau401-418 [pS404/S409]; ACI-41, T8.5: Tau206-211 [pT212/pS214] y T9.5: Tau196-211 [pS202/pT205]; PolyPeptide Laboratories, Hillerød, Dinamarca), el correspondiente péptido Tau (ACI-33, T1.6: Tau5-20; ACI-36, T4.6: Tau401-4; ACI-41, T8.6: Tau206-221 y T9.6: Tau196-211, PolyPeptide Laboratories, Hillerød, Dinamarca), proteína Tau de longitud completa (441 aa) fosforilada (proteína pTau, Vandebroek et al., 2005) y proteína Tau de longitud completa (441 aa) (proteína Tau, SignalChem, Richmond, Canadá). Finalmente, como control negativo se usó Albúmina de Suero Bovino (BSA).

30 Se recubrieron placas con 10 μ g/mL del correspondiente péptido Tau y 1 μ g/mL de la correspondiente proteína Tau durante una noche a 4°C. Tras lavar cada pocillo con PBS-Tween 20 al 0,05% y bloquear con BSA al 1% en PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadió sobrenadante de hibridoma sin diluir o medio del control negativo a las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Despues de un lavado, las placas fueron incubadas con un anticuerpo total de IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) durante 2 horas a 37°C. Tras un lavado, las placas fueron incubadas con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa para AP, y fueron leídas a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica).

40 6.1.5. Cribado IHC de hibridomas: Unión de anticuerpos anti-Tau a marañas en secciones de cerebro de ratones transgénicos (TAUPIR)

Los experimentos TAUPIR se llevaron a cabo según el protocolo del Ejemplo 5.1.5.

6.1.6. Cribado de IgG de matraces T25

45 Se recubrieron placas ELISA con 5 μ g/mL de anticuerpo específico de fragmento F(ab')2 de IgG anti-ratón (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) en tampón de recubrimiento de carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (Sigma, Buchs, Suiza) durante una noche a 4°C. Tras lavar las placas, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente el sobrenadante de hibridoma, anticuerpo IgG1 de control positivo (6E10 a 1 μ g/mL: Covance, Emeryville, CA, EE.UU.) o control negativo (solo medio de cultivo). Tras una etapa de lavado, se incubó el anticuerpo secundario específico de fragmento Fcγ de IgG (subclases 1+2a+2b+3) anti-ratón de cabra conjugado con AP (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) sobre las placas durante 2 h a 37°C. Tras un lavado final, se llevó a cabo la detección con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa para AP, y las placas fueron leídas a 405 nm con un lector de placas ELISA. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica).

6.2. Resultados

Hibridomas de ACI-33

Se sometieron a cribado los sobrenadantes celulares de 8x placas de 96 pocillos resultantes de la fusión, para determinar la producción de IgG. En los 768 pocillos (8x96 pocillos) evaluados, 277 pocillos fueron positivos para la expresión de IgG y fueron transferidos a placas de 24 pocillos. En las placas de 24 pocillos, se cultivaron 79 clones y el sobrenadante de dichas células fue analizado. Los clones positivos fueron transferidos nuevamente a matraces T25 y los sobrenadantes fueron sometidos a cribado de producción de IgG, de ELISA y de TAUPIR (Tabla 6).

Tabla 6:

Cribado de placas de 24 pocillos		Cribado de matraces T25		
Positivo en ELISA	Positivo en TAUPIR	Positivo en cribado de IgG	Positivo en ELISA	Positivo en TAUPIR
1A7		1A7		
	1A11			
	1C11	1C11		
2C9		2C9		
3C3		3C3	3C3	
3C5		3C5		
3E8		3E8		
3G10	3G10	3G10	3G10	
6C10	6C10	6C10	6C10	6C10
6F3		6F3		
6F8		6F8		

10 El clon 6C10 fue el único positivo en los 3 cribados y fue seleccionado para subclonación.

Hibridomas de ACI-36

Se sometieron a cribado los sobrenadantes celulares de 8x placas de 96 pocillos resultantes de la fusión, para determinar la producción de IgG. En los 768 pocillos (8x96 pocillos) evaluados, 333 pocillos fueron positivos para la expresión de IgG y fueron transferidos a placas de 24 pocillos. En las placas de 24 pocillos, se cultivaron 75 clones y el sobrenadante de dichas células fue analizado. Los clones positivos fueron transferidos nuevamente a matraces T25 y los sobrenadantes fueron sometidos a cribado de producción de IgG, de ELISA y de TAUPIR (Tabla 7).

Tabla 7:

Cribado de placas de 24 pocillos		Cribado de matraces T25		
Positivo en ELISA	Positivo en TAUPIR	Positivo en cribado de IgG	Positivo en ELISA	Positivo en TAUPIR
2B6	2B6	2B6	2B6	2B6
2F9	2F9	2F9	2F9	2F9
2G1		2G1	2G1	2G1
3A8	3A8	3A8	3A8	3A8
3B9		3B9	3B9	3B9
3F11	3F11	3F11		3F11
	4A3			4A3
4C1		4C1	4C1	4C1
4C12		4C12	4C12	4C12
4E12		4E12	4E12	4E12
5E10		5E10	5E10	
5F5		5F5	5F5	
7D6	7D6	7D6	7D6	7D6
6H1		6H1	6H1	6H1

Para seleccionar los clones para las siguientes etapas, se realizó una clasificación de todos los sobrenadantes positivos en los cribados de IgG/ELISA/TAUPIR en base a los resultados de ELISA y TAUPIR. La clasificación de los resultados de ELISA y TAUPIR se realizó como se explica en la sección de métodos. La tinción TAUPIR fue casi idéntica para los cinco primeros clones y correspondió a los resultados de ELISA. Se descartó el 4C12, ya que se observó en la misma placa que el 4C1, lo que aumentó la probabilidad de los 2 clones sean el mismo (que reconozcan el mismo epítopo). Los mejores 4 clones seleccionados fueron 3A8, 2B6, 4C1 y 6H1. Los otros 6 clones (4C12, 2G1, 2F9, 7D6, 3B9, 4E12) se mantuvieron como reserva.

5 Se realizó una clasificación de los 10 clones que fueron positivos en el cribado ELISA y en el cribado TAUPIR para seleccionar los mejores (Tabla 8). En gris se destacan los mejores 5 clones.

10 **Tabla 8: Clasificación de clones positivos en ELISA y TAUPIR**

Clasificación para ELISA	Clasificación para TAUPIR
3A8	6H1
2B6	4C1
4C1	3A8
6H1	4C12
4C12	2B6
2G1	2F9
2F9	3B9
7D6	2G1
3B9	7D6
4E12	4E12

Hibridomas de ACI-41

15 Se sometieron a cribado los sobrenadantes celulares de 8x placas de 96 pocillos resultantes de la fusión, para determinar la producción de IgG. En los 768 pocillos (8x96 pocillos) evaluados, 215 pocillos fueron positivos para la expresión de IgG y fueron transferidos a placas de 24 pocillos. En las placas de 24 pocillos, se cultivaron 81 clones y el sobrenadante de dichas células fue analizado. Los clones positivos fueron transferidos nuevamente a matraces T25 y los sobrenadantes fueron sometidos a cribado de producción de IgG, de ELISA y de TAUPIR (Tabla 9).

Tabla 9:

Cribado de placas de 24 pocillos		Cribado de matraces T25		
Positivo en ELISA	Positivo en TAUPIR	Positivo en cribado de IgG	Positivo en ELISA	Positivo en TAUPIR
	3D11	3D11		3D11
4H6		4H6		4H6
5D10	5D10	5D10	5D10	5D10
5E6	5E6			
5F10		5F10		
6B7		6B7	6B7	
7C2	7C2	7C2	7C2	7C2
	8G8			8G8
	8H8	8H8		8H8

20 Los clones 5D10 y 7C2 fueron los únicos positivos en los 3 cribados y fueron seleccionados para subclonación. El clon 5D10 se une solo al péptido T8.5, mientras que el clon 7C2 se une a los dos péptidos de la vacuna ACI-41 (T8.5 y T9.5) (Figura 10). El subclon 5D10A4 que procede del 5D10 fue específico para el péptido pTau.

8.3. Conclusión

Los anticuerpos generados han demostrado una elevada especificidad hacia péptidos pTau, con una unión solo marginal a péptidos no fosforilados.

5 De las 3 fusiones (ACI-33, ACI-36 y ACI-41), se depositaron un total de 7 clones en DSMZ (tabla 10) y se seleccionaron para continuar con la subclonación.

Tabla 10: Lista de hibridomas depositados

Antígeno	Vacuna	Nombre de hibridoma	Número de depósito	Fecha de depósito
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 marzo 2010
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	2B6	DSM ACC3044	10 marzo 2010
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	3A8	DSM ACC3045	10 marzo 2010
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	4C1	DSM ACC3046	10 marzo 2010
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	5D10A3	DSM ACC3047	10 marzo 2010
T1: Tau 5-20 [pY18]	ACI-33	6C10	DSM ACC3048	10 marzo 2010
T4: Tau 401-418 [pS404, pS409]	ACI-36	6H1	DSM ACC3049	10 marzo 2010
T8: Tau206-221 [pT212/pS214] + T9: Tau196-211 [pS202/pT205]	ACI-41	7C2	DSM ACC3050	10 marzo 2010

Ejemplo 7: Tinción específica de lámina de cerebro con AD humano con dos anticuerpos (ACI-41-Ab1 y 5D10), derivados de ratones vacunados con ACI-41

10 El objetivo de este estudio fue teñir marañas neurofibrilares (NFTs, del inglés “neurofibrillary tangles”) en cerebro humano con enfermedad de Alzheimer (AD) usando los anticuerpos ACI-41-Ab1 (9H3 subclon T89-F4) y 5D10, generados a partir de diferentes fusiones de ratones inmunizados con la vacuna ACI-41. Para realizar la evaluación, se empleó un ensayo de tinción de inmunorreactividad de proteína fosfo-Tau (TAUPIR) usando secciones de cerebro con AD.

15 **7.1 Métodos**

7.1.1 Generación de anticuerpo 5D10

El 5D10 se generó como se ha descrito en el Ejemplo 9.

7.1.2. Generación de ACI-41-Ab1

7.1.2.1. Fusión

20 Para la producción de hibridomas se usó un ratón salvaje C57BL/6 vacunado con ACI-41 (la vacuna ACI-41 contiene una mezcla de dos fosfo-péptidos Tau, el Tau206-221 [pT212/pS214] y el Tau196-211 [pS202/pT205]). El ratón fue inyectado con péptido ACI-41 cinco días antes de la fusión. Se fusionaron 58×10^6 esplenocitos procedentes del ratón inmunizado con células de mieloma SP2/0-O-Ag 14 en una proporción de 5 esplenocitos / 1 célula de mieloma. La fusión dio como resultado 10 x placas de 96 pocillos que fueron sometidas a continuación a cribado para determinar los clones interesantes.

25 7.1.2.2. Cribado ELISA de hibridomas

Se llevó a cabo un cribado ELISA de hibridomas en placas recubiertas con T8: Tau206-211 [pT212/pS214], T9: Tau196-211 [pS202/pT205] o Tau hiperfosforilada (hP) (explicado en la sección de Western Blot).

30 Las placas fueron recubiertas con 2 µg/mL de hP-Tau durante una noche a temperatura ambiente. Tras lavar cada pocillo con PBS y bloquear con FCS al 2% en PBS, se añadió sobrenadante de hibridoma a las placas y se incubó

durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado, las placas fueron incubadas con Ig total anti-ratón de cabra AffiniPure conjugada peroxidasa (Detección de IgG + IgM, Dako Glostrup, Dinamarca) en FCS al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron desarrolladas con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N y se leyó a 450 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresaron en densidad óptica (D.O.) para cada clon de hibridoma.

Para los péptidos, las placas fueron recubiertas con 10 µg/mL de Tau206-221 [pT212/pS214] o Tau196-211 [pS202/pT205] durante una noche a 4°C. Después de un lavado con PBS y de bloquear con NHS al 2% en PBS, se añadió el sobrenadante de hibridoma a las placas y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras una etapa de lavado, las placas fueron incubadas con IgG anti-ratón biotinilada (adquirida en los laboratorios Vector) en NHS al 1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó una etapa suplementaria para los anticuerpos conjugados a biotina y las placas fueron incubadas durante 30 minutos en estreptavidina-HRP (kit ABC, laboratorios Vector) antes de la detección. Tras una etapa de lavado, las placas fueron desarrolladas con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 N y se leyó a 450 nm usando un lector de placas ELISA. Los resultados se expresaron en densidad óptica (D.O.) para cada clon de hibridoma.

15 7.1.2.3 Cribado IHC de hibridomas: Unión de anticuerpos anti-Tau a marañas en secciones de cerebro procedentes de ratones transgénicos (TAUPIR)

La unión de los anticuerpos a marañas producidas por células de hibridoma se realizó mediante inmunohistoquímica (IHC) sobre secciones de cerebro de ratones transgénicos Tau.

20 Secciones de cerebro de ratones biGT transgénicos dobles viejos (>20 meses) (ratones transgénicos GSK-3 cruzados con ratones que expresan TPLH (la isoforma más larga de Tau humana (441 aa) con la mutación P301L, y procedentes de ratón bloqueado para Tau (TKO) como control negativo.

La tinción TAUPIR se realizó según el protocolo del Ejemplo 5.1.5.

7.1.2.4. Cribado Western Blot (WB) de hibridomas

25 La unión de anticuerpos producidos por células de hibridoma a pTau en extracto de cerebro de animales transgénicos y/o extracto hP-Tau se llevó a cabo mediante WB.

30 La homogenización de cerebro de ratones salvajes FVB, TPLH, biGT y bloqueados para Tau (TKO) se realizó en el siguiente tampón: Tris/HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 30 mM, Na₃VO₄ 0,2 mM, ácido okadaico 1 nM, fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF), Na₄P₂O₇ 5 mM, 1 comprimido de cóctel de inhibidor de proteasa completo (CPIC) por cada 12 mL del total. Para obtener el homogenato de cerebro total, el cerebro se homogenizó sobre hielo en una semiesfera de 10 vol. /peso (mL / g) con un homogeneizador tipo Potter (tubo de vidrio / mortero de teflón) motorizado usado a 700 rpm.

35 Para la extracción de hP-Tau, se homogenizó cerebro de ratón TPLH y TKO con el siguiente tampón: MES 100 mM pH 6,8, β-mercapto-etanol 1 mM, EDTA 5 mM, PMSF 2,5 mM, 5 µg/mL de tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), NaF 100 mM, ácido okadaico 1 nM, Na₃VO₄ 0,2 mM y 1 comprimido de cóctel inhibidor de proteasa completo (CPIC) por cada 12 mL totales. El cerebro se homogenizó sobre hielo en semiesferas de 6 vol. / peso (mL / g) con un homogeneizador de tipo Potter (tubo de vidrio / mortero de teflón) motorizado usado a 700 rpm. El homogenato fue centrifugado a 20000 x g 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió y se calentó rápidamente hasta 95°C, donde se mantuvo durante 10 minutos tras enfriarlo en hielo fundido. Se realizó una etapa de centrifugación antes de tomar alícuotas de sobrenadante y almacenar a -20°C como "hP-Tau".

40 Se diluyó homogenato de cerebro total a la mitad en tampón de muestra (Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, dodecil sulfato sódico (SDS) al 4% (p/v), glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,01%) + beta-mercapto-etanol al 5%, a continuación se calentó rápidamente hasta 95°C. Las muestras se mantuvieron 5 minutos, se diluyeron a ¼ en tampón de muestra, se calentaron de nuevo hasta 95°C y después se enfriaron y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min para eliminar los restos que no se hubiesen solubilizado. Se recogieron los sobrenadantes y se cargaron en un gel SDS-PAGE. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL) se realizó en tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,6, Glicina 190 mM, 20% de metanol). La membrana se transfirió a la disolución de bloqueo (0,1% de Tween en TBS (Tris/HCl 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM) + 5% de leche en polvo) antes de una incubación de una noche a 4°C con sobrenadante de hibridoma sin diluir. La incubación con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado a HRP (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluido 1/10.000 en disolución de bloqueo se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. La detección se realizó usando los Re却tivos de Detección ECI Western Blotting de GE Healthcare.

7.1.3. Unión de anticuerpos anti-fosfo-Tau a marañas Tau en un cerebro humano con AD

55 Se generaron los clones de anticuerpos anti-fosfo Tau ACI-41-Ab1 (subclon 9H3 T89-F4) (isotipo IgM de ratón) y 5D10 (isotipo IgG de ratón) a partir de dos fusiones separadas de ratones vacunados con ACI-41. La vacuna ACI-41 contiene una mezcla de dos péptidos fosfo-Tau, el Tau206-221 [pT212/pS214] y el Tau196-211 [pS202/pT205]. La unión del clon de anticuerpo T89-F4 a las marañas en láminas de cerebro procedentes de cerebros humanos con AD se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica TAUPIR. Se usaron secciones de cerebro cortical de individuos con AD, parálisis

supranuclear progresiva (PSP) y controles sanos. Las secciones de cerebro se lavaron durante 5 minutos en PBS y después se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en H_2O_2 al 1,5% en PBS:MeOH (1:1) para bloquear la peroxidasa endógena. Tras lavar las secciones 3 veces en PBST (PBS/Triton X-100 al 1%) se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en disolución de bloqueo de PBST+FCS al 10% (suero fetal de ternero). La 5 incubación con los anticuerpos primarios (clon 9H3 T89-F4, 5D10 y AT100 como control positivo) se realizó durante una noche a 4°C. Las secciones fueron lavadas 3 veces en PBST antes de la incubación con un anticuerpo secundario 10 anti-ratón de cabra conjugado a HRP (adquirido a Dako, Glostrup, Dinamarca) en PBST/FCS al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente. Antes de la detección, las secciones fueron lavadas 3 veces con PBST e incubadas en Tris/HCl 50 mM pH 7,6 durante 5 minutos. La detección se realizó incubando las secciones durante 3 minutos en 15 Diaminobenzidina (DAB: 1 comprimido en 10 mL de Tris/HCl 50 mM + 3 μ L de H_2O_2 al 30%; MP Biomedicals, Solon, OH, EE.UU.). La reacción se detuvo lavando las secciones 3 veces en PBST. A continuación las secciones fueron 20 transferidas a placas de vidrio silanizado y se secaron al aire sobre una placa caliente a 50°C durante 2 horas. Se realizó la contra tinción incubando con hematoxilina de Mayers (Fluka Chemie, Buchs, Suiza) durante 1 minuto seguido de una etapa de lavado durante 4 minutos en agua de grifo corriente. Las secciones fueron desparafinadas pasándolas por xilol 2 veces durante 5 minutos y 2 veces durante 1 minuto en EtOH al 100%, seguido de un lavado de 1 minuto en EtOH al 90%, 70%, 50% y en agua destilada. Para la recuperación de los antígenos, las secciones fueron hervidas durante 10 minutos en una disolución de ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0) y se enfriaron durante 20 minutos. Finalmente, las secciones fueron montadas con DePex (BDH Chemicals Ltd., Poole, Inglaterra) en cubreobjetos de vidrio. Las secciones teñidas fueron examinadas microscópicamente con óptica de iluminación epifluorescente y una cámara 3CCD (Leica, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron capturadas y analizadas usando un software especializado (IM500, Leica).

7.2. Resultados

7.2.1. Cribado de hibridomas

Se realizaron cribados ELISA como se ha descrito en los métodos y se seleccionaron 172 clones de hibridomas, que 25 se transfirieron a placas de 12 pocillos. Se llevaron a cabo ELISAs adicionales para evaluar la especificidad de los anticuerpos producidos contra los péptidos pTau Tau206-221 [pT212/pS214], Tau196-211 [pS202/pT205] y/o extracto de hP-Tau. Esto dio como resultado 25 clones positivos para los péptidos pTau y 21 clones que mostraron especificidad para hP-Tau (Figura 11).

30 Se realizaron estudios de inmunohistoquímica en paralelo al análisis ELISA. Se observaron diferentes patrones de tinción en los clones transferidos a las placas de 12 pocillos. Se observó una tinción glial inespecífica, nuclear y citoplásica, en algunas secciones de biGT incubadas con sobrenadante no diluido procedente de clones seleccionados.

El sobrenadante procedente del clon 9H3 (ACI-41-Ab1) presentó tinción de estructuras de maraña citoplásicas con una elevada especificidad.

35 Se llevó a cabo un cribado WB de cerebro y extractos hP-Tau de diferentes ratones usando el sobrenadante sin diluir procedente de hibridomas seleccionados. No se observó reacción con Tau para ninguno de los sobrenadantes de hibridoma evaluados.

7.2.2. Tinción de marañas neurofibrilares en secciones de cerebro humano con enfermedad de Alzheimer

40 Se examinó la capacidad de los clones de anticuerpos ACI-41-Ab1 (subclon 9H3 T89-F4) y 5D10 para unirse a NFTs en cerebro humano con AD mediante inmunohistoquímica TAUPIR. El clon de anticuerpo anti-fosfo Tau T89-F4 se unió a NFTs que contenían fosfo-Tau en cerebro humano con AD (Figura 12).

Se examinó la capacidad del anticuerpo 5D10 para unirse a NFTs en secciones corticales de cerebro humano con AD mediante inmunohistoquímica TAUPIR. El clon de anticuerpo anti-fosfo Tau 5D10 se unió a NFTs que contenían fosfo-Tau y a hebras de neuropilo en secciones corticales de cerebro humano con AD (Figura 13).

45 7.3. Conclusión

El cribado de clones de hibridoma generados con ACI-41 mediante ELISA dio como resultado 36 clones que se unían a péptidos fosforilados y/o a extracto de hP-Tau de longitud completa. El cribado mediante TAUPIR de dichos 36 clones confirmó la tinción de la estructura de maraña citoplásica solo con un clon (9H3), ACI-41-Ab1.

50 Los dos anticuerpos ACI-41-Ab1 (9H3-F4) y 5D10 demostraron una unión específica a NFTs y hebras de neuropilo en secciones de cerebro humano con AD.

Ejemplo 8: Potencia de ACI-35 producido mediante 2 procesos diferentes para inducir respuestas de IgG específicas de pTau tras inmunizaciones i.p. ó s.c. en ratones salvajes (C57BL/6)

El objetivo de este estudio fue evaluar la potencia del ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]) producido mediante 2 procesos diferentes, del Proceso A ACI o del Proceso L3 ACI, para inducir títulos de anticuerpos después de una

inyección subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.) en ratones salvajes C57BL/6. Los ratones fueron inmunizados 3 veces con intervalos de 2 semanas y se tomaron muestras de sangre 1 semana antes de la primera inyección y a partir de ahí 1 semana después de cada inmunización. Mediante ELISA se midieron las respuestas de IgG anti-pTau totales (Tau393-408 [pS396/pS404]). Adicionalmente, se analizó la estructura de isotipos de la respuesta de

5 anticuerpos después de 3 inmunizaciones para evaluar la distribución de las diferentes subclases de IgGs, así como de IgM. Se analizaron los títulos de anticuerpos contra el correspondiente péptido no pTau (Tau393-408). Se analizaron las respuestas de células T inducidas por ACI-35 usando la técnica ELISPOT.

8.1. Métodos

8.1.1. Preparación de la vacuna ACI-35. Proceso A ACI.

10 Las vacunas ACI-35 se prepararon según el protocolo del Ejemplo 3. La suspensión liposómica (lote ACI-35-081103B) se dividió a continuación en alícuotas antes de su almacenamiento a 2-8°C. La proporción final péptido / fosfolípido fue de 1:100.

8.1.2. Preparación de la vacuna ACI-35. Proceso L3 ACI

15 Se pesó el fosfopeptido tetrapalmitoilado Tau-derivado Tau393-408 [pS396/pS404] (Tau 393-408 humano con un grupo fosfo en S396 y S404) (4,0 mg) en un vial de vidrio de 25 mL, al cual se añadió hexafluoroisopropanol (HFIP) (5 mL). A continuación esta disolución transparente se añadió a una disolución agitada de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), colesterol y adyuvante monofosforil Lípido A (MPLA) (todos de Avanti Polar Lipids Inc., AL, EE.UU.) en cloroformo (35 mL) (relación molar 9:1:7:0,2 respectivamente). La disolución resultante fue filtrada a continuación a través de un filtro de membrana de PTFE hidrofóbico de 0,2 µm a un matraz de fondo redondo de vidrio de 250 mL. Después se eliminó el disolvente orgánico mediante evaporación a presión reducida a 40°C y a continuación en condiciones de alto vacío durante 3 horas. La película fina resultante fue rehidratada mediante la adición de PBS (40 mL) y agitación suave a temperatura ambiente durante 18 horas. La suspensión liposómica (lote ACI-35-081103-A) fue dividida a continuación en alícuotas antes de su almacenamiento a 2-8°C. La relación molar final de péptido / fosfolípido fue 1:100.

20 25 8.1.3. Inmunizaciones

Ratones C57BL/6 de 13 semanas de edad (10 ratones por grupo) recibieron s.c. o i.p. inyecciones de la vacuna en tres ocasiones con un intervalo de 2 semanas entre cada administración (día 0, día 14, día 28) según la Tabla 11. 1 semana (día -7) antes de las primeras inmunizaciones, después a los 7 días de las inyecciones (esto es, día 7, día 21, día 35), y en el momento del sacrificio (día 56) se tomaron muestras de sangre y se prepararon muestras de plasma.

30 Se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpo de IgM y de IgG específicos de Tau393-408 [pS396/pS404] y los patrones de isotipos de IgG. Como control, se determinaron los títulos de anticuerpo de IgG no específico de pTau393-408 mediante ELISA.

Tabla 11: Inmunización de ratones

Grupo	Número de animales y género	Tratamiento /Volumen ^a	Lote de vacuna	Proceso	Ruta de administración ^b	Nivel de dosis, cantidad de péptido Tau µg/dosis ^c	Cantidad de MPLA µg/dosis ^c
1	10 hembras	ACI-35 0,2 mL	ACI-35-081103-A	L3 ACI	i.p.	10	16
2	10 hembras	ACI-35 0,2 mL	ACI-35-081103-A	L3 ACI	s.c.	10	16
3	10 hembras	ACI-35 0,2 mL	ACI-35-081103-B	A ACI	i.p.	13	19
4	10 hembras	ACI-35 0,2 mL	ACI-35-081103-B	A ACI	s.c.	13	19

^a volumen teórico. ^b s.c.: subcutánea. ^c cantidad medida determinada tras análisis.

35 8.1.4. Cuantificación de anticuerpos específicos de péptido Tau

Los anticuerpos de IgG específicos para Tau393-408 [pS396/pS404] fueron determinados mediante ELISA en las 5 muestras de plasma sanguíneo. Los anticuerpos de IgG específicos de Tau393-408, los de IgM y de isotypos de IgG específicos de Tau393-408 [pS396/pS404] fueron determinados mediante ELISA en la muestra de plasma sanguíneo del día 35. Las placas fueron recubiertas con 10 µg/mL del correspondiente péptido Tau durante una noche a 4°C.

40 Tras el lavado de cada pocillo con PBS-Tween 20 al 0,05% y de un bloqueo con BSA al 1% en PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadieron diluciones en serie de plasma a las placas y se incubó a 37°C durante 2 horas. Tras lavar, las placas fueron incubadas con un anticuerpo de IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Jackson

Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) o con anticuerpos específicos de isotipo (IgM anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), IgG1 anti-ratón conjugado a AP, IgG2a e IgG3 anti-ratón conjugados a biotina, adquiridos en Pharmingen BD, San Diego, CA, EE.UU., e IgG2b anti-ratón conjugado a HRP de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) durante 2 horas a 37°C. Después de lavar, las placas fueron incubadas con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa para AP, o ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etylbenzotiazolina-6-sulfónico)), el sustrato para HRP, y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Se realizó una etapa suplementaria para los anticuerpos conjugados a biotina, en la que las placas fueron incubadas durante 45 minutos en estreptavidina-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) antes de la detección usando ABTS. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica) en la primera dilución y una dilución no saturada para IgG, y a una D.O. no saturada para los isotipos de IgG y para IgM.

8.1.5. Cuantificación de células T productoras de citoquinas específicas de péptido Tau mediante ELISPOT

La producción de citoquinas de células T específicas de Tau393-408 [pS396/pS404] y Tau393-408 fue determinada mediante ELISPOT. Se recubrieron placas de nitrocelulosa de 96 pocillos para multicribado (Millipore, Molsheim, Francia) durante una noche con anticuerpos monoclonales anti-ratón IFN-γ e IL-4 según las instrucciones de los fabricantes (Pharmingen BD, San Diego, CA, EE.UU.). Se prepararon suspensiones celulares individuales a partir de los bazos de ratones inmunizados y se incubaron en diluciones en serie con Tau393-408[pS396/pS404] y Tau393-408 (10 y 1 µg/mL) y Concavalina A (5 µg/mL, Amersham) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 horas. A continuación las placas fueron lavadas e incubadas 1 hora a 37°C con anticuerpos monoclonales anti-ratón IFN-γ e IL-4 biotinilados. Tras un lavado, las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C con Estreptavidina-HRP y después de lavar se desarrollaron manchas mediante la adición de un sustrato (AEC, 3-amino-9-etylcarbazol). Se contabilizó el número de manchas por pocillo visualmente con un estéreo-microscopio y los resultados se expresaron como manchas por cada 10⁶ de células. Como controles negativos se usaron los bazos de ratones naïve.

8.1.6. Ensayo de proliferación celular no radiactivo

Se prepararon suspensiones celulares individuales a partir de bajos de ratones inmunizados y se incubaron en diluciones en serie con Tau393-408 [pS396/pS404] y Tau393-408 (10 y 1 µg/mL) y Concavalina A (5 µg/mL, Amersham) a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 horas. Para medir la proliferación, se usó un kit de ensayo de proliferación celular no radiactivo (MTT) (Promega, Dübendorf, Suiza), según las instrucciones del fabricante. Resumidamente, se añadieron 15 µL de disolución colorante a cada pocillo y las placas fueron incubadas durante 4 horas a 37°C. A continuación, se añadieron 100 µL de disoluciones de solubilización/parada por pocillo y las placas se incubaron a 4°C durante un mínimo de 1 hora adicional. Se midió la D.O. a las longitudes de onda de 570 nm y de 690 nm.

8.2. Resultados

8.2.1. Evaluación de la respuesta a anticuerpos inducidos por diferentes vacunas

La vacuna ACI-35 indujo una respuesta robusta de IgG anti-pTau393-408 [pS396/pS404] tras inyección i.p. o s.c. independiente del proceso usado. En general, ya había presentes títulos robustos de anticuerpos a los 7 días de la primera inmunización de vacuna. Para el mismo proceso se produjo una respuesta mayor para inyección s.c. que para inyección i.p. para el día 21 y el día 35 para los animales vacunados con el proceso L3 ACI (Figura 14, Anova de 2-sentidos, P<0,001 día 21/día 35) y para el día 21, el día 35 y el día 56 para los animales inyectados con el proceso A ACI (Figura 14, Anova de 2 sentidos, P<0,001 día 21/día 35, P<0,01 día 56). Para los animales inyectados i.p., la respuesta fue mayor con el proceso L3 ACI que con el proceso A ACI en la toma temprana de muestra sanguínea el día 7 y el día 21 (Figura 14, Anova de 2-sentidos, P<0,001 día 7/día 21) mientras que no se produjo ninguna diferencia para los animales inyectados s.c. En resumen, los dos procesos parecieron equivalentes cuando fueron inyectados s.c.

Los análisis de los resultados a una dilución de D.O. no saturada confirmaron la diferencia entre la inyección i.p. y la s.c. de los diferentes procesos de vacuna ACI-35. En resumen, los resultados permanecieron igual, mostrando que la inyección s.c. produce mayores títulos de Ab que la inyección i.p., y que para la inyección s.c. no hay diferencias significativas entre los 2 procesos.

Para determinar los isotipos de anticuerpos inducidos por vacuna, se analizaron los plasmas del día 35 mediante ELISA de IgG específico de isotipo. El ACI-35 indujo en todos los grupos IgG anti-pTau393-408 [pS396/pS404] de los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. La IgG2b fue el isotipo dominante con una elevada D.O. incluso a una dilución de 1/3200. Para la subclase IgG1 hubo una mayor respuesta para inyecciones s.c. que para i.p. para ambos procesos (Figura 15, Anova de 1-sentido, P<0,05). La misma diferencia se observó para la subclase IgG3. Para las subclases IgG2a y 2b no hubo diferencia entre los 2 procesos evaluados, ni entre la inyección i.p. o s.c. de la vacuna.

No hubo diferencia entre los 2 procesos evaluados en términos de respuestas de anticuerpo de IgM anti-pTau393-408 [pS396/pS404], mientras que hubo títulos significativamente mayores con la inyección i.p. que con la inyección s.c. (Figura 16a, Anova de 1-sentido, P<0,001).

Los títulos de anticuerpos contra fosfo Tau393-408 también fueron analizados para todos los grupos. Se detectaron los anticuerpos de IgG específicos anti-Tau393-408 para todos los grupos, pero dichos títulos fueron menores que

para el anti-pTau393-408 [pS396/pS404]. No hubo diferencia en los títulos de IgG anti-Tau393-408 entre los 2 procesos o en el modo de inyección (Figura 16b, Anova de 1-sentido, $P>0,05$).

La media de los primeros tres títulos de IgG para los diferentes péptidos Tau se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Media de los tres primeros títulos de IgG anti-Tau393-408 [pS396/S404] (D.O. a una dilución 1/100)

Péptido pTau de vacuna	Proceso para generar vacuna	Modo de inyección	día 7	día 21	día 35	Media
Tau393-408 [pS396/pS404]	L3 ACI	i.p.	1,899	2,284	1,825	2,003
		s.c.	1,485	2,956	2,444	2,295
	A ACI	i.p.	0,902	1,467	1,708	1,359
		s.c.	1,276	2,964	2,426	2,222

5

8.2.2. Evaluación de la respuesta de células T inducida por ACI-35

La re-estimulación *in vitro* de esplenocitos con los péptidos ConA, pTau393-408 [pS396/pS404] o Tau393-408 no dio como resultado diferencias en la proliferación entre los grupos evaluados (Figura 17), mientras que fue positiva para ConA.

- 10 La re-estimulación con 10 μ g/mL de Tau393-408 [pS396/S404] indujo una secreción de citoquinas, que fue superior para los esplenocitos de ratones vacunados que para los ratones naïve (Figura 18). Las inyecciones s.c. del proceso L3 ACI indujeron un nivel más elevado de ambas citoquinas analizadas, sin diferencias claras entre IFN- γ e IL-4. La inyección i.p. o s.c. del proceso A ACI indujeron una secreción de citoquinas correspondientes principalmente a IL-4, y los niveles fueron mayores para la inyección i.p. La re-estimulación con 1 μ g/mL de Tau393-408 [pS396/S404] indujo resultados comparables a la re-estimulación con 10 μ g/mL de Tau393-408 [pS396/S404].
- 15

La re-estimulación con péptido no pTau393-408 indujo resultados comparables a las contrapartidas de péptido pTau (Figura 18). Nuevamente, el uso del proceso A ACI indujo la secreción de citoquinas principalmente IL-4.

8.3. Conclusión

- 20 La vacuna ACI-35 indujo títulos de IgG robustos ya después de la primera inmunización independientemente del Proceso o modo de inyección evaluado. A modo de comparación, la inyección s.c. de las vacunas, independientemente del proceso usado, dio lugar a mayores títulos de anticuerpos de IgG. La inyección i.p. de ACI-35 del Proceso A ACI dio como resultado menores títulos de IgG1 e IgG3 que el otro grupo. La inyección i.p. de ACI-35 dio como resultado títulos de IgM significativamente mayores que la inyección s.c. Finalmente, todos los grupos presentan títulos de IgG contra el péptido no-pTau393-408.

- 25 La re-estimulación con pTau y péptidos Tau indujo la producción de citoquinas en el estudio ELISPOT, que fueron principalmente IL-4 para los ratones vacunados con el Proceso A ACI.

Ejemplo 9: Inmunogenicidad de la vacuna tau en ratones transgénicos Tau P301L (TPLH)

El objetivo de este estudio fue analizar la inmunogenicidad de la vacunación anti-Tau usando inyección subcutánea (s.c.) de vacunas liposómicas tau (ACI-33, ACI-35, ACI-39 y ACI-40) en ratones transgénicos Tau P301L.

30 9.1. Métodos

9.1.1. Ratones transgénicos Tau P301L (TPLH)

Se usaron ratones transgénicos Tau P301L homozigotos (TPLH) con antecedentes FVB/N para evaluar la eficacia de la vacunación s.c. con ACI-33 ó ACI-35. Dichos ratones expresan la isoforma tau humana de mayor longitud con la mutación P301L bajo el control del promotor de ratón thy1. Los síntomas clínicos aparecieron a la edad de 6 a 7 meses, y en el envejecimiento los ratones TPLH desarrollaron una tauopatía moribunda con afectación neuronal progresiva y formación de marañas neurofibrilares (NFT). En las etapas terminales, pierden peso y mueren repentinamente (probablemente debido a problemas respiratorios (asfixia)), la mayoría de ellos a la edad de 9 a 11 meses y sin excepción antes de los 12 meses.

9.1.2. Preparación de la vacuna ACI-33 y ACI-35

- 40 Se prepararon vacunas según el proceso A descrito en el Ejemplo 3.

La suspensión liposómica (lote ACI-33-081031-A y lote ACI-35-081015-A + ACI-35-090402-A) se dividió entonces en alícuotas antes de su almacenamiento a 2-8°C. La relación molar final de péptido / fosfolípido fue de 1:100.

9.1.3. Inmunizaciones

ACI-33, ACI-39 y ACI-40

Ratones TPLH de entre 21 y 31 semanas de edad (8-10 ratones por grupo: mezcla de hembras (♀) y machos (♂)) recibieron inyecciones s.c. de la vacuna en cinco ocasiones (Tabla 14). Las tres primeras inmunizaciones se realizaron

5 con un intervalo de 2 semanas entre cada administración (día 0, día 13, día 28) según el Esquema 1. A continuación los animales fueron inyectados una vez al mes durante dos meses (día 91 y día 133). 1 día antes (día -1) de las primeras inmunizaciones y después de la segunda (día 27) y tercera (día 41) inmunizaciones, se tomaron muestras de sangre. También se tomaron muestras de sangre antes, durante y después de las inyecciones (día 76, día 104, día 135). Se prepararon sueros con la sangre dejando que las muestras coagularan durante una noche y extrayendo a 10 continuación el sobrenadante tras centrifugación. Los títulos de anticuerpos de IgG e IgM específicos de péptidos fosfo-Tau y los patrones de isotipos de IgG fueron determinados mediante ELISA. Los títulos específicos de anticuerpos de IgG para no-pTau, proteína Tau de longitud completa (441 aa) y proteína Tau de longitud completa fosforilada (441 aa) también fueron determinados mediante ELISA.

ACI-35

15 Ratones TPLH de entre 22 y 31 semanas de edad (10 ratones por grupo: mezcla de hembras (♀) y machos (♂)) recibieron inyecciones s.c. de la vacuna en cinco ocasiones (Tabla 13). Las tres primeras inmunizaciones se realizaron con un intervalo de 2 semanas entre cada administración (día 0, día 13, día 27) según el Esquema 1. A continuación los animales fueron inyectados una vez al mes durante dos meses (día 91 y día 133). 1 día antes (día -1) de las primeras inmunizaciones y después de la segunda (día 26) y tercera (día 40) inmunizaciones, se tomaron muestras de sangre. También se tomaron muestras de sangre antes, durante y después de las inyecciones (día 75, día 103, día 145, día 155). Se prepararon sueros con la sangre dejando que las muestras coagularan durante una noche y extrayendo a continuación el sobrenadante tras centrifugación. Los títulos de anticuerpos de IgG e IgM específicos de

20 Tau393-408 [pS396/pS404] y los patrones de isotipos de IgG fueron determinados mediante ELISA. Los títulos específicos de anticuerpos de IgG para no-pTau393-408, proteína Tau de longitud completa (441 aa) y proteína Tau de longitud completa fosforilada (441 aa) también fueron determinados mediante ELISA.

25

Tabla 13: Inmunización de ratones

Grupo	Nº de animales y género	Tratamiento /Volumen ^a	Lote de vacuna	Ruta de administración ^b	Nivel de dosis, cantidad de péptido Tau µg/dosis ^c	Cantidad de MPLA µg/dosis ^c
1	5 ♀ 5 ♂ 5 ♀ 3 ♂	ACI-33 0,2 mL PBS 0,2 mL	ACI-33-081031-A N.A.	s.c. s.c.	9 N.A.	12 N.A.
2	5 ♀ 5 ♂ 5 ♀ 5 ♂	ACI-35 0,2 mL PBS 0,2 mL	ACI-35-081015-A ACI-35-090402-A N.A.	s.c. s.c.	16 8 N.A.	23 27 N.A.
3	5 ♀ 5 ♂ 5 ♀ 3 ♂	ACI-39 0,2 mL PBS 0,2 mL	ACI-39-090202-A N.A.	s.c. s.c.	9,6 N.A.	28,8 N.A.
4	5 ♀ 5 ♂ 5 ♀ 3 ♂	ACI-40 0,2 mL PBS 0,2 mL	ACI-40-090202-A N.A.	s.c. s.c.	12 N.A.	24,4 N.A.

N.A. = No aplicable

^a volumen teórico.

^b s.c.: subcutánea.

30 ^c cantidad medida determinada tras análisis.

9.1.4. Cuantificación de anticuerpos específicos de péptido Tau

Para los ratones tratados con ACI-33, ACI-39 y ACI-40, se determinaron mediante ELISA los anticuerpos de IgG específicos de, respectivamente, Tau5-20 [pY18], Tau206-221 [pT212, pS214] y Tau196-211 [pS202, pT205] en las 6

muestras de sueros sanguíneos. En los sueros de las muestras del día -1 y el día 41 se determinó la IgG específica de Tau5-20, proteína Tau de longitud completa (441 aa) y la proteína Tau de longitud completa fosforilada (441 aa). Los anticuerpos de IgM y de isótipos de IgG específicos de péptido fosfo-tau fueron determinados mediante ELISA en la muestra de suero sanguíneo del día 41.

- 5 Para los ratones tratados con ACI-35, los anticuerpos de IgG específicos para Tau393-408 [pS396/pS404] fueron determinados mediante ELISA en las 7 muestras de suero sanguíneo. En los sueros de las muestras del día -1 y el día 40 se determinó la IgG específica de Tau393-408, proteína Tau de longitud completa (441 aa) y la proteína Tau de longitud completa fosforilada (441 aa). Los anticuerpos de IgM y de isótipos de IgG específicos de Tau393-408 [pS396/pS404] fueron determinados mediante ELISA en la muestra de suero sanguíneo del día 40.
- 10 Se recubrieron placas con 10 µg/mL del correspondiente péptido Tau y 1 µg/mL de la correspondiente proteína Tau durante una noche a 4°C. Tras lavar todos los pocillos con PBS-Tween 20 al 0,05% y bloquear con BSA al 1% en PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadieron a las placas diluciones en serie de los sueros y se incubó a 37°C durante 2 horas. Tras lavar, las placas fueron incubadas con un anticuerpo total de IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) o anticuerpos específicos de isótipo (IgM anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), IgG1 anti-ratón conjugado a AP, IgG3 anti-ratón conjugado a biotina, adquiridos en Pharmingen BD San Diego, CA, EE.UU.; IgG2a anti-ratón conjugado a biotina adquirido en Invitrogen CA, EE.UU., e IgG2b anti-ratón conjugado a HRP de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) durante 2 horas a 37°C. Tras lavar, las placas fueron incubadas con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa para AP, o con ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico)), el sustrato para HRP, y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Para los anticuerpos conjugados a biotina se realizó una etapa suplementaria en la que las placas fueron incubadas durante 45 minutos en estreptavidina-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) antes de la detección con ABTS. Los resultados se expresan como D.O. (Densidad Óptica) a una D.O. no saturada para IgG, isótipos de IgG e IgM.

- 25 9.1.5. Unión de anticuerpos anti-Tau a marañas Tau en láminas de cerebro procedentes de animales transgénicos (TAUPIR)

La unión de anticuerpos presentes en el suero de animales vacunados con ACI-33, ACI-35, ACI-39 y ACI-40 a marañas en las láminas de cerebro se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica TAUPIR.

La tinción TAUPIR se realizó según el protocolo del Ejemplo 5.1.5.

9.1.6. Análisis de transferencia Western Blot (WB)

- 30 Se realizaron análisis Western Blot según el protocolo del Ejemplo 5.1.6 excepto en que se realizó un lavado antes de la detección con la disolución de conjugado de estreptavidina Qdot 625 (Invitrogen, CA, EE.UU.) durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.

9.2. Resultados

9.2.1. Respuesta de anticuerpos de IgG

- 35 Todas las construcciones de vacuna han generado títulos de anticuerpo de IgG específicos.

La vacuna ACI-33 indujo una respuesta de IgG específica después de la inyección s.c. Tras 2 inmunizaciones (día 27), la respuesta de IgG permaneció estable sin aumento en la tercera inmunización (día 41) (Figura 19, Anova de 1-sentido P<0,001 día -1 frente a día 27, P>0,05 día 27 frente a día 41). Se observó un descenso en los títulos de anticuerpos en el día 76 (Figura 19, Anova de 1-sentido P<0,001 día 41 frente a día 76) y la inyección a los animales aumentó ligeramente de nuevo los títulos en el día 104.

La vacuna ACI-35 indujo una respuesta de IgG anti-Tau393-408 [pS396/pS404] después de la inyección s.c. Tras 2 inmunizaciones (día 26), la respuesta de IgG no aumentó en la tercera inmunización (día 40) (Figura 20, Anova de 1-sentido P<0,001 día -1 frente a día 26 y día 40). La inyección a los animales aumentó de nuevo los títulos en el día 103 (Figura 20, Anova de 1-sentido P<0,05 día -1 frente a día 104 y P<0,001 día -1 frente a día 145).

- 45 La vacuna ACI-39 indujo una respuesta de IgG anti-Tau206-221 [pT212/pS214] después de la inyección s.c. Tras 2 inmunizaciones (día 27), la respuesta de IgG permaneció estable sin aumento en la tercera inmunización (día 41) (Figura 21, Anova de 1-sentido P<0,001 día -1 frente a día 27/41). No se produjo una caída en los títulos en el día 76 y la inyección a los animales restauró los títulos al mismo nivel que después de 3 inmunizaciones (Figura 21, Anova de 1-sentido P<0,05 día -1 frente a día 76 y P>0,05 día 41 frente a día 104).

- 50 Los análisis de los resultados a una dilución de D.O. no saturada mostró las mismas conclusiones que la dilución 1/100 saturada (Anova de 1-sentido P<0,05 día -1 frente a día 27/41/104 y P>0,05 día -1 frente a día 76).

La vacuna ACI-40 indujo una respuesta de IgG anti-Tau196-211 [pS202, pT205] tras la inyección s.c. Después de 2 inmunizaciones (día 27), la respuesta de IgG permaneció estable sin aumento en la tercera inmunización (día 41) (Figura 22, Anova de 1-sentido P<0,001 día -1 frente a día 27, P>0,05 día 27 frente a día 41). Se observó un descenso

en los títulos de anticuerpo para el día 76 (Figura 22, Anova de 1-sentido $P<0,001$ día 41 frente a día 76) y una nueva inyección a los animales incrementó ligeramente de nuevo los títulos para el día 104.

Los análisis de los resultados de una dilución de D.O. no saturada mostraron las mismas conclusiones que la dilución saturada 1/100 (Anova de 1-sentido $P<0,001$ día -1 frente a día 27, $P>0,05$ día 27 frente a día 41 y $P<0,01$ día 41 frente a día 76).

9.2.2. Análisis de isotipos

La vacunación con ACI-33 indujo títulos de anticuerpos que principalmente eran de las subclases IgG2a y 2b después de 3 inmunizaciones s.c. (Figura 23). Los niveles de IgG1, IgG3 e IgM fueron bajos y se observó una diferencia significativa entre los niveles de IgG2a/2b e IgG1/IgM (Figura 23, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG1 frente a IgG2a/2b, $P<0,001$ IgM frente a IgG2a/2b).

La vacunación con ACI-35 indujo títulos de anticuerpos que principalmente eran de las subclases IgG2a y 2b después de 3 inmunizaciones s.c. (Figura 24). El nivel de IgG1 fue inferior con una diferencia significativa entre IgG1 e IgG2a (Figura 24, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG1 frente a IgG2a). Los niveles de IgG3 e IgM fueron bajos y se observó una diferencia significativa entre los niveles de IgG2a/2b e IgG3/IgM (Figura 24, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG3/IgM frente a IgG2b, $P<0,0001$ IgG3/IgM frente a IgG2a).

La vacunación con ACI-39 indujo títulos de anticuerpos que principalmente eran de las subclases IgG2a y 2b después de 3 inmunizaciones s.c. (Figura 25). Los niveles de IgG1, IgG3 e IgM fueron significativamente menores que los títulos de IgG2a/2b (Figura 25, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG2b frente a IgG1/3, $P<0,01$ IgG2a frente a IgG1/3, $P<0,001$ IgG2a/2b frente a IgM).

La vacunación con ACI-40 indujo títulos de anticuerpos que principalmente eran de la subclase IgG2b después de 3 inmunizaciones s.c. (Figura 26, Anova de 1-sentido $P<0,05$ IgG2b frente a IgG2a y $P<0,001$ IgG2b frente a IgG1/IgG3/IgM). Los títulos de IgG2a también fueron mayores que los de IgM (Figura 26, Anova de 1-sentido $P<0,01$ IgG2a frente a IgM).

9.2.3. Especificidad de anticuerpos

También se analizaron los títulos de IgG inducidos después de 3 inyecciones s.c. de vacunas tau con diferentes péptidos Tau (péptido pTau y péptido Tau) y proteínas Tau (anti-proteína Tau de longitud completa (441 aa) fosforilada = proteína anti-pTau y anti-proteína Tau de longitud completa (441 aa) = proteína anti-Tau).

En los ratones vacunados con ACI-33, se usó la toma de sangre del día -1 como control y para todos los recubrimientos diferentes se observó una diferencia entre la pre-toma de muestra y los sueros tomados después de 3 inmunizaciones para recubrimientos de proteína Tau5-20 [pY18] y proteína Tau (Figura 27, Anova de 1-sentido $P<0,001$ día -1 frente a día 41 para Tau5-20 [pY18], $P<0,05$ día -1 frente a día 41 para proteína Tau).

En los ratones vacunados con ACI-35, se usó la toma de muestra del día -1 como control y se observó una diferencia significativa entre el día -1 y el día 40 solo para los títulos de anti-Tau393-408 [pS396/pS404] (Figura 28, Anova de 1-sentido $P<0,0001$ día -1 frente a día 40 para los títulos de anti-Tau393-408 [pS396/pS404]). Los niveles de anticuerpos del día 40 obtenidos para el péptido Tau393-408 [pS396/pS404] también fueron significativamente diferentes a los niveles obtenidos para el resto de recubrimientos (Figura 28, Anova de 1-sentido $P<0,0001$ anti-Tau393-408 [pS396/pS404] del día 40 frente a anti-Tau393-408 / proteína pTau / proteína Tau del día 40).

En los ratones vacunados con ACI-39, la toma de muestra del día -1 se usó como control y solo se observó una diferencia para el recubrimiento de Tau206-221 [pT212, pS214] entre la pre-toma de muestra y los sueros obtenidos después de 3 inmunizaciones (Figura 29; Anova de 1-sentido $P<0,001$ día -1 frente a día 41 para Tau206-221 [pT212, pS214]).

En los ratones vacunados con ACI-40, la toma de muestra del día -1 se usó como control y se observó una diferencia entre la pre-toma de muestra y los sueros recogidos después de 3 inmunizaciones para los recubrimientos de Tau196-211 [pS202, pT205] y Tau 196-211 (Figura 30, Anova de 1-sentido $P<0,001$ día -1 frente a día 41 para Tau196-211 [pS202, pT205], $P<0,05$ día -1 frente a día 41 para Tau196-211).

Además se usó el suero de ratón en experimentos TAUPIR para determinar si los anticuerpos anti-Tau presentes en el suero podían reconocer marañas en láminas de cerebro procedentes de animales transgénicos para Tau.

También se llevaron a cabo análisis WB de extractos de cerebro procedentes de diferentes ratones usando los sueros de ratón o el anticuerpo de control Tau-5 para la detección de todas las formas de Tau (pTau y Tau).

Los datos se resumen en la tabla 14 presentada a continuación.

Tabla 14: Resumen de experimentos TAUPIR y WB en ratones TPLH vacunados

Vacuna	TAUPIR (positivos/ratones totales)	Western Blot (positivos/ratones totales)
ACI-33	6/10	3/9
ACI-35	4/10	0/4
ACI-39	7/10	1/5
ACI-40	10/10	3/7

9.3. Conclusión

Se analizaron los títulos de anticuerpos anti-tau para determinar su unión a diferentes péptidos Tau y pTau, así como a la proteína pTau o la Tau de longitud completa. La inmunización liposómica con Tau generó anticuerpos de IgG que se unen específicamente a péptidos pTau y a proteína fosfo-tau con una unión más débil a los péptidos y proteína no fosforilados.

En términos de isótipos de IgG, se observó una baja respuesta de anticuerpos de IgG1 en comparación con IgG2b e IgG3. Se observó una baja respuesta de IgM, en consonancia con el modo de inmunización (s.c.).

La especificidad de los anticuerpos generados por los ratones inmunizados con vacuna tau fue evaluada en TAUPIR y casi todos los sueros de ratón mostraron una unión elevada a las marañas Tau presentes en las láminas de cerebro correspondientes a animales Tau.

Ejemplo 10: Eficacia en el modelo de ratón transgénico Tau P301L tras vacunación con ACI-33 ó ACI-35

El objetivo de este estudio fue analizar la eficacia de la vacunación anti-Tau usando inyección subcutánea (s.c.) de las vacunas ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) ó ACI-35 (Tau393-408 [pS396/pS404]) en ratones transgénicos Tau P301L. Los ratones fueron inmunizados 5 veces y se analizaron los cambios de comportamiento mediante rotarod, análisis llevados a cabo a lo largo de toda la vida del animal.

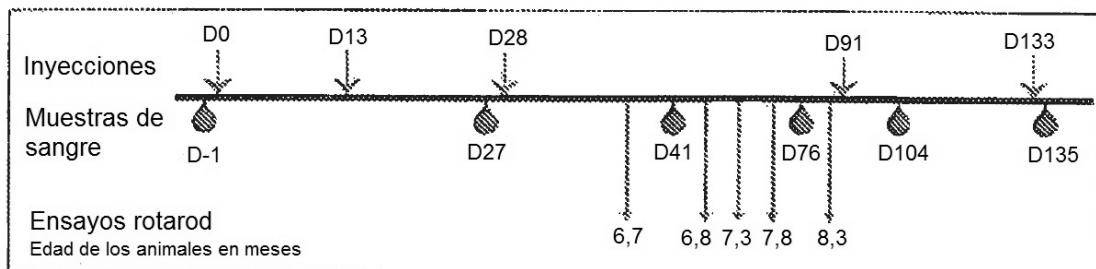
10.1. Métodos

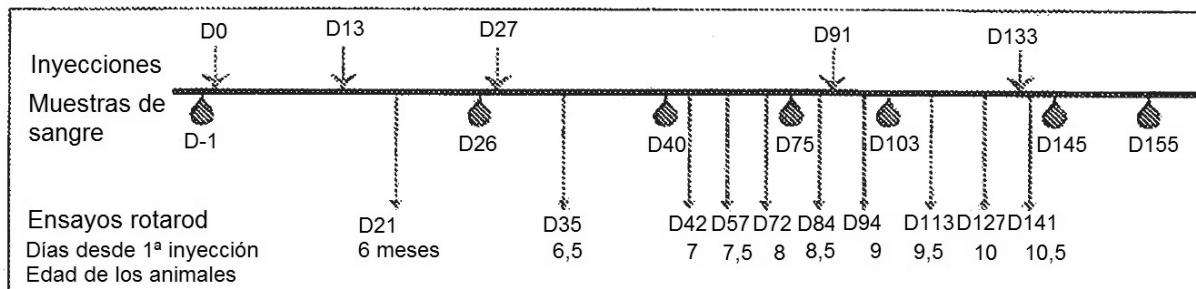
10.1.1. Preparación de vacunas

Las vacunas ACI-33 y ACI-35 se prepararon según el protocolo del Ejemplo 3.

10.1.2. Inmunización

Los animales fueron inmunizados con ACI-33 o con ACI-35 según el protocolo descrito en el Ejemplo 9 (Esquema 2 para ACI-33 y Esquema 3 para ACI-35).

Esquema 2: Calendario de inmunizaciones, tomas de muestras de sangre y ensayos rotarod para ACI-33.

Esquema 3: Calendario de inmunizaciones, tomas de muestras de sangre y ensayos rotarod para ACI-35.**10.1.3. Comportamiento (rotarod)**

Para observar la condición motora de los animales, se llevó a cabo un ensayo automatizado rotarod. Se evaluaron simultáneamente cinco ratones en una barra rotativa giratoria (diámetro 3 cm), separados por divisores no translúcidos. Durante el ensayo, la barra acelera de 4 a 40 rpm en 5 minutos. Para cada ratón, se registró el tiempo de permanencia sobre la barra, con un máximo de 5 minutos.

10.2. Resultados

Para evaluar la condición motora de los TPLH tras los tratamientos con ACI-33 o PBS, los ratones fueron sometidos al ensayo de rotarod en cinco ocasiones diferentes (Figura 31). Se observó una diferencia significativa entre los animales inyectados con ACI-33 y los inyectados con PBS a la edad de 7,3 meses (Figura 31, Anova de 2-sentidos $P<0,001$ edad de 7,3 meses). Este efecto de la ACI-33 sobre el comportamiento motor de los ratones se correlacionó con los títulos de anticuerpos anti-Tau5-20 [pY18] en los sueros de ratones de 7,8 meses (Figura 32, Spearman $r<0,001$).

Para evaluar la condición motora de los TPLH después de los tratamientos con ACI-35 o PBS, los ratones fueron sometidos a ensayo rotarod (Figura 33). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y de control, se pudo observar una tendencia para la eficacia de ACI-35 en el ensayo rotarod llevado a cabo cuando los ratones tenían una edad de 9,5 meses (Figura 33, ensayo Mann-Whitney $P=0,1905$ edad 9,5 meses).

10.3. Conclusión

La vacunación con ACI-33 en ratones TPLH mostró un efecto beneficioso sobre los déficits motores del ratón durante el ensayo rotarod frente a los animales inyectados con PBS. Este efecto positivo se correlacionó con los títulos de anticuerpos anti-Tau en sueros de ratón.

La vacunación con ACI-35 en ratones TPLH mostró una tendencia en la eficacia sobre los déficits motores de ratón durante el ensayo rotarod a los 9,5 meses frente a los animales inyectados con PBS.

25 Ejemplo 11: respuesta de anticuerpos anti-pTau en ratones nude hembra

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta de anticuerpos anti-pTau inducida por inyección de vacuna ACI-33 (Tau5-20 [pY18]) en ratones nude hembra. Los ratones nude portan la mutación *Foxn1^{nu}*, tienen una función de células T reducida debido a la carencia de glándula tímica con funcionamiento apropiado. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar si la respuesta de anticuerpos inducida por ACI-33 es independiente de células T.

Los ratones nude con un antecedente de C57BL/6 y los compañeros de camada salvajes correspondientes a una edad de 11 ó 13 semanas fueron inyectados subcutáneamente (s.c.). Los ratones fueron inmunizados 3 veces a intervalos de 2 semanas y se tomaron muestras sanguíneas 1 semanas después de cada inmunización. Las respuestas de IgG de péptido anti-pTau total (Tau5-20 [pY18]) se midieron mediante ELISA. Adicionalmente, el patrón de isotipos de la respuesta de anticuerpos fue analizado después de 3 inmunizaciones para evaluar la distribución de las diferentes subclases de IgGs, así como de IgM. También se analizaron los títulos de anticuerpo contra los correspondientes no-pTau (Tau5-20), proteína Tau de longitud completa (441 aa) y proteína Tau de longitud completa (441 aa) fosforilada.

Para verificar la ausencia de células T colaboradoras en los ratones nude, se evaluó el porcentaje de células CD3⁺/CD4⁺ mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

11.1. Métodos**40 11.1.1. Preparación de la vacuna ACI-33**

Las vacunas ACI-33 fueron preparadas según el Ejemplo 3.

La suspensión liposómica (lote ACI-33-090818-A) fue dividida a continuación en alícuotas antes de su almacenamiento a 2-8°C. La relación molar final de péptido / fosfolípido fue de 1:100. Las vacunas se enviaron a JSW Life Sciences GmbH (Austria).

11.1.2. Inmunizaciones

5 En JSW Life Sciences GmbH, ratones nude (B6.Cg-Foxn1nu/J) con antecedentes C57BL/6 y los correspondientes compañeros de camada (6 ratones ♀/grupo) recibieron inyecciones s.c. de ACI-33 en tres ocasiones con un intervalo de 2 semanas entre cada administración (día 0, 14, 28) según la Tabla 15. Se tomaron muestras de plasma de la vena/arteria facial 7 días antes y 2, 4, 7, 21, 35 y 56 días después de las primeras inyecciones. Se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpos de IgG e IgM específicos de Tau5-20 [pY18], así como los patrones de 10 isótipos de IgG. También se determinaron mediante ELISA los títulos de anticuerpos de IgG específicos para no-
pTau5-20, proteína Tau de longitud completa (441 aa) y proteína Tau de longitud completa (441 aa) fosforilada. También se tomaron muestras de sangre en el día -7 para análisis FACS para determinar el porcentaje de células CD3+/CD4+.

11.1.3. Cuantificación de anticuerpos específicos de péptido Tau

15 Los anticuerpos de IgG específicos para Tau5-20 [pY18] se midieron mediante ELISA en 5 muestras de suero sanguíneo (día 2, día 7, día 21, día 35 y día 56). Los IgG específicos de Tau5-20, proteína Tau de longitud completa (441 aa) y proteína Tau de longitud completa (441 aa) fosforilada fueron determinado en los sueros del día 35. Los 20 anticuerpos de isótipo de IgG y de IgM específicos de Tau5-20 [pY18] fueron determinados mediante ELISA en la muestra de sueros sanguíneos del día 35. Se recubrieron placas con 10 µg/mL del correspondiente péptido Tau y 1 µg/mL de la correspondiente proteína Tau durante una noche a 4°C. Después de lavar todos los pocillos con PBS-Tween 20 al 0,05% y de bloquear con BSA al 1% en PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadieron disoluciones en serie a las placas y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Tras lavar, las placas fueron incubadas con un anticuerpo total de IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Jackson Laboratories, Baltimore, PA, EE.UU.) o con anticuerpos específicos de isótipo (IgM anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP), IgG1 anti-ratón conjugado a AP, IgG3 anti-ratón conjugado a biotina, adquiridos en Pharmingen BD San Diego, CA, EE.UU.; IgG2a anti-ratón conjugado a biotina adquirido en Invitrogen CA, EE.UU., e IgG2b anti-ratón conjugado a HRP de Zymed Laboratories, San Francisco, CA) durante 2 horas a 37°C. Tras lavar las placas, fueron incubadas con pNPP (para-nitro-fenil-fosfato), el sustrato de fosfatasa para AP, ó ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-etylbenztiazolin-6-sulfónico)), el sustrato para HRP, y se leyeron a 405 nm usando un lector de placas ELISA. Se realizó una etapa suplementaria adicional para los anticuerpos conjugados a biotina, en la que las placas fueron incubadas durante 45 minutos en estreptavidina-HRP (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) antes de la detección usando ABTS. Los resultados se expresaron como D.O. (Densidad Óptica) a una D.O. no saturada para IgG, los isótipos de IgG e IgM.

11.1.4. Cuantificación de células CD3+/CD4+

35 Las muestras de sangre de ratón fueron lisadas con cloruro amónico hasta ser transparentes, a continuación se centrifugaron a 400x g durante 7 minutos y las partículas fueron re-suspendidas en PBS que contenía EDTA. A continuación las células fueron bloqueadas con reactivo bloqueante CD16/CD32 y se tiñeron con anticuerpos CD4 (conjugado de PE) y CD3 (PE-Cy5) durante 30 minutos a 4°C. Las muestras fueron lavadas con PBS, re-suspendidas en disolución de fijación (DB Cellfix diluida 1:40 en BD FACS Flow) y se adquirieron en un citómetro BD FACS Calibur. Se evaluó el porcentaje de células activadas, que eran positivas en la tinción para CD3+ y CD4+ (células T 40 colaboradoras).

Tabla 15 Inmunización de ratones

Grupo	Número de animales y género	Tratamiento /Volumen ^a	Lote de vacuna	Proceso	Ruta de administración ^b	Nivel de dosis, cantidad de péptido Tau µg/dosis ^c	Cantidad de MPLA µg/dosis ^c
1	6 ratones nude ♀	ACI-33 0,2 mL	ACI-33-090818-A	ACI-A	s.c.	12,6	15,8
2	6 ratones salvajes ♀	ACI-33 0,2 mL	ACI-33-090818-A	ACI-A	s.c.	12,6	15,8

^a volumen teórico. ^b s.c.: subcutánea. ^c cantidad medida determinada tras análisis.

11.2. Resultados

45 11.2.1. Observaciones generales

Ninguno de los animales murió de forma prematura y no se observaron efectos secundarios debidos al tratamiento.

Para todos los animales B6.Cg-Foxn1nu/J, estaba presente el fenotipo nude típico, mientras que los compañeros de camada salvajes (wt, del inglés "wild-type") presentaron un pelo normal.

11.2.2. Cuantificación de células CD3+/CD4+

La tinción de CD3+/CD4+ seguida de análisis FACS reveló una reducción significativa del recuento de células T colaboradoras (células CD3+/CD4+) en ratones nude, en comparación con los animales wt (Figura 34).

11.2.3. Análisis de la respuesta inmune

Los títulos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] generados por la vacunación ACI-33 fueron analizados para estudiar la inmunogenicidad de la vacuna en los ratones wt y nude. Los títulos de IgG anti-Tau5-20 [pY18] de nude fueron analizados para estudiar si la respuesta inducida por ACI-33 era independiente de la función de células T. La vacuna indujo una respuesta anti-Tau5-20 [pY18] en ratones nude y no se observó ninguna diferencia significativa entre la respuesta de anticuerpos inducida por ACI-33 en los ratones wt o los ratones nude para todos los tiempos evaluados (Figura 35; ANOVA de 2-sentidos $P<0,05$ para todas las muestras de sangre entre ratones nude y wt).

La vacuna ACI-33 indujo en ambos tipos de ratón una respuesta de IgG anti-Tau5-20 [pY18] después de la inyección s.c. que alcanzó un máximo después de 2 inmunizaciones (día 27) (Figura 35).

La vacunación con ACI-33 indujo títulos de anticuerpos del mismo perfil para las diferentes subclases de IgG e IgM entre ratones nude y wt, ya que no hubo diferencias significativas entre los dos tipos de ratón después de 3 inmunizaciones s.c. de la vacuna (Figura 36, ANOVA de 1-sentido $P>0,05$ IgG1 nude frente a IgG1 wt, IgG2a/2b nude frente a IgG2a/2b wt, IgG3 nude frente a IgG3 wt, IgM nude frente a IgM wt). En ambos tipos de ratón, se observó un nivel significativamente inferior de IgG1 en comparación con IgG2b e IgM (Figura 36, ANOVA de 1-sentido, ratones nude: $P<0,01$ IgG1 frente a IgG2b ó IgM; ratones wt: $P<0,05$ IgG1 frente a IgG2b ó IgM). Además, los ratones nude mostraron un nivel significativamente menor de IgG1 en comparación con IgG3 (Figura 36, ANOVA de 1-sentido, ratones nude: $P>0,05$ IgG1 frente a IgG3) y el nivel de IgG2a también fue inferior en comparación con IgG2b, IgG3 e IgM (Figura 36, ANOVA de 1-sentido, ratones nude: $P<0,05$ IgG2a frente a IgG2b, IgG3 ó IgM).

Los títulos de IgG inducidos después de 3 inyecciones s.c. de ACI-33 también fueron analizados en diferentes péptidos Tau (anti-Tau5-20 [pY18] y anti-Tau5-20) y proteínas (proteína anti-Tau de longitud completa (441 aa) fosforilada = proteína anti-pTau, y proteína anti-Tau de longitud completa (441 aa) = proteína anti-Tau (Figura 37). No se observó ninguna diferencia en los títulos de los diferentes péptidos y proteínas entre ratones wt y nude. En el grupo de ratones nude, se observó una diferencia significativa en el anti-Tau5-20 [pY18], siendo éste mayor que los títulos de anti-Tau5-20 (Figura 37, ANOVA de 1-sentido, $P<0,05$ títulos de anti-Tau5-20 [pY18] frente a títulos de anti-Tau5-20).

11.3. Conclusión

A pesar del porcentaje pequeño de células CD3+ y CD4+ en ratones nude, la vacuna ACI-33 indujo una respuesta de IgG anti-Tau5-20 [pY18] robusta. La persistencia de la respuesta de anticuerpos y la distribución de isótipos de IgG fueron similares en ratones wt y nude, lo que sugiere que estos parámetros son independientes de las células T en el contexto de la vacunación con ACI-33. En comparación con los ratones inmuno-competentes, la inmunización con ACI-33 indujo un título de anticuerpos idéntico y una cinética con un perfil de IgG similar en ratones deficientes en células T. Adicionalmente, los títulos de anticuerpo de los diferentes péptidos y proteínas Tau fueron similares entre ratones inmuno-competentes y ratones deficientes en células T. Estos datos indicaron que la ACI-33 indujo una respuesta de anticuerpos independiente de células T tanto en ratones nude como en ratones wt.

Lista de referencias

- 40 Alving et al., (1992) Infect. Immun. 60: 2438-2444
- Asuni et al., (2007) J Neurosc. 27 (34), 9115-29
- Hodgson et al., (1991) Bio/Technology, 9: 421
- Khaw, B. A. et al. (1982) J. Nucl. Med. 23: 1011-1019
- Lewis et al., (2000) Nature Genetics, 25: 402-405
- 45 Maslia et al., (2005) 46(6), 857-68
- Muhs et al., (2007) Proc. Natl Acad Sci USA, 104(23), 9810-5
- Muyllaert et al., (2006) Rev Neurol, 162(10), 903-907
- Muyllaert et al., (2008) Genes Brain Behav., Suppl., 1, 57-66
- Nicolau et al., (2002) Proc Natl. Acad. Sci USA 99, 2332-2337

- Nicoli et al., (2003) Nature Med, 9, 448-452
- Oddo et al., (2004) Neuron, 43, 321-332
- Queen et al., (1989) Proc. Natl Acad Sci USA, 86: 10029-10032
- Ribe et al., (2005) Neurobiol Dis, 20(3), 814-22
- 5 Roberson et al, (2007) Science, 316 (5825), 750-4
- Rosenmann et al., (2006) Arch Neurol, 63(10), 1459-67
- Rousseaux et al. Methods Enzymology, (1986), Academic Press 121: 663-69
- Terwel et al., (2006) J Biol Chem, 280, 3963-3973
- Terwel et al, (2008) Am J Pathol., 172(3), 786-98
- 10 Urushitiani et al., (2007) Proc. Natl Acad Sci USA, 104(79), 2495-500
- Wagner et al (2002) Journal of Liposome Research Vol 12(3), pp 259-270

Depósitos:

Las siguientes líneas celulares de hibridomas fueron depositadas en nombre de AC IMMUNE S.A. en el "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)" en Braunschweig, Inhoffenstr. 7B, D-28124 Braunschweig, bajo las consignas del Tratado de Budapest:

Nombre de hibridoma	Número de acceso	Fecha de depósito
ACI-41-Ab1	DSM ACC3043	3 de marzo de 2010
2B6	DSM ACC3044	10 de marzo de 2010
3A8	DSM ACC3045	10 de marzo de 2010
4C1	DSM ACC3046	10 de marzo de 2010
5D10A3	DSM ACC3047	10 de marzo de 2010
6C10	DSM ACC3048	10 de marzo de 2010
6H1	DSM ACC3049	10 de marzo de 2010
7C2	DSM ACC3050	10 de marzo de 2010

Sumario de aspectos descritos:

1. Un péptido antigénico que se puede obtener a partir de una proteína tau y que está modificado (a) mediante la unión y/o reconstitución en un vehículo o un fragmento funcional del mismo.
- 20 2. El péptido antigénico o fragmento del aspecto 1, en donde dicho péptido es un fosfo-péptido que imita un fosfo-epítopo patológico principal de la proteína tau.
3. El péptido o fragmento del aspecto 1 y 2, en donde dicho vehículo también tiene una funcionalidad como adyuvante.
4. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho vehículo es un liposoma.
- 25 5. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho péptido está modificado adicionalmente mediante un enlace a un resto lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la capa bilipídica del liposoma vehículo.
6. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, un triglicérido, un diglicérido, un esteroide, un esfingolípido, un glicolípido o un fosfolípido.
- 30 7. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el resto lipofílico o hidrofóbico es un ácido graso, particularmente un ácido graso con una cadena principal carbonada de al menos 10, particularmente al menos 12, átomos de carbono, particularmente al menos 16 átomos de carbono.
8. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde el resto hidrofóbico es ácido palmítico.
9. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho resto hidrofílico o hidrofóbico

está ligado covalentemente a cada uno de los extremos del péptido o fragmento de péptido a través de al menos uno, particularmente uno o dos, aminoácidos tales como, por ejemplo, lisina, ácido glutámico y cisteína.

10. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho péptido está modificado adicionalmente mediante un enlace a un resto hidrofílico.

5 11. El péptido o fragmento según el aspecto 10, en donde dicho resto hidrofílico es polietilen glicol.

12. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicha proteína tau es una proteína humana.

10 13. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

15 14. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

15. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

20 16. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

25 17. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

30 18. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

35 19. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

20. El péptido o fragmento según el aspecto 12, que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 modificada mediante sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos y que todavía mantiene el mismo, o esencialmente el mismo, potencial antigénico que la secuencia no modificada.

40 21. El péptido o fragmento según el aspecto 13, que se puede obtener a partir de una proteína tau humana entre la posición 5 y la 20 y en donde la tirosina de la posición 18 está fosforilada.

22. El péptido o fragmento según el aspecto 14 y 15, que se puede obtener a partir de una proteína tau humana entre la posición 196-221 y en donde al menos uno, particularmente al menos dos, particularmente al menos 3, pero especialmente los 4 aminoácidos de la posición 202, 205, 212, 214 están fosforilados.

45 23. El péptido o fragmento según el aspecto 16, que se puede obtener a partir de una proteína tau humana entre la posición 393 y 408 y en donde al menos uno de los aminoácidos, pero especialmente todos los aminoácidos de la posición 396, 404 están fosforilados.

24. El péptido o fragmento según el aspecto 17, que se puede obtener a partir de una proteína tau entre la posición 401 y 418 y en donde al menos uno de los aminoácidos, pero especialmente todos los aminoácidos de la posición 404 y 409 están fosforilados.

50 25. El péptido o fragmento según el aspecto 18, que se puede obtener a partir de una proteína tau humana entre la posición 200 y 216 y en donde al menos uno de los aminoácidos, pero especialmente todos los aminoácidos de la posición 202 y 205 y/o de la posición 212 y 214, están fosforilados.

26. El péptido o fragmento según el aspecto 19, que se puede obtener a partir de una proteína tau humana entre la posición 407 y 418 y en donde la serina de la posición 409 está fosforilada.
27. El péptido o fragmento según el aspecto 20, que se puede obtener a partir de proteína tau humana entre la posición 399 y 408 y en donde la serina de la posición 404 está fosforilada.
- 5 28. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 2 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 2, en donde el residuo de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 18 (P-Tyr₁₈) de la SEQ ID NO: 2 está fosforilado (T1).
- 10 29. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 3 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 3, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 3 están fosforilados.
- 15 30. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 4 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 4, en donde al menos uno, particularmente al menos 2 de los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂) y 205 (P-Thr₂₀₅) de la SEQ ID NO: 4 están fosforilados.
- 20 31. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 5 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 5, en donde al menos uno, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 396 (P-Ser₃₉₆) y 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 5 están fosforilados.
- 25 32. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 6 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 6, en donde al menos uno, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) y 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 6 están fosforilados.
- 30 33. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 7 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 7, en donde al menos uno, particularmente al menos 2, particularmente al menos 3, pero especialmente todos los residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 7 están fosforilados.
- 35 34. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 8 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 8, en donde el residuo de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 8 está fosforilado.
- 40 35. El péptido o fragmento según el aspecto 12, en donde dicha proteína tau tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 9 de al menos el 95%, y tiene sustancialmente la misma actividad inmunogénica que dicho péptido antigénico de la SEQ ID NO: 9, en donde el residuo de aminoácido correspondiente al residuo de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 9 está fosforilado.
- 45 36. El péptido según el aspecto 28, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
37. El péptido según el aspecto 29, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.
38. El péptido según el aspecto 30, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
- 45 39. El péptido según el aspecto 31, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.
40. El péptido según el aspecto 32, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
41. El péptido según el aspecto 33, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.
42. El péptido según el aspecto 34, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
43. El péptido según el aspecto 35, en donde dicha proteína tau tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.
- 50 44. El péptido o fragmento según cualquiera de los aspectos precedentes, o una combinación del mismo, para uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como las tauopatías.

45. El péptido o fragmento según el aspecto 44 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
46. Una composición farmacéutica que comprende el péptido o fragmento de cualquiera de los aspectos precedentes o una combinación de los mismos.
- 5 47. Una composición farmacéutica según el aspecto 46, que contiene un adyuvante y/o inmunomodulador farmacéuticamente aceptable.
48. Una composición farmacéutica según el aspecto 47, en donde el inmunomodulador es lípido A destoxicificado, tal como monofosforil o difosforil lípido A.
49. Una composición farmacéutica según cualquiera de los aspectos precedentes para uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo tal como una tauopatía.
- 10 50. Una composición farmacéutica según el aspecto 49 para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están producidas por la formación de lesiones neurofibrilares, o que están asociadas a la misma, la patología cerebral predominante en la tauopatía, que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades y trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran la co-existencia de patologías tau y amiloide, que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen, aunque sin limitación, el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, distrofia miotónica.
- 20 51. Una composición farmacéutica según el aspecto 50 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- 25 52. Un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo tal como la tauopatía que comprende la administración a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un humano, que padece dicha enfermedad o trastorno, de una composición farmacéutica terapéutica como la mencionada en cualquiera de los aspectos precedentes.
- 30 53. Un método según el aspecto 52 para el tratamiento de enfermedades y trastornos que están producidas por la formación de lesiones neurofibrilares, o que están asociadas a la misma, la patología cerebral predominante en la tauopatía, que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades y trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran la co-existencia de patologías tau y amiloide, que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen, aunque sin limitación, el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, distrofia miotónica.
- 35 54. Un método para inducir una respuesta inmune en un animal, particularmente un mamífero o un humano, que padece un trastorno neurodegenerativo tal como una tauopatía mediante la administración a dicho animal o humano de un péptido antigénico o una composición terapéutica como los mencionados en cualquiera de los aspectos precedentes.
- 40 55. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo, capaz de reconocer y unirse a una proteína tau *in vitro* y/o *in vivo*.
- 45 56. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo, del aspecto 47, en donde dicha proteína tau está fosforilada.
- 50 57. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo, según el aspecto 48 capaz de reconocer y unirse a un fragmento peptídico según cualquiera de los aspectos precedentes.
- 55 58. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que reconoce y se une a una proteína tau-confórmero patológica fosforilada o a aquellas partes del confórmero que producen las propiedades patológicas de dicho confórmero, particularmente un

fosfo-epítopo patológico de la proteína tau.

59. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo según cualquiera de los aspectos precedentes, que se puede obtener inmunizando un animal adecuado con un péptido antigénico de cualquiera de los aspectos precedentes, particularmente un péptido antigénico que comprende una secuencia de aminoácidos como la proporcionada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, que incluye un fragmento funcional o un fragmento variante del mismo.
- 10 60. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma ACI-41-Ab1 depositada el 3 de marzo de 2010 como DSM ACC3043.
- 15 61. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 60 producido mediante la línea celular de hibridoma ACI-41-Ab1 depositada el 3 de marzo de 2010 como DSM ACC3043.
- 20 62. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 2B6 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3044.
- 25 63. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 62 producido mediante la línea celular de hibridoma 2B6 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3044.
64. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 3A8 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3045.
- 30 65. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 64 producido mediante la línea celular de hibridoma 3A8 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3045.
66. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 4C1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3046.
- 35 67. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 66 producido mediante la línea celular de hibridoma 4C1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3046.
68. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 5D10A3 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3047.
- 40 69. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 68 producido mediante la línea celular de hibridoma 5D10A3 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3047.
70. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 6C10 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3048.
- 45 71. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 70 producido mediante la línea celular de hibridoma 6C10 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3048.
72. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 6H1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3049.
- 50 73. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente

equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 72 producido mediante la línea celular de hibridoma 6H1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3049.

- 5 74. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales según cualquiera de los aspectos precedentes, anticuerpo que tiene las propiedades características de un anticuerpo producido mediante la línea celular de hibridoma 7C2 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3050.
75. Un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo según el aspecto 74 producido mediante la línea celular de hibridoma 7C2 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3050.
- 10 76. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos precedentes, que es un anticuerpo policlonal.
77. El anticuerpo según cualquiera de los aspectos precedentes que es un anticuerpo monoclonal.
- 15 78. Un anticuerpo de cualquiera de los aspectos precedentes, particularmente un anticuerpo monoclonal o partes funcionales del mismo, que se une directa y específicamente a un epítopo de la proteína tau, particularmente a un epítopo de una proteína tau-confórmero patológica, particularmente a un epítopo como el representado, o comprendido, por una secuencia de péptido seleccionada del grupo de secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, y fragmentos variantes de las mismas.
79. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de los aspectos precedentes junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 80. La composición farmacéutica del aspecto 79 para el tratamiento de enfermedades o trastornos que están producidas por la formación de lesiones neurofibrilares, o que están asociadas a la misma, la patología cerebral predominante en la tauopatía, que comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades y trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades o trastornos que muestran la co-existencia de patologías tau y amiloide, que incluyen, aunque sin limitación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, y angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, lesión cerebral traumática y otras enfermedades o trastornos que no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen, aunque sin limitación, el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, distrofia miotónica.
- 25 81. Un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo tal como una tauopatía que comprende administrar a un animal, particularmente a un mamífero, pero especialmente a un humano, que padece dicha enfermedad o trastorno, un anticuerpo o una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como el mencionado en cualquiera de los aspectos precedentes.
- 30 82. Un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección asociada a proteína tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o de un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína tau en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de
- 40 (a) poner la muestra, o una parte específica del cuerpo o área del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína tau, en contacto con dicho anticuerpo, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
- (b) permitir que el anticuerpo se una a la proteína tau para formar un complejo inmunológico;
- (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- 45 (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de proteína tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo.
83. Un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección asociada a proteína tau en un paciente, que comprende detectar la unión inmunoespecífica de un anticuerpo o de un fragmento activo del mismo a un epítopo de la proteína tau en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de
- 50 (a) poner la muestra, o una parte específica del cuerpo o área del cuerpo que se sospecha que contiene la proteína tau, en contacto con dicho anticuerpo según la invención y tal como se ha descrito con anterioridad en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
- (b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno tau para formar un complejo inmunológico;

- (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
 - (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo,
 - (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,
- 5 en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado con respecto a un valor de control normal indica que dicho paciente está padeciendo, o está en riesgo de desarrollar, una enfermedad o afección asociada a proteína tau.
84. Un método para monitorizar una enfermedad residual mínima en un paciente después de tratamiento con un anticuerpo o una composición farmacéutica según uno cualquiera de los aspectos precedentes, en donde dicho método comprende:
- 10 (a) poner la muestra, o una parte específica del cuerpo o área del cuerpo que se sospecha que contiene el antígeno tau, en contacto con un anticuerpo según la invención y tal como se ha descrito con anterioridad en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
 - (b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno tau para formar un complejo inmunológico;
 - (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
- 15 (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo,
- (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico con un valor de control normal,
- en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado con respecto a un valor de control normal indica que dicho paciente todavía padece una enfermedad residual mínima.
- 20 85. Un método para predecir la capacidad de respuesta de un paciente que está siendo tratado con un anticuerpo o composición farmacéutica según uno cualquiera de los aspectos precedentes, que comprende
- (a) poner la muestra, o una parte específica del cuerpo o área del cuerpo que se sospecha que contiene el antígeno tau, en contacto con un anticuerpo según la invención y tal como se ha descrito con anterioridad en la presente memoria, anticuerpo que se une a un epítopo de la proteína tau;
 - 25 (b) permitir que el anticuerpo se una al antígeno tau para formar un complejo inmunológico;
 - (c) detectar la formación del complejo inmunológico; y
 - (d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de antígeno tau en la muestra o parte o área específica del cuerpo,
 - (e) comparar la cantidad de dicho complejo inmunológico antes y después del inicio del tratamiento,
- 30 en donde un aumento de la cantidad de dicho agregado indica que dicho paciente presenta un alto potencial de capacidad de respuesta al tratamiento.
86. Kits de ensayo para la detección y la diagnosis de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas a proteína tau, que comprenden anticuerpos según cualquiera de los aspectos precedentes.
- 35 87. Kit de ensayo según el aspecto 86 que comprende un recipiente que contiene uno o más anticuerpos según la presente invención e instrucciones para usar los anticuerpos para el propósito de unión a antígeno tau para formar un complejo inmunológico y detectar la formación del complejo inmunológico de tal modo que la presencia o ausencia del complejo inmunológico se correlaciona con la presencia o ausencia de antígeno tau.
88. Un epítopo como el representado, o comprendido, por una secuencia de péptido seleccionada del grupo de secuencias proporcionadas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, y fragmentos variantes de las mismas.
- 40 89. Una línea celular que produce un anticuerpo según cualquiera de los aspectos precedentes.
90. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma ACI-41-Ab1 depositada el 3 de marzo de 2010 como DSM ACC3043.
- 45 91. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 2B6 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3044.
92. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 3A8 depositada el 10 de marzo de 2010

como DSM ACC3045.

93. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 4C1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3046.

5 94. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 5D10A3 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3047.

95. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 6C10 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3048.

96. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 6H1 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3049.

10 97. Una línea celular según el aspecto 89, que es la línea celular de hibridoma 7C2 depositada el 10 de marzo de 2010 como DSM ACC3050.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción antigénica que comprende un fosfo-péptido en donde el fosfo-péptido está (A) modificado mediante unión a un resto funcional lipofílico o hidrofóbico que facilita la inserción en la bicapa lipídica de un liposoma y (B) reconstituido en un liposoma de tal modo que el fosfo-péptido se presenta sobre la superficie del liposoma, en donde dicho fosfo-péptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 a. SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- 10 b. SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- 15 c. SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- 20 d. SEQ ID NO: 5 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- 25 e. SEQ ID NO: 6 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- f. SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- 25 g. SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar; y
- h. SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y que presenta la misma actividad inmunogénica que la secuencia sin modificar;
- 30 2. La construcción antigénica según la reivindicación 1, en donde dicho fosfo-péptido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- a. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 2, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 2, y en donde el residuo de aminoácido 18 (P-Tyr₁₈) de la SEQ ID NO: 2 está fosforilado;
- 35 b. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 3, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 3, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 3 está fosforilado;
- 40 c. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 4, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 4, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂) y 205 (P-Thr₂₀₅) de la SEQ ID NO: 4 está fosforilado;
- d. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 5, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 5, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 396 (P-Ser₃₉₆) y 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 5 está fosforilado;
- 45 e. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 6, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 6, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) y 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 6 está fosforilado;
- f. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 7, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 7, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 202 (P-Ser₂₀₂), 205 (P-Thr₂₀₅), 212 (P-Thr₂₁₂) y 214 (P-Ser₂₁₄) de la SEQ ID NO: 7 está fosforilado;
- 50 g. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 8, en donde el fosfo-péptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-péptido de la SEQ ID NO: 8, y en donde al

menos uno de los residuos de aminoácido 409 (P-Ser₄₀₉) de la SEQ ID NO: 8 está fosforilado; y

h. una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la SEQ ID NO: 9, en donde el fosfo-peptido presenta la misma actividad inmunogénica que dicho fosfo-peptido de la SEQ ID NO: 9, y en donde al menos uno de los residuos de aminoácido 404 (P-Ser₄₀₄) de la SEQ ID NO: 9 está fosforilado.

5 **3. La construcción antigénica según la reivindicación 2, en donde**

a. al menos dos de los sitios de fosforilación enumerados en la reivindicación 2(b)-2(f) de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOs: 3-7 están fosforilados; o

b. tres o cuatro de los sitios de fosforilación enumerados en la reivindicación 2(f) de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 están fosforilados.

10 **4. Una construcción antigénica que comprende un fosfo-peptido, en donde el fosfo-peptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y que presenta la misma actividad inmunogénica que el fosfo-peptido de la SEQ ID NO: 5, en donde el fosfo-peptido está (a) modificado a través de al menos una cadena de ácido palmitíco que facilita la inserción en la bicapa lipídica de un liposoma, y (b) reconstituido en el liposoma de tal modo que el fosfo-peptido se presenta sobre la superficie del liposoma.**

15 **5. La construcción antigénica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una combinación del mismo, para uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, particularmente para uso en el tratamiento de tauopatías, particularmente para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.**

20 **6. Una composición farmacéutica que comprende la construcción antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una combinación de las mismas, junto con un vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.**

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que además comprende un adyuvante y/o un inmunomodulador farmacéuticamente aceptable, particularmente monofosforil Lípido A.

25 **8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en donde el fosfo-peptido está tetrapalmitoilado.**

30 **9. Una composición farmacéutica que comprende una construcción antigénica que comprende un fosfo-peptido, en donde el fosfo-peptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, o una variante de la misma que comprende una sustitución, eliminación o inserción conservativa de al menos uno, pero no más de 5, aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y que presenta la misma actividad inmunogénica que el fosfo-peptido de la SEQ ID NO: 5, y el fosfo-peptido está (a) modificado a través de al menos una cadena de ácido palmitíco que facilita la inserción en la bicapa lipídica de un liposoma, y (b) reconstituido en el liposoma de tal modo que el fosfo-peptido se presenta sobre la superficie del liposoma, en donde la composición farmacéutica comprende además al menos un vehículo, diluyente y excipiente farmacéuticamente aceptable, y un adyuvante y/o inmunomodulador farmacéuticamente aceptable.**

35 **10. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para uso en el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, particularmente para el uso en el tratamiento de tauopatía, particularmente para el uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que está producido por, o se asocia a, la formación de lesiones neurofibrilares o la patología cerebral predominante en la tauopatía, particularmente para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en:**

40 **a. enfermedades o trastornos que presentan la co-existencia de patologías tau y amiloide, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, la demencia pugilística, el síndrome de Down, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, la miositis de cuerpo de inclusión, la angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, y la lesión cerebral traumática; y**

45 **b. enfermedades o trastornos que no presenten una patología amiloide distintiva, que incluyen el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico, y distrofia miotónica.**

50 **11. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10 para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.**

12. Un método para usar la construcción antigénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una combinación de las mismas, o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de

- a. un trastorno neurodegenerativo;
- b. una enfermedad o trastorno que está producido por la formación de lesiones neurofibrilares, o que está asociado a las mismas, y que presenta una coexistencia de patologías tau y amiloide;
- 5 c. enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, miositis de cuerpo de inclusión, angiopatía amiloide cerebral de proteína de prion, y lesión cerebral traumática; o
- d. una enfermedad o trastorno que no presente una patología amiloide distintiva, que incluyen el complejo de Guam de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia, la enfermedad de neuronas motoras no Guamaniana con marañas neurofibrilares, la demencia de grano argirofílico, la degeneración corticobasal, las marañas neurofibrilares difusas con calcificación, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, la enfermedad de Hallevorden-Spatz, atrofia de sistema múltiple, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerotizante subaguda, demencia solo de maraña, parkinsonismo post-encefalítico o distrofia miotónica.
- 10 13. Un método para producir una composición farmacéutica de cualquiera de las realizaciones 6 a 9, que comprende combinar la construcción antigénica con el vehículo y/o diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 14. Un método para producir una construcción antigénica de cualquiera de las realizaciones 1 a 4, que comprende:
 - a. modificar el fosfo-péptido mediante enlace al resto funcional lipofílico o hidrofóbico que facilite la inserción en la bicapa lipídica del liposoma, y
 - b. reconstituir el fosfo-péptido modificado en el liposoma de tal modo que el fosfo-péptido esté presente sobre la superficie del liposoma.
- 20

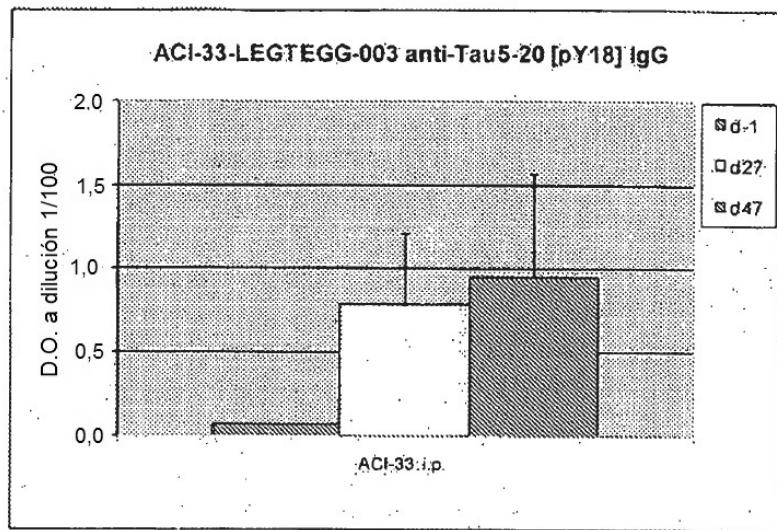


FIGURA: 1a

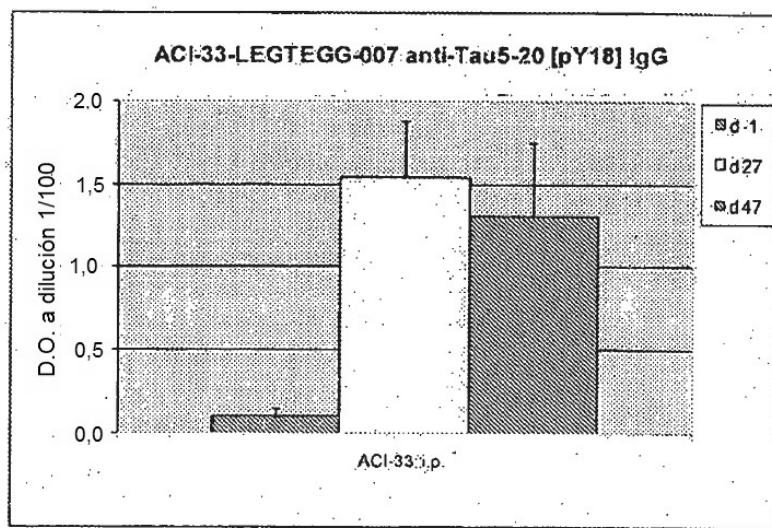


FIGURA: 1b

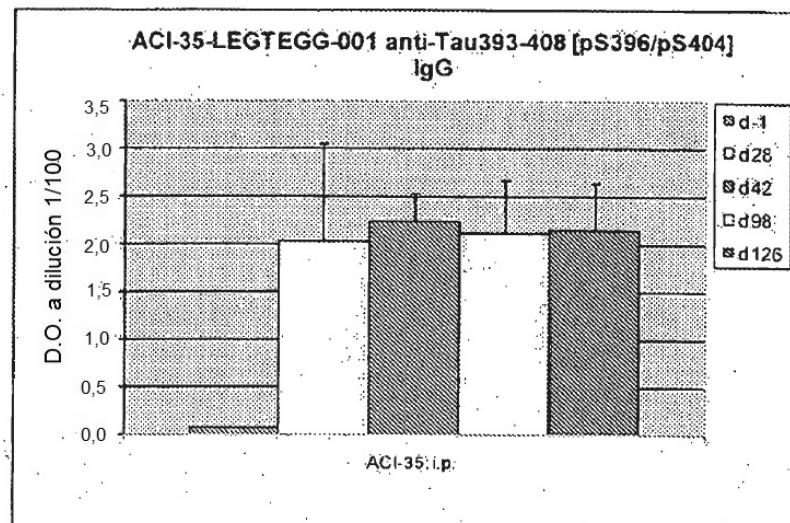


FIGURA: 2a

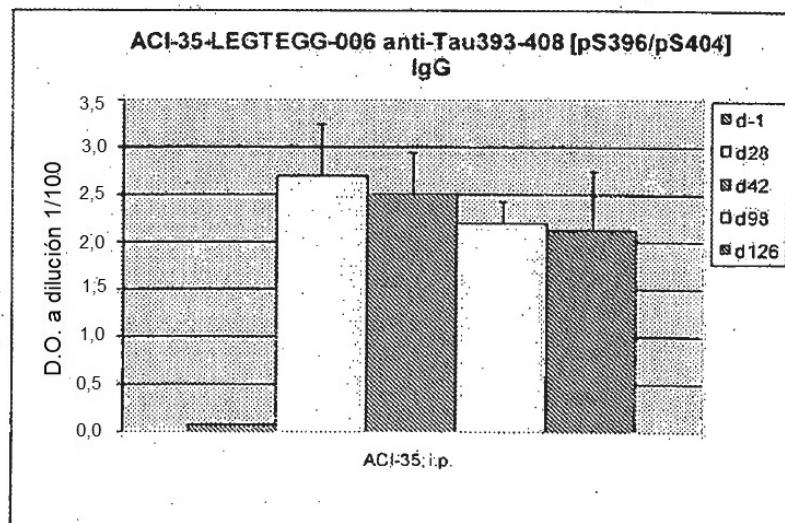


FIGURA: 2b

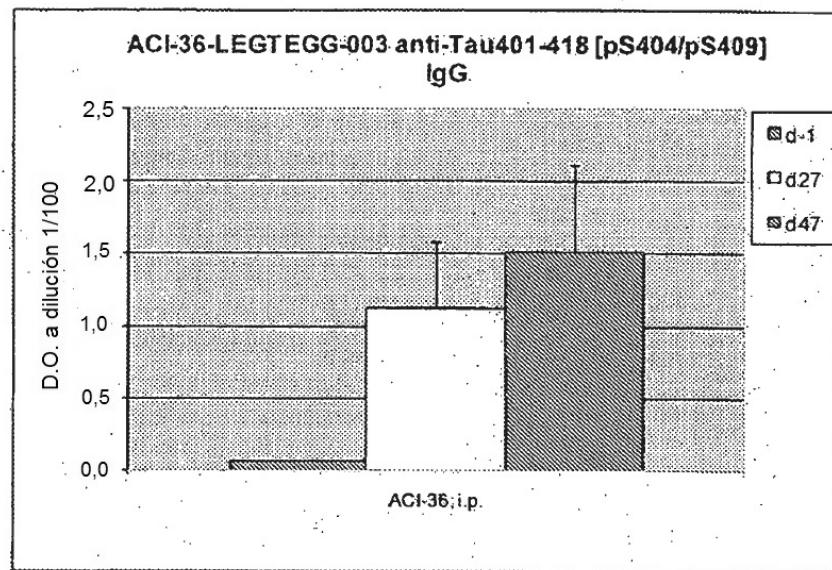


FIGURA: 3a

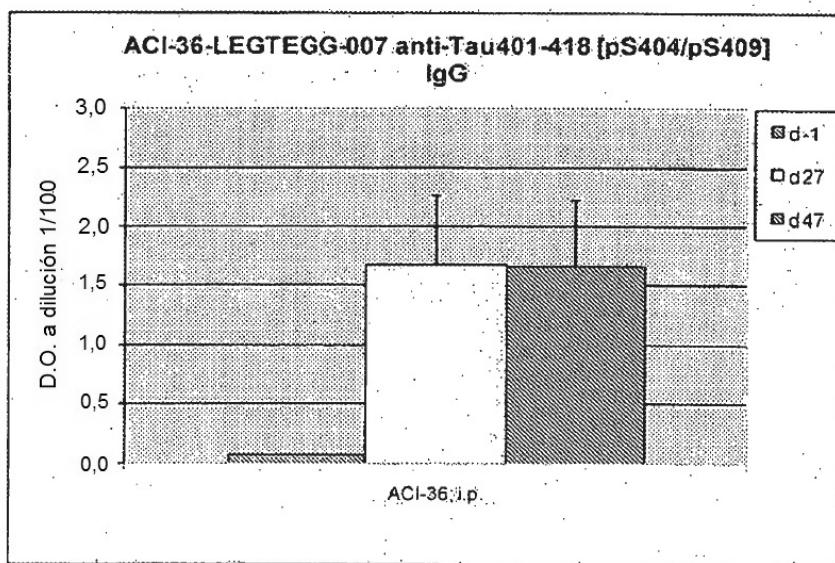


FIGURA: 3b

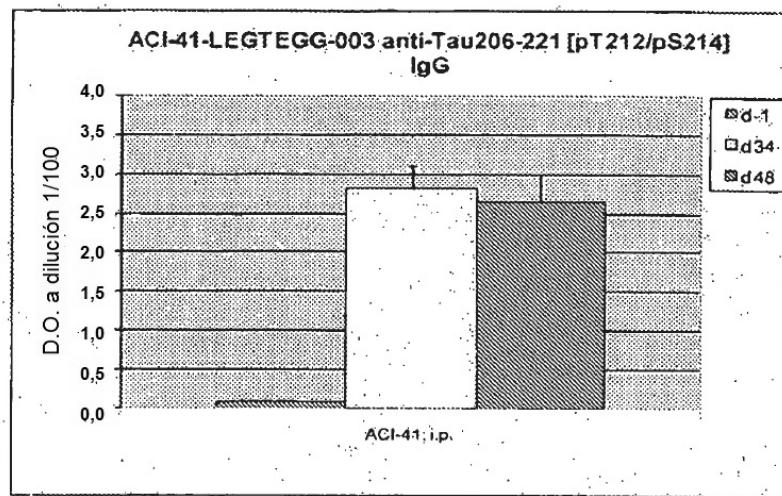


FIGURA: 4a

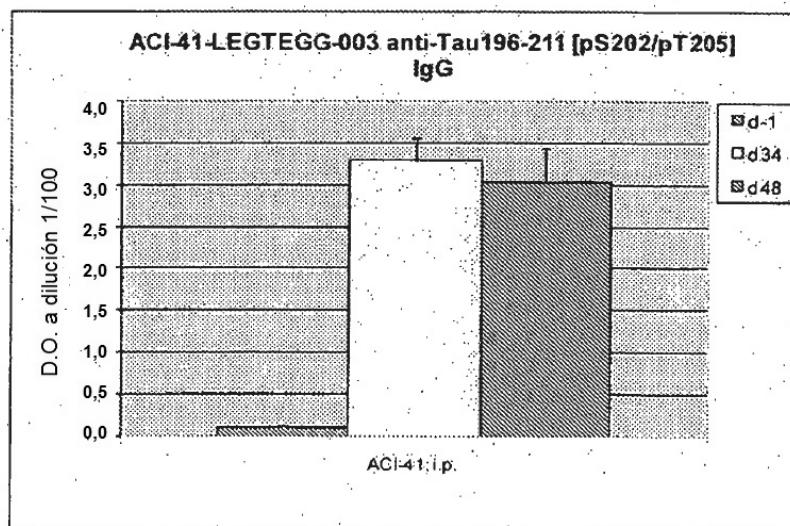


FIGURA: 4b

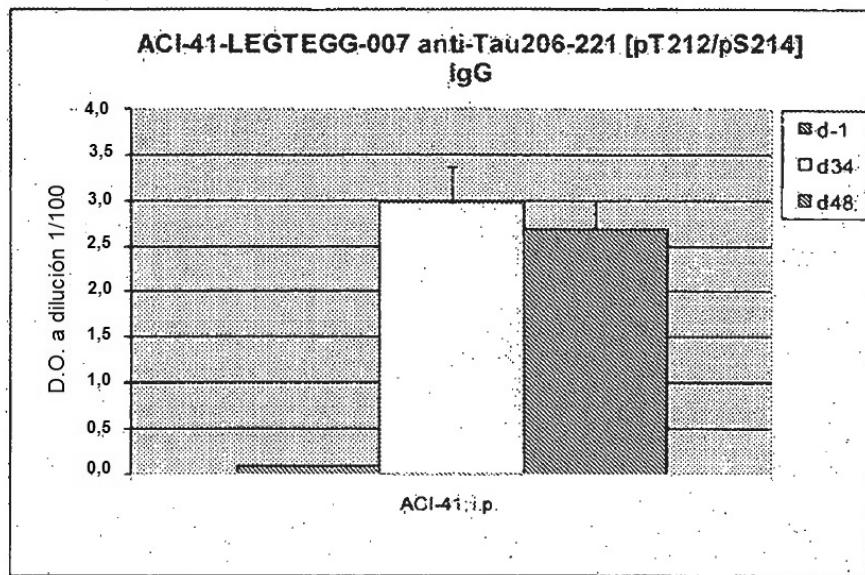


FIGURA: 4c

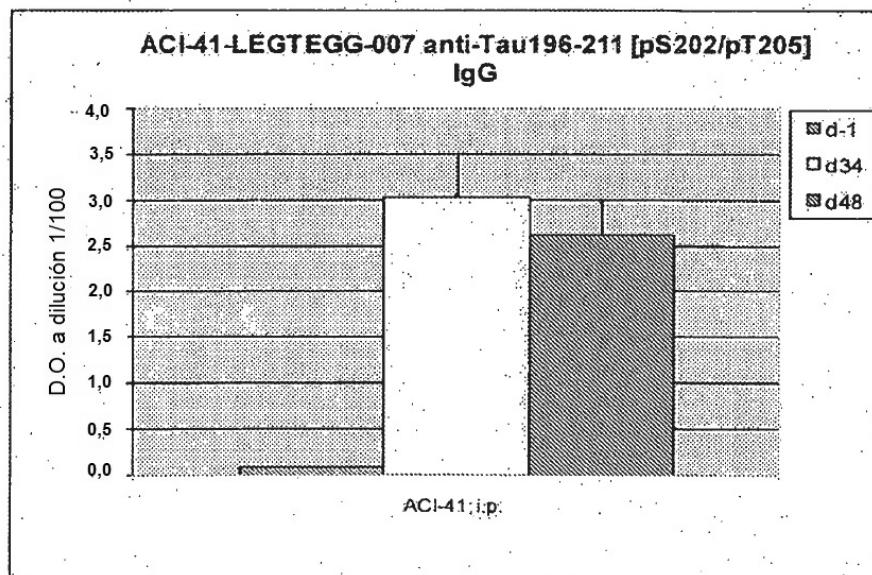


FIGURA: 4d

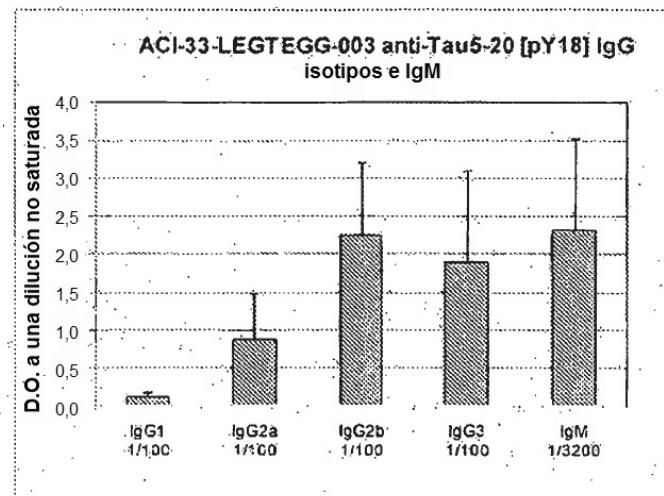


FIGURA: 5a

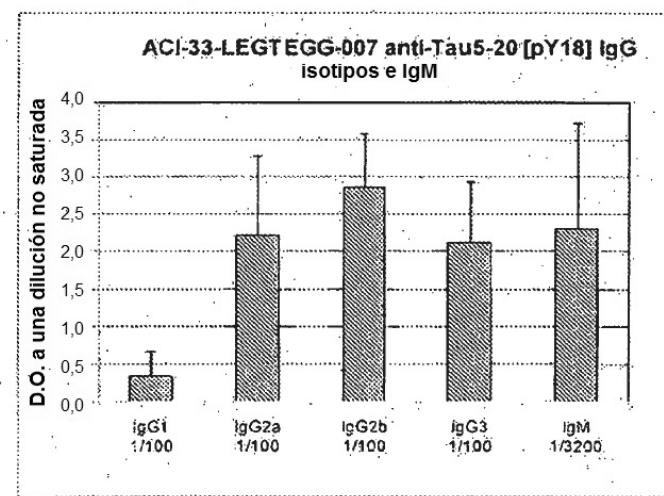


FIGURA: 5b

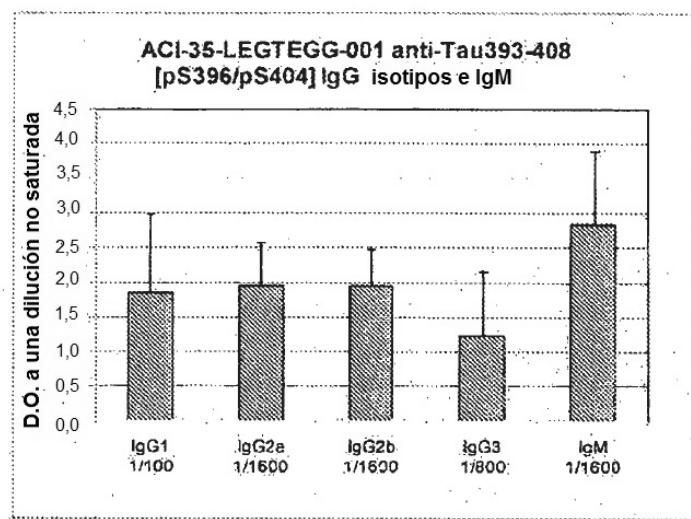


FIGURA: 6a

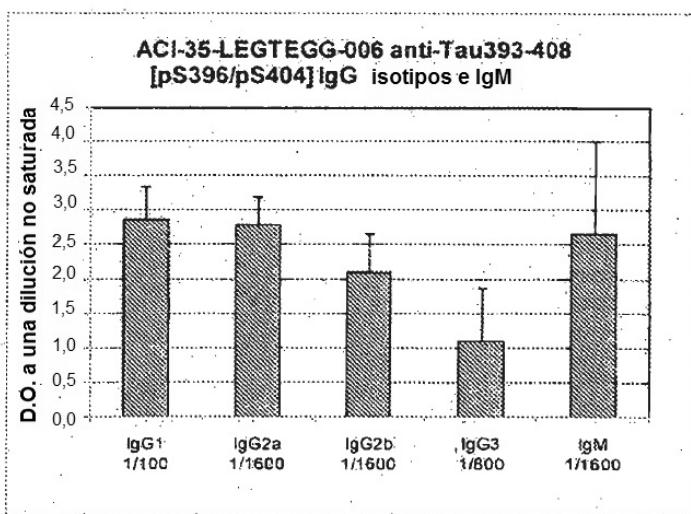


FIGURA: 6b

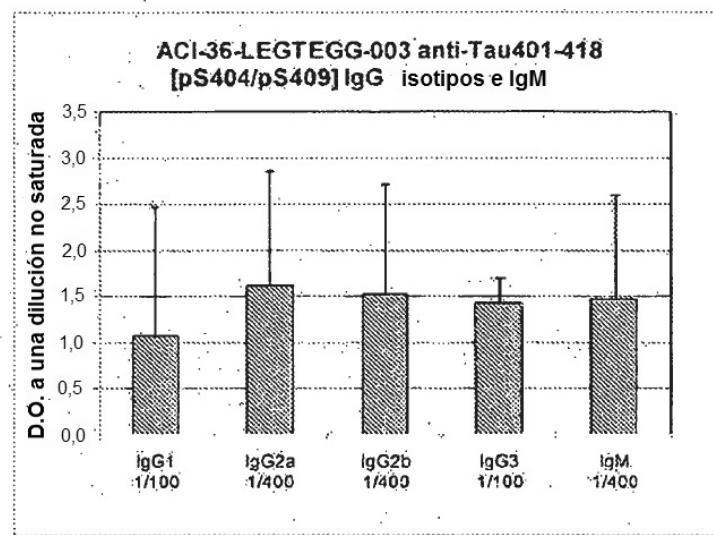


FIGURA: 7a

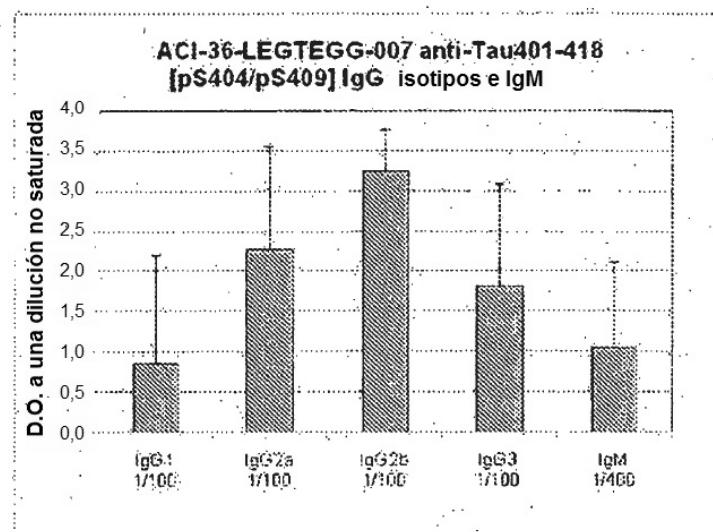


FIGURA: 7b

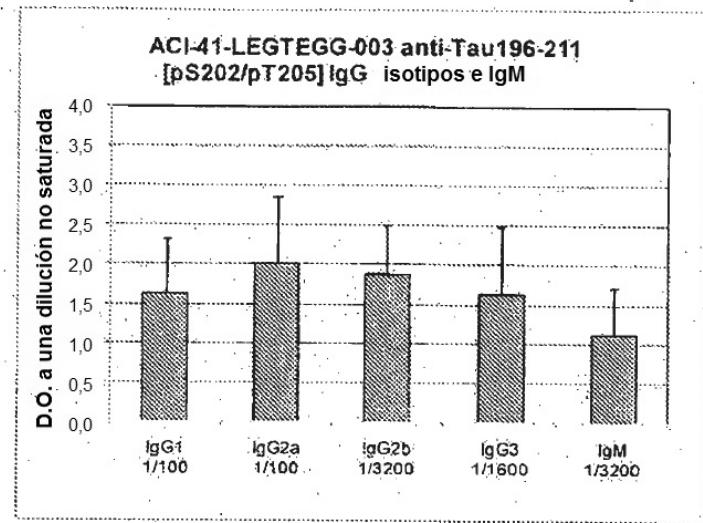


FIGURA: 8a

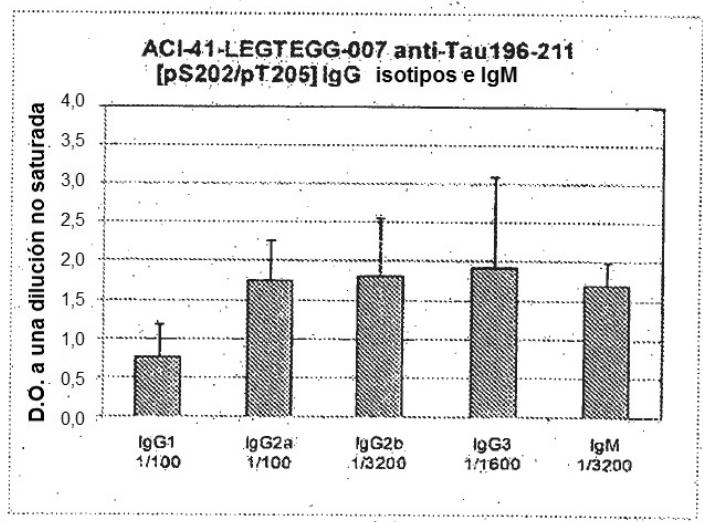


FIGURA: 8b

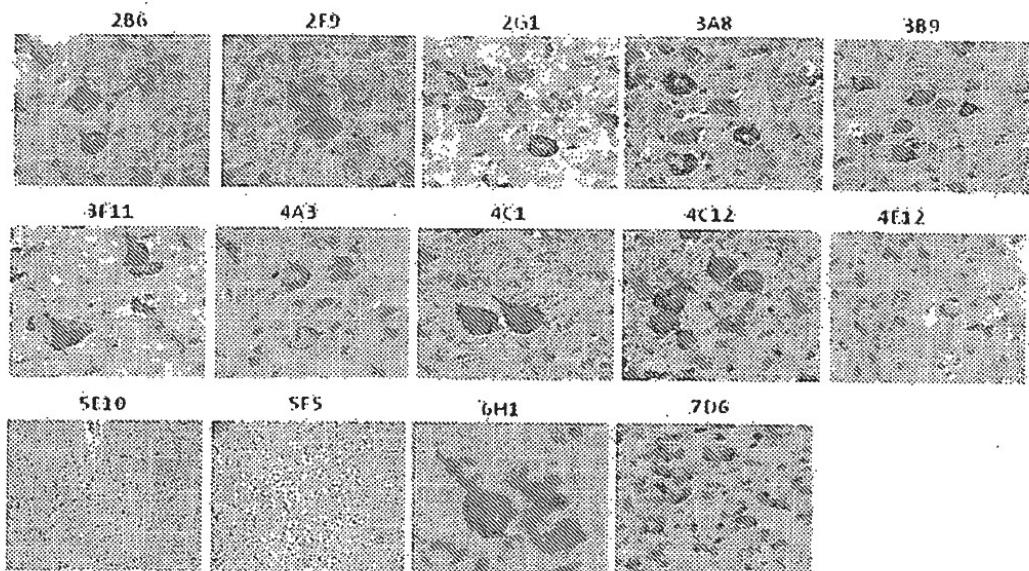


FIGURA: 9a

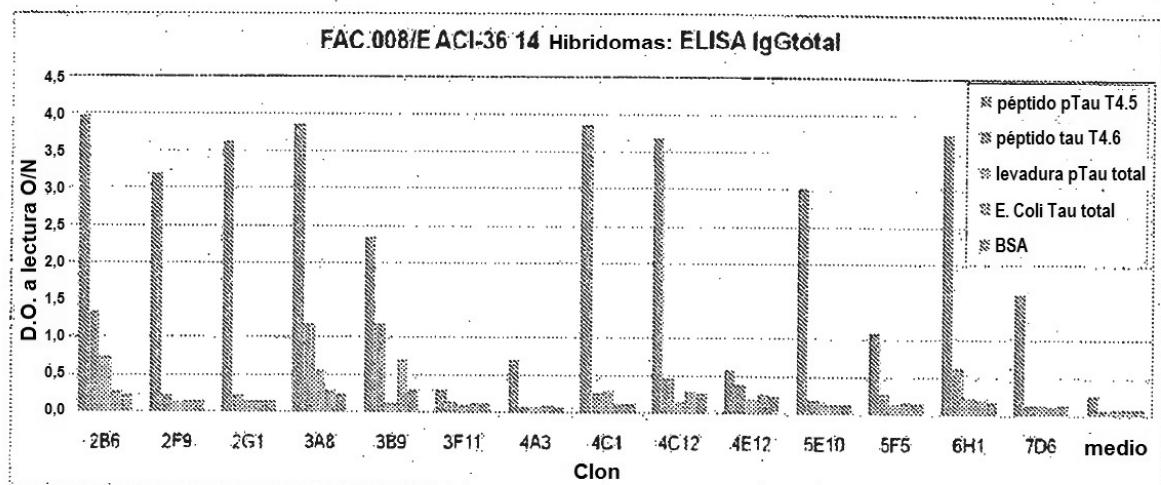


FIGURA: 9b

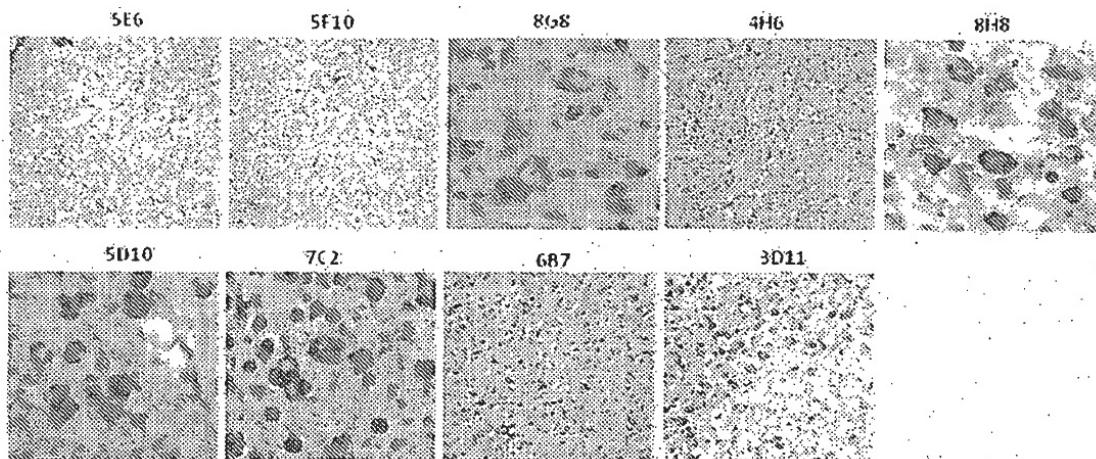


FIGURA: 10a

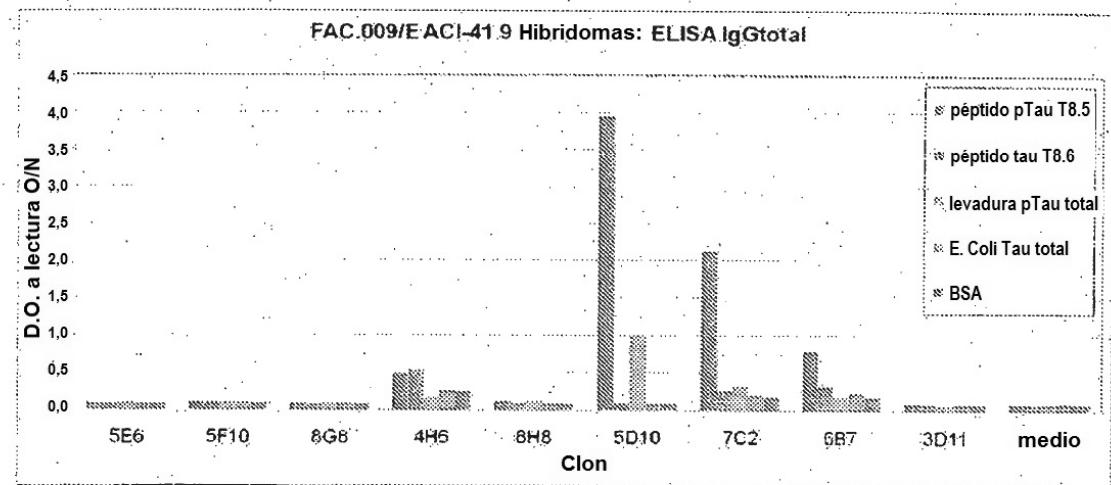


FIGURA: 10b

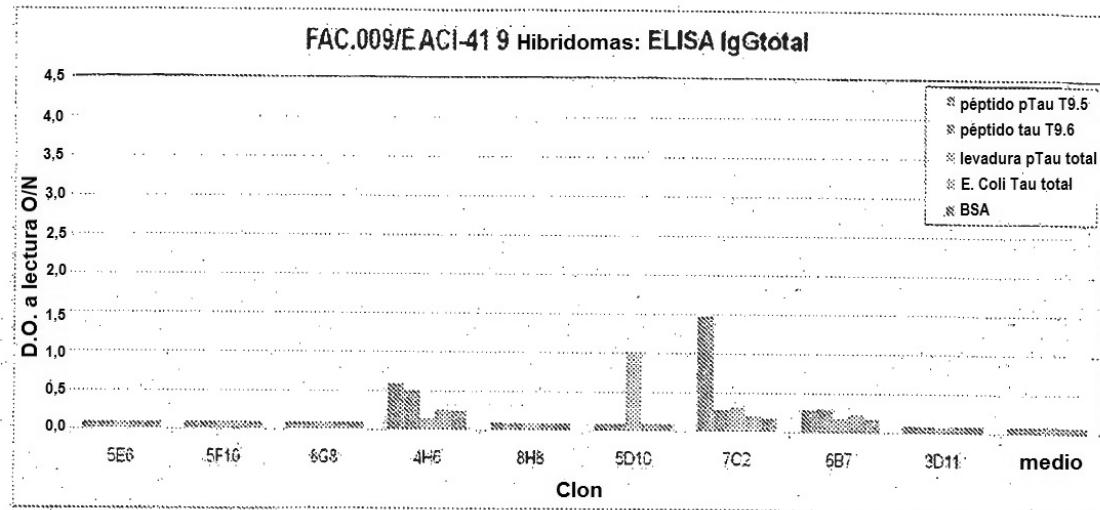
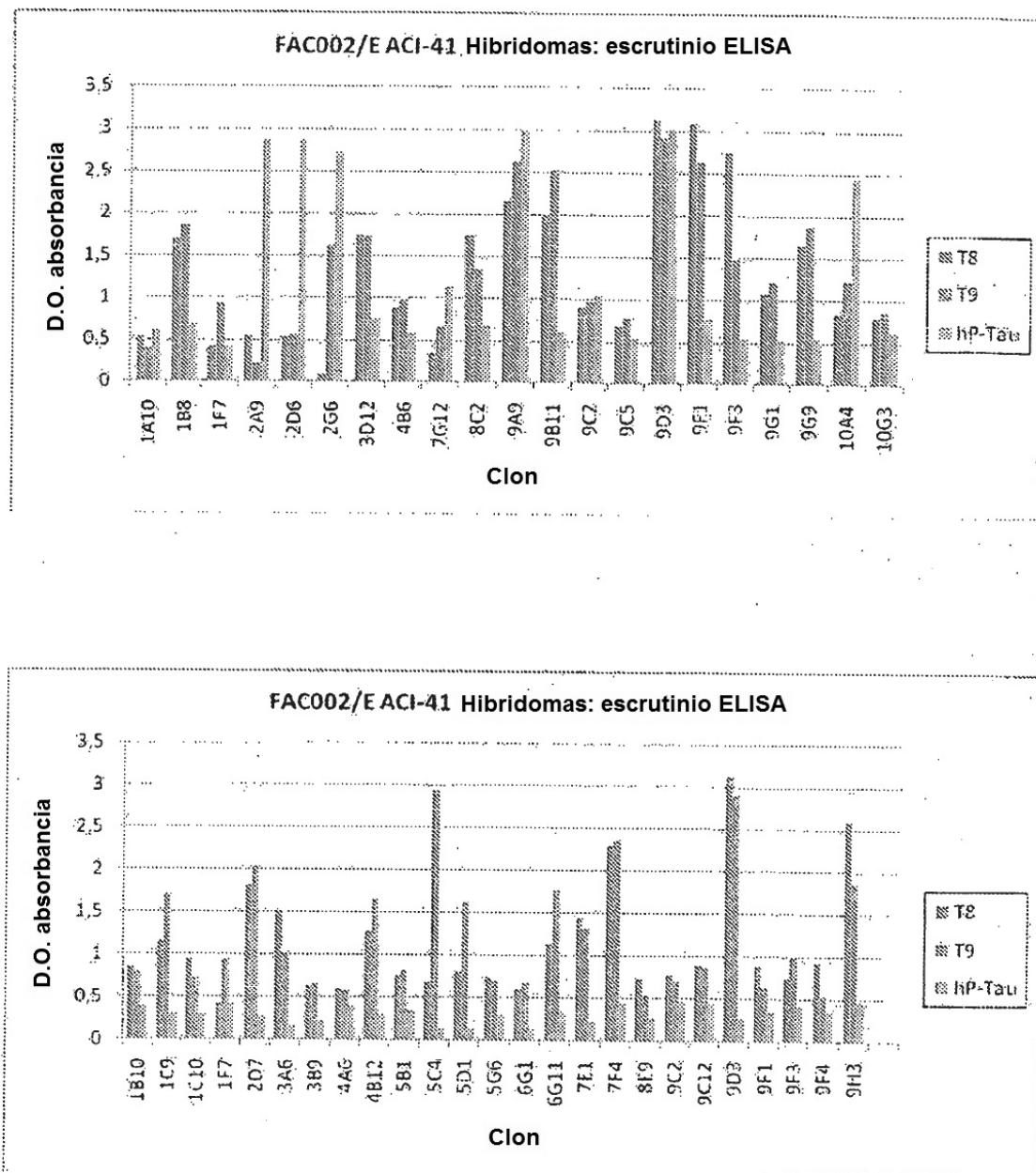


FIGURA: 10c

**FIGURA: 11**

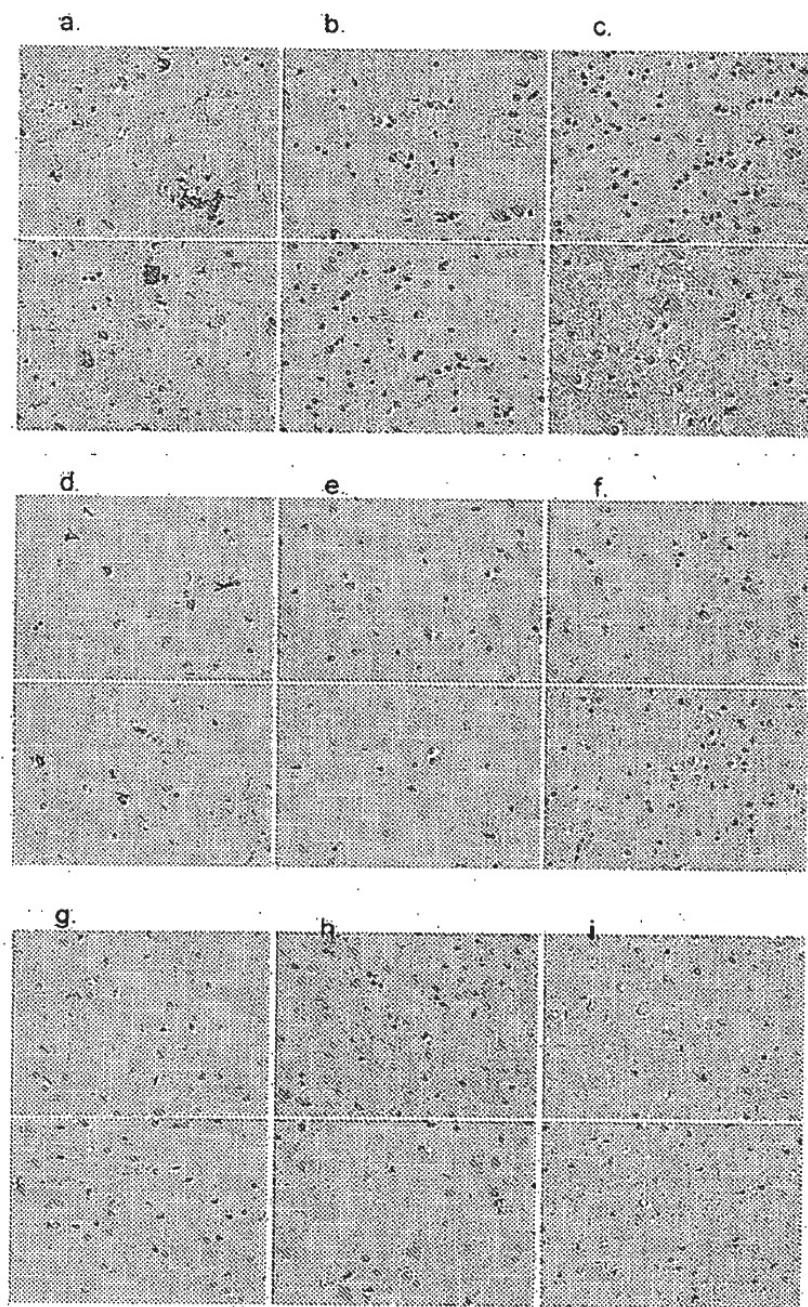


FIGURA: 12

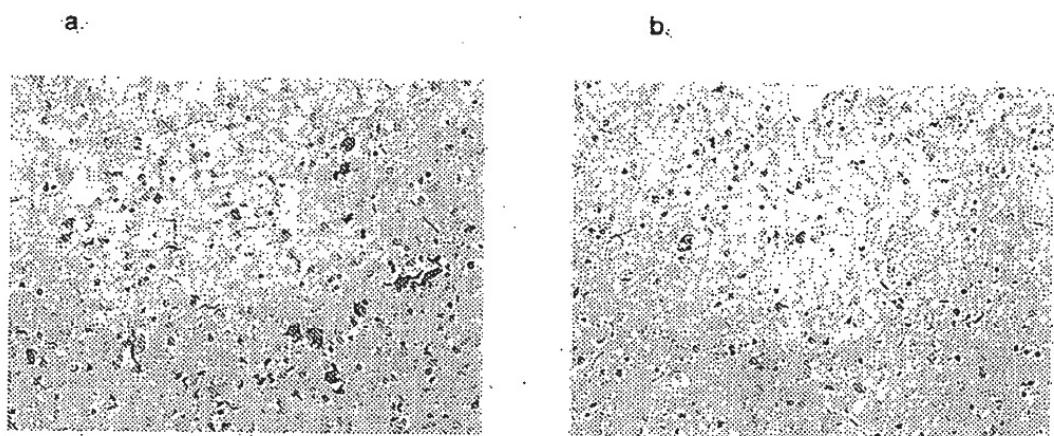


FIGURA: 13

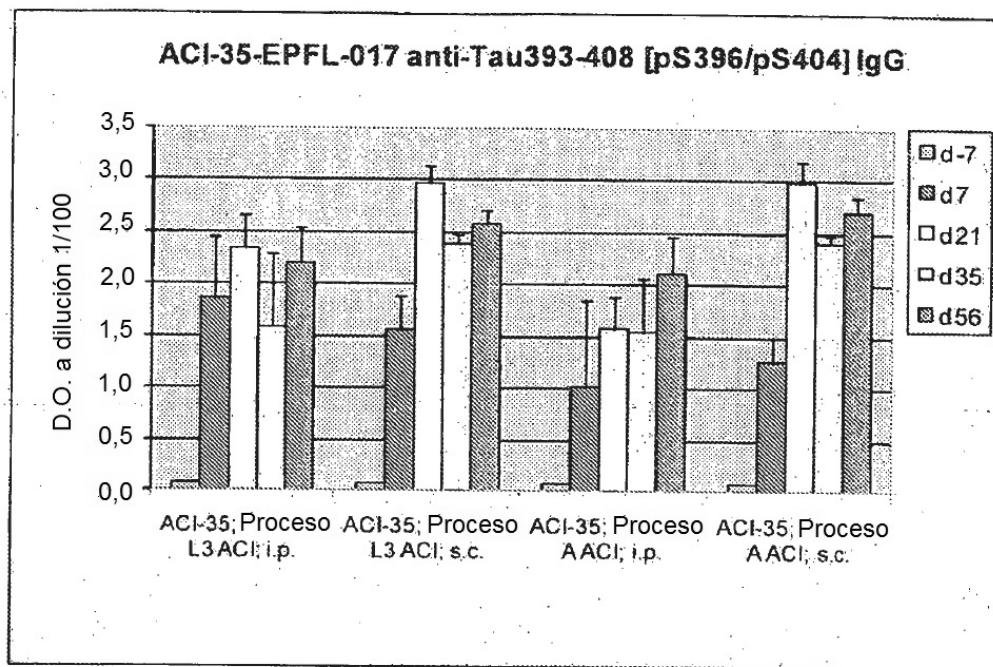
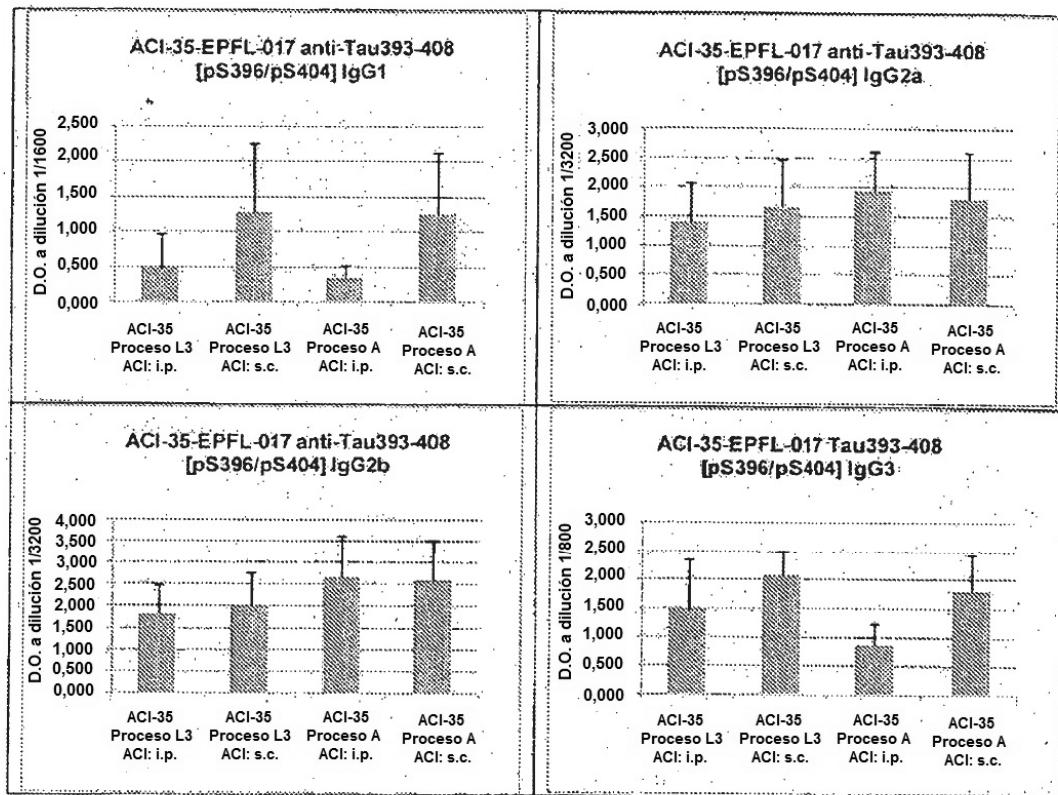


FIGURA: 14

**FIGURA: 15**

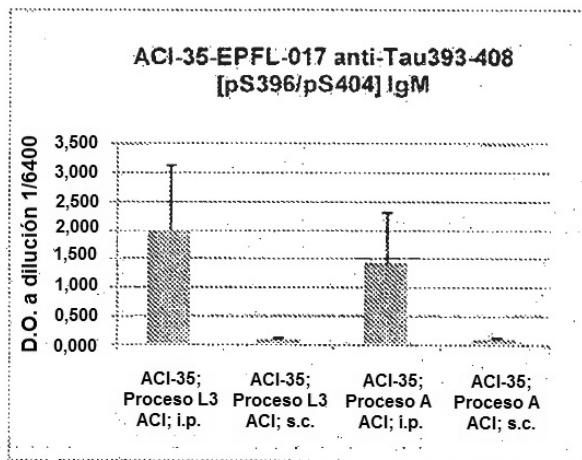


FIGURA: 16a

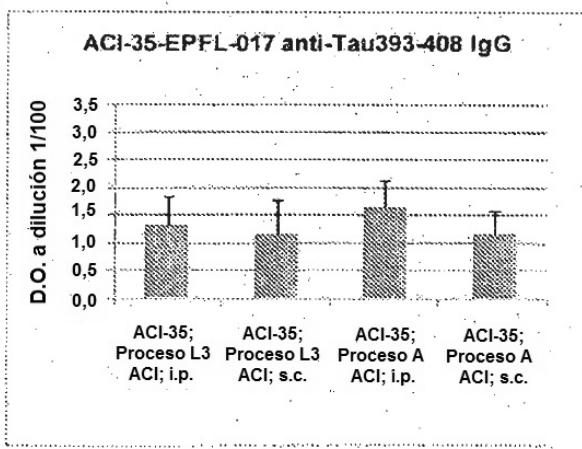


FIGURA: 16b

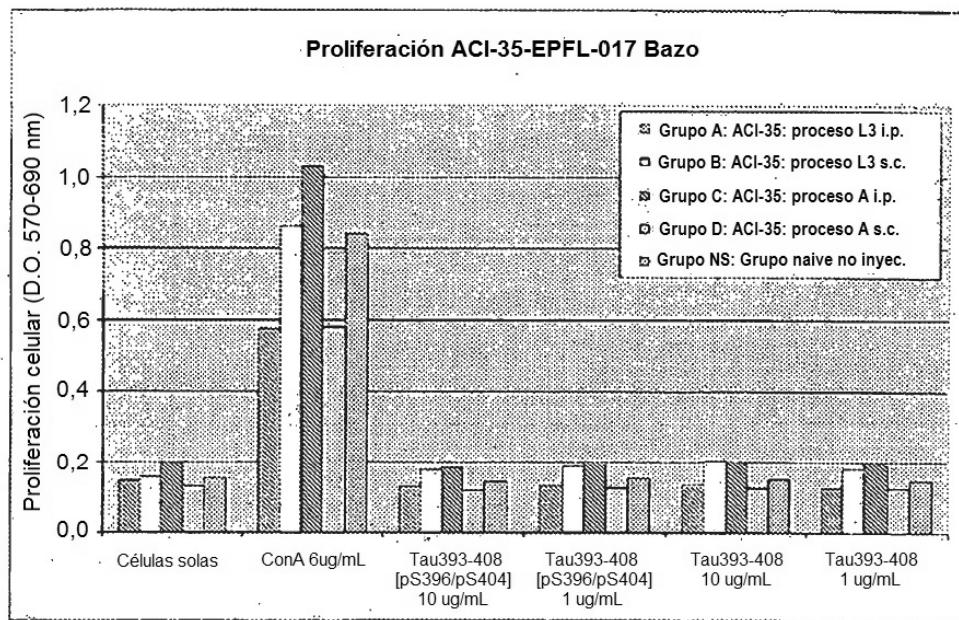


FIGURA: 17

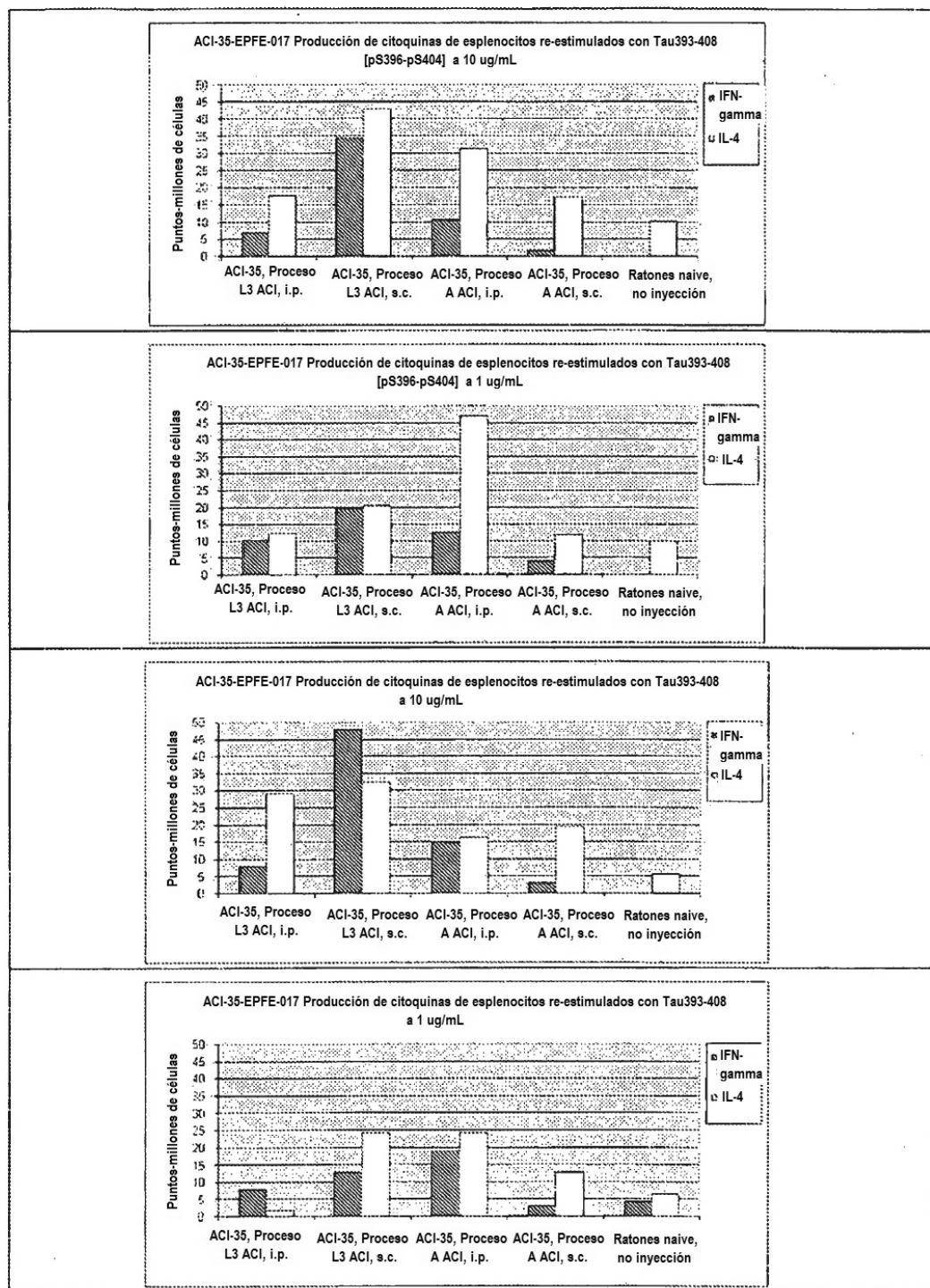


FIGURA: 18

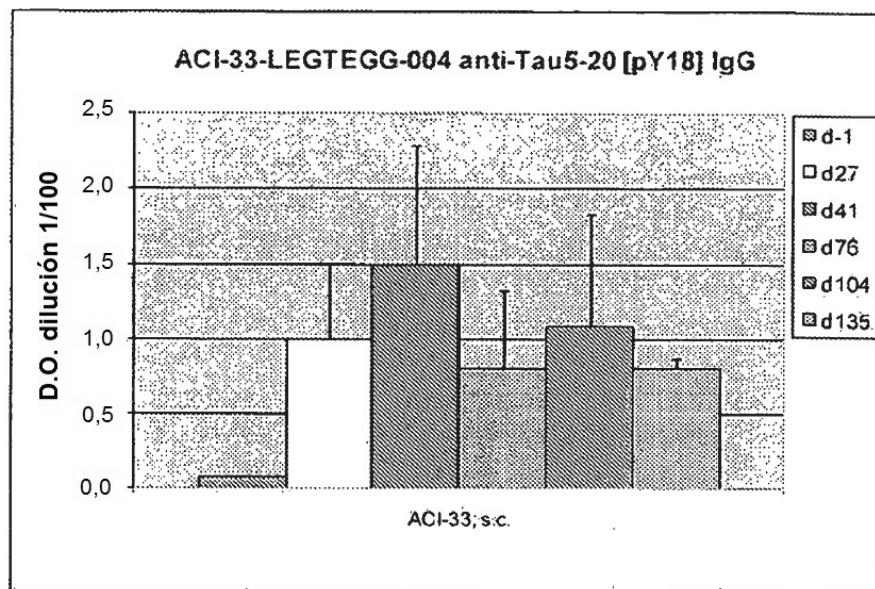


FIGURA: 19

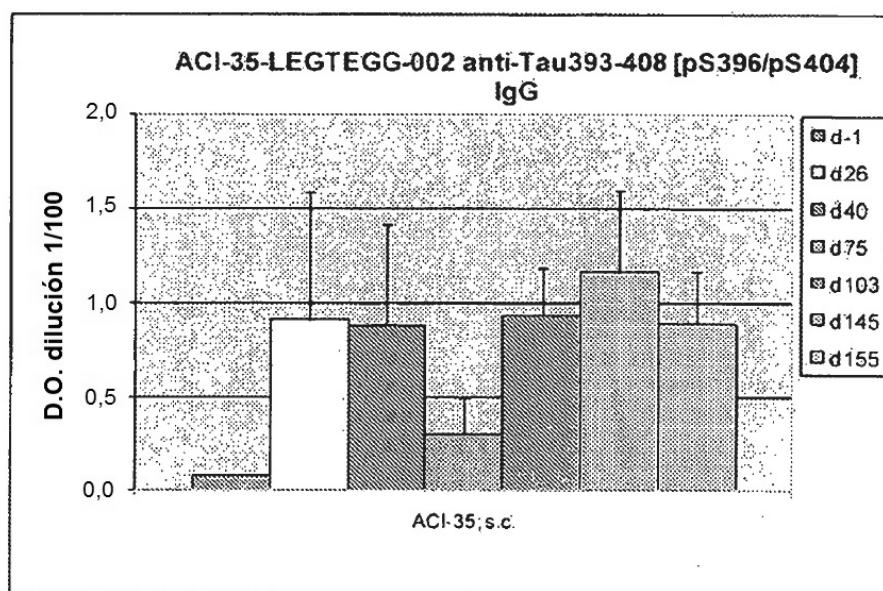


FIGURA: 20

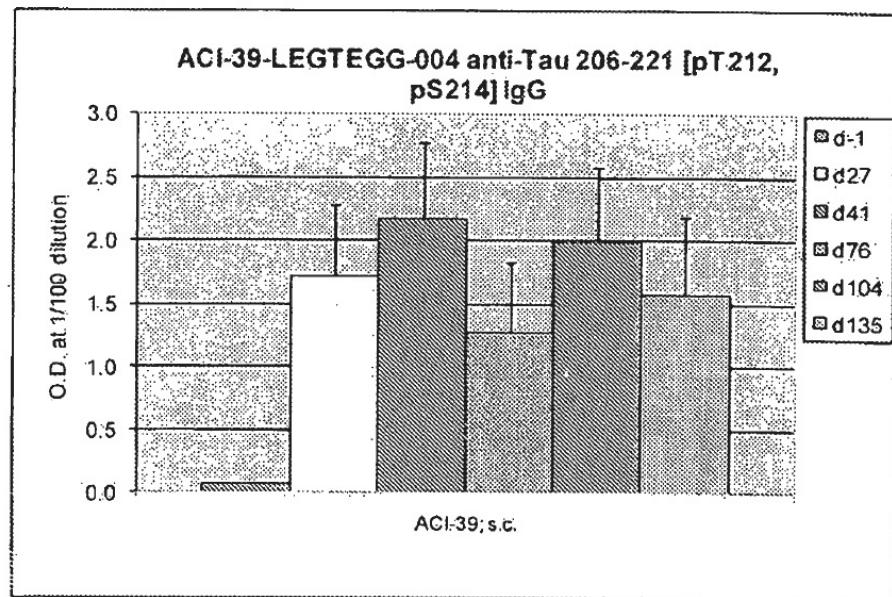


FIGURE: 21

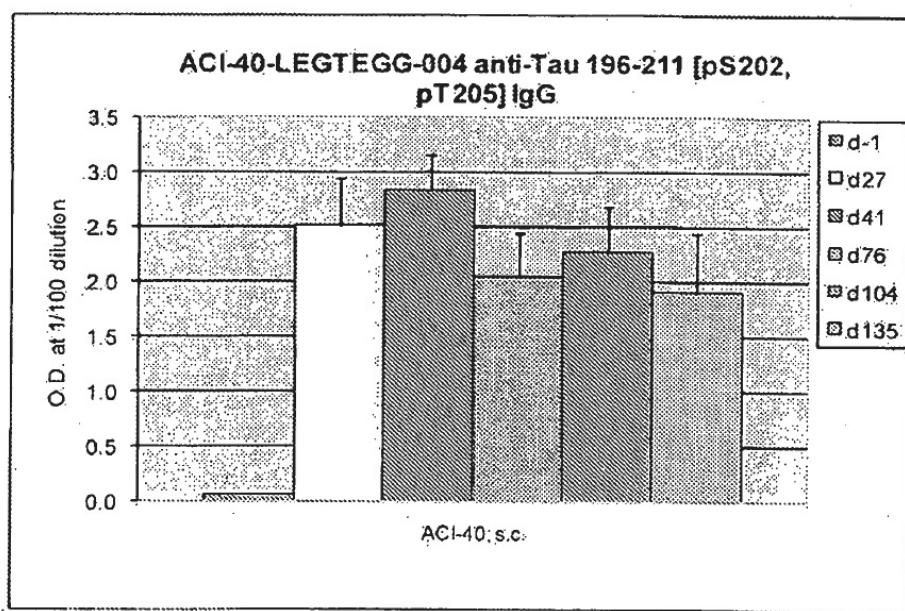


FIGURE: 22

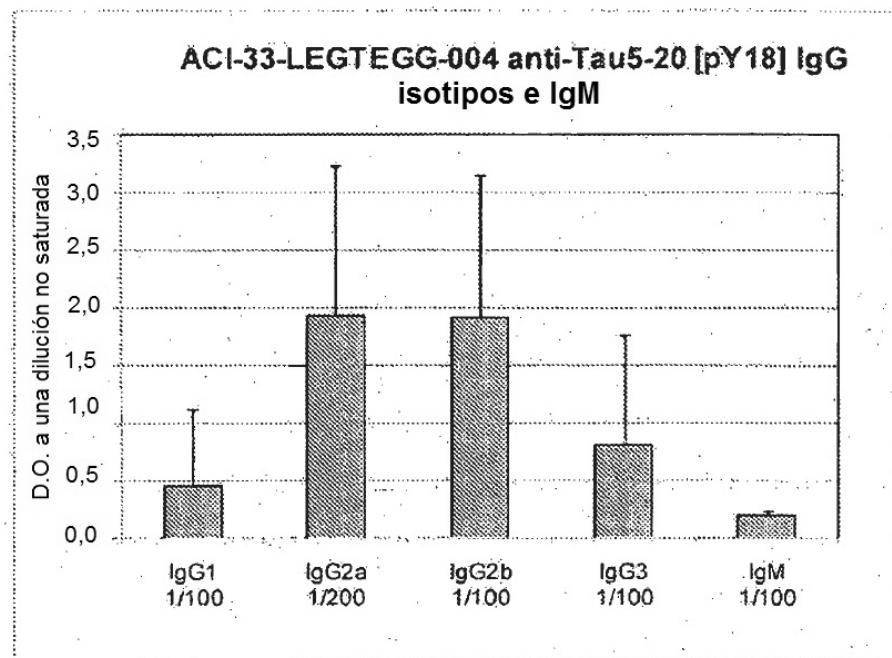


FIGURA: 23

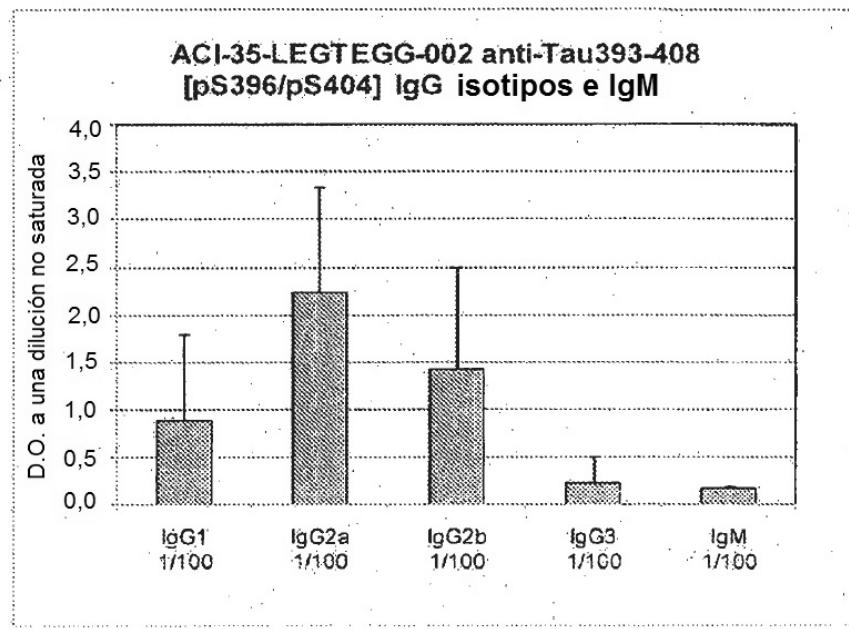


FIGURA: 24

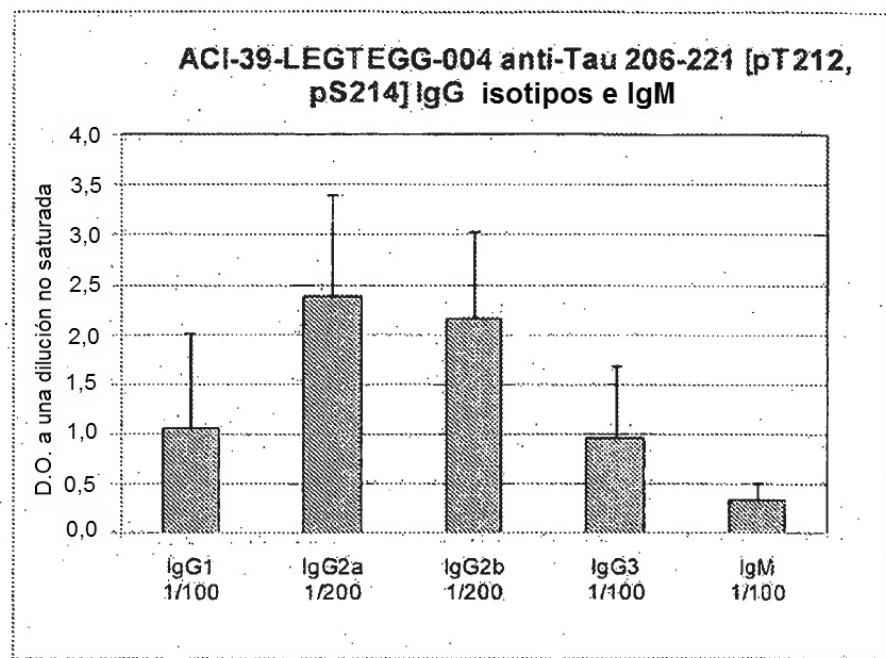


FIGURA: 25

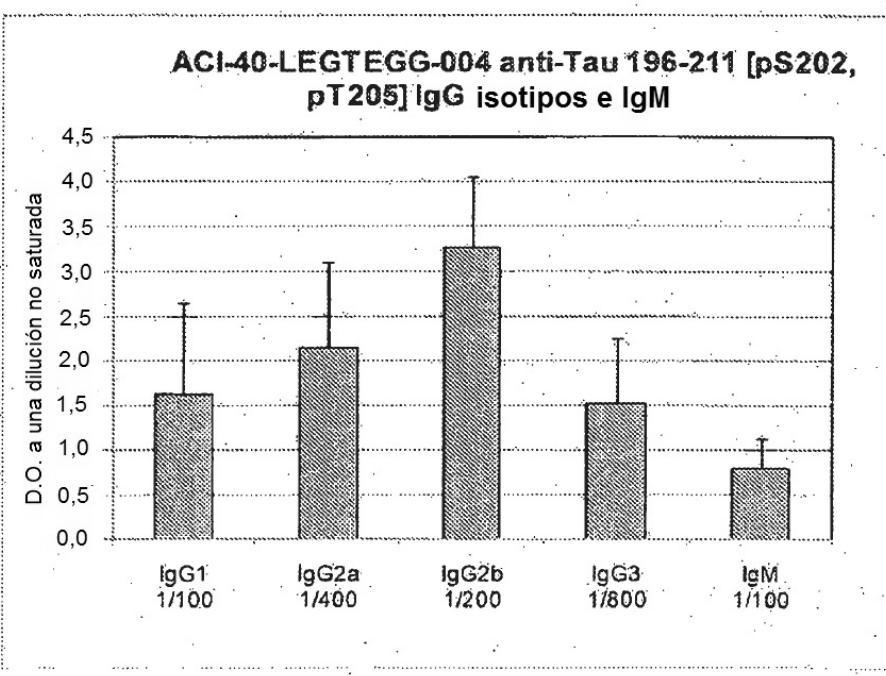
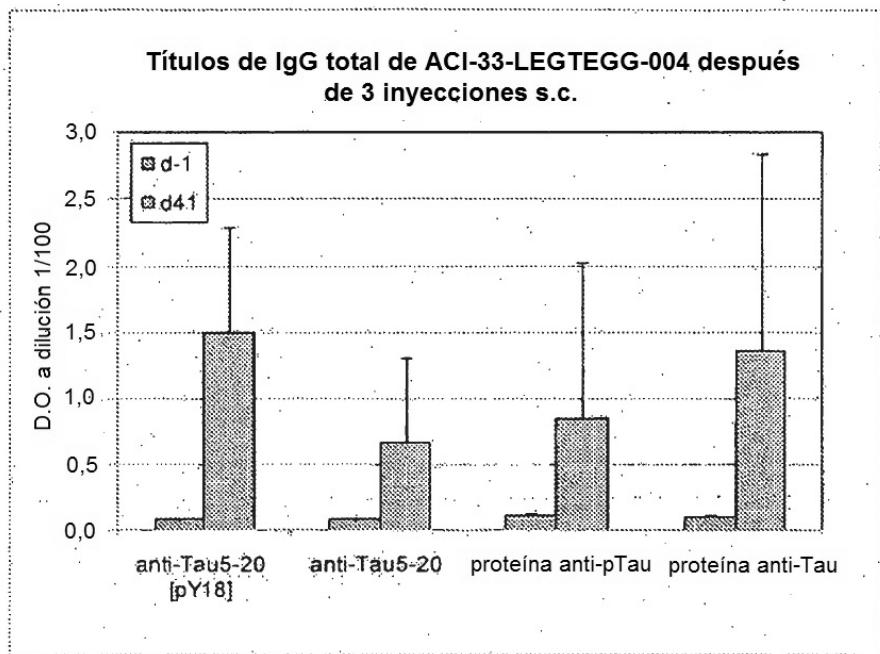
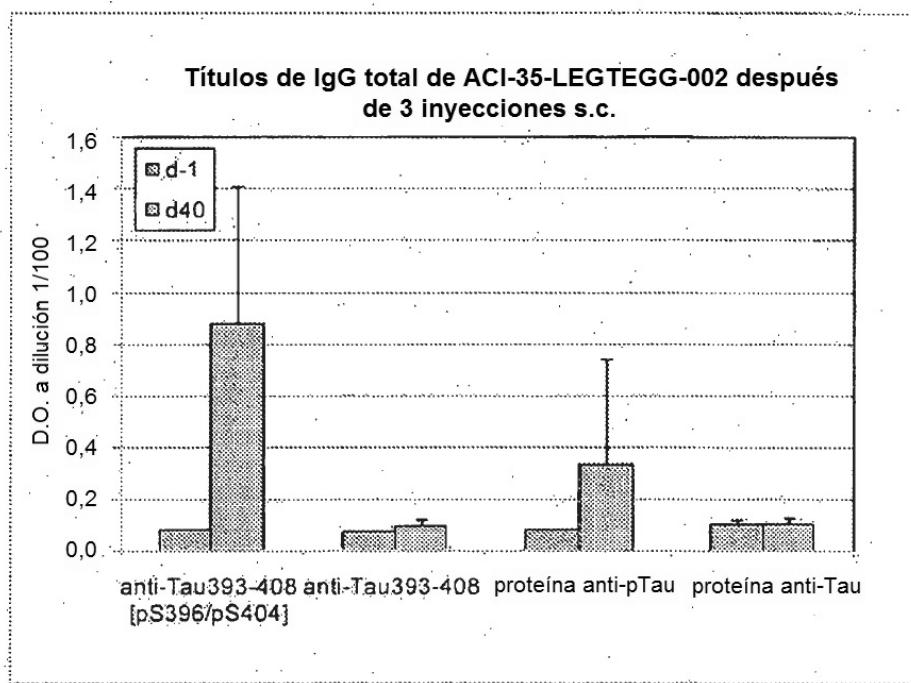
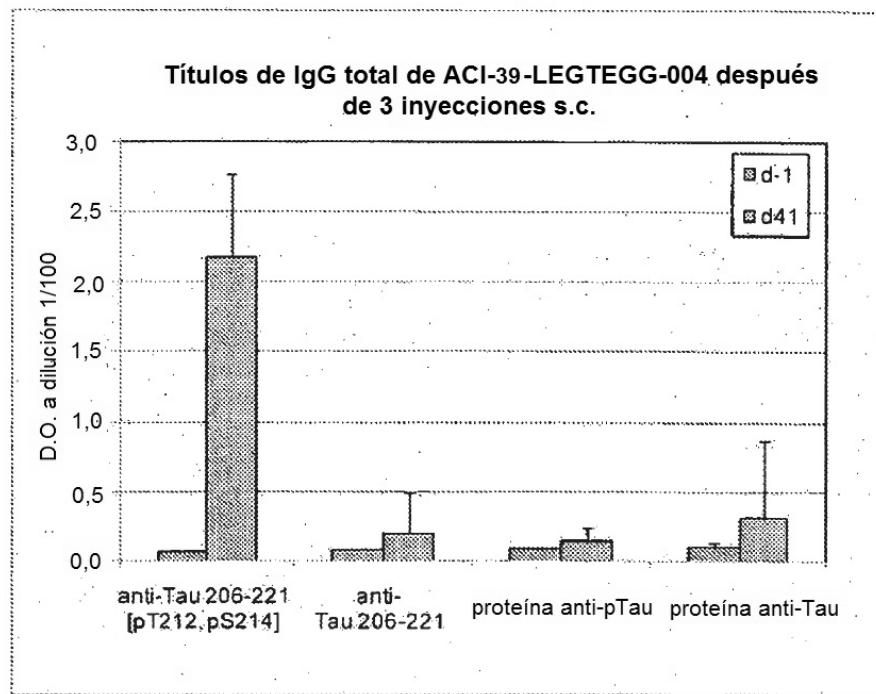
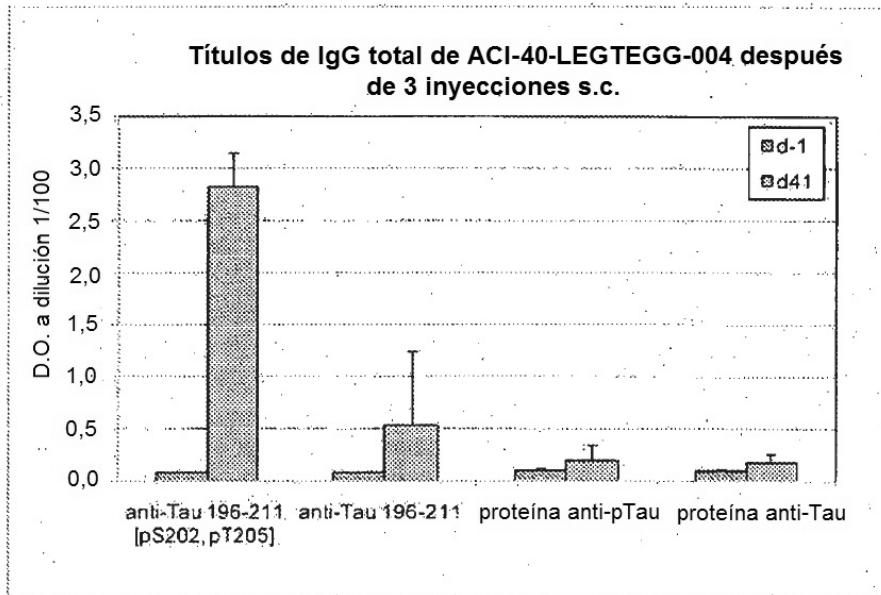


FIGURA: 26

**FIGURA: 27****FIGURA: 28**

**FIGURA: 29****FIGURA: 30**

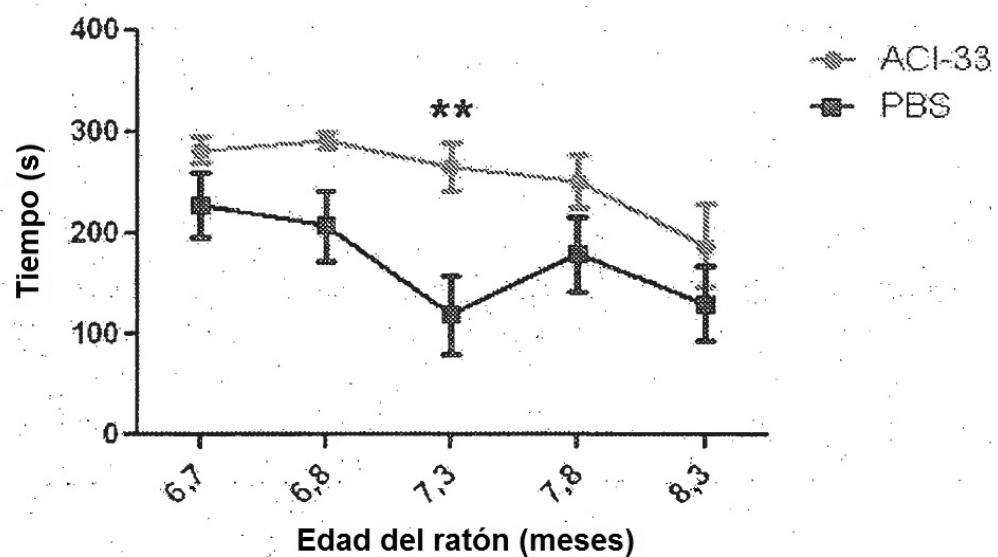


FIGURA: 31

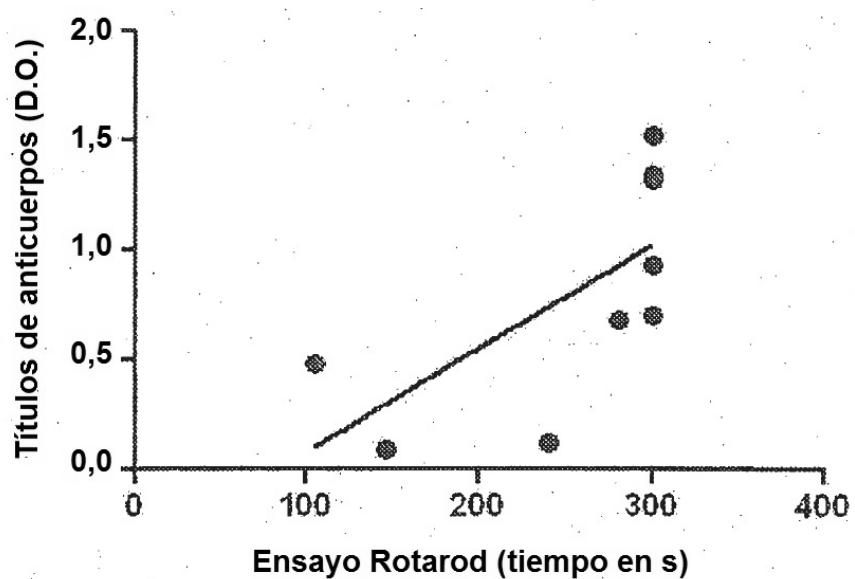


FIGURA: 32

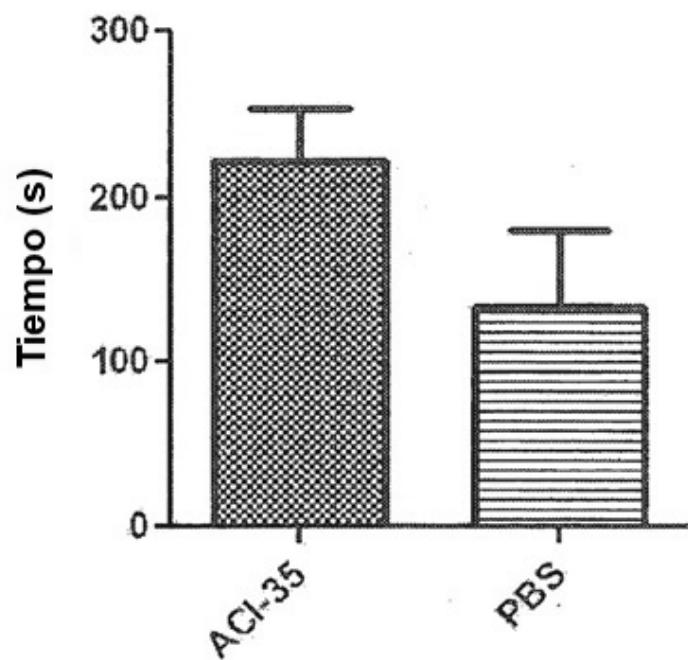


FIGURA: 33

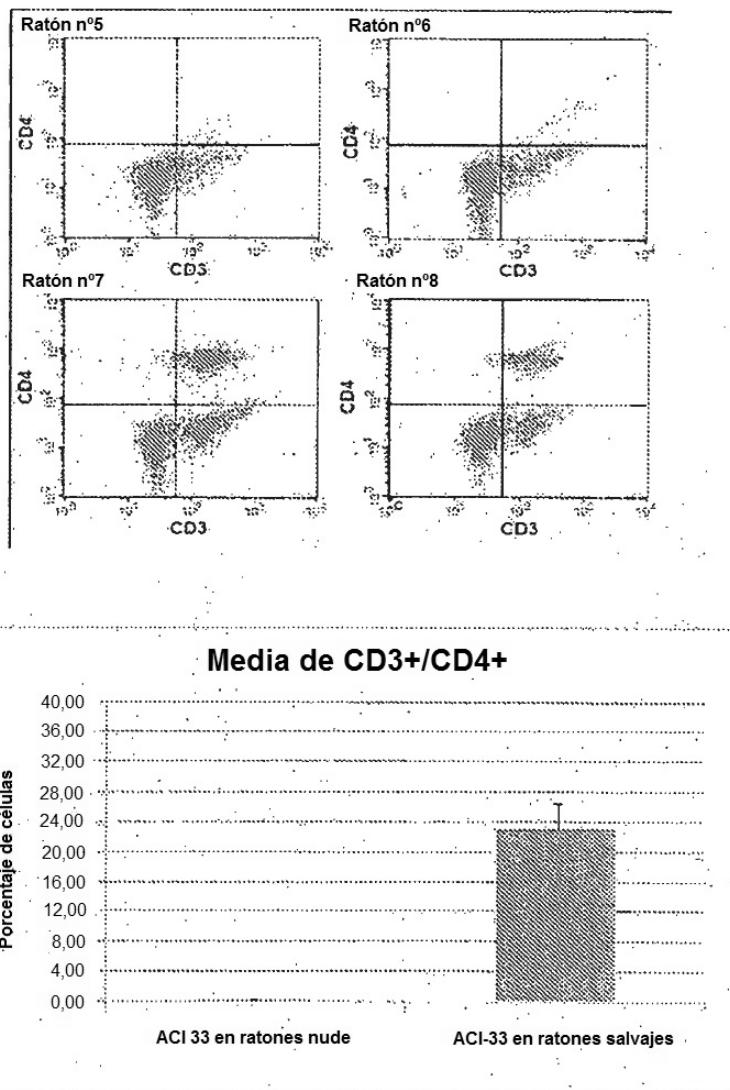


Figura 34

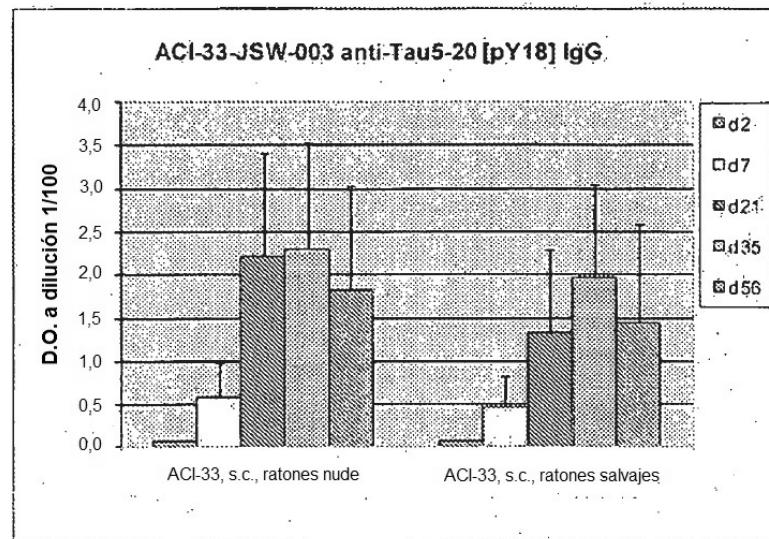


Figura 35

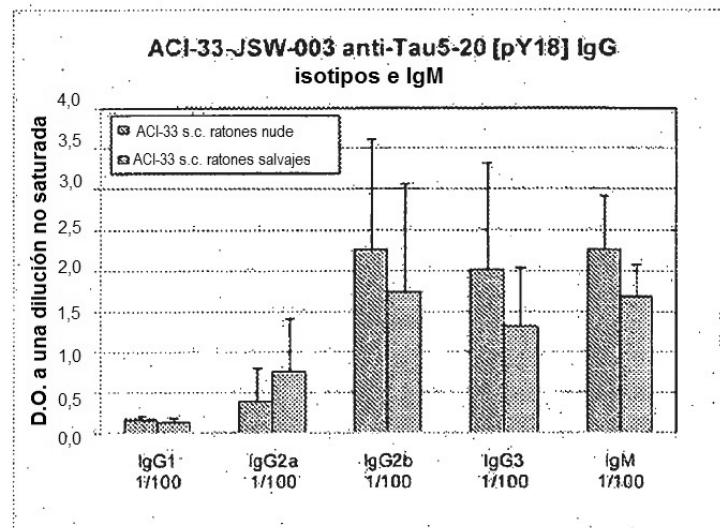


Figura 36

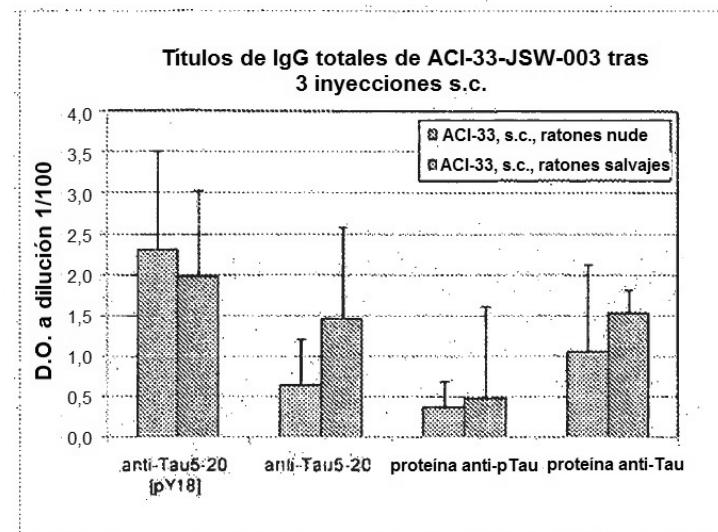


Figura 37