



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 510**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01957875 .6**

96 Fecha de presentación : **21.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1295129**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54 Título: **Diagnóstico diferencial de las enfermedades neurológicas.**

30 Prioridad: **30.06.2000 EP 00870151**
18.07.2000 US 218907 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.08.2010

73 Titular/es: **Innogenetics N.V.**
Industriepark Zwijnaarde 7, Box 4
9052 Ghent, BE

72 Inventor/es: **Vanmechelen, Eugeen;**
Vanderstichele, Hugo y
Hulstaert, Frank

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 343 510 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

Diagnóstico diferencial de las enfermedades neurológicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de las enfermedades neurológicas. La presente invención estipula un método nuevo para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer frente a otras enfermedades neurológicas. Más particularmente, la presente invención estipula un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer frente a la demencia con cuerpos de Lewy, frente a la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a la atrofia multisistémica y/o frente a la parálisis supranuclear progresiva.

Antecedentes de la invención

Se ha postulado el uso de tau y fosfo-tau como marcadores neurológicos en el diagnóstico de enfermedades neurológicas (Blennow *et al.*, 1995; Vigo-Pelfrey *et al.*, 1995; Andreasen *et al.*, 1998; Andreasen *et al.*, 1999a; Ishiguro *et al.*, 1999). La proteína tau asociada al microtúbulo es un componente proteico principal de los filamentos helicoidales apareados (FHA) y los ovillos neurofibrilares (ONF), asociados a la enfermedad de Alzheimer (Brion *et al.*, 1985; Delacourte y Defossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Wood *et al.*, 1986; Kondo *et al.*, 1988). La proteína tau existe en diferentes isoformas, de las cuales entre 4 y 6 se encuentran en el cerebro del adulto pero sólo 1 isoforma se detecta en el cerebro del feto. La diversidad de las isoformas se genera a partir de un único gen del cromosoma humano 17 por empalme alternativo del ARNm (Himmler, 1989; Goedert *et al.*, 1989; Andreadis *et al.*, 1992). La característica más sorprendente de la proteína tau, según se deduce de la clonación molecular, es un tramo de 31 ó 32 aminoácidos, que se encuentra en la parte carboxilo terminal de la molécula, que puede repetirse 3 ó 4 veces. Otra diversidad se genera a través de inserciones de 29 ó 58 aminoácidos de longitud en la parte NH₂-terminal de las moléculas tau (Goedert *et al.*, 1989). *In vivo*, tau promueve el ensamble y la estabilidad del microtúbulo en el compartimiento axonal de las neuronas mediante interacciones en las que participa su dominio de unión al microtúbulo que está ubicado en la región repetida de tau (255-381) (Lewis *et al.*, 1988). En circunstancias normales el cerebro del adulto contiene 2 a 3 moles de fosfato por mol de tau (Selden y Pollard, 1983; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). La fosforilación de diferentes sitios en la proteína tau normal según se estudió en ratas y seres humanos depende del estado de desarrollo (Lee *et al.*, 1991; Bramblett *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1993). Se detectaron variantes de tau de 60, 64 y 68 kDa que surgen como consecuencia de la fosforilación en áreas cerebrales que presentan ovillos neurofibrilares (Delacourte *et al.*, 1990; Goedert *et al.*, 1992; Flament *et al.*, 1990. Greenberg y Davies, 1990). Estos cerebros contienen de 6 a 8 moles de fosfato por mol de tau (Ksiezak-Reding *et al.*, 1992). En proteína tau aislada de FHA (tau de FHA), la fosforilación tiene lugar en varias posiciones (Iqbal *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1991; Hasegawa *et al.*, 1992; Hanger *et al.*, 1998; Buee *et al.*, 1999).

La enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia frontotemporal (DFT) son los tipos más comunes de demencia degenerativa primaria asociada a una patología tau y tienen una prevalencia de 42-75% y 8-10%, respectivamente (Brun, 1993; Gustafson, 1993; Eby *et al.*, 1994). La patología filamentosa asociada a tau es decir los ovillos neurofibrilares (ONF), se encuentra congruentemente en la EA (Tomlinson y Corsellis, 1984) pero también en la DFT (Spillantini y Goedert, 1998). Las proteínas tau patológicas se encuentran tanto en la EA como en la DFT (Vermersch *et al.*, 1995; Delacourte *et al.*, 1996). No obstante, estudios en el tejido cerebral, han sugerido que la patología tau es diferente en la EA y en la DFT, lo que está posiblemente relacionado con el grado de fosforilación (Delacourte *et al.*, 1996). Vanmechelen E. *et al.* (Neurosci. Lett. 2000, 285 (1): 49-52) encontraron que los niveles de tau fosforilada en las muestras de LCR es diferente en la EA y en la DFT. Otras formas de demencia asociadas a una patología tau incluyen la DFT familiar, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (DCB) y la panencefalitis esclerosante subaguda. En la actualidad no se comprende muy bien el papel de la hiperfosforilación en la patología de estas tauopatías.

La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es una enfermedad que se presenta con demencia progresiva o psicosis. Los signos de parkinsonismo, que pueden estar ausentes o son leves al comienzo, finalmente se vuelven comunes y la rigidez es generalmente severa. Los cuerpos de Lewy se encuentran profusamente en el tallo encefálico, el prosencéfalo basal, los núcleos hipotalámicos y la neocorteza. La demencia con cuerpos de Lewy se caracteriza por la ausencia relativa de ovillos y tau hiperfosforilada en el cerebro. La enfermedad de Parkinson (EP) es un tipo de enfermedad con cuerpos de Lewy que se presenta hacia la mitad de la vida o al final, que progresa muy gradualmente y tiene un curso prolongado. Se puede considerar como un ejemplo de enfermedad neuronal sistémica, que involucra principalmente al sistema nigroestriatal y dopaminérgico. La demencia con cuerpos de Lewy fue definida recientemente como una forma especial de demencia que requiere el manejo diferencial del paciente (Lebert *et al.*, 1998; McKeith *et al.*, 1999). La demencia con cuerpos de Lewy, que es sensible a los neurolepticos, es clínicamente muy difícil de diferenciar de la enfermedad de Alzheimer (McKeith *et al.*, 1996; Ballard *et al.*, 1998). La mayoría de los pacientes (más del 75%) son definidos neuropatológicamente como pacientes con enfermedad de Alzheimer si bien se estima que 15 a 25% de los pacientes con diagnóstico clínico de enfermedad de Alzheimer tienen demencia con cuerpos de Lewy (Hooten *et al.*, 1998). Como la demencia con cuerpos de Lewy es más sensible al tratamiento con acetilcolinesterasa, la diferenciación de la demencia con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer es esencial para la optimización del tratamiento (Levy *et al.*, 1994; Perry *et al.*, 1994; Wilcock *et al.*, 1994).

ES 2 343 510 T3

El péptido β -amiloide en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y tau en LCR fueron validados para diferenciar la enfermedad de Alzheimer del envejecimiento normal, la depresión y la enfermedad de Parkinson (Galasko *et al.*, 1998; Kanai *et al.*, 1998; Hulstaert *et al.*, 1999) y estos marcadores están bien posicionados para el diagnóstico diferencial de esos trastornos (Andreasen *et al.*, 1999b). Más controversial, sin embargo, es su papel en la diferenciación de la enfermedad de Alzheimer de afecciones estrechamente relacionadas como la demencia con cuerpos de Lewy y de otras demencia asociadas con patologías tau como la demencia frontotemporal, la atrofia multisistémica (AMS) y/o la parálisis supranuclear progresiva. En la actualidad, no existen métodos exactos para el diagnóstico diferencial de estas enfermedades neurológicas.

10 **Objetivos de la invención**

Es un objetivo de la presente invención estipular un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy.

15 Es un objetivo de la presente invención estipular un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia.

Es un objetivo de la presente invención estipular un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica.

20 Es un objetivo de la presente invención estipular un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva. Es un objetivo de la presente invención estipular el uso de un anticuerpo que reconozca específicamente a fosfo-tau para el diagnóstico diferencial, *in vitro*, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica y/o frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tablas

Tabla 1: Datos demográficos y resultados de LCR por diferentes grupos diagnósticos

Grupo	Sujetos, n (M/F)	Edad, Y, mediana, (intervalo)	MMSE		AB42, pM, mediana (p25-p75)	Tau, pM, mediana (p25-p75)	Ptau (181), pM, mediana (p25-p75)
			n	Mediana (p25-p75)			
EA	80 (35/45)	72 (53-86)	78	22 (14-24)	69.2 (47.1-96.0) *	13.2 (9.4-17.0) *	14.7 (11.6-19.1) *
Controles	40 (20/20)	70 (56-84)	20	30 (29-30)	99.3 (75.5- 145.3) \$	3.0 (2.1-4.0) \$	7.8 (6.4-8.9) \$
DFT	69 (42/27)	67 (40-94)	61	22 (16-25)	90.3 (67.0- 132.5) \$	7.5 (5.2- 10.8) £, \$	9.4 (8.2-12.3) £, \$
DCL	43 (35/8)	72 (61-87)	37	19 (14-24)	72.2 (53-103) £	5.7 (1.6-9.0) \$	8.1 (6.1-10.0) \$
EP	15 (8/7)	70 (51-79)	1	23	72.3 (58.1-99.1)	4.2 (2.2-7.6) \$	7.4 (6.9-8.8) \$
AMS	16 (11/5)	64 (42-77)	3	20 (20-22)	91.5	5.3	7.6

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Grupo	Sujetos, n (M/F)	Edad, Y, mediana, (intervalo)	MMSE		Aβ42, pM, mediana (p25-p75)	Tau, pM, mediana (p25-p75)	Ptau (181), pM, mediana (p25-p75)
			n	Mediana (p25-p75)			
PSP	15 (11/4)	67 (64-76)	4	26 (21-27)	(41.9-113.4)	(3.8-8.3)§	(6.2-10.9)§
DCB	5 (0/5)	70 (57-75)	4	13 (12-15)	(82.2-101.1)	(2.0-4.5)§	(6.1-7.5)§

EA = enfermedad de Alzheimer, DFT = demencia frontotemporal, DCL = demencia con cuerpos de Lewy, EP = enfermedad de Parkinson,
AMS = atrofia multististémica, PSP = parálisis supranuclear progresiva, DCB = degeneración corticobasal

***Significativamente diferente de los controles (p<0.001)**
£Significativamente diferente de los controles (p<0.05)
§ Significativamente diferente de la EA (p<0.001)

ES 2 343 510 T3

TABLA 2

Comparación del poder diferenciador de tau en LCR y fosfo-tau en LCR usando análisis ROC

Grupos	Tau en LCR (AUC ± SE)	Fosfo-tau en LCR (AUC ± SE)	valor p
EA vs. controles (n = 40)	0.862 ± 0.038	0.897 ± 0.032	0.191
EA vs. DFT (n = 69)	0.711 ± 0.045	0.754 ± 0.044	0.049
EA vs. DCL (n = 43)	0.782 ± 0.048	0.839 ± 0.042	0.039
EA vs. afecciones relacionadas con Parkinson (n = 46)	0.873 ± 0.035	0.864 ± 0.037	0.319

Análisis de la curva de la característica operativa del receptor (ROC) con el área bajo la curva (AUC) y el error estándar (SE) calculados de acuerdo con Hanley y McNeil. EA = enfermedad de Alzheimer, DFT = demencia frontotemporal, DCL = demencia con cuerpos de Lewy, afecciones relacionadas con la enfermedad de Parkinson incluida la enfermedad de Parkinson sin demencia (n=15), atrofia multisistémica (n=16) y parálisis supranuclear progresiva (n=15).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer (EA) frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica y/o un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva, caracterizado porque se usa fosfo-tau en LCR como marcador neurológico. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método como el descrito antes, que comprende los pasos de:

- determinación del nivel de fosfo-tau en dicho individuo;
- deducción de que dicho individuo está sufriendo una enfermedad neurológica diferente de la enfermedad de Alzheimer por comparación del nivel obtenido de fosfo-tau en dicho individuo con el nivel de fosfo-tau en individuos que sufren la enfermedad de Alzheimer, por medio de la cual un menor nivel de fosfo-tau es una indicación de que dicho individuo sufre una enfermedad neurológica diferente de la enfermedad de Alzheimer.

“El diagnóstico diferencial de un individuo que sufre una enfermedad neurológica frente a un individuo que sufre otra enfermedad neurológica” se refiere a la diferenciación entre dicha primera enfermedad y otras enfermedades neurológicas en el sentido de que una determinada enfermedad neurológica o cierta causa de trastorno neurológico en un individuo se asocia a una determinada afección neurodegenerativa de dicho individuo. El método de la presente invención permite el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy (DCL), frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson (EP) sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica (AMS), frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva (PSP). La enfermedad de Alzheimer, la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson sin demencia, la atrofia multisistémica y la parálisis supranuclear progresiva al igual que otras enfermedades neurológicas fueron descritas en detalle por Wilson *et al.* (1991) y McKeith *et al.* (1999).

La presente invención se basa en el hallazgo de que el nivel de fosfo-tau en el LCR de individuos que sufren demencia con cuerpos de Lewy, EP sin demencia, AMS o PSP es significativamente menor en comparación con el nivel de fosfo-tau en el LCR de individuos que sufren la enfermedad de Alzheimer. La indicación de que el nivel de fosfo-tau difiere entre dichas enfermedades neurológicas, establece la base para el desarrollo de una prueba diagnóstica para el diagnóstico diferencial de dichas enfermedades neurológicas en un individuo. En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica y/o frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva, donde dicho método se caracteriza porque se usa fosfo-tau en el LCR como un marcador neurológico.

El método de la invención comprende por lo tanto el paso de determinación del nivel de fosfo-tau en una muestra de LCR de dicho individuo que se sospecha que sufre EA, DCB, EP sin demencia, AMS o PSP y de comparación con un rango previamente definido de niveles de fosfo-tau característico para EA, DCB, EP sin demencia, AMS o PSP. Un nivel de fosfo-tau que se encuentre dentro del rango de niveles de fosfo-tau previamente definido para la enfermedad de Alzheimer es una indicación de que dicho individuo sufre la enfermedad de Alzheimer. Un nivel de fosfo-tau que se encuentre dentro del rango de niveles de fosfo-tau previamente definido para la DCL es una indicación de que dicho individuo sufre demencia con cuerpos de Lewy. Un nivel de fosfo-tau que se encuentre dentro del rango de niveles de fosfo-tau previamente definido para la EP sin demencia es una indicación de que dicho individuo sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia. Un nivel de fosfo-tau que se encuentre dentro del rango de niveles de fosfo-tau previamente definido para la AMS es una indicación de que dicho individuo sufre atrofia multisistémica. Un nivel de fosfo-tau que se encuentre dentro del rango de niveles de fosfo-tau previamente definido para la PSP es una indicación de que dicho individuo sufre parálisis supranuclear progresiva.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica y/o frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva, que comprende los pasos de:

- determinación del nivel de fosfo-tau en una muestra de LCR obtenida de dicho individuo; deducción de que dicho individuo sufre DCL, EP sin demencia, AMS y/o PSP por comparación del nivel obtenido de fosfo-tau en dicho individuo con el nivel de fosfo-tau en un individuo que sufre la EA, por medio de la cual un menor nivel de fosfo-tau es una indicación de que dicho individuo sufre DCL, EP sin demencia, AMS y/o PSP.

El nivel de fosfo-tau se detecta *in vitro*. El método para la detección *in vitro* del nivel de fosfo-tau en un individuo comprende los pasos de obtención de una muestra de LCR de dicho individuo, determinación del nivel de fosfo-tau en dicha muestra y comparación de éste con un rango previamente definido de niveles de fosfo-tau para dicha enfermedad neurológica.

En la presente invención el nivel de fosfo-tau se determina en una muestra de líquido cefalorraquídeo extraída del paciente. Consecuentemente, la presente invención se refiere a un método como el descrito antes, que comprende los pasos de:

- obtención de una muestra de líquido cefalorraquídeo de dicho individuo;
- determinación del nivel de fosfo-tau en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo;
- deducción de que dicho individuo sufre una enfermedad neurológica distinta de la EA como DCL, EP sin demencia, AMS y/o PSP por comparación del nivel obtenido de fosfo-tau en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo con el nivel de fosfo-tau en una muestra de líquido cefalorraquídeo de individuos que sufren la EA, por medio de la cual un nivel menor de fosfo-tau es una indicación de que dicho individuo sufre otra enfermedad neurológica como DCL, EP sin demencia, AMS y/o PSP.

ES 2 343 510 T3

El nivel de fosfo-tau medido en el LCR de un individuo que se sospecha que sufre DCL, EP sin demencia, AMS y/o PSP se compara con el nivel de fosfo-tau en el LCR de un individuo que sufre la EA. Un menor nivel de fosfo-tau en el LCR se interpreta como una indicación de que el individuo sufre DCL, EP sin demencia, AMS y/o PSP.

5 Fosfo-tau incluye todas las formas de tau que tienen una fosforilación en cualquier posición de la secuencia de la proteína tau, pero más específicamente se refiere a las fosforilaciones en las posiciones de los aminoácidos que no están fosforilados en la tau humana normal, aislada de individuos adultos que no sufren ningún trastorno neurológico.

10 “Un menor nivel de fosfo-tau” significa que el nivel de fosfo-tau medido en el pacientes es menor que el nivel de fosfo-tau medido en pacientes que sufren la EA. Fosfo-tau se puede cuantificar por cualquier método conocido en el área, incluido, pero no exclusivamente, el uso de anticuerpos. En una realización preferida, fosfo-tau se cuantifica mediante un inmunoensayo que comprende al menos los pasos siguientes:

- 15 - obtener una muestra de LCR del paciente;
- poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente a fosfo-tau, en condiciones adecuadas para producir un complejo antígeno-anticuerpo;
- 20 - detectar la unión inmunológica de dicho anticuerpo con dicha muestra.

En otra realización, fosfo-tau se puede cuantificar mediante un inmunoensayo ELISA tipo sándwich que comprende los pasos siguientes:

- 25 - obtener una muestra de LCR del paciente;
- poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo (anticuerpo primario o anticuerpo de captura) que reconozca a fosfo-tau, en condiciones adecuadas para producir un complejo antígeno-anticuerpo;
- 30 - poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal (anticuerpo secundario o anticuerpo detector) que reconozca específicamente a fosfo-tau, en condiciones adecuadas para producir un complejo antígeno-anticuerpo;
- 35 - poner en contacto el complejo antígeno-anticuerpo con un marcador para etiquetado específico o acoplamiento con dicho anticuerpo secundario, donde dicho marcador puede ser cualquier marcador posible conocido por los técnicos con experiencia en el tema;
- 40 - posiblemente además, a los efectos de estandarización, poner en contacto los anticuerpos con una proteína fosfo-tau purificada o un fosfo-péptido que reaccione con ambos anticuerpos.

De manera ventajosa, el anticuerpo secundario tiene él mismo un marcador o un grupo para el acoplamiento directo o indirecto con un marcador.

45 Las expresiones “que reconozca”, “que reaccione con”, “unión inmunológica” o “producir un complejo antígeno-anticuerpo” como se usan en la presente invención se deben interpretar en el sentido de que la unión entre el antígeno y el anticuerpo se produce en todas las condiciones que respeten las propiedades inmunológicas del anticuerpo y el antígeno.

50 La expresión “que reconozca específicamente” como se usa en la presente invención se debe interpretar en el sentido de que dicho anticuerpo es capaz de formar un complejo inmunológico con fosfo-tau pero no con la tau humana normal.

55 Cualquier anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente a fosfo-tau se puede usar en dicho método para la cuantificación de fosfo-tau. Los anticuerpos monoclonales para usar en la cuantificación de fosfo-tau incluyen AT8 (WO 93/08302), AT180 y AT270 (WO 95/17429) y AT100 (WO 96/04309). También se pueden usar otros anticuerpos conocidos en el área que reconozcan específicamente a fosfo-tau.

60 Asimismo se pueden usar en un método de la presente invención fragmentos derivados de esos anticuerpos monoclonales como Fab, F(ab)₂, ssFv (“fragmento variable de una sola cadena”) y otros constructos semejantes a anticuerpos que retengan la región variable del anticuerpo, siempre que hayan retenido las propiedades de unión originales. Dichos fragmentos se generan habitualmente mediante, por ejemplo, digestión enzimática de los anticuerpos con papaína, pepsina u otras proteasas. Es bien sabido por los técnicos con experiencia en el tema que los anticuerpos monoclonales, o sus fragmentos, se pueden modificar para diversos usos. También se pueden usar en un método de 65 la invención minianticuerpos y anticuerpos multivalentes como diacuerpos, triacuerpos, anticuerpos tetravalentes y peptacuerpos. La preparación y el uso de estos fragmentos y anticuerpo multivalentes fueron descritos extensamente en la solicitud de patente internacional WO 98/29442.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en un método de la invención pueden ser versiones humanizadas de los anticuerpos monoclonales de ratón preparados mediante tecnología de recombinación del ADN, partiendo de secuencias de ADN genómico de ratón y/o humanas que codifican las cadenas H y L o de clones de ADNc que codifican las cadenas H y L. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales utilizados en un método de la invención pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. La expresión “anticuerpo humanizado” significa que al menos una porción de las regiones de armazón de una inmunoglobulina deriva de secuencias de la inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos utilizados en un método de la presente invención se pueden marcar mediante un marcado apropiado del tipo enzimático, fluorescente o radiactivo.

La presente invención se refiere por lo tanto al uso de fosfo-tau como un marcador neurológico para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la EA frente a un individuo que sufre DCL, frente a un individuo que sufre la EP sin demencia, frente a un individuo que sufre AMS y/o frente a un individuo que sufre PSP.

La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfo-tau para el diagnóstico diferencial en LCR de un individuo que sufre la EA frente a un individuo que sufre DCL, frente a un individuo que sufre la EP sin demencia, frente a un individuo que sufre AMS y/o frente a un individuo que sufre PSP.

En toda esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera algo diferente, la palabra “comprenden” y las variaciones como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero o paso establecido o grupo de números enteros o pasos establecidos pero que no excluye ningún otro número entero ni paso o grupo de números enteros o pasos.

La presente invención se ilustrará a continuación por referencia a los ejemplos siguientes que exponen realizaciones particularmente ventajosas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos ejemplos son ilustrativos y no pueden interpretarse en modo alguno como restrictivos de la invención.

Ejemplos

Sujetos y métodos

Se contactaron 14 centros universitarios involucrados en la investigación de LCR para participar en un estudio multicéntrico. A cada centro se le solicitó que incluyera 500 μ l de LCR de exactamente 10 pacientes con EA (McKhann *et al.*, 1984) y un mínimo de 6 muestras de pacientes con DCL (McKeith *et al.*, 1996) o DFT (Anonymous, 1994). Ocho centros cumplieron estas condiciones. Cuando hubo disponible LCR de pacientes con PSP (Golbe *et al.*, 1993), DCB (Rinne *et al.*, 1994) y atrofia multisistémica (AMS) (Colosimo *et al.*, 1995) también se incluyó en este estudio. Se incluyeron testigos coincidentes en edad, sin problemas neurológicos ni cognitivos ni enfermedad de Parkinson (EP) sin demencia (langston *et al.*, 1992), cuando hubo 10 muestras disponibles por centro.

El estudio se llevó a cabo en muestras de LCR para investigación siempre que el protocolo requerido hubiera sido revisado y aprobado por el Comité de ética independiente/Comité institucional de revisión (IEC/IRB) antes de comenzar el estudio.

Las muestras se recogieron en tubos de polipropileno usando punción lumbar. Debido a que se había demostrado que la congelación-descongelación afectaba seriamente los niveles de β -amiloide₄₂ (A β 42) (Andreasen *et al.*, 1999b; Vanderstichele *et al.*, 1998) se documentó la cantidad de ciclos de congelación-descongelación. Las muestras de LCR que contenían > 500 glóbulos rojos por microlitro no fueron incluidas.

Todas las determinaciones se realizaron en Innogenetics (Gent, Bélgica) usando juegos de reactivos estándar para A β 42 en LCR (K-1080, Innogenetics) (Andreasen *et al.*, 1999b; Vanderstichele *et al.*, 1998), hTau (K-1032, Innogenetics) (Vandermeeren *et al.*, 1993; Blennow *et al.*, 1995; Van de Voorde *et al.*, 1995) y una versión para investigación del FOSFO-TAU INNOTEST. El juego de fosfo-tau se desarrolla usando un anticuerpo específico para humanos, HT7, para captura y un anticuerpo específico para fosfo-treonina-181, AT270, para detección (Goedert *et al.*, 1994). Como péptido sintético estándar se usó (Ac-P₁₅₄RGAAAPPGQKQANATRIPAKTPPAPKT(p)PPSSGE₁₈₇-NH₂) con la correspondiente treonina 181 fosforilada. La fiabilidad y el comportamiento de fosfo-tau se controlaron usando una mezcla de 5 muestras de LCR que cubrían el rango de rendimiento del ensayo.

Métodos estadísticos

La distribución normal de tau en LCR, A β 42 y fosfo-tau se analizaron usando la prueba de Shapiro-Wilk y cuando la hipótesis de normalidad fue rechazada, se usaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) para comparar. Para comparaciones con la EA o el grupo de control, se ajustaron los valores p usando la prueba de comparación múltiple de Dunn. Se usó el análisis de la curva de la característica operativa del receptor (ROC) para examinar el poder diferenciador de tau y fosfo-tau entre la EA y los controles, DBL, DFT o afecciones relacionadas con Parkinson, respectivamente (Hanley y McNeil, 1983). Las posibles correlaciones se determinaron con el coeficiente de correlación de Spearman.

ES 2 343 510 T3

Niveles de fosfo-tau en LCR en los diferentes grupos de enfermedades neurológicas

En términos generales se obtuvieron 294 muestras de LCR de los 8 centros. El transporte de las muestras de LCR desde uno de los centros tomó más de 5 días y las muestras se descongelaron durante el transporte. Por consiguiente, se volvieron a despachar nuevas alícuotas de estas muestras de LCR, aparte de una muestra de LCR (DFT). Cinco muestras del centro 2 (5 DFT) y 5 del centro 8 (5 EP) no se analizaron porque la cantidad de LCR que se había despachado no era suficiente para realizar todas las pruebas. En resumen, se analizaron 283 muestras de LCR de los diferentes grupos diagnósticos (40 controles, 80 EA, 43 DCL, 69 DFT, 15 EP, 15 PSP, 16 AMS y 5 DCB) para determinar al menos uno de los marcadores bioquímicos (consulte la Tabla 1). Las muestras de LCR se obtuvieron entre 1985 y 1999. El porcentaje de hombres en el grupo de pacientes con DCL es alto, como se esperaba.

Los niveles de fosfo-tau y sus intervalos de confianza se determinaron en cinco muestras de CC que se usaron para controlar el comportamiento de las pruebas de fosfo-tau. Los valores para todas las muestras de CC cayeron dentro de los criterios establecidos (no se muestran los resultados).

Se observaron efectos por centro para A β 42 y tau, pero no para fosfo-tau en los grupos de EA. Se observó un efecto de congelación-descongelación ($p < 0.0001$) para A β 42, pero no para tau ni fosfo-tau y fue particularmente pronunciado en los grupos de EA y DCL. El efecto se confirmó además en el análisis de LCR del centro 03. Esas muestras fueron analizadas previamente en el centro para determinar tanto tau como A β 42 y se reanalizaron en Innogenetics (Gent, Bélgica) después de dos ciclos de congelación-descongelación. Se observó una reducción general de 20% de A β 42 en LCR en 8 de las 10 muestras de control.

No se observó ningún efecto por la edad en los diferentes marcadores en ninguno de los grupos diagnósticos. No se encontró una correlación significativa entre un biomarcador y el MMSE (mini examen del estado mental) en el grupo de hombres o mujeres con EA o el grupo total de EA, excepto para tau y MMSE en el grupo total (Spearman, $r = -0.275$ [-0.491, -0.059], $p = .01$). El genotipo ApoE no se correlacionó con los niveles de tau en LCR ni de fosfo-tau en LCR, en tanto que se observó una correlación significativa para A β 42 en LCR (Spearman, $r = -0.263$ [-0.434, -0.093], $p = 0.003$).

Se rechazó la hipótesis de normalidad para A β 42, tau y fosfo-tau en todos los grupos y por lo tanto se realizaron análisis usando pruebas no paramétricas (Tabla 1). Se observaron aumentos significativos de los niveles de tau en LCR en el grupo de la EA ($p < 0.001$) y DFT ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de control. Aunque los niveles de tau en LCR aumentaron en la DFT, los niveles fueron significativamente mayores en el grupo de la EA ($p < 0.01$). Usando PSP como grupo de referencia, además de EA y DFT, la DCB tuvo niveles de tau en LCR significativamente mayores ($p < 0.05$). Para fosfo-tau se observó un patrón similar cuando se usaron la EA y los controles para comparar. Sólo se observaron niveles significativamente menores de A β 42 la EA ($p < 0.001$) y el grupo de DCL ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de control, y la comparación de los niveles de A β 42 de todos los grupos con el grupo de la EA muestra una diferencia claramente significativa entre la EA y la DFT ($p < 0.001$). Puesto que en todas las afecciones relacionadas con la enfermedad de Parkinson, excepto la DCB, los niveles medios de los biomarcadores estuvieron dentro del rango normal, estos grupos fueron tratados como un único grupo en el análisis posterior.

La fuerte correlación entre tau y fosfo-tau para todos los pacientes, independiente del grupo de diagnóstico ($y = 0.75x + 4.6$, $r = -0.904$, $p < 0.001$) sugiere que la diferenciación obtenida con tau entre la EA y otros grupos, también se puede obtener con fosfo-tau. Usando el análisis ROC, se comparó el poder diferenciador de tau total con el de fosfo-tau. Se observó una diferencia significativa entre tau y fosfo-tau para distinguir la EA frente a la DFT y la EA frente a la DCL, en tanto no se observó diferencia para la EA en comparación con los controles o con las afecciones relacionadas con Parkinson (Tabla 2). Puesto que hay una mayor representación de hombres en el grupo de DCL, el análisis de ROC también se llevó a cabo para hombres con EA frente a hombres con DCL con un AUC de 0.800 ± 0.057 , comparable a la de las mujeres y los hombres juntos.

Usando la línea de diferenciación establecida previamente, que combina tau en LCR y β -amiloide₄₂ en LCR ($A\beta_{42} = 240 + 1.18 \text{ tau}$) (Hulstaert *et al.*, 1999), la sensibilidad (98% (IC 91-99%)) y la especificidad para la población de control (73% (CI 56-85%)) fueron comparables a las de los estudios previos. La especificidad de esta línea de diferenciación para DFT es 77% (IC 66-85%), para DCL 67% (IC 52-80%) y para las afecciones relacionadas con Parkinson 68% (IC 50-81%).

Bibliografía

Andreadis A., Brown W., Kosik K. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochem.* 31: 10626-10633.

Andreasen N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen S., R ih a I., Sourander L., Winblad B., Blennow K. (1998) Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community-based follow-up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 64: 298-305.

Andreasen N., Minthon L., Clarberg A., Davidsson P., Gottfries J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Winblad B., Blennow K. (1999a) Sensitivity, specificity and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 53: 1488-1494.

- Andreasen N., Hesse C., Davidsson P., Minthon L., Wallin A., Winblad B., Vanderstichele H., Vanmechelen E., Blennow, K. (1999b)** Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-ons et alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch. Neurol.* 56: 673-680.
- 5 **Anonymous (1994)** Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57: 416-418.
- Arbit E., Cheung N.K., Yeh S.D., Daghighian F., Shang J.J., Cordon-Cardo C., Pentlow K., Canete A., Finn R., Larson S.M. (1995)** Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialogangliosid GD2 in human brain tumors. *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 419-426.
- 10 **Ballard C., Grace J., McKeith I., Holmes C. (1998)** Neuroleptic sensitivity in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Lancet* 351: 1032-3.
- 15 **Blennow K., Wallin A., Agren H., Spenger C., Siegfried J., Vanmechelen E. (1995)** Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 231-245.
- Bramblett G., Goedert M., Jakes R., Merrick S., Trojanowski J., Lee V. (1993)** The abnormal phosphorylation of tau at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates Phosphorylation during development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 10: 1089-1099.
- 20 **Brion J., Passareiro J., Nunez J., Flament-Durand J. (1985)** Mise en evidence immunologique de la proteine tau au niveau des lesions de degenerescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* 95: 229-235.
- 25 **Brun A. (1993)** Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type revisited. *Dementia* 4: 126-131.
- Buee L., Delacourte A. (1999)** Comparative biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, FTDP-17 and Pick's disease. *Brain Pathol.* 9: 681-693.
- 30 **Colosimo C., Albanese A., Hughes A.J., de Bruin V.M., Lees, A.J. (1995)** Some specific clinical features differentiate multiple system atrophy (striatonigral variety) from Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 52: 294-298.
- Delacourte A., Défossez A. (1986)** Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* 76: 173-180.
- 35 **Delacourte A., Flament S., Dibe E., Hublau P., Sablonniere B., Hemon B., Sherrer V., Defossez A. (1990)** Pathological proteins Tau64 and 69 are specifically expressed in the somatodendritic domain of the degenerating cortical neurons during Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 80: 111-117.
- 40 **Delacourte A., Buée L., Vermersch P. (1996)** Immunocytochemistry in frontotemporal dementia. In: Pasquier F, Lebert F., Scheltens P. (eds.) Frontotemporal dementia. *ICG Publications, Dordrecht, The Netherlands.* pp. 115-124.
- Ebly E.M., Parhad I.M., Hogan D.B., Fung T.S. (1994)** Prevalence and types of dementia in the very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neurology* 44: 1593-1600.
- 45 **Flament S., Delacourte A. (1990)** Tau Marker? *Nature* 346: 6279.
- Galasko D., Chang L., Motter R., Clark C.M., Kaye J., Knopman D., Thomas R., Kholodenko D., Schenk D., Lieberburg I., Miller B., Green R., Basherad R., Kertiles L., Boss M.A., Seubert P. (1998)** High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch. Neurol.* 55: 937-945.
- 50 **Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. (1989)** Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3: 519-526.
- 55 **Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. (1992)** Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.
- 60 **Goedert M., Jakes R., Crowther R., Six J., Lübke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J.Q., Lee V. (1993)** The abnormal phosphorylation of tau protein at serine 202 in Alzheimer's disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 5066-5070.
- 65 **Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Cras P. (1994)** Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* 301: 871-877.

ES 2 343 510 T3

- Goedert M., Crowther R.A., Spillantini M.G. (1998)** Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21: 955-958.
- Golbe L.I., Davis P.H. (1993)** *Progressive supranuclear palsy. Baltimore: Williams & Wilkins.*
- 5 **Greenberg S., Davies P. (1990)** A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5827-5831.
- 10 **Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y., Quinlan M., Wisniewski H., Binder L. (1986)** Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4913-4917.
- Gustafson L. (1993)** Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. *Dementia* 4: 143-148.
- 15 **Hanger D.P., Betts J.C., Loviny T.L., Blackstock W.P., Anderton B.H. (1998)** New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Neurochem.* 71: 2465-2476.
- 20 **Hanley J.A., McNeil B.J. (1983)** A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 148: 839-843.
- Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K., Suzuki M., Titani K., Ihara Y. (1992)** Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem* 267: 17047-17054.
- 25 **Himmler A. (1989)** Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts. *Mol. Cell Biol.* 9(4): 1389-96.
- Hooten W.M., Lyketsos C.G. (1998)** Differentiating Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: receiver operator characteristic curve analysis of four rating scales. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 9: 164-174.
- 30 **Huang Q., He G., Lan Q., Li X., Qian Z. Chen J. Lu Z., Du Z. (1996)** Target imaging diagnosis of human brain glioma. Clinical analysis of 40 cases. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316.
- 35 **Hulstaert F., Blennow K., Ivanoiu A., Schoonderwaldt H.C., Riemenschneider M., De Deyn P.P., Bancher C., Cras P., Wiltfang J., Mehta P.D., Iqbal K., Pottel H., Vanmechelen E., Vanderstichele H. (1999)** Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52: 1555-1562.
- 40 **Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Smith A., George L., Tung Y., Zaidi T. (1989)** Identification and localisation of a Tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 5646-5650.
- Ishiguro K., Ohno H., Arai H., Yamaguchi H., Urakami K., Park J.M., Sato K., Kohno H., Imahori K. (1999)** Phosphorylated tau in human cerebrospinal fluid is a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 270: 91-94.
- 45 **Kanai M., Matsubara E., Isoe K., Urakami K., Nakashima K., Arai H., Sasaki H., Abe K., Iwatsubo T., Kosaka T., Watanabe M., Tomidokoro Y., Shizuka M., Mizushima K., Nakamura T., Igeta Y., Ikeda Y., Amari M., Kawarabayashi T., Ishiguro K., Harigaya Y., Wakabayashi K., Okamoto K., Hirai S., Shoji M. (1998)** Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta₁₋₄₀, and A beta₁₋₄₂(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann. Neurol.* 44: 17-26.
- 50 **Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M., Ihara Y. (1988)** The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834.
- 55 **Kosik K.S., Joachim C.L., Selkoe D.J. (1986)** Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4044-4048.
- Ksiazak-Reding H., Liu W.K., Yen S.H. (1992)** *Brain Res.* 597: 209-219.
- 60 **Langston J.W., Widner H., Goetz C.G., Brooks D., Fahn S., Freeman T., Watts R. (1992)** Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov. Disord.* 7: 2-13.
- Lebert F., Pasquier F., Souliez L., Petit H. (1998)** Tacrine efficacy in Lewy body dementia. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 13: 516-519.
- 65 **Lee V., Balin B., Otvos L., Trojanowski J. (1991)** A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251(4994): 675-8.

Levy R., Eagger S., Griffiths M., Perry E., Honavar M., Daen A., Lantos P. (1994) Lewy bodies and response to tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet* 343: 176-178.

Lewis S., Wang D., Cowan N. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. *Science* 242: 936-939.

Mariani G., Lasku A., Pau A., Villa G., Motta C., Calcagno G., Taddei G.Z., Castellani P., Syrigos K., Dorcarratto A., Epenetos A.A., Zardi L., Viale G.A. (1997) A pilot pharmacokinetic and immunoscintigraphic study with the technetium-99m labeled monoclonal antibody BC-1 directed against oncofetal fibronectin in patients with brain tumours. *Cancer* 15: 2484-2489.

McKeith I.G., Galasko D., Kosaka K., Perry E.K., Dickson D.W., Hansen L.A., Salmon D.P., Lowe J., Mirra S.S., Byrne E.J., Lennox G., Quinn N.P., Edwardson J.A., Ince P.G., Bergeron C., Burns A., Miller B.L., Lovestone S., Collerton D., Jansen E.N., Ballard C., de Vos R.A., Wilcock G.K., Jellinger K.A., Perry, R.H. (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47: 1113-1124.

McKeith I.G., O'Brien J.T., Ballard C. (1999) Diagnosing dementia with Lewy bodies. *Lancet* 354: 1227-1228.

Mc Khann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report on the NINCDS-ADRDA Work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939-944.

Perry E.K., Haroutunian V., Davis K.L., Levy R., Lantos P., Eagger S., Honavar M., Dean A., Griffiths M., McKeith I.G., et al. (1994) Neocortical cholinergic activities differentiate Lewy body dementia from classical Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5: 747-749.

Rinne J.O., Lee M.S., Thompson P.D., Marsden C.D. (1994). Corticobasal degeneration. A clinical study of 36 cases. *Brain* 117 (Pt 5): 1183-1196.

Sandrock D., Verheggen R., Helwig A.T., Munz D.L., Markakis E., Emrich D. (1996) Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316.

Selden S., Pollard T. (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258(11): 7064-71.

Spillantini M.G., Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 21: 428-433.

Tamada K., Fujinaga S., Watanabe R., Yamashita R., Takeuchi Y., Osano M. (1995) Specific deposition of passively transferred monoclonal antibodies against herpes simplex virus type 1 in rat brain infected with the virus. *Microbiol-Immunol.* 39: 861-871.

Tomlinson B.E., Corsellis J.A.N. (1984) Ageing and the demntias. In: Hume Adams J., Corsellis J.A.N., Duchen L.W. (eds.) *Greenfield's neuropathology*. Edward Arnold, London, UK. pp. 951-1025.

Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Van de Voorde A., Martin J.J., Cras P. (1993) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 61: 1828-1834.

Van de Voorde A., Vanmechelen E., Vandermeeren M., Dessaint F., Beeckman W., Cras P. (1995) Detection of tau in cerebrospinal fluid. In: Iqbal K., Mortimer J. A., Winblad B. and Wisniewski H. M. *Alzheimer's disease: Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. John Wiley & Sons, Ltd. Chicester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. pp. 189-195.

Vanderstichele H., Blennow K., D'Heuvaert N., Buyse M.-A., Wallin A., Andreasen N., Seubert P., Van de Voorde A., Vanmechelen, E. (1998) Development of a specific diagnostic test for measurement of β -amyloid(1-42) [β A4(1-42)] in CSF. In: Fisher A., Hanin A. and Yoshida M. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Plenum Press, New York and London. pp. 773-778.

Vermersch P., Bordet R., Ledoze F., Ruchoux M.M., Chapon F., Thomas P., Destee A., Lechevallier B., Delacourte A. (1995) C R Demonstration of a specific profile of pathological Tau proteins in frontotemporal dementia cases. *Acad. Sci.* 318: 439-445.

Vigo-Pelfrey C., Seubert P., Barbour R., Blomquist C., Lee M., Lee D., Coria F., Chang L., Miller B., Lieverburg I., et al. (1995) Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 45: 788-793.

ES 2 343 510 T3

Wakabayashi T., Yoshida J., Okada H., Sugita K., Itoh K., Tadokoro M., Ohshima M. (1995) Radioimaging of human glioma by indium-111 labelled G-22 anti-glioma monoclonal antibody. *Noshuyo-Byori* 12: 105-110.

5 **Wilcock G.K., Scott M.I. (1994)** Tacrine for senile dementia of Alzheimer's or Lewy body type. *Lancet* 344: 544-544.

Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK (1991) *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th Edition, McGraw-Hill Inc, NY, USA.

10 **Wood J., Mirra S., Pollock N., Binder L. (1986)** Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4040-4043.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica y/o frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva, donde fosfo-tau en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se usa como un marcador neurológico.

10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende los pasos de:

- 15 - determinación del nivel de fosfo-tau en una muestra de LCR obtenida de dicho individuo;
- 15 - deducción de que dicho individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, Parkinson sin demencia, atrofia multisistémica y/o parálisis supranuclear progresiva por comparación del nivel de fosfo-tau obtenido en la muestra extraída de dicho individuo con el nivel de fosfo-tau en una muestra obtenida de individuos que sufren la enfermedad de Alzheimer, por medio de la cual un nivel menor de fosfo-tau es una indicación de que dicho individuo sufre demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson sin demencia, atrofia multisistémica y/o parálisis supranuclear progresiva.

20 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que se **caracteriza** además porque el nivel de fosfo-tau se determina inmunológicamente, haciendo uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfo-tau.

25 4. El uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfo-tau para el diagnóstico diferencial, *in vitro*, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer frente a un individuo que sufre demencia con cuerpos de Lewy, frente a un individuo que sufre la enfermedad de Parkinson sin demencia, frente a un individuo que sufre atrofia multisistémica y/o frente a un individuo que sufre parálisis supranuclear progresiva.

30

35

40

45

50

55

60

65