



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 274 869**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01909655 .1**
86 Fecha de presentación : **18.01.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1250600**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.10.2002**

54 Título: **Diagnóstico de tauopatías determinando la relación tau/fosfotau.**

30 Prioridad: **24.01.2000 EP 00870008**
27.01.2000 US 178391 P
22.11.2000 EP 00870280

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

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

72 Inventor/es: **Vanmechelen, Eugene y**
Vanderstichele, Hugo

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

ES 2 274 869 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 de tauopatías determinando la relación tau/fosfotau.

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el diagnóstico de tauopatías. Asimismo proporciona un método nuevo para la detección y/o el diagnóstico diferencial de tauopatías. Y también proporciona un fosfopéptido que se puede usar en la estandarización de un método de la invención.

10 Antecedentes de la invención

Se han asociado varias formas de demencia, las denominadas tauopatías (Goedert *et al.*, 1998), con el mismo mecanismo fisiopatológico, la participación de la proteína estructural tau. La proteína tau asociada al microtúbulo es un componente principal por ejemplo 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 de 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. Se genera una diversidad adicional mediante inserciones de 29 ó 58 aminoácidos de longitud en la parte NH₂-terminal de las moléculas de tau (Goedert *et al.*, 1989). *In vivo* la proteína tau promueve el ensamblaje del microtúbulo y la estabilidad del 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) es el tipo más común de demencia degenerativa primaria asociada a una patología tau y tiene una prevalencia de 42 a 75% (Brun, 1993; Gustafson, 1993; Eibly *et al.*, 1994). La demencia frontotemporal (DFT) es una afección clínica en la que están presentes patológicamente la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, la demencia frontotemporal esporádica y enfermedades de las motoneuronas. Según un estudio pequeño de Mann *et al.* (2000), 16 de los 37 casos de DFT se pueden clasificar como tauopatías basándose en la inmunohistoquímica de tau. La patología tau filamentosa asociada a tau es decir 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), sin embargo estudios del tejido cerebral sugieren que la patología tau es diferente en la EA y la DFT, lo que está posiblemente relacionado con el grado de fosforilación (Delacourte *et al.*, 1996). Otras formas de demencia asociadas a una patología tau incluyen 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. Además, se han encontrado varias dificultades para determinar exactamente el grado de fosforilación de sitios de fosforilación específicos concentrados en la región de la prolina. Debido a estas dificultades, no se cuenta todavía con un método preciso para la detección específica de estas tauopatías.

Objetivos de la invención

55 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 en un individuo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no tauopática.

65 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una neurodegeneración no-tauopática.

ES 2 274 869 T3

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a la demencia vascular, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, el accidente cerebrovascular y/o la neurotoxicidad en pacientes con leucemia.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer; la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 frente a la demencia vascular, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, el accidente cerebrovascular y la neurotoxicidad en pacientes con leucemia.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método *in vitro* según se describió precedentemente.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un fosfopéptido para usar en estandarización.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un fosfopéptido para usar en la estandarización de un método para detectar fosfotau (181).

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un fosfopéptido para usar en la estandarización de un método según se describió precedentemente.

20 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un juego de reactivos de diagnóstico para usar en un método según se describió precedentemente.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido, un método y/o un juego de reactivos de diagnóstico para la experimentación o la selección de fármacos, para la determinación de las concentraciones de un fármaco y/o para la determinación de la eficacia de un determinado tratamiento para una tauopatía.

Leyendas de las figuras

30 Figura 1. Cartografía fina de los anticuerpos contra tau, HT7, tau1, BT2, AT120 y AT270 en péptidos sintéticos superpuestos. Sólo se muestran péptidos inmunorreactivos. A. Cartografía de péptidos sintetizados sobre pines (varillas). Se utilizaron 48 nonapéptidos con 8 aminoácidos superpuestos para cubrir la región de tau desde 155 hasta 208. B. Síntesis de péptidos sobre papel. Dieciséis péptidos superpuestos de 12 aminoácidos de longitud definen el epitopo AT120 en la región 206-232. C. Cartografía del anticuerpo AT270 en fosfopéptidos biotinilados (la treonina fosforilada está indicada) que cubren la región desde 166 hasta 196.

35 Figura 2. Especificidad del anticuerpo AT270 para fosfoThr 181 según se definió por cribado de fosfopéptidos sintéticos. Los fosfopéptidos biotinilados se capturaron en placas recubiertas con estreptavidina a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Se detectó AT270 a través de un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Las secuencias de los péptidos se muestran en la Tabla 1.

40 Figura 3. Relación de los niveles de fosfotau, determinados mediante el ensayo de HT7-AT270, y de los niveles de tau total (ensayo AT120-(HT7-BT2)). Se analizaron varias preparaciones de tau en FHA con diferentes diluciones. La figura muestra los datos brutos según se analizaron por duplicado en dos placas diferentes de la dilución de la preparación de tau en FHA correspondiente aproximadamente a una DO_{450} de 0,5. Las barras en la gráfica son desviaciones estándar. Los FHA-A a D derivan de corteza frontotemporal, en tanto los FHA-E se preparan de una región del hipocampo de un cerebro con Alzheimer.

Figura 4. Nube de puntos de tau total en LCR en demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y encefalopatía arteriosclerótica subcortical.

50 Figura 5. Nube de puntos de fosfotau (181) en LCR en la demencia frontotemporal, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la encefalopatía arteriosclerótica subcortical.

Figura 6. Representación gráfica de la correlación entre tau total en LCR y fosfotau (181) en LCR, con todos los individuos del estudio incluidos.

Figura 7. Nube de puntos de la relación de fosfotau (181)/tau total en el LCR de pacientes con demencia frontotemporal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y encefalopatía arteriosclerótica subcortical.

60 Figura 8 Tau total en LCR (izquierda) y fosfotau (181) en LCR (derecha) en diferentes momentos (puntos de la gráfica correspondientes al tiempo) después del accidente cerebrovascular. Las grapas son valores medios y las barras desviaciones estándar (DE). Número de muestras en diferentes momentos: día 0-1: n = 9, día 2-3: n = 18, días 7-9: n = 22, semana 3: n = 21, meses 3-5: n = 21. Significancia comparada con día 0-1: para tau en LCR: día 2-3: p = 0,002, días 7-9: p < 0,0001, semana 3: p < 0,0001, meses 3-5: p = 0,035; para fosfotau en LCR: No hubo diferencias significativas en ningún punto de la gráfica correspondiente al tiempo en comparación con los días 0-1.

Figura 9. Valores individuales de tau total en LCR (izquierda) y fosfotau (181) en LCR (derecha) en diferentes momentos, de los nueve pacientes de los que se obtuvieron muestras de LCR el día uno.

ES 2 274 869 T3

Figura 10. Correlación entre tau total en LCR y fosfotau (181) en LCR en pacientes con enfermedad de Alzheimer (n = 54) y controles (n = 17) (izquierda) y en pacientes con accidente cerebrovascular (n = 22, número de muestras = 91) (derecha).

5 Tablas

TABLA 1

10 *Secuencia de los péptidos fosforilados utilizados para determinar la especificidad de AT270 para fosfoThr 181*

Nombre	Secuencia	N° de ID Sec
15 153	KGADGKTKIAT (p) PRGAAPPQK	8
175	QANATRIAPKT (p) PPAPKTPPSS	9
20 181	RIPAKTPPAPKT (p) PPSSGEPKKS	10
198	PPKSGDRSGYS (p) SGSPGTPGSR	11
199	PKSGDRSGYSS (p) GSPGTPGSR	12
25 202	SGDRSGYSSGS (p) PGTPGSRRT	13
205	RSGYSSGSPGT (p) PGRSRTPSL	14
30 208	YSSGSPGTPGS (p) RSRTPSLPTP	15
210	SGSPGTPGSR (p) RTPSLPTPTR	16
212	SPGTPGSRRT (p) PSLPTPTREP	17
35 214	GTPGSRRTPS (p) LPTPTREP	18
217	GSRRTPSLPT (p) PTREP	19
231	REP	20
40 235	KKVAVVTPKS (p) PSSAKSRLQ	21
262	VKSKIGS (p) TENIK	22
45 396	TDHGAEIVYKS (p) PVVSDTSPRH	23
400	AEIVYKSPVVS (p) DTSPRHLSNV	24
403	IVYKSPVVS (p) SPRHLSNVSS	25
50 404	YKSPVVDTS (p) PRHLSNVSST	26
409	VVSDTSPRHLS (p) NVSSTGSIDM	27
55 412	DTSPRHLSNV (p) STGSIDMVDS	28
422	SSTGSIDMVDS (p) PQLATLADEV	29

(p): el aminoácido está fosforilado.

60

65

ES 2 274 869 T3

TABLA 2

Características clínicas de los pacientes que participaron en el estudio descrito en el ejemplo 2

5

Diagnóstico	N	Sexo (M:F)	Edad	Duración de demencia (y)	Grado de demencia ^a	Relación de albúmina ^b
DFT	18	5:13	65,5±8,4	4,1±3,2	17,7±6,4	9,7±2,9
Prob EA	41	13:28	73,8±5,9	3,2±1,8	17,6±5,2	5,4±1,8
Pos EA	19	11:8	78,9±5,7	3,0±2,3	21,9±3,7	7,9±2,9
EAS	17	12:5	75,8±4,4	2,6±2,2	22,1±7,2	11,9±7,2
EP	15	11:4	69,9±7,5	-	-	6,8±2,4
Controles	17	4:13	71,8±4,2	-	-	5,3±1,8

10

15

20

25

30

^a Puntuación MMSE (Mini examen del estado mental); ^bRelación de albúmina = [albúmina en LCR (mg/L)/albúmina en suero (g/L)]. Todos los valores se expresan como medias ± DE. Se utilizan las abreviaturas siguientes: DFT: Demencia frontotemporal; EA: enfermedad de Alzheimer; EAS: encefalopatía arterioesclerótica subcortical; EP: enfermedad de Parkinson; Prob: probable; Pos: posible; N: número de individuos; M: masculino; F: femenino; y; años de edad; LCR: líquido cefalorraquídeo

TABLA 3

Niveles en LCR de tau total, fosfotau (181) y relación fosfotau (181)/tau total en los trastornos de demencia, la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento normal

35

40

45

50

55

Diagnóstico	Niveles en líquido cefalorraquídeo (pM)		
	Tau total	Fosfotau (181)	Fosfotau(181) /tau total
DFT	9,74 ± 2,88	8,59 ± 3,88***	0,88 ± 0,34***
Probable EA	20,01 ± 7,58***	23,12 ± 10,10**	1,16 ± 0,24***
Posible EA	16,34 ± 4,30***	18,01 ± 5,86	1,10 ± 0,20***
EAS	3,70 ± 2,29***	6,39 ± 5,59***	1,96 ± 1,08
EP	7,45 ± 1,59	14,07 ± 3,11	1,92 ± 0,42
Controles	8,33 ± 2,83	15,92 ± 5,72	1,95 ± 0,60

Todos los valores se expresan como medias ± DE. Abreviaturas:

60

DFT: demencia frontotemporal; EA: enfermedad de Alzheimer; EP: enfermedad de Parkinson; EAS: encefalopatía arterioesclerótica subcortical.

***: el valor es significativamente diferente comparado con el valor de los controles (p<0,001).

**: el valor es significativamente diferente comparado con el valor de los controles (p<0,01).

65

*: el valor es significativamente diferente comparado con el valor de los controles (p<0,05).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo, donde dicho método comprende los pasos de:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicho individuo con la relación fosfotau (181)/tau total en los individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en los individuos de control constituye una indicación.

La presente invención también se relaciona con un método para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía en un individuo, donde dicho método comprende los pasos de:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicho individuo con la relación fosfotau (181)/tau total en un individuo que sufre una no-tauopatía o con la relación fosfotau (181)/tau total en individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en individuos que sufren una no-tauopatía o en individuos de control constituye una indicación.

La presente invención se basa en el hallazgo de que la relación fosfotau (181)/tau total en el LCR de los pacientes que sufren la EA y en el LCR de los pacientes que sufren ciertas formas de DFT está significativamente alterada en comparación con la relación fosfotau (181)/tau total en el LCR de los individuos de control. La presente invención se basa además en el hallazgo de que la relación fosfotau (181)/tau total en el LCR de pacientes que sufren la EA está significativamente alterada en comparación con la relación fosfotau (181)/tau total en el LCR de pacientes que sufren un accidente cerebrovascular. La indicación de que la relación fosfotau (181)/tau total en pacientes con una tauopatía está alterada, aporta una base para el desarrollo de una prueba para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo y/o para el diagnóstico diferencial de individuos que sufren una tauopatía frente a individuos que sufren una no-tauopatía. Una "tauopatía" es cualquier forma de demencia que se asocia con una patología tau.

La enfermedad de Alzheimer y ciertas formas de demencia frontotemporal (la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17) son las formas más comunes de tauopatía. Consecuentemente, la presente invención se relaciona con cualquier método como el descrito antes, donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17. Otras tauopatías incluyen pero no exclusivamente la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (DCB) y la panencefalitis esclerosante subaguda.

En una materialización específica, la presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo, donde dicho método comprende los pasos de:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre la enfermedad de Alzheimer por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicho individuo con la relación fosfotau (181)/tau total en los individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en los individuos de control constituye una indicación.

Una "no tauopatía" es cualquier estado del cerebro que no se asocia con una patología tau. En una materialización de la invención, dicha no-tauopatía es una neurodegeneración no tauopática. Una neurodegeneración no tauopática es cualquier forma de trastorno neurológico que no esté asociado a una patología tau. Las neurodegeneraciones no tauopáticas incluyen pero no exclusivamente a la demencia vascular, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, el accidente cerebrovascular y/o la neurotoxicidad en pacientes con leucemia. Por consiguiente, en una materialización específica, la presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico diferencial en un individuo de la enfermedad de Alzheimer frente al accidente cerebrovascular, donde dicho método comprende los pasos de:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre la enfermedad de Alzheimer y no un accidente cerebrovascular por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicho individuo con la relación fosfotau (181)/tau total en los individuos que sufren un accidente cerebrovascular, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en los individuos que sufren un accidente cerebrovascular constituye una indicación.

ES 2 274 869 T3

Fosfotau (181) incluye todas las moléculas tau que tienen un fosfato en la treonina en la posición 181. La numeración con respecto a la secuencia de aminoácidos hace referencia a la isoforma más larga hTau40 (Goedert *et al.*, 1989).

5 Tau total hace referencia a todas las formas de tau e incluye la proteína tau en cualquier estado de fosforilación.

La presente invención por lo tanto se basa en el uso de tau y fosfotau (181) como marcadores neurológicos para el diagnóstico de una tauopatía y/o para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía.

10 Basándose en el nivel de fosfotau (181) y tau total en un individuo, se puede determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicho individuo.

La relación fosfotau (181)/tau total se puede detectar *in vitro* e *in vivo*.

15 El método para la detección *in vitro* de la relación fosfotau (181)/tau total en un individuo comprende los pasos de:

- obtener una muestra de dicho individuo;
- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicha muestra;
- 20 - inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicho individuo con la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra de individuos que sufren una no-tauopatía o con la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra de individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en individuos que
- 25 - sufren una no-tauopatía o en individuos de control constituye una indicación.

El término “muestra” se refiere a cualquier fuente de material biológico, por ejemplo, líquidos orgánicos, extracto cerebral, sangre periférica o cualquier otra muestra que contenga la proteína fosfotau (181). En una materialización de la invención, la relación fosfotau (181)/tau total se determina *in vitro* mediante el análisis de la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra de un líquido orgánico del paciente. La expresión “líquido orgánico” hace referencia a todos los líquidos que están presentes en el organismo humano incluidos sin carácter excluyente la sangre, la linfa, la orina y el líquido cefalorraquídeo (LCR) que contienen la proteína fosfotau (181). En otra materialización de la presente invención la relación fosfotau (181)/tau total se determina en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) extraída del paciente. Consecuentemente, la presente invención se relaciona con un método como el descrito antes, que comprende los pasos de:

- extraer una muestra de líquido cefalorraquídeo del individuo;
- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en dicha muestra de líquido cefalorraquídeo;
- 40 - inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicho individuo con la relación fosfotau (181)/tau total en el LCR de individuos que sufren una no-tauopatía o con la relación fosfotau (181)/tau total en el LCR de individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en el LCR de individuos que
- 45 - sufren una no-tauopatía o en el LCR de individuos de control constituye una indicación.

Tau total se puede cuantificar por cualquier método conocido, incluido sin carácter excluyente el uso de anticuerpos o de lo contrario mediante un ensayo funcional (Bramblett *et al.*, 1992). Cualquier anticuerpo monoclonal o policlonal que reconozca específicamente a tau total se puede usar para su cuantificación. Los anticuerpos que reconocen a la proteína tau normal y anormalmente fosforilada incluyen el Alz50 (Ghanbari *et al.*, 1990), el HT7 (Mercken *et al.*, 1992) y el AT120 (Vandermeeren *et al.*, 1993). Pero también se pueden usar otros anticuerpos conocidos por los técnicos en la materia que reconozcan a tau total. Un método muy rápido y fácil de usar para la cuantificación de tau total es INNOTEST hTau-Ag (Innogenetics, Gent, Bélgica).

55 Fosfotau (181) se puede cuantificar por cualquier método conocido por los técnicos en la materia, incluido pero no exclusivamente el uso de anticuerpos. En una materialización preferida, se cuantifica fosfotau (181) mediante un inmunoensayo que comprende al menos los pasos siguientes:

- obtener una muestra del paciente;
- 60 - poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente a fosfotau (181), en condiciones adecuadas para producir un complejo antígeno-anticuerpo;
- detectar la unión inmunológica de dicho anticuerpo con dicha muestra.
- 65

En una materialización aún más preferida, se puede cuantificar a fosfotau (181) mediante el inmunoensayo ELISA tipo sándwich que comprende los pasos siguientes:

ES 2 274 869 T3

- obtener una muestra del paciente;
- poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal (anticuerpo primario o anticuerpo de captura) que reconozca a fosfotau (181), en condiciones adecuadas para producir un complejo antígeno-anticuerpo;
- poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo monoclonal (anticuerpo secundario o anticuerpo detector) que reconozca específicamente a fosfotau (181), en condiciones adecuadas para producir un complejo antígeno-anticuerpo;
- poner en contacto el complejo antígeno-anticuerpo con un marcador para etiquetado específico o acoplamiento con dicho anticuerpo secundario, donde dicho marcador es cualquier marcador posible conocido por los técnicos con experiencia en el tema;
- posiblemente además, a los efectos de estandarización, poner en contacto los anticuerpos con una proteína fosfotau purificada o un fosfopéptido que reaccione con ambos anticuerpos.

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

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.

La expresión “que reconozca específicamente” según se usa en la presente invención se debe interpretar en el sentido de que dicho anticuerpo es capaz de formar un complejo inmunológico con fosfotau (181) pero no con una molécula de tau que no esté fosforilada en la treonina 181.

Cualquier anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente a fosfotau (181) se puede usar en dicho método para la cuantificación de fosfotau (181). Un anticuerpo monoclonal preferido para usar en la cuantificación de fosfotau (181) es AT270 (Solicitud internacional, publicada como WO 95/17429). Pero también se pueden usar otros anticuerpos conocidos por los técnicos en la materia que reconozcan específicamente a fosfotau (181).

A efectos de estandarización, se puede usar una proteína tau o un péptido fosforilado en la treonina 181. Éste se puede obtener mediante cualquier método como la extracción del cerebro o la fosforilación *in vitro* de tau normal. Puesto que es difícil determinar con exactitud el grado de fosforilación de los sitios de fosforilación específicos concentrados en la región prolinea, en una materialización de la invención, se usa un fosfopéptido sintético para la estandarización. Dicho fosfopéptido sintético debe poder formar un complejo inmunológico con los anticuerpos usados en el inmunoensayo.

La presente invención por lo tanto se relaciona también con un fosfopéptido que comprende al menos dos epítopos que son reconocidos por un anticuerpo monoclonal, donde dicho fosfopéptido es responsable de formar un complejo inmunológico con dichos anticuerpos monoclonales en un inmunoensayo ELISA tipo sándwich. Trabajos anteriores demostraron que, aunque un péptido contenga un epítipo para un determinado anticuerpo monoclonal, dicho anticuerpo monoclonal no siempre reconoce a dicho péptido (DeLeys *et al.*, 1996). Los inventores de la presente pudieron definir un fosfopéptido con dos epítopos tales, que en verdad dicho fosfopéptido es capaz de formar un complejo inmunológico con los anticuerpos monoclonales que reconocen a dichos epítopos. Además, los inventores de la presente pudieron definir ambos epítopos de modo que el fosfopéptido fuera capaz de formar un complejo inmunológico con los anticuerpos monoclonales que reconocen dichos epítopos en un inmunoensayo ELISA tipo sándwich.

El término “péptido” hace referencia a un polímero de aminoácidos (aa) y no hace referencia a una longitud específica del producto. En una materialización de la invención, la longitud del fosfopéptido es entre 15 y 100 aminoácidos. En una materialización preferida de la invención, el fosfopéptido contiene 20 a 50 aminoácidos. En otra materialización preferida de la invención, el fosfopéptido contiene 30 a 40 aminoácidos.

El péptido de la invención se puede producir mediante cualquier método conocido por los técnicos en la materia como síntesis química clásica según describen Houbenweyl (1974) y Atherton y Shepard (1989), mediante cualquier método comercial como los que se describen en la sección de los ejemplos, o por medio de técnicas de ingeniería genética según describen Sambrook *et al.* (1989).

Un fosfopéptido es un péptido que tiene un fosfato en al menos un aminoácido. El uso del fosfopéptido de la invención permitió a los inventores determinar la relación entre el fosfopéptido y las fosfoisoformas específicas y evaluar el grado de fosforilación de los sitios de fosforilación específicos (ver ejemplo 1, 1.5). El uso del fosfopéptido de la invención permitirá la cuantificación de formas moleculares particulares de tau de manera estandarizada.

ES 2 274 869 T3

Los péptidos fosforilados se pueden preparar por cualquier método conocido. Se pueden preparar post ensamblaje, mediante la reacción por ejemplo con di-t-butil diisopropil diisopropilfosfoaramidita y oxidación con hidroperóxido de t-butilo de los residuos de serina y treonina desprotegidos. También se pueden preparar por incorporación de aminoácidos fosforilados durante la síntesis peptídica. Recientemente, comenzó la comercialización de nuevos derivados fosforilados de serina (N- α -Fmoc-O-bencil-L-fosfoSer) (Calbiochem-Novabiochem AG, San Diego, CA 92121) para sintetizar fosfopéptidos directamente sin fosforilación post ensamblaje.

En una materialización, la presente invención se relaciona con un fosfopéptido responsable de formar un complejo inmunológico con el anticuerpo monoclonal HT7 y el anticuerpo monoclonal AT270, que comprende al menos:

- el epítipo mínimo de HT 7:PPGQK (SEC. N° de ID 1); y
- el epítipo mínimo de AT270:PPAPKT(p)P (SEC. N° de ID 2).

En una materialización aún más preferida, la presente invención se relaciona con un fosfopéptido como el descrito anteriormente, que comprende la siguiente secuencia:

PRGAAPPGQKGANATRIPAKTPPAPKT(p)PPSSGE (SEC. N° de ID 3)

donde “(p)” significa que la treonina está fosforilada, o secuencias variantes en las condiciones en que todavía se une a los anticuerpos monoclonales HT7 y AT270. El término “secuencias variantes” hace referencia a cualquier variante o fragmento del péptido representado en la SEC. N° de ID 3, por sustitución o delección de uno o más aminoácidos, que todavía reconoce los anticuerpos monoclonales HT7 y AT270. El término no se refiere específicamente a, ni excluye, las modificaciones post traduccionales del péptido como glicosilación, acetilación, fosforilación, modificaciones con ácido graso y similares. Incluidos en la definición están, por ejemplo, los péptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos los aminoácidos que no son naturales), los péptidos con uniones sustituidas, las versiones mutadas, los péptidos que contienen enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína, los péptidos biotinilados así como otras modificaciones conocidas por los técnicos en la materia.

La presente invención se relaciona además con el uso de dicho fosfopéptido en un método para medir el nivel de fosfotau (181).

La presente invención se relaciona además con el uso de dicho fosfopéptido en un método para el diagnóstico de una tauopatía y/o para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía.

La presente invención se relaciona además con el uso de dicho fosfopéptido en un método para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se relaciona además con el uso de dicho fosfopéptido en un método para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer frente al accidente cerebrovascular.

El método para la detección *in vitro* de la relación fosfotau (181)/tau total en un individuo, también se puede usar para la experimentación o el cribado de fármacos, para la determinación de las concentraciones de un fármaco y/o para evaluar el efecto de un determinado tratamiento sobre la tauopatía en dicho individuo.

El método para la detección precoz *in vivo* de la relación fosfotau (181)/tau total en un individuo comprende los pasos de determinación de la relación fosfotau (181)/tau total en dicho individuo y de comparación con la relación fosfotau (181)/tau total en individuos sanos de control. En una materialización, fosfotau (181) y tau total se pueden cuantificar *in vivo* mediante imaginología. Fosfotau (181) y tau total se pueden cuantificar *in situ* por métodos no invasivos que incluyen sin carácter restrictivo los métodos de imaginología del cerebro descritos por Arbit *et al.* (1995), Tamada *et al.* (1995), Wakabayashi *et al.* (1995), Huang *et al.* (1996), Sandroock *et al.* (1996), Mariani *et al.* (1997). Estos métodos de imaginología *in vivo* permiten la localización y cuantificación de fosfotau (181) y tau total, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos etiquetados que reconocen específicamente a fosfotau (181) o tau total, respectivamente.

Fosfotau (181) y tau total también se pueden usar como marcadores para imaginología *in vivo* para la experimentación o el cribado de fármacos, para la determinación de la concentración de un fármaco y/o para evaluar el efecto de un determinado tratamiento sobre la tauopatía en dicho individuo.

La presente invención se relaciona además con un juego de reactivos para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo y/o para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía que comprende al menos un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181).

En otra materialización, la presente invención se relaciona con un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes que comprende al menos:

- un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181);

ES 2 274 869 T3

- un anticuerpo que reconoce a tau.

En otra materialización, la presente invención se relaciona con un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes que comprende al menos un fosfopéptido de acuerdo con la invención.

5

En otra materialización, la presente invención se relaciona con un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes que comprende al menos:

- un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181);
- un fosfopéptido de acuerdo con la invención.

10

En otra materialización, la presente invención se relaciona con un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes que comprende al menos:

15

- un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181);
- un anticuerpo que reconoce a tau;
- un fosfopéptido de acuerdo con la invención.

20

Un juego de reactivos preferido para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo se basa en un inmunoensayo y comprende:

25

- un anticuerpo monoclonal (anticuerpo primario) que forma un complejo inmunológico con un epítipo de fosfotau (181);
- un anticuerpo monoclonal (anticuerpo secundario) que reconoce específicamente a fosfotau (181);
- un marcador para etiquetado específico o acoplamiento con dicho anticuerpo secundario;
- soluciones amortiguadoras apropiadas para llevar a cabo la reacción inmunológica entre el anticuerpo primario y la muestra de ensayo, entre el anticuerpo secundario y la muestra de ensayo y/o entre el anticuerpo secundario enlazado y el marcador;
- un fosfopéptido de acuerdo con la invención.

30

35

La presente invención se relaciona además con el uso de un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo y/o para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía.

40

La presente invención se relaciona además con el uso de un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17.

45

La presente invención se relaciona además con el uso de un juego de reactivos de diagnóstico como el que se describió antes para el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 frente a la demencia vascular, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, el accidente cerebrovascular y/o la neurotoxicidad en pacientes con leucemia.

50

La presente invención también se relaciona con el uso de tau total y fosfotau (181) como marcadores neurológicos para la fabricación de un juego de reactivos de diagnóstico para el diagnóstico de una tauopatía y/o para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía.

55

La presente invención también se relaciona con el uso de un fosfopéptido, un método y/o un juego de reactivos de diagnóstico de la invención para la experimentación o el cribado de fármacos, la determinación de las concentraciones de un fármaco y/o para la determinación de la eficacia de un determinado tratamiento para una tauopatía.

60

En toda esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, 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 otro número entero ni paso o grupo de números enteros o pasos.

65

La referencia a cualquier estado anterior de la técnica en esta especificación, no es y no debe tomarse como un reconocimiento ni ningún tipo de sugerencia de que ese estado anterior de la técnica forma parte del conocimiento general común en Australia.

La presente invención se ilustrará a continuación por referencia a los ejemplos siguientes que exponen materializaciones particularmente ventajosas. Sin embargo, se debe observar que estos ejemplos son ilustrativos y no pueden interpretarse como restrictivos de la invención de ninguna manera.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño de un fosfopéptido para usar en la estandarización

10

1.1 Síntesis de tau y péptidos derivados de tau

Se utilizaron dos cebadores de RCP (un cebador que contiene el codón de inicio de la metionina -CATGGCTGAG CCCC GCCAGGAGTTCGAAGTGATGG (1 a 34) (SEC. N° de ID 4) y el cebador inverso alrededor del codón de parada CCTGATCACA AACCCCTGCTTGGCCAGGGAGGC (SEC. N° de ID 5)) para amplificar la forma más pequeña de la tau humana en un sistema de expresión basado en P_L (Innogenetics, Gent, Belgium). La secuencia del producto de RCP se confirmó por secuenciación. Sólo se observaron cambios en el tercer par de bases en los codones: en Pro 182 CAG en vez de CAA, en Ala 227 GCG en vez de GCA y en Asn 251 AAC en vez de AAT. Toda la numeración con respecto a la secuencia de aminoácidos hace referencia a la isoforma más larga de tau: hTau40 (Goedert *et al.*, 20 1989). Se hicieron mutantes por delección basados en la construcción de mutantes del marco de lectura llenando el sitio SacII (posición del aminoácido 154-155) y el sitio PstI (posición 242-243).

Se llevó a cabo una síntesis peptídica automatizada en un sintetizador Millipore 9050, en general como péptidos biotinilados N-terminalmente. Se llevó a cabo una síntesis a gran escala del péptido Ac-PRGAAPPQKQGQANATRI-PAKTPAPKT(p)PPSSGE-NH₂ (posición 154-187) (SEC. N° de ID 3) por inmunoensayo ELISA tipo sándwich tanto internamente como en Neosystems (Estrasburgo, Francia). El control de calidad incluye RP-HPLC (cromatografía líquida de alta presión en fase reversa) (>99% puro), análisis de espectrometría de masa (PM promedio 3.454,8) y análisis de aminoácidos (84,3% de contenido neto de péptido).

Para la cartografía de epítomos, se sintetizaron péptidos manualmente sobre pines (varillas) derivatizados (Multiple Peptide Systems, San Diego, CA92121) o sobre papel. Para los péptidos sintetizados en papel, el papel se derivatizó usando el anhídrido simétrico de Fmoc-β-alanina (9-fluorenilmetoxicarbonil-β-alanina) en presencia de la dimetilaminopiridina. Después de la eliminación del grupo Fmoc, se agregó un segundo residuo de β-alanina a continuación de la activación con TBTU (=2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1',3,3'-tetrametiluronio tetrafluoroborato). A continuación se sintetizaron los péptidos manualmente como manchas.

Los péptidos fosforilados se hicieron mediante reacción post ensamblaje con di-t-butil diisopropil diisopropilfosfoamidita y oxidación con hidroperóxido de t-butilo de los residuos desprotegidos de serina y treonina. Recientemente, comenzó la comercialización de nuevos derivados fosforilados de serina (N-α-Fmoc-O-bencil-L-fosfoSer) (Calbiochem-Novabiochem AG, San Diego, CA 92121) para sintetizar fosfopéptidos directamente sin fosforilación post ensamblaje. Después de separarlos del soporte sólido, los péptidos y fosfopéptidos se purificaron por cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC). La calidad de los péptidos se verificó por espectrometría de masa.

45 1.2 Inmunoensayos

Se describieron detalles del aislamiento y la caracterización de los anticuerpos AT120 (Vandermeeren *et al.*, 1993b), HT7 (Mercken *et al.*, 1992), BT2 (Vandermeeren *et al.*, 1993a) y AT270 (Goedert *et al.*, 1994). Para cuantificar las interacciones péptido-anticuerpo por ensayo de captura, se recubrió con estreptavidina (Roche Diagnostics, Bruselas, Bélgica) a una concentración de 5 µg/ml durante toda la noche en una solución amortiguadora de carbonato 50 mM de pH 9,5. Después de bloquear, se agregaron y se detectaron los péptidos biotinilados con los anticuerpos contra tau. Se usó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano para cuantificar la inmunoreacción.

La versión de investigación del INNOTEST fosfotau (181P) se diseñó del modo siguiente:

55

Las inmunoplasmas de HT7 recubierto se incubaron durante toda la noche a 4°C con 75 µl de muestra o estándar, simultáneamente con AT270 biotinilado. Después del lavado, se agregó estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (RDI, Flandes, NJ, EE.UU.) durante 30 min. La reacción se detuvo por agregado de 50 µl de H₂SO₄ 0,9 N.

60 Se midió tau total usando INNOTEST hTau-Ag y se empleó un peso molecular calculado de 41.065 para la tau recombinante que se usó como estándar para convertir pg/ml a pM.

1.3 Cartografía de los anticuerpos contra tau

65 Para cartografiar los anticuerpos contra tau que reconocen a tau recombinante en la molécula de tau completa, se construyeron mutantes por delección basados en los sitios PstI y SacII. Los anticuerpos probados, es decir HT7, AT120, BT2 y tau 1, están todos en el mapa de la región rica en prolina (posición 154-242 en hTau40, no se muestran los resultados). Para delinear mejor los epítomos, se sintetizaron péptidos superpuestos pequeños. En un primer paso,

se sintetizaron 48 péptidos, de 9 aminoácidos de longitud y 8 aminoácidos superpuestos en los pines (varillas). La secuencia varió de 155 a 208. Se probaron AT120, HT7, BT2 y tau1. Se pudo cartografiar a cuatro de los cinco anticuerpos: el epítipo mínimo de HT7 fue PPGQK (posición 159-163) (SEC. N° de ID 1), en tanto las reactividades de BT2 y tau-1 no se pudieron distinguir: DRSGYS (posición 193-198) (SEC. N° de ID 6) (Fig. 1a). Puesto que no se pudo cartografiar a AT120 en esos péptidos, se sintetizó un nuevo conjunto de péptidos sobre papel, cubriendo la secuencia de 206 a 232. Fue necesario un total de 16 péptidos de 12 aminoácidos de longitud y con 11 aminoácidos superpuestos para cubrir esta región. El epítipo mínimo de AT 120 se definió mediante la secuencia PPTREPK (posición 218-224) (SEC. N° de ID 7) (Fig. 1b).

1.4 Especificidad de AT270

Se confirmó la especificidad del anticuerpo fosfo dependiente, AT270, en los fosfopéptido sintéticos que cubrían 22 sitios de fosforilación de tau. Las secuencias de estos péptidos se resumen en la Tabla 1. Los péptidos sin fosforilar correspondientes a 12 de estos sitios se analizaron en paralelo (Fig. 2). AT270 sólo reaccionó con fosfopéptidos que contenían fosfoThr 181 y/o fosfoThr 175. Cuando se valoraron esos péptidos en un ensayo de captura, AT270 fue 18 veces menos reactivo en base molar con el péptido que contenía a fosfoThr 175 en comparación con el que contenía a fosfoThr 181 (los resultados no se muestran). Finalmente el epítipo mínimo se definió usando péptidos fosforilados biotinilados de 15 aminoácidos de longitud que cubrían la región 166-196. Los péptidos inmunorreactivos se muestran en la Fig. 1c y el epítipo mínimo de AT270 fue PPAKPT(p)P (posición 176-182) (SEC. N° de ID 2).

1.5 Diseño del fosfopéptido y determinación del grado de fosforilación

Usando esta información del péptido, se sintetizó un fosfopéptido que cubría la posición 154 a 187. Esta secuencia cubre el epítipo de HT7 (159-163) y de AT270 (176-182) y otros 5 aminoácidos N-terminales respecto al epítipo de HT7 y C-terminales respecto al epítipo de AT270. La concentración exacta del fosfopéptido se determinó usando análisis de aminoácidos (Blennow *et al.*, 1995). Basado en esta concentración, el intervalo dinámico de un inmunoensayo ELISA basado en peroxidasa es entre 5 y 300 pM usando precisión de perfilamiento. Los coeficientes de variación intraensayo y entre ensayos fueron inferiores al 10%.

Para determinar en qué medida el grado de fosforilación se relaciona con los niveles absolutos de fosfotau (181) y tau total, se cuantificaron simultáneamente cinco preparaciones diferentes de tau en FHA en los ensayos respectivos. Se preparó tau de FHA de acuerdo con Goedert *et al.* (1992) usando N-lauroilsarcosinato al 1% para precipitar selectivamente tau de FHA de sobrenadantes de extractos de un cerebro. Se obtuvo tejido de la corteza temporal (FHA-A-D) o del hipocampo (FHA-E) de pacientes con EA del banco de cerebros Born-Bunge (Dr. P. Cras, Amberes, Bélgica).

Como se muestra en la Fig. 3, el grado de fosforilación de fosfoThr 181 fue diferente en las distintas preparaciones de tau de FHA. Suponiendo que la preparación de tau de FHA con los niveles más altos de fosfotau tiene un grado de fosforilación próximo al 100%, la relación fosfotau (181)/tau total sobreestima el grado de fosforilación al menos en 3,3 veces. No obstante, teniendo en cuenta que la relación fosfotau (181)/tau total sobreestima el grado de fosforilación, el estado de fosforilación de Thr 181 de tau en tau de LCR es un $59\% \pm 18\%$ (1,952/3,3) como máximo, que está bastante de acuerdo con el estado de fosforilación de Thr 181 en tau derivada de cerebro en condiciones normales (20-30%; Watanabe *et al.*, 1993; Matsuo *et al.*, 1994).

Ejemplo 2

Uso del fosfopéptido para la estandarización de un ensayo para determinar fosfotau (181) en pacientes con enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal y/o demencia vascular

2.1 Pacientes

Se incluyeron en el estudio 18 pacientes con DFT (intervalo de edad 48 a 77 años), 60 pacientes con EA (intervalo de edad para posible EA 68 a 88 años; para probable EA 58 a 90 años), 17 pacientes con encefalopatía arterioesclerótica subcortical (EAS; una supuesta forma de demencia vascular) (intervalo de edad 67 a 84 años), 15 pacientes con EP (intervalo de edad 59 a 82 años) y 17 controles (intervalo de edad 68 a 80 años). Sus características se resumen en la tabla 2.

Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían un diagnóstico clínico de DFT, EA, EAS o EP y fueron reclutados consecutivamente de estudios longitudinales prospectivos sobre pacientes con demencia o EP. Se establecieron los diagnósticos clínicos y se obtuvieron muestras de LCR. Luego se realizaron los análisis neuroquímicos en el Instituto de Neurociencias Clínicas, Sahlgrenska University Hospital, Mölndal, Suecia. Se excluyeron los pacientes con demencia inespecífica (por ejemplo, demencia mixta), antecedentes de enfermedad psiquiátrica grave (por ejemplo, esquizofrenia), alcoholismo crónico, enfermedad neurológica no degenerativa diferenciada (por ejemplo, hidrocefalia normotensiva), antecedentes de traumatismo craneoencefálico grave, infecciones graves del SNC, enfermedad sistémica (por ejemplo, tumores malignos) y causas secundarias de demencia (por ejemplo, hipotireosis) de acuerdo con el manual de Diagnóstico y estadística de trastornos mentales (Association AP, 1987) o criterios bioquímicos. También se excluyeron los pacientes con infartos cerebrales importantes y/o lagunas múltiples. Todos los pacientes incluidos fueron sometidos a una investigación clínica minuciosa, que incluyó una historia clínica, exámenes físicos, neurológicos y psiquiátricos, análisis de sangre de cribado (análisis clínicos pertinentes para descartar otras causas de demencia

por ejemplo, hipotiroidismo), análisis de rutina del LCR (por ejemplo, citología), ECG, radiografía de tórax, EEG, tomografía computarizada (CT) o imaginología por resonancia magnética (IRM) del cerebro, investigación del flujo sanguíneo cerebral regional (FSC), usando tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o técnica de inhalación de ¹³³Xenon (Cortexplorer; Risberg y Gustafson, 1983).

5

La DFT se diagnosticó de acuerdo con los criterios de Lund/Manchester (Brun *et al.*, 1994) según se describió previamente (Sjögren *et al.*, 1997). Ninguno de los pacientes con DFT tuvo signos de infarto, y sólo se encontraron cambios leves en la sustancia blanca de algunos pacientes con DFT.

10

El diagnóstico de “probable EA” se hizo por exclusión, de conformidad con los criterios de NINCDS-ADRDA (Mc Khann *et al.*, 1984). Los pacientes con EA se dividieron en un grupo con probable EA y otro con posible EA, de acuerdo con los criterios de NINCDS-ADRDA.

15

Los criterios diagnósticos para EAS fueron todos los siguientes: a) deterioro mental (predominantemente trastorno asteno-depresivo y disfunción cognitiva frontal; b) el trastorno de la marcha (ataxia y/o disfunción motriz); c) signos neurológicos focales; d) factores de riesgo vascular como hipertensión y diabetes, o presencia de vasculopatía sistémica; e) en resonancia magnética o tomografía computarizada, cambios en la sustancia blanca profunda bilaterales múltiples o subcorticales difusos - periventriculares (>2 mm), infartos lacunares, sistema ventricular agrandado y ausencia de más de un infarto cortical. Los criterios fueron compatibles con los sugeridos por otros (Bennett *et al.*, 1990). Quince de los pacientes con EAS no tenían infarto cortical; los cuatro restantes tenían un infarto cortical.

20

25

El diagnóstico de EP se hizo según las recomendaciones de Langstron y Koller (1991a, b). Todos los pacientes con EP presentaron al menos dos de tres de las características: bradicinesia, rigidez y temblor de reposo y todos los pacientes con EP fueron receptivos al tratamiento con L-dopa. Ningún paciente con EP mostró ningún signo de demencia, y todos tuvieron una puntuación de Mini examen del estado mental (MMSE) (Folstein *et al.*, 1975) de 27 o superior.

30

Todos los diagnósticos clínicos fueron hechos por médicos que no conocían los resultados de los análisis bioquímicos y viceversa. Ninguno de los pacientes fue tratado por demencia (por ejemplo, con inhibidores de la colinesterasa).

En los pacientes dementes, el grado de demencia se evaluó usando e MMSE (Folstein *et al.*, 1997).

35

Los pacientes normales de control y los pacientes con EP se incluyeron en el análisis de sensibilidad y especificidad del posible marcador.

El grupo de control constó de individuos sin antecedentes, síntomas ni signos de enfermedad psiquiátrica o neurológica, enfermedad maligna o trastornos sistémicos (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad infecciosa). Se usó el MMSE para evaluar su estado cognitivo, y se excluyeron los que tuvieron puntuaciones inferiores a 28.

40

Los Comités de Ética de las Universidades de Göteborg, Lund/Malmö y Linköping, Suecia, aprobaron el estudio. Todos los pacientes (o sus familiares más cercanos) y los controles dieron su consentimiento informado para participar en el estudio, que se llevó a cabo de conformidad con las disposiciones de la Declaración de Helsinki.

45

2.2 Análisis de LCR

Se realizó una punción lumbar en todos los pacientes y controles, en los espacios intervertebrales L3/L4 o L4/L5. Los 12 primeros mL de LCR se recogieron en tubos de polipropileno y se mezclaron suavemente para evitar efectos de gradiente (Blennow *et al.*, 1993). Al mismo tiempo, se extrajo una muestra de suero. Se excluyeron todas las muestras de LCR con más de 500 eritrocitos por μ l. El LCR y las muestras séricas se centrifugaron a 2.000 xg durante 10 min para eliminar las células y otro material insoluble. Después se almacenaron alícuotas -80°C hasta la realización del análisis bioquímico.

50

55

La determinación cuantitativa de albúmina en el suero y el LCR se realizó por nefelometría, usando el Nephelometer Analyzer de Behring (Behringwerke AG, Marburg, Alemania). La relación de albúmina en LCR/suero (Tibbling *et al.*, 1977) se calculó como [albúmina en LCR (mg/L)/albúmina en suero (g/L)] y se usó como medida de la función de la barrera hematoencefálica (BHE).

60

Se determinó tau en LCR usando un inmunoensayo ELISA tipo sándwich (INNOTEST hTau-Ag, Innogenetics, Gent, Bélgica), construido para medir tau total (tanto tau normal como tau en FHA), según se describió previamente en detalle (Vandermeeren *et al.*, 1993b; Blennow *et al.*, 1995).

El nivel de fosfotau (181) se determinó mediante el INNOTEST fosfotau (181P) según se describió anteriormente.

65

2.3 Análisis estadístico

Se hizo una distribución normal de todas las variables y por consiguiente se usaron estadísticas paramétricas para comparaciones de grupos con respecto a las variables de efecto (tau en LCR y fosfotau en LCR). Se realizó un análisis

multi factorial ANOVA con tau en LCR y fosfotau en LCR como variables dependientes, la edad, la duración y la gravedad de la demencia como covariables, y la categoría diagnóstica (probable y posible EA, DFT, EP, EAS y envejecimiento normal) como factor. Se excluyeron del análisis los factores que no contribuyeron a la varianza y se volvió a realizar el cálculo. Se llevaron a cabo comparaciones *a posteriori* utilizando pruebas de Turkey *a posteriori* para los n' desiguales.

La media de edad fue significativamente inferior en la EP ($p < 0,001$) y la probable EA ($p < 0,05$) que en la posible EA. Los pacientes con probable EA fueron significativamente más dementes que los pacientes con posible EA ($p < 0,05$). No se encontró ninguna diferencia entre ninguno de los grupos de pacientes ni de control con respecto a la relación albúmina en LCR/suero y el sexo (sólo para los grupos de demencia) (tabla 2).

2.4 Tau total en LCR y fosfotau (181) en LCR en la demencia, la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento normal

Tau en LCR fue significativamente mayor en la probable EA y en la posible EA en comparación con la DFT ($p < 0,001$), la EP ($p < 0,001$), La EAS ($p < 0,001$) y los controles ($p < 0,001$) y en la DFT en comparación con la EAS ($p < 0,01$) (tabla 3; fig. 4).

Fosfotau (181) en LCR fue significativamente mayor en la probable EA en comparación con la DFT ($p < 0,001$), la EP ($p < 0,001$), la EAS ($p < 0,001$) y los controles ($p < 0,0079$) y en la posible EA en comparación con la DFT ($p < 0,001$), y la EAS ($p < 0,001$), pero no en comparación con los controles. Además, la fosfotau (181) en LCR también fue significativamente menor en DFT ($p < 0,0001$) y en EAS ($p < 0,0001$) en comparación con los controles (tabla 3; fig. 5).

Tau en LCR y fosfotau (181) en LCR se correlacionaron positivamente en todos los grupos de diagnóstico (probable y posible EA: $r = 0,86$, $p < 0,001$; DFT: $r = 0,66$, $p < 0,01$; EAS: $r = 0,58$, $p < 0,05$; EP: $r = 0,62$; $p < 0,05$; controles: $r = 0,65$, $p < 0,01$; fig. 6).

Se calculó una relación fosfotau (181) en LCR/tau total en LCR y se encontró que era significativamente menor en la probable EA ($p < 0,001$; $1,16 \pm 0,24$), la posible EA ($p < 0,001$; $1,10 \pm 0,20$), y la DFT ($p < 0,001$; $0,88 \pm 0,34$) en comparación con los controles ($p < 0,001$ para los tres grupos; $1,95 \pm 0,60$), la EP ($p < 0,001$ para los tres grupos; $1,92 \pm 0,42$), y la EAS ($p < 0,001$ para los tres grupos; $1,96 \pm 1,08$) (tabla 3; fig. 7).

Ejemplo 3

Determinación del nivel de fosfotau (181) en LCR y tau total en LCR en los pacientes con enfermedad de Alzheimer frente a los pacientes con accidente cerebrovascular isquémico

3.1 Pacientes

Se examinaron tau total en LCR y fosfotau (181) en LCR en muestras de LCR longitudinales de 22 pacientes, 16 hombres y 6 mujeres con una media de edad \pm DE de $65,7 + 9,2$ años, con un accidente cerebrovascular isquémico. Se evaluaron todos los pacientes de manera estandarizada, según se describió previamente (Tarkowski *et al.*, 1999). Cuando fue posible, las muestras de LCR se recogieron en cinco ocasiones; al ingreso día 0-1 ($n = 9$), día 2-3 ($n = 18$), días 7-9 ($n = 22$), a las tres semanas ($n = 21$) y a los 3-5 meses ($n = 21$).

También se estudiaron 54 pacientes con probable EA, 25 hombres y 29 mujeres con una media de edad + DE, de $73,3 + 7,4$ años y 17 controles sanos, 4 hombres y 13 mujeres con una media de edad + DE de $68,6 + 7,5$ años. La media de edad fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en la EA que en el grupo de control. El diagnóstico de "probable EA" se hizo por exclusión, de acuerdo con los criterios de NINCDS-ADRDA (McKhann *et al.*, 1984). La evaluación clínica y el procedimiento diagnóstico se describieron en detalle en otra parte (Andreasen *et al.*, 1998, 1999). Se evaluó el grado de demencia usando al MMSE (Folstein, 1975) y fue de $23,8 + 4,4$ en el grupo de la EA. El grupo de control constó de individuos sin antecedentes, síntomas ni signos de enfermedad psiquiátrica o neurológica, enfermedad maligna o trastornos sistémicos. No se incluyeron individuos con puntuaciones de MMSE inferiores a 28. Todos los diagnósticos clínicos se hicieron sin conocimiento de los resultados de los análisis bioquímicos y viceversa.

Los pacientes con accidente cerebrovascular se examinaron por tomografía computarizada (TCT) e imaginología por resonancia magnética (IRM) aproximadamente 1 mes después del accidente cerebrovascular, según se describió en detalle previamente (Tarkowski *et al.*, 1999). Se determinó el tamaño (en cm^2) por TC y el volumen (en mL) por MRI.

Se usó la prueba de Kruskal-Wallis para las comparaciones entre tres o más grupos, y si era indicativa de algo, la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre dos grupos. Para las correlaciones se usó el coeficiente de correlación de Spearman.

Los Comités de Ética de las Universidades de Göteborg y Umeå aprobaron el estudio. Todos los pacientes (o sus familiares más cercanos) y los controles dieron su consentimiento informado para participar en el estudio, que se llevó a cabo de acuerdo con las disposiciones de la Declaración de Helsinki.

3.2 Análisis de LCR

Se realizó una punción lumbar en el espacio intervertebral L3/L4 o L4/L5. Los 12 primeros mL del LCR se recogieron en tubos de polipropileno y se mezclaron suavemente para evitar posibles efectos de gradiente (Blennow, 1993).

Se excluyeron las muestras de LCR con más de 500 eritrocitos por μl .

Las muestras de LCR se centrifugaron a 2.000 xg durante 10 min, para eliminar las células y otro material insoluble, y después se almacenaron alícuotas a -80°C en espera de los análisis bioquímicos.

El nivel de tau en LCR se determinó usando un inmunoensayo ELISA tipo sándwich (Innotest hTAU-Ag, Innogenetics, Gent, Bélgica), construido para medir tau total (tanto tau normal como tau en FHA), según se describió en detalle previamente (Vandermeeren *et al.*, 1993b, Blennow *et al.*, 1995). El nivel de fosfotau (181) en LCR se determinó mediante el INNOTEST fosfotau (181P) según se describió antes.

3.3 Fosfotau (181) en LCR y tau total en LCR en los pacientes con enfermedad de Alzheimer y en los pacientes con accidente cerebrovascular

En los pacientes con accidente cerebrovascular, la tau total en LCR experimentó un marcado aumento en el día 2-3 (24,4 + 7,4 pM; $p = 0,002$) después del accidente cerebrovascular en comparación con el día 0-1 (media + EEM 5,4 + 1,2 pM) y permaneció elevada en los días 7-9 (24,1 + 4,3 pM; $p < 0,0001$) y después de tres semanas (25,0 + 4,1 pM; $p < 0,0001$) y luego recuperó los niveles normales después de 3-5 meses (8,5 + 1,2 pM; $p = 0,35$) (Fig. 8). En la Fig. 9 se presentan los valores de tau total en LCR de cada uno de los nueve pacientes a los que se les extrajo una muestra de LCR al inicio.

En contraposición, no hubo ningún cambio significativo en fosfotau (181) en LCR entre el inicio (media + EEM 9,1 + 3,1 pM) y el día 2-3 (10,9 + 1,0 pM), los días 7-9 (13,0 + 2,1 pM), a las tres semanas (11,5 + 2,0 pM) o a los 3-5 meses (10,6 + 2,0 pM) (fig. 8). En la fig. 9 se presentan los valores de fosfotau (181) en LCR de cada uno de los nueve pacientes a los que se les extrajo una muestra de LCR al inicio.

Tau total en LCR aumentó significativamente en la probable EA (media + DE 14,4 + 5,5 pM) en comparación con los controles (8,3 + 2,8 pM) ($p < 0,0001$). También fosfotau (181) en LCR aumentó significativamente en la probable EA (20,5 + 6,5 pM) en comparación con los controles (15,9 + 5,7 pM) ($p < 0,05$).

Tau total en LCR y fosfotau (181) en LCR se correlacionaron positivamente en la EA ($r = 0,93$; $p < 0,0001$) y en los grupos de control ($r = 0,72$, $p < 0,01$) (fig. 10). En el grupo del accidente cerebrovascular, la correlación fue mayor en el día 0-1 ($r = 0,63$, $p < 0,001$) y después de 3 meses ($r = 0,80$), que en el día 2-3 ($r = 0,54$), los días 7-9 ($r = 0,58$) y especialmente después de tres semanas ($r = 0,15$).

De la fig. 10 se desprende claramente que hay una diferencia entre la relación fosfotau (181) en LCR/ tau total en LCR en los pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con los pacientes con accidente cerebrovascular. El análisis de regresión para los valores obtenidos de los pacientes con enfermedad de Alzheimer ($y = 0,82x + 4,39$; $r = 0,90$, $p < 0,0001$) y de los pacientes con accidente cerebrovascular ($y = 0,17x + 8,09$; $r = 0,415$, $p < 0,0001$) reveló una diferencia significativa ($p < 0,001$).

Hubo una correlación positiva entre el tamaño del infarto medido por TC y el nivel máximo de tau total en LCR ($r = 0,72$; $p < 0,01$), en tanto la correlación para fosfotau (181) en LCR no fue significativa ($r = 0,349$). También hubo una correlación positiva entre el volumen del infarto medido por IRM y el valor máximo de tau total en LCR ($r = 0,66$; $p < 0,05$), en tanto la correlación para fosfotau (181) en LCR no fue significativa ($r = 0,59$).

Bibliografía

Andreadis A., Brown W. and Kosik K. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochem.* 31: 10.626-10.633.

Andreasen N., Vanmechelen E., Van de Voorde A., Davidsson P., Hesse C., Tarvonen S., Råihä 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 Neural. Neurosurg. Psychiatry* 64: 298-305.

Andreasen N., Minthon L., Clarberg A., Davidsson P., Gottfries J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Winblad B., Blennow K. (1999) Sensitivity, specificity and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 53: 1.488-1.494.

Arbit E., Cheung N.K., Yeh S.D., Daghighian F., Shang J.J., Cordon-Cardo C., Pentlow K., Canete A., Finn R. and Larson S.M. (1995) Quantitative studies of monoclonal antibody targeting to disialogangliosid GD2 in human brain tumors. *Eur. J. Nucl. Med.* 22:419-426.

ES 2 274 869 T3

- Association AP (1987) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3rd ed. (revised). *Cambridge University Press*, Washington DC., US.
- 5 **Atherton and Shepard** (1989) Solid phase peptide synthesis. *IRL Press*, Oxford, UK.
- Bennett D.A., Wilson R.S., Gilley D.W. and Fox J.H.** (1990) Clinical diagnosis of Binswanger's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 53: 961-965.
- 10 **Binder L.I., Frankfurter A. and Rebhun L.I.** (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101: 1.371-1.378.
- Blennow K., Fredman P., Wallin A., Gottfries C.-G., Langstrom L. and Svennerholm L.** (1993) Protein analysis in cerebrospinal fluid. I. Influence of concentration gradients for proteins on cerebrospinal fluid/serum albumin ratio, *European Neurology* 33: 126-128.
- 15 **Blennow K., Wallin A., Agren H., Spenger C., Siegfried J. and Vanmechelen E.** (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26: 231-245.
- 20 **Bramblett G., Trojanowski J. and Lee V.** (1992) Regions with abundant neurofibrillary pathology in human brain exhibit a selective reduction in levels of binding-competent tau and accumulation of abnormal tau isoforms (A68 proteins). *Lab. Invest.*, 66: 212-222.
- Bramblett G., Goedert M., Jakes R., Merrick S., Trojanowski J. and 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: 1.089-1.099.
- 25 **Brion J., Passareiro J., Nunez J. and 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.
- 30 **Brun A.** (1987) Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type, 1. *Neuropathology. Arch. Gerontol. Geriatr.* 6: 193-208.
- Brun A.** (1993) Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type revisited. *Dementia* 4:126-131.
- 35 **Brun A., Englund B., Gustafsson L., Passant U., Mann D.M.A., Neary D. and Snowden J.S.** (1994) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *J. Neurol., Neurosurgery and Psych.* 57: 416-418.
- 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.
- 40 **Delacourte A. and 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.
- 45 **Delacourte A., Flament S., Dibe E., Hublau P., Sablonniere B., Hemon B., Sherrer V. and Défossez 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.
- Delacourte A., Buée L. and 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.
- 50 **DeLeys R., Hendrickx G., Dekeyser P., Demol H., Raymakers J., Brasseur R., Borremans F., Vanmechelen E. and Van de Voorde A.** (1996) Mapping and sequence requirements of the phosphorylation-sensitive epitopes recognized by the monoclonal antibodies Tau1, BT2, and AT8. In: Schneider C.H. (ed.) Peptides in *Immunology*. John Wiley & Sons, New York, NY, US. Pp. 239-244.
- 55 **Ebly E.M., Parhad I.M., Hogan D.B. and Fung T.S.** (1994) Prevalence and types of dementia in the-very old: results from the Canadian Study of Health and Aging. *Neurology* 44: 1.593-1.600.
- 60 **Flament S. and Delacourte A.** (1990) Tau Marker? *Nature* 346: 6.279.
- Folstein M., Folstein S. and Me Hugh P.** (1975) "Mini-mental State" A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychol. Res.* 12: 189-198.
- 65 **Ghanbari H., Kozuk T., Miller B. and Riesing S.** (1990) A sandwich enzyme immunoassay for detecting and measuring Alzheimer's disease-associated proteins in human brain tissue. *J. Clin. Laboratory Anal* 4: 189-192.

- Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D. and 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.
- 5 Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J. and Crowther R.A. (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.
- Goedert M., Jakes R., Crowther R., Six J., Lübke U., Vandermeeren M., Cras P., Trojanowski J.Q. and 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: 5.066-5.070.
- 10 Goedert M., Jakes R., Crowther R.A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandermeeren M. and 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.
- 15 Goedert M., Crowther R.A., Spillantini M.G. (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21: 955-958.
- Greenberg S. and 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: 5.827-5.831.
- 20 Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y., Quinlan M., Wisniewski H. and Binder L. (1986) Abnormal phosphorylation of the micro tubule-associated protein (tau) in Alzheimer's cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 4.913-4.917.
- 25 Gustafson L. (1993) Clinical picture of frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. *Dementia* 4: 143-148.
- 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 nano-electrospray mass spectrometry, *J. Neurochem.* 71: 2.465-2.476.
- 30 Hasegawa M., Morishima-Kawashima M., Takio K. Suzuki M., Titani K. and Ihara Y. (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem* 267: 17.047-17.054.
- 35 Himmler A. (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts. *Mol. Cell Biol.* 9(4): 1.389-96.
- Houbenweyl (1974) Method of organic chemistry. Vol. 15-I et II. Eds. E Wunch, Thieme, Stuttgart, Germany.
- 40 Huang Q., He G., Lan Q., Li X., Qian Z. Chen J. Lu Z. and Du Z. (1996) Target imaging diagnosis of human brain glioma. Clinical analysis of 40 cases. *Nucl. Med. Commun.* 17:311-316.
- Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Smith A., George L., Tung Y. and Zaidi T. (1989) Identification and localisation of a Tau peptide to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Proc.Natl. Acad. Sci. (USA)* 86: 5.646-5.650.
- 45 Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M. and Ihara Y. (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834.
- Kosik K.S., Joachim C.L. and 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.)* S3: 4.044-4.048.
- 50 Ksiezak-Reding H., Liu W.K. and Yen S.H. (1992) Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res.* 597: 209-219.
- 55 Langstron J.W. and Koller W.C. (1991a) Preclinical detection of Parkinson's disease. The next frontier: presymptomatic detection. Introduction. *Geriatrics* 46 Suppl. 1; 5-7.
- Langstron J.W. and Koller W.C. (1991b) The next frontier in Parkinson's disease: presymptomatic detection. *Neurology* 41: 5-7.
- 60 Lee V., Balin B., Otvos L. and Trojanowski J. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251(4994): 675-8.
- Lewis S., Wang D. and Cowan N. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with Tau protein. *Science* 242: 936-939.
- 65 Mann D., McDonagh A., Snowden J., Neary D. and Pickering-Brown S. (2000) Molecular classification of the dementias. *The Lancet* 355: 626.

- Matsuo E.S., Shin R.W., Billingsley M.L., Van de Voorde A., O'Connor M., Trojanowski J.Q. and Lee V.M.** (1994) Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13: 989-1002.
- 5 **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.
- 10 **Mercken M., Vandermeersen M., Lübke U., Six J., Boons J., Vanmechelen E., Van de Voorde A. and Gheuens J.** (1992) Affinity purification of human tau proteins and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human tau detection. *J. Neurochem.* 58: 548-553.
- 15 **Risberg J. and Gustafson L.** (1983) ¹³³Xe cerebral blood flow in dementia and in neuropsychiatry research. In: Magistretti P.L. (ed.) *Functional Radionuclide Imaging of the brain.* Raven Press, New York, NY, US, Pp. 151-159.
- 20 **Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sandrock D., Verheggen R., Helwig A.T., Munz D.L., Markakis E. and Emrich D.** (1996) Immunoscintigraphy for the detection of brain abscesses. *Nucl. Med. Commun.* 17: 311-316.
- Selden S. and Pollard T.** (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 258(11): 7064-71.
- 25 **Sjögren M., Edman A. and Wallim A.** (1997) Symptomatology characteristics distinguish between frontotemporal dementia and vascular dementia with a dominating frontal lobe syndrome. *Int. J. Geriatric Psychiatry* 12: 656-661.
- 30 **Spillantini M.G. and Goedert M.** (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 21: 428-433.
- Tamada K., Fujinaga S., Watanabe R., Yamashita R., Takeuchi Y. and 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.
- 35 **Tarkowski E., Rosengren L., Blomstrand C., Jensen C., Ekholm S. and Tarkowski A.** (1999) Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 30:323-327.
- 40 **Tibbling G., Link H. and Ohman S.** (1977) Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 37: 385-390.
- Tomlinson B.E. and Corsellis J.A.N.** (1984) Ageing and the dementias. In: Hume Adams J., Corsellis J.A.N., Duchon L.W. (eds.) *Greenfield's neuropathology.* Edward Arnold, London, UK. Pp. 951-1025.
- 45 **Vandermeeren M., Lübke U., Six J. and Cras P.** (1993a) The phosphatase inhibitor okadaic acid induces a phosphorylated paired helical filament tau epitope in human LA-N-5 neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.* 153: 57-60.
- 50 **Vandermeeren M., Mercken M., Vanmechelen E., Six J., Van de Voorde A., Martin J.J. and Cras P.** (1993b) Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 61: 1.828-1.834.
- Vermersch P., Bordet R., Ledoze F., Ruchoux M.M., Chapon F., Thomas P., Destee A., Lechevallier B. and Delacourte A.** (1995) C R Demonstration of a specific profile of pathological Tau proteins in frontotemporal dementia cases. *Acad. Sci.* 318: 439-445.
- 55 **Wakabayashi T., Yoshida J., Okada H., Sugita K., Itoh K., Tadokoro M. and Ohshima M.** (1995) Radioimaging of human glioma by indium-111 labelled G-22anti-glioma monoclonal antibody. *Noshuyo-Byori* 12: 105-110.
- 60 **Watanabe A., Hasegawa M., Suzuki M., Takio K., Morishima-Kawashima M., Titani, K., Arai T., Kosik K.S. and Ihara Y.** (1993) *In vivo* phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J. Biol. Chem.* 268: 25.712-25.717.
- Wood J., Mirra S., Pollock N. and 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: 4.040-4.043.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo, donde dicho método comprende los pasos de:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra obtenida de dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicha muestra con la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra obtenida de los individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en la muestra obtenida de los individuos de control constituye una indicación.

2. Un método *in vitro* para el diagnóstico diferencial de un tauopatía frente a una no-tauopatía en un individual, donde dicho método comprende los pasos de:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra obtenida de dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicha muestra con la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra obtenida de individuos que sufren una no-tauopatía o con la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra obtenida de individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en la muestra obtenida de individuos que sufren una no-tauopatía o con la muestra obtenida de los individuos de control constituye una indicación.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 donde dicha no-tauopatía es una neurodegeneración no-tauopática.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3 donde dicha no-tauopatía es demencia vascular, enfermedad de Creutzfeldt Jacob, accidente cerebrovascular y/o neurotoxicidad en pacientes con leucemia.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde dicho método comprende los pasos siguientes:

- determinar la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenida de dicho individuo;
- inferir que dicho individuo sufre una tauopatía por comparación de la relación fosfotau (181)/tau total obtenida en dicha muestra de LCR con la relación fosfotau (181)/tau total en la muestra de LCR obtenida de individuos que sufren una no-tauopatía o con la relación fosfotau (181)/tau total en una muestra de LCR obtenida de los individuos de control, donde una relación fosfotau (181)/tau total alterada en comparación con dicha relación en la muestra de LCR obtenida de individuos que sufren una no-tauopatía o con la muestra de LCR obtenida de los individuos de control constituye una indicación.

7. Un anticuerpo que reconoce específicamente a tau y un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181) para usar en un método para el diagnóstico *in vivo* de una tauopatía y/o para el diagnóstico diferencial *in vivo* de una tauopatía frente a una no-tauopatía.

8. El uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a tau y de un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181) para la fabricación de un juego de reactivos para el diagnóstico *in vivo* de una tauopatía y/o para el diagnóstico diferencial *in vivo* de una tauopatía frente a una no-tauopatía.

9. Un fosfopéptido sintético de 15 a 100 aminoácidos responsable de formar un complejo inmunológico con el anticuerpo monoclonal HT7 y el anticuerpo monoclonal AT270, que comprende al menos:

- el epítipo mínimo de HT7: PPGQK (SEC. N° de ID 1) y
- el epítipo mínimo de AT270: PPAPKT(p)P (SEC. N° de ID 2)

10. Un fosfopéptido de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho fosfopéptido comprende la secuencia siguiente:

PRGAAPPGQKQGQANATRIPAKTPPAPKT(p)PPSSGE (SEC. N° de ID 3)

o secuencias variantes en las condiciones en las que todavía se une a los anticuerpos monoclonales HT7 y AT270.

ES 2 274 869 T3

11. El uso de un fosfopéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 en un método para medir el nivel de fosfotau (181).

5 12. Un juego de reactivos de diagnóstico para el diagnóstico de una tauopatía en un individuo y/o para el diagnóstico diferencial de una tauopatía frente a una no-tauopatía que comprende al menos:

- un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181);
- un anticuerpo que reconoce a tau total.

10

13. Un juego de reactivos de diagnóstico que comprende al menos un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10.

15 14. Un juego de reactivos de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 que comprende al menos:

- un anticuerpo que reconoce específicamente a fosfotau (181);
- un anticuerpo que reconoce a tau total;
- un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10.

20

15 15. El uso de un juego de reactivos de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para el diagnóstico *in vitro* de una tauopatía y/o para el diagnóstico diferencial *in vitro* de una tauopatía frente a una no-tauopatía de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

25

30 16. El uso de un juego de reactivos de diagnóstico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para el diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 y/o para el diagnóstico diferencial *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal esporádica y/o la demencia frontotemporal con parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 frente a la demencia vascular, la enfermedad de Creutzfeldt Jacob, el accidente cerebrovascular y/o la neurotoxicidad en pacientes con leucemia.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 2

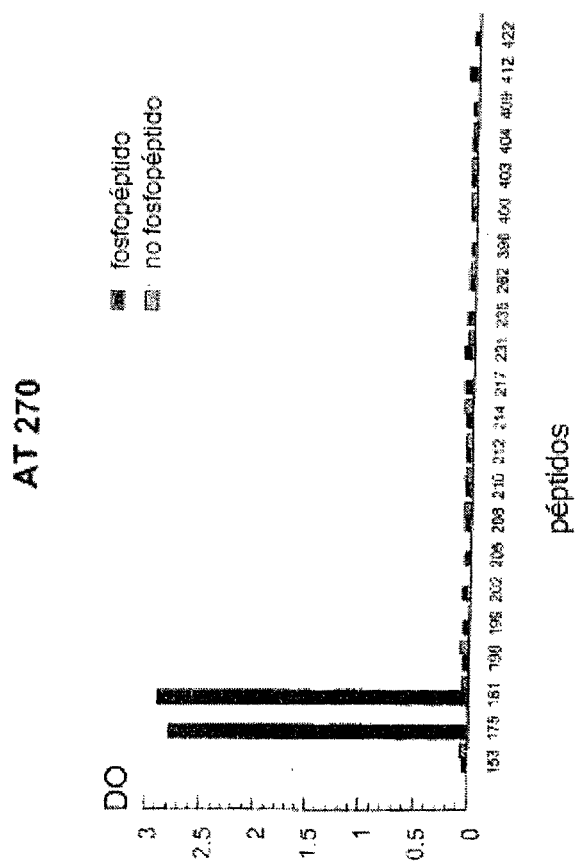


FIGURA 3

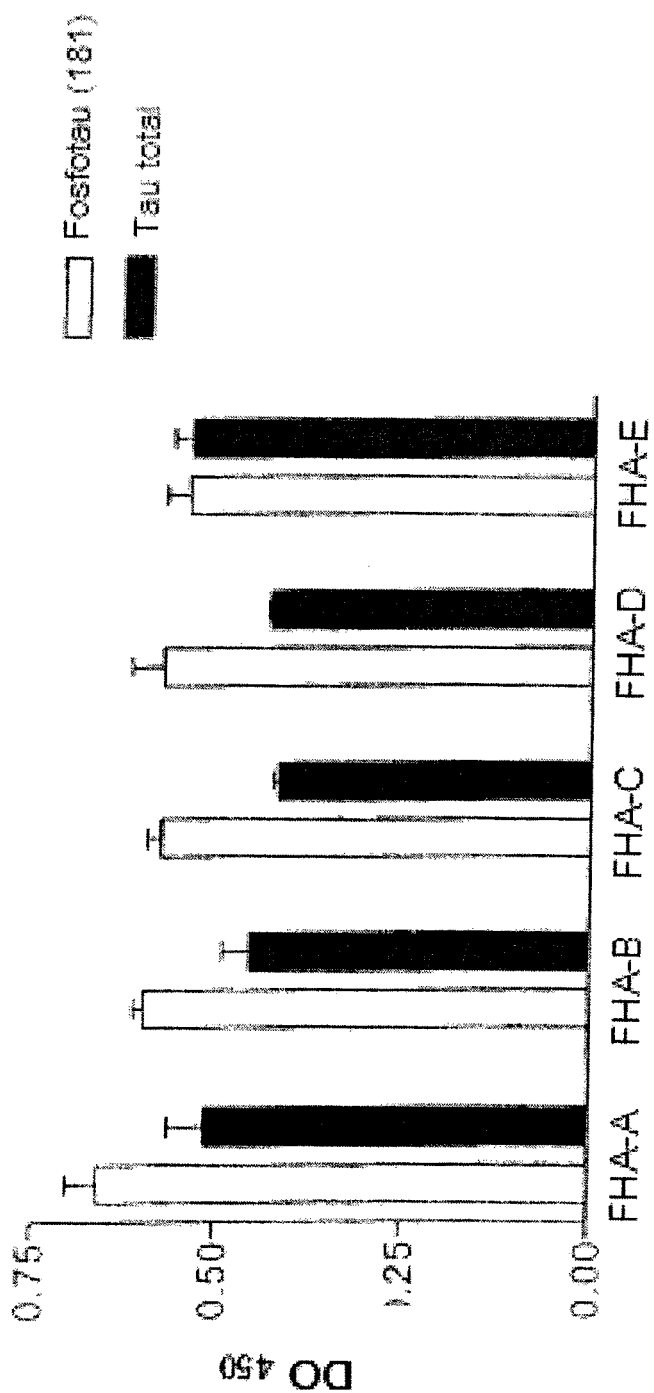


FIGURA 4

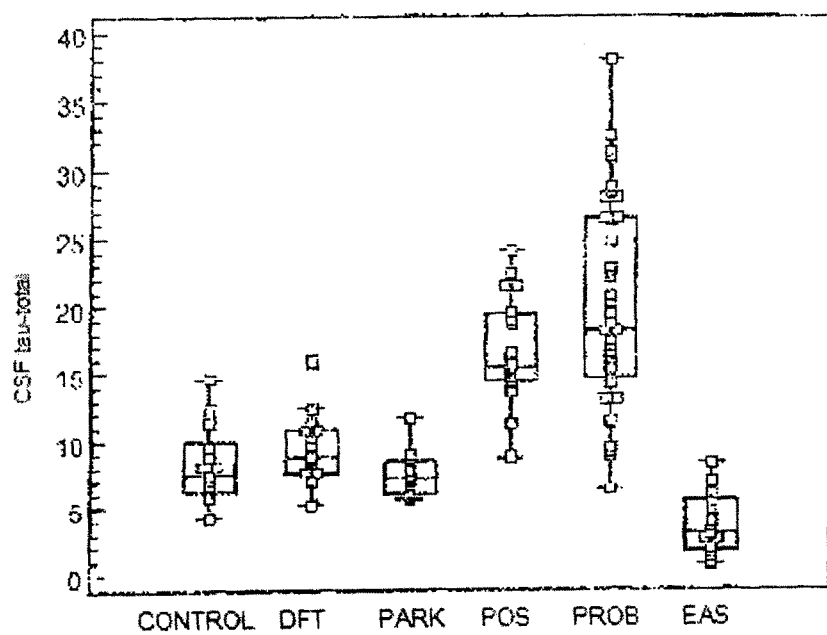


FIGURA 5

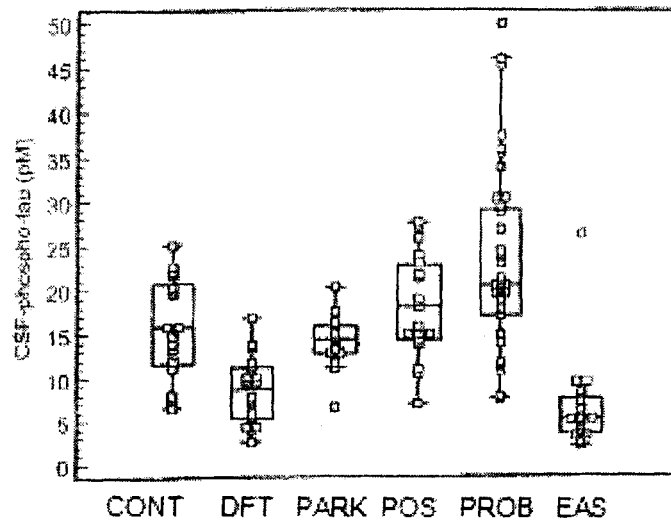


FIGURA 6

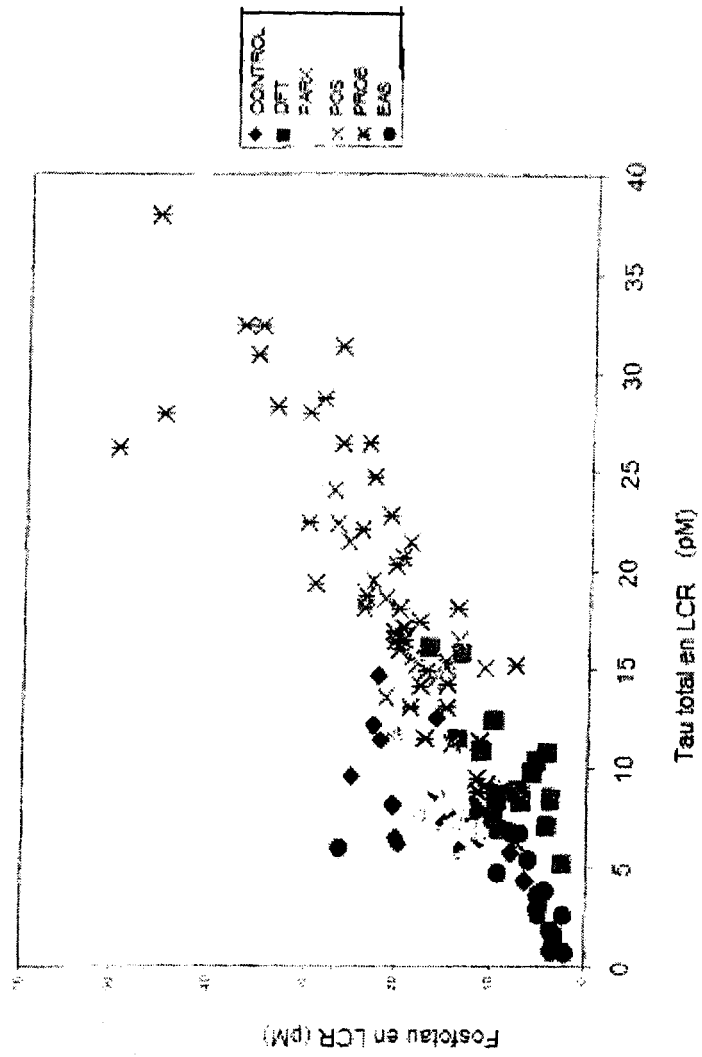


FIGURA 7

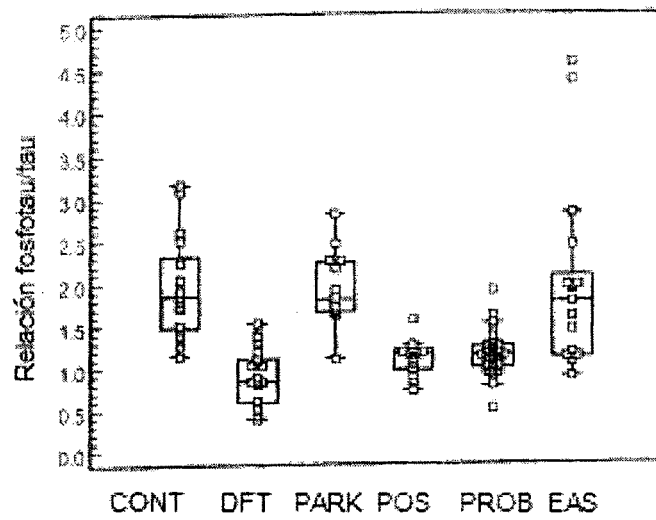


FIGURA 8

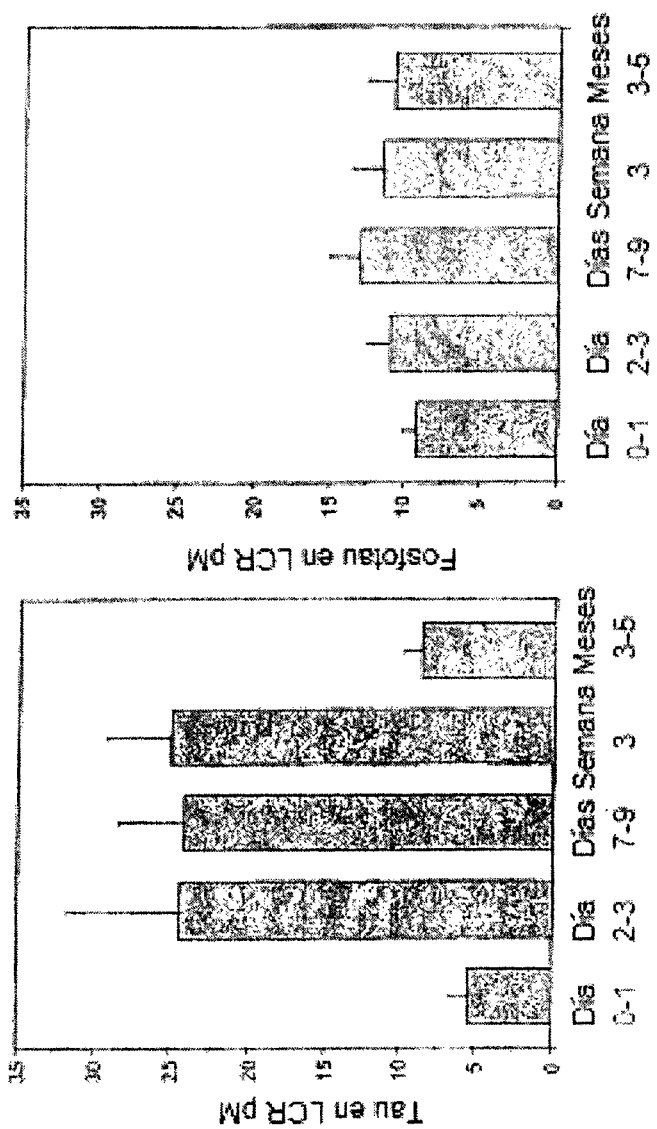


FIGURA 9

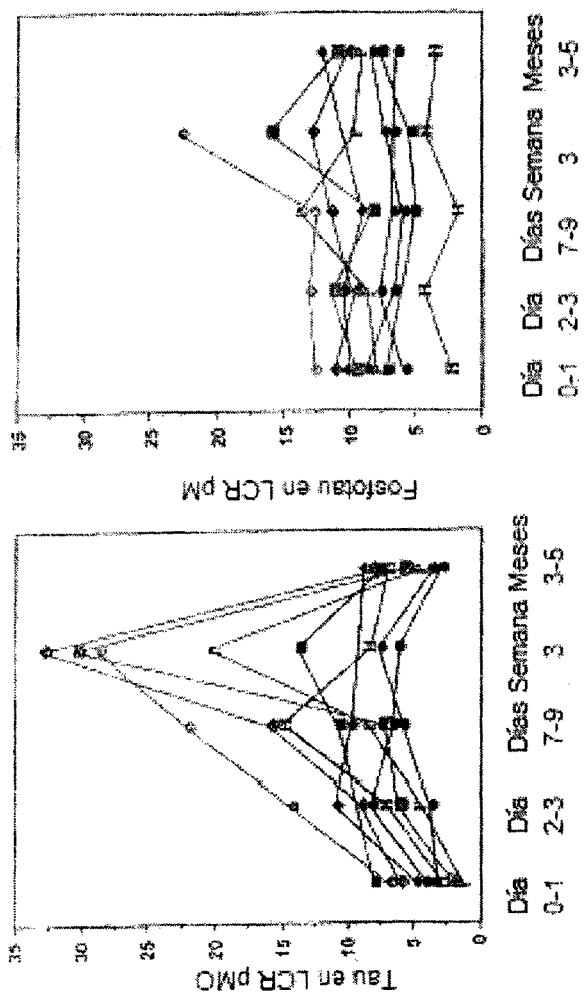
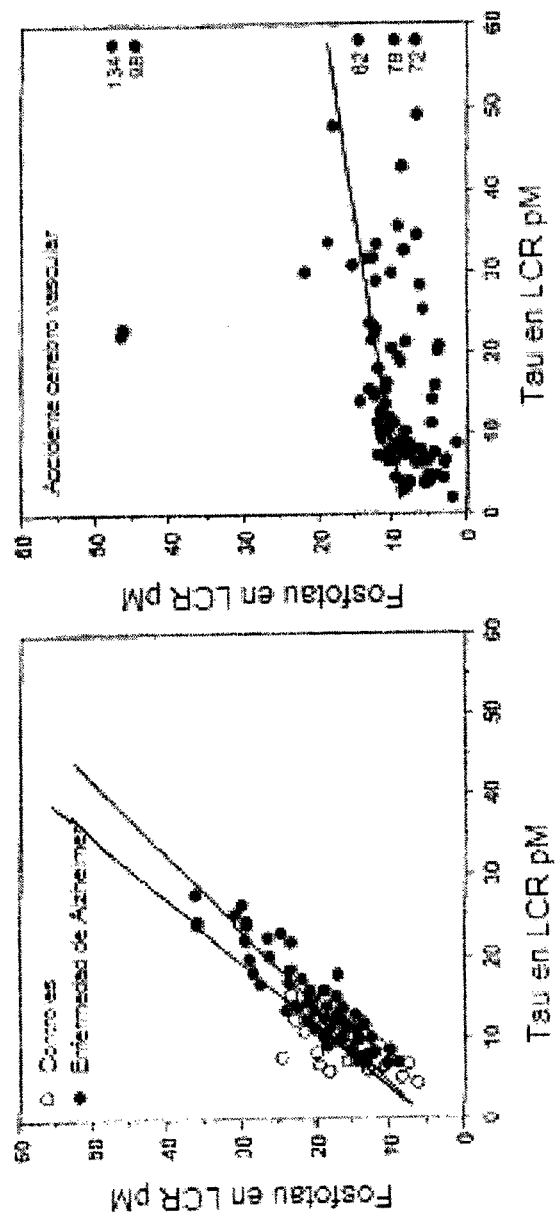


FIGURA 10



ES 2 274 869 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INNOGENETICS N.V.

5 <120> Diagnóstico de tauopatías
<130> PCT.112.T181

<140>
10 <141>

<150> 00870008.8
15 <151> 2000-01-24

<150> 00870280.5
<151> 2000-11-22

20 <150> 60/178,391
<151> 2000-01-27

<160> 54
25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
30 <211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

Pro Pro Gly Gln Lys
1 5

40

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
45 <213> *Homo sapiens*

<220>
50 <221> MOD_RES
<222> (6)
<223> FOSFORILACIÓN

55 <400> 2

Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro
1 5

60 <210> 3
<211> 34
<212> PRT
65 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 274 869 T3

<221> MOD_RES
<222> (28)
<223> FOSFORILACIÓN

5
<400> 3

10 Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr
1 5 10 15
Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser
20 25 30
Gly Glu

15
<210> 4
<211> 35
<212> DNA
20 <213> *Homo sapiens*
<400> 4

25 catggctgag ccccgccagg agttcgaagt gatgg 35

<210> 5
<211> 32
30 <212> DNA
<213> *Homo sapiens*
<409> 5

35 cctgatcaca aacctgctt ggccaggag gc 32

<210> 6
40 <211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 6
Asp Arg Ser Gly Tyr Ser
1 5

50
<210> 7
<211> 7
<212> PRT
55 <213> *Homo sapiens*
<400> 7

60 Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
1 5

<210> 8
65 <211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 274 869 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
5 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 8
10 Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala
1 5 10 15
Pro Pro Gly Gln Lys
20

15 <210> 9
<211> 21
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MOD_RES
25 <222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 9
30 Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys
1 5 10 15
Thr Pro Pro Ser Ser
20

35 <210> 10
<211> 22
40 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
45 <221> MOD_RES
<222> (12)
<223> FOSFORILACIÓN

50 <400> 10

Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
55 Gly Glu Pro Pro Lys Ser
20

<210> 11
60 <211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65 <220>
<221> MOD_RES

ES 2 274 869 T3

<222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

5 <400> 11

Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly
1 5 10 15
10 Thr Pro Gly Ser Arg
20

<210> 12
<211> 21
15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

25 <400> 12

Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr
1 5 10 15
30 Pro Gly Ser Arg Ser
20

35 <210> 13
<211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)

45 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 13

50 Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly
1 5 10 15
Ser Arg Ser Arg Thr
20

55 <210> 11
<211> 21
<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MOD_RES

65 <222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

ES 2 274 869 T3

<400> 14

Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser
1 5 10 15
5 Arg Thr Pro Ser Leu
20

<210> 15

10 <211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (11)

20 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 15

Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro
1 5 10 15
25 Ser Leu Pro Thr Pro
20

30 <210> 16

<211> 21

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MOD_RES

40 <222> (11)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 16

Ser Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu
1 5 10 15
45 Pro Thr Pro Thr Arg
50 20

<210> 17

<211> 21

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

60 <221> MOD_RES

<222> (11)

<223> FOSFORILACIÓN

65

ES 2 274 869 T3

<400> 17
Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
1 5 10 15
5 Pro Thr Arg Glu Pro
20

<210> 18
10 <211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
20 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 18
25 Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Thr
1 5 10 15
Arg Glu Pro Lys Lys
20

30 <210> 19
<211> 21
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MOD_RES
40 <222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 19
45 Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Thr Arg Glu Pro
1 5 10 15
Lys Lys Val Ala Val
20

50
<210> 20
<211> 20
55 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
60 <221> MOD_RES
<222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

65

ES 2 274 869 T3

<400> 20

Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Lys Ser Pro Ser
1 5 10 15
5 Ser Ala Lys Ser
20

<210> 21

10 <211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (11)

20 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 21

Lys Lys val Ala Val Val Arg Thr Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
1 5 10 15
25 Ser Arg Leu Gln
20

30 <210> 22

<211> 12

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MOD_RES

40 <222> (7)

<223> FOSFORILACIÓN)

<400> 22

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

50 <210> 23

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <220>

<221> MOD_RES

<222> (11)

60 <223> FOSFORILACIÓN

65

ES 2 274 869 T3

<400> 23
Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Asp
1 5 10 15
5 Thr Ser Pro Arg His
20

<210> 24
10 <211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)
20 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 24
25 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Asp Thr Ser Pro Arg
1 5 10 15
His Leu Ser Asn Val
20

30 <210> 25
<211> 21
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MOD_RES
40 <222> (11)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 25
45 Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
1 5 10 15
Ser Asn Val Ser Ser
20

50
<210> 26
<211> 20
55 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
60 <221> MOD_RES
<222> (10)
<223> FOSFORILACIÓN

65

ES 2 274 869 T3

<400> 26

5 Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
1 5 10 15
Val Ser Ser Thr
20

<210> 27

10 <211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (11)

20 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 27

25 Val Val Ser Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr
1 5 10 15
Gly Ser Ile Asp Met
20

30 <210> 28

<211> 21

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MOD_RES

40 <222> (11)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 28

45 Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile
1 5 10 15
Asp Met Val Asp Ser
20

50

<210> 29

<211> 21

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

60 <221> MOD_RES

<222> (11)

<223> FOSFORILACIÓN

65

ES 2 274 869 T3

<400> 29

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
1 5 10 15
5 Leu Ala Asp Glu Val
20

<210> 30

10 <211> 78

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 30

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
1 5 10 15
20 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
20 25 30
25 Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
35 40 45
30 Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
50 55 60
35 Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro
65 70 75

<210> 31

<211> 9

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

45 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys
1 5

50 <210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 32

60 Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly
1 5

<210> 33

<211> 9

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 274 869 T3

<400> 33

Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln
1 5

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

15

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala
1 5

<210> 35

20

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 35

Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn
1 5

30

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

40

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser
1 5

<210> 37

45

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 37

Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser
1 5

55

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

60

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

65

Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro
1 5

ES 2 274 869 T3

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 39
10 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly
1 5

<210> 40
15 <211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 40
1 Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
1 5 10

25 <210> 41
<211> 12
<212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 41
35 Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys
1 5 10

<210> 42
40 <211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 42
45 Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val
1 5 10

50 <210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
55

<400> 43
60 Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala
1 5 10

<210> 44
<211> 12
65 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 274 869 T3

<400> 44

Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val
1 5 10

5

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

15

Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val
1 5 10

<210> 46

20

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)

30

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 46

35

Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro
1 5 10 15

<210> 47

40

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> FOSFORILACIÓN

50

<400> 47

55

Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

60

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

65

<221> MOD_RES

<222> (12)

ES 2 274 869 T3

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 48

5 Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser
1 5 10 15

<210> 49

10 <211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)

20 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 49

25 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15

<210> 50

30 <211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)

40 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 50

45 Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

50 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <221> MOD_RES
<222> (9)

<223> FOSFORILACIÓN

60 <400> 51

65 Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu
1 5 10 15

<210> 52

ES 2 274 869 T3

<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5
<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)

10
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 52

15 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro
 1 5 10 15

<210> 53
20 <211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)

30 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 53

35 Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 54
40 <211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)

<223> FOSFORILACIÓN

50
<400> 54

55 Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys
 1 5 10 15

60

65