

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 665**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2005 E 05755789 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1794313**

54 Título: **Procedimientos de cribado usando c-abl, fyn y sky en combinación con la proteína tau**

30 Prioridad:

**21.06.2004 US 580901 P**

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

**26.07.2013**

73 Titular/es:

**PROTEOME SCIENCES PLC (50.0%)  
Coveham House, Downside Bridge Road Cobham  
Surrey KT11 3EP , GB y  
KING'S COLLEGE LONDON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WARD, MALCOLM;  
BYERS, HELEN;  
ANDERTON, BRIAN, HENRY;  
DERKINDEREN, PASCAL;  
REYNOLDS, CHRISTOPHER HUGH y  
WILLIAMSON, RITCHIE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 415 665 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

Procedimientos de cribado usando c-abl, fyn y sky en combinación con la proteína tau

5 **Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos de cribado, y más en particular, a procedimientos relacionados con el papel de las tirosina quinasas como dianas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer y afecciones relacionadas.

10

**Antecedentes de la invención**

**[0002]** La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el cerebro. El grado de demencia en el momento del fallecimiento está más correlacionado con el número de ovillos neurofibrilares y con la pérdida neuronal y sináptica que con la cantidad de placas seniles. La presencia de ovillos neurofibrilares en las neuronas causa la muerte de dichas neuronas, lo que implica que la prevención de la formación de ovillos es un objetivo terapéutico importante. La proteína principal que forma el ovillo neurofibrilar es la proteína asociada a microtúbulos tau, que se ensambla en filamentos que se entrelazan por pares uno con otro y a los que se denomina filamentos helicoidales apareados (PHF, por sus siglas en inglés). Los PHF se presentan en diferentes localizaciones en las neuronas en degeneración en el cerebro de pacientes con Alzheimer, y cuando muchos se agregan en el cuerpo de la célula neuronal, producen el ovillo neurofibrilar (Lee y col., 2001).

**[0003]** Las placas seniles tienen un depósito central extracelular de péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ), que está rodeado por neuritas distróficas para formar la placa senil o neurítica. Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que A $\beta$  es neurotóxico. El A $\beta$  deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés) más grande. Se ha prestado mucha atención a la producción de A $\beta$  como diana terapéutica porque se cree que su producción constituye un acontecimiento inicial en la patogénesis de la EA. Esto es debido a que las mutaciones en el gen de APP, que origina la EA autosómica dominante, da lugar al aumento de la producción total de A $\beta$  o a un aumento relativo de la forma ligeramente más larga A $\beta_{42}$  sobre A $\beta_{40}$ , siendo la primera más amiloidogénica; A $\beta_{42}$  tiene dos aminoácidos hidrófobos adicionales en el extremo C-terminal con respecto al A $\beta_{40}$  de 40 restos, dotando así al péptido de una mayor tendencia a agregarse y formar fibras de amiloide. Las mutaciones en otros dos genes que también causan EA autosómica dominante, presenilina-1 y presenilina-2 (PS1 y PS2) también originan un aumento de la relación entre A $\beta_{42}$  y A $\beta_{40}$ . La creencia de que el depósito de A $\beta$  en el cerebro precede a la aparición de los ovillos neurofibrilares ha sido la base de la hipótesis de la cascada del amiloide, pero no está claro si los ovillos son importantes en la patogénesis o son simplemente un epifenómeno sin importancia. Esto ha cambiado con el descubrimiento de mutaciones en el gen de tau en algunas otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

**[0004]** Aún no se ha establecido el mecanismo por el cual el A $\beta$  mata las neuronas en el cerebro. Se han realizado muchos estudios sobre la toxicidad de A $\beta$  en cultivos tisulares usando cultivos neuronales de cerebro de rata. Los presentes inventores han demostrado que la exposición de cultivos neuronales de cerebro tanto de fetos de rata como humanos a A $\beta$  agregado induce en 2 a 10 minutos aumentos en el contenido de fosfotirosina de varias proteínas, incluida tau (Williamson y col., 2002). También han demostrado que este tratamiento tiene como consecuencia la activación de las tirosina quinasas FAK y Fyn, siendo esta última un miembro de la familia src de tirosina quinasas. Esta fosforilación de tirosinas de la tau se previno mediante inhibidores que actúan sobre la familia src de tirosina quinasas y sobre c-Abl.

**[0005]** Se ha publicado previamente que los niveles elevados de Fyn se asocian con neuronas que contienen tau fosforilada de forma anómala en el cerebro de pacientes con EA (Shirazi y Wood, 1993) y los presentes inventores han demostrado usando anticuerpos que reconocen fosfotirosina que PHF-tau de cerebro de pacientes con EA contiene fosfotirosina (Williamson y col., 2002). Existen cinco posibles sitios de fosforilación de la tirosina en tau, que son los restos 18, 29, 197, 310 y 394, según la numeración de restos en las isoformas más largas de tau de 441 aminoácidos de cerebro humano. Los presentes inventores han demostrado *in vitro* que Fyn y Lck, ambas quinasas de la familia src, fosforilan la proteína tau recombinante humana y que las fosfotirosinas 18, 197, 310 y 394 se identificaban positivamente en uno o más de sus respectivos péptidos tripticos, a partir de la información de la secuencia de los péptidos fragmentados (Scales y col., 2002).

**[0006]** Las neuronas en los cortes de cerebro de ratones transgénicos en los que se ha interrumpido el gen

Fyn son resistentes a la toxicidad de A $\beta$  (Lambert y col., 1998). Por tanto, existen indicios de que la activación de Fyn puede estar implicada en la toxicidad de A $\beta$ .

**[0007]** Se ha descrito que el tratamiento de la microglía con A $\beta$  en cultivo tiene como consecuencia la activación de algunas otras tirosina quinasas, concretamente Syk, Lyn y FAK (McDonald y col., 1997) y, como se menciona anteriormente, los presentes inventores han encontrado que FAK también se activa en cultivos primarios de neuronas expuestas a A $\beta$  (Williamson y col., 2002). Se ha descrito que Syk fosforila la  $\alpha$ -sinucleína en la tirosina, siendo  $\alpha$ -sinucleína la principal proteína de los cuerpos de Lewy que constituyen la característica patológica de la enfermedad de Parkinson y que también está presente hasta en el 70% de los cerebros de pacientes con EA (Negro y col., 2002). Por último, los presentes inventores han encontrado que la proteína tirosina quinasa Abl fosforila la proteína tau en células cotransfectadas y que Abl está implicada en la activación de la proteína serina/treonina quinasa cdk5, que se considera una quinasa de tau importante a nivel patológico que fosforila muchos restos en tau y puede ser fosforilada alternativamente por GSK-3 (Zukerberg y col., 2000). Por tanto, existe una elevada posibilidad de que tau sea sustrato de diversas tirosina quinasas y que sea necesario considerar a estas proteínas en el contexto de la posible patogénesis de las tauopatías.

**[0008]** La presencia de depósitos intraneuronales de tau en la forma de ovillos neurofibrilares típicos en la EA o de otros agregados de tau morfológicamente distintos en otra serie de enfermedades neurodegenerativas, constituyen la base para agrupar estas afecciones como tauopatías. De este modo, además de la EA, los principales ejemplos de tauopatías son la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (PSP), enfermedad de Pick, degeneración corticobasal y atrofia multisistémica (AMS). Los depósitos intracelulares de tau (normalmente neuronales, aunque también a veces gliales) son filamentosos y en estado hiperfosforilado en comparación con la fosforilación de la proteína tau en el cerebro humano control. En el caso de la EA, esta proteína tau hiperfosforilada a menudo se denomina PHF-tau porque deriva de los PHF.

**[0009]** Aparte de la EA, en estas otras tauopatías no hay depósitos de A $\beta$  en el cerebro o estos son mínimos. Existen algunas tauopatías con genealogía de enfermedad autosómica dominante en las que el gen causante se ha identificado como el gen tau y, aunque se pueden presentar algunos casos con la misma mutación en enfermedades aparentemente diferentes, invariablemente tienen depósitos de tau en el cerebro y son principalmente de la variedad FTDP-17. Por consiguiente, el hallazgo de mutaciones en el gen tau causantes de enfermedad y depósitos de agregados de tau en las neuronas es un indicio convincente de la importancia patogénica principal del depósito de tau en todas estas afecciones, incluida la EA, cualquiera que sea la causa de la enfermedad. Por tanto, el descubrimiento de las mutaciones en tau corrobora la hipótesis de la cascada del amiloide y confirma que, de hecho, la formación de ovillos neurofibrilares bien puede estar supeditada al depósito de A $\beta$  en la EA, pero que en las otras tauopatías en las que no hay depósitos de A $\beta$ , la patología tau debe estar desencadenada por algún otro acontecimiento principal. Las anomalías y el depósito de la proteína tau son por ello dianas terapéuticas importantes para todas las tauopatías, incluida la EA.

**[0010]** Tau es una fosfoproteína, pero aún queda por establecer de forma inequívoca la función de su fosforilación. Sin embargo, el aumento de la fosforilación de tau en varios restos de serina y treonina reduce la capacidad de tau para favorecer el ensamblaje de los microtúbulos y estabilizar los microtúbulos ensamblados, efectos que se han demostrado tanto *in vitro* como en células. En muchos estudios se ha demostrado que los PHF-tau del cerebro de enfermos con EA está más fosforilado en serina y treonina que la proteína tau de cerebro control. Esto se ha demostrado en parte mediante la secuenciación de la proteína y en parte por la demostración de que determinados anticuerpos monoclonales solo marcan los PHF-tau o, alternativamente, marcan la proteína tau no fosforilada y no PHF-tau; los epítopes de muchos de estos anticuerpos se han mapeado en restos fosforilados concretos presentes en PHF-tau y que no están presentes, o lo están a niveles más bajos, en la proteína tau control. La proteína tau patológica de la mayoría de los otros casos de otras tauopatías parece estar hiperfosforiladas de forma similar a PHF-tau.

**[0011]** Estos resultados sugieren en gran medida que todas las tauopatías, incluida la EA, comparten anomalías similares en la regulación de la fosforilación. Puesto que la fosforilación de las proteínas es realizada por las proteína quinasas y la desfosforilación por la proteína fosfatasas, la identificación de las proteínas quinasas y fosfatasas de la proteína tau es importante, ya que estas enzimas son posibles dianas terapéuticas para estas enfermedades.

**[0012]** Como se mencionó anteriormente, existen cinco tirosinas en la proteína tau del cerebro humano. Se ha descrito que Fyn fosforila tau en células no neuronales cotransfectadas y que la tirosina 18 es el sitio preferido de

fosforilación (Lee y col., 1998). Los presentes inventores describieron que PHF-tau aislado del cerebro de pacientes con Alzheimer está fosforilada en las tirosinas y otros investigadores han identificado la tirosina 18 como un sitio de fosforilación (Williamson y col., 2002; Lee y col., 2004).

5 **[0013]** Las neuronas en cultivo procedentes de ratones transgénicos en las que se ha interrumpido el gen tau, de modo que estos animales ya no pueden expresar la proteína tau, son resistentes a la exposición a A $\beta$  y no se mueren (Rapoport y col., 2002). Este requisito de tau para que A $\beta$  sea neurotóxico se ha confirmado en experimentos en los que las neuronas tratadas con oligonucleótidos complementarios para reducir la expresión de tau eran resistentes a los efectos neurotóxicos de la exposición a A $\beta$  (Liu y col., 2004).

10

**[0014]** Continúa siendo un problema considerable en la técnica identificar las enzimas responsables de causar la fosforilación del filamento helicoidal apareado tau y los sitios fosforilados por estas enzimas.

### Resumen de la invención

15

**[0015]** En general, la presente invención se refiere a la modulación de la fosforilación de la proteína tau en sitios de tirosina a través de su interacción con quinasas. En particular, la presente invención se refiere a la identificación de sitios de fosforilación de tirosinas en la proteína tau y las quinasas que preferiblemente fosforilan subgrupos de estos sitios (p. ej., tirosina quinasas). Esto identifica nuevas dianas terapéuticas e interacciones que se pueden emplear en los procedimientos de cribado de agentes terapéuticos candidatos. En un aspecto, la presente invención se basa en la identificación de la función de la proteína tirosina quinasa c-Abl en la fosforilación de la tirosina 394 en PHF-tau. Esto se ha descrito anteriormente en la técnica previa. Antes de la presente invención, la técnica previa proponía que la tirosina 394 era fosforilada por Fyn, otra proteína tirosina quinasa de la familia Src. Por tanto, a diferencia de los métodos de la técnica previa basados en el cribado de compuestos capaces de inhibir la fosforilación de la tirosina 394 mediante la inhibición de la quinasa Fyn; en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de cribado de sustancias útiles para el tratamiento de la EA, u otra tauopatía, que son inhibidores de c-Abl.

30 **[0016]** Algunos de los trabajos descritos en este documento implican la determinación técnicamente difícil del estado de fosforilación de tau en PHF-tau del cerebro de pacientes con Alzheimer, en vez de los métodos más convencionales que emplean tau normal o tau de cerebro fetal. En consecuencia, la presente invención proporciona la primera descripción de la presencia de la fosforilación de tirosinas en PHF-tau clínica y, en algunos aspectos, la primera vez que se asocia una quinasa específica con un acontecimiento de fosforilación específica.

35 **[0017]** Asimismo, la identificación en este documento de c-Abl como candidato para ser una diana para el tratamiento de la EA se basa en la modificación de la fosforilación de las tirosinas de tau asociada a la enfermedad, que además viene avalado por la observación de que c-Abl puede ser una fuente de activación de cdk5 puesto que cdk5 se propone como alternativa a GSK-3 en la producción de PHF-tau.

40 **[0018]** Además, la presente invención propone que fyn, lck y c-Abl son dianas candidatas de fármacos para tratar la EA u otras tauopatías por el trabajo descrito en este documento que relaciona estas quinasas con la teoría de la cascada del amiloide a través de su reclutamiento en las balsas lipídicas. Sin desear estar ligado por ninguna explicación en particular, los presentes inventores proponen que A $\beta$  activa estas tirosina quinasas a través de la interacción con dominios ricos en colesterol de las membranas celulares y que esto da lugar a una sobreasociación inapropiada de la proteína tau con estas regiones de las membranas y una posterior alteración de los procesos de señalización intracelular. Como se describe en este documento, las quinasas implicadas en estos acontecimientos de señalización pueden por tanto usarse solas o en cualquier combinación como dianas terapéuticas para el cribado de moduladores de la actividad y/o su interacción con tau.

50 **[0019]** En consecuencia, la presente invención proporciona los procedimientos de cribado de compuestos candidatos útiles en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o un tauopatía que actúan inhibiendo la fosforilación específica de la proteína tau. Como se establece en las reivindicaciones, estos procedimientos se pueden llevar a cabo de muchas formas, como la medición mediante espectrometría de masas e inmunoensayo.

55 **[0020]** Considerando los requisitos descritos anteriormente de expresión obligatoria tanto de Fyn como de tau para que A $\beta$  sea neurotóxico y el hecho previamente conocido de que Fyn puede fosforilar la proteína tau en las células, los presentes inventores proponen que está implicada una secuencia de acontecimientos bioquímicos en el procesamiento de la proteína tau. Esto es que la exposición de las neuronas al A $\beta$  induce la activación de Fyn, y probablemente otras proteína tirosina quinasas, que fosforila tau y da lugar a una serie de cambios bioquímicos

adicionales que culminan en la muerte de la célula neuronal, lo que puede implicar la hiperfosforilación de tau en numerosos restos de serina y treonina.

5 **[0021]** La primera etapa en la identificación de las enzimas responsables es mapear todos los sitios de fosforilación en PHF-tau y comparar la secuencia complementaria de los sitios con los de la proteína tau de cerebro control. Los estudios de secuenciación de proteínas han tenido como resultado en total la identificación de 25 sitios de fosforilación en PHF-tau (Hanger y col., 1998; Morishima-Kawashima y col., 1995); la proteína tau de cerebro control no se ha estudiado ampliamente y solo se han identificado algunos de estos sitios en la proteína tau de cerebro humano control adulto o de cerebro humano control fetal (se sabe que la proteína tau de cerebro fetal se fosforila más que la forma de cerebro adulto).

15 **[0022]** Como se describe anteriormente, en la técnica previa se describió que de los cinco posibles sitios de fosforilación de tirosinas presentes en la proteína tau humana en las posiciones 18, 29, 197, 310 y 394, las tirosina quinasas Lck y Fyn fosforilan tau en las tirosinas de las posiciones 18, 310 y 394 y que la tirosina 18 es el sitio de fosforilación preferido de Fyn. Sin embargo, la presente invención describe por primera vez que PHF-tau de cerebro de pacientes con EA se fosforila en Tyr-394, un nuevo resultado obtenido a partir de los experimentos de espectrometría de masas. La presente invención también demuestra que Fyn fosforila principalmente la Tyr-18 en las células y que Abl fosforila principalmente la Tyr-394. Estos resultados significan que la fosforilación de la Tyr-394 puede contribuir a la patología de la EA y que Abl es una posible diana farmacológica.

20 **[0023]** En consecuencia, el trabajo descrito en la presente solicitud define las indicaciones iniciales proporcionadas en la técnica previa e investiga cómo A $\beta$  puede desencadenar la activación de Fyn, cómo podría Fyn entrar en contacto con tau y en qué resto de tirosina de tau en concreto Fyn y las quinasas Syk y Abl podrían actuar.

#### 25 *Neurotoxicidad de A $\beta$ – balsas lipídicas*

30 **[0024]** Se sabe que Fyn está asociada con las balsas lipídicas, que son dominios de las membranas celulares ricos en colesterol y esfingolípidos. La solubilización de células en determinados detergentes como Triton X100 a 4 °C permite aislar las balsas lipídicas, ya que estos dominios ricos en colesterol permanecen insolubles y pueden separarse de los demás componentes de la célula en virtud de su baja densidad de flotación. De este modo, las balsas lipídicas se aíslan por flotación en soluciones de sacarosa mediante ultracentrifugación. Asimismo, se ha descrito que la unión de A $\beta$  a las membranas está mediada, al menos en parte, por el colesterol y que los niveles crecientes de colesterol en la membrana se correlacionaban positivamente con la toxicidad de A $\beta$  para las células neuronales y endoteliales (Eckert y col., 2000; Subasinghe y col., 2003; Wang y col., 2001; Yip y col., 2001). La flotilina, un constituyente de las balsas lipídicas, se acumula en las neuronas portadoras de ovillos en el cerebro de pacientes con Alzheimer, lo que indica anomalías en las balsas lipídicas en el cerebro enfermo (Girardot y col., 2003) y, de hecho, se ha documentado que la composición proteica de las balsas lipídicas aisladas del cerebro de pacientes con Alzheimer es anómala (Ledesma y col., 2003). Los presentes inventores han investigado las balsas lipídicas en el contexto de la neurotoxicidad de A $\beta$ .

40 **[0025]** En la presente solicitud se describen investigaciones sobre los efectos en las balsas lipídicas de la exposición de las neuronas a A $\beta$ . En resumen, los presentes inventores han encontrado mediante inmunotransferencia que las balsas lipídicas aisladas de cultivos primarios de neuronas corticales de cerebro de rata contienen la proteína marcador, flotilina, así como Fyn, FAK y cantidades pequeñas, pero reproducibles, de actina, tubulina y tau. Tras la exposición a A $\beta$  10  $\mu$ M durante 5 minutos, se observa un aumento en el contenido de fosfotirosinas de numerosas proteínas, según se detectó con el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10; también se observan aumentos en la cantidad de Fyn, FAK, tau, tubulina, actina y quinasa c-Src, pero no de  $\beta$ -catenina, con respecto al contenido de flotilina de las balsas lipídicas en comparación con las neuronas no tratadas.

50 **[0026]** Se encuentra también que el tratamiento previo de los cultivos de neuronas con el inhibidor de tirosina quinasas de la familia Src, PP2, antes de la exposición a A $\beta$  y posterior aislamiento de las balsas lipídicas, tenía como consecuencia el bloqueo del reclutamiento de mayores cantidades de tau y Fyn en las balsas lipídicas inducido por A $\beta$ .

#### 55 *Fosforilación de tirosinas de tau*

**[0027]** Se ha demostrado previamente que Fyn fosforila tau en células cotransfectadas con tau y Fyn (Lee y col., 1998). Como se mencionó anteriormente, los presentes inventores encontraron que Fyn y Lck fosforilan *in vitro* la proteína tau humana en cuatro de las cinco tirosinas presentes en la proteína tau humana (Y18, Y197, Y310 e

Y394) (Scales y col., 2002). Los inventores han obtenido ahora una serie de formas mutantes de tau en las que cada una de las cinco tirosinas se cambió mediante mutación individualmente por fenilalanina (F18, F29, F197, F310 y F394) o en las que solo quedaba una única tirosina, estando las otras cuatro sustituidas por fenilalanina (solo-Y18, solo-Y29, solo-Y197, solo-Y310 y solo-Y394).

5

**[0028]** Usando estos mutantes, los presentes inventores han encontrado que mediante el tratamiento de las células no neuronales transfectadas con estas formas mutantes de tau con pervanadato para inhibir las tirosina fosfatasas, se observa un aumento de la fosforilación de tirosinas endógenas de tau, principalmente en la tirosina 394, con una contribución de la tirosina 197. En otros experimentos en los que se cotransfectaron formas mutantes de tau con las tirosina quinasas Fyn, Syk o Abl, se encontró la fosforilación preferente de las tirosinas 18 y 310 por Fyn y de las tirosinas 18, 29, 197 y 394 por Syk, pero Abl fosforilaba preferentemente las tirosinas 197, 310 y 394. Usando lisado de cerebro de rata en presencia de pervanadato para fosforilar la proteína tau recombinante humana *in vitro*, se ha encontrado mediante espectrometría de masas que se fosforilaron las tirosinas 310 y 394.

10

**[0029]** Por ultimo, la fosforilación de tirosinas en tau es un suceso fisiológico ya que los inventores encontraron mediante espectrometría de masas indicios inequívocos de que la tirosina 394 está fosforilada en la proteína tau aislada de cerebro humano fetal y en PFH.

*La fosforilación de tirosinas de tau genera un sitio de unión SH2 para Fyn*

20

**[0030]** Los presentes inventores han encontrado que la fosforilación *in vitro* de tau por Lck genera un sitio de unión para el dominio SH2 de Fyn. En resumen, los indicios sugieren que más de una tirosina quinasa fosforila la proteína tau, fosforilando diferentes quinasas preferentemente diferentes restos de tirosina, y que A $\beta$  es capaz de activar al menos alguna de estas quinasas. Los datos también demuestran que la fosforilación de las tirosinas de tau genera un sitio de unión para al menos una tirosina quinasa, lo que implica que tau puede ser una proteína de señalización importante, además de su función como proteína asociada a los microtúbulos.

25

**[0031]** En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos de cribado basados en la quinasa c-Abl como se establece en las reivindicaciones. Esto se basa en el trabajo descrito en este documento que muestra que las tres quinasas fosforilan la proteína tau en los sitios de fosforilación de tirosinas en Tyr18, Tyr29, Tyr197, Tyr130 y Tyr384. Las quinasas son Fyn, Syk y Abl. Una descripción y las secuencias de estas quinasas se proporcionan en:

30

**Fyn:** Semba, K. y col. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5459-5463. Véase Genbank NM\_002037 y que hay dos isoformas principales. La presente invención está relacionada principalmente con la isoforma expresada en cerebro, aunque la otra forma expresada en células hematopoyéticas, como las células T, también puede encontrar uso en el procedimiento de cribado descrito en este documento.

35

**Syk:** Law, C.L. y col., J. Biol. Chem. 269, 12310-12319. Véase Genbank L28824.

**c-Abl:** Fainstein, E., Einat, M., Gokkel, E., Marcelle, C., Croce, C.M., Gale, R.P. y Canaani, E. (1989) Oncogene 4, 1477-1461. Véase Genbank X16416 y M14752. Existen varias isoformas que afectan al extremo N-terminal, pero que tienen un dominio catalítico similar.

40

**[0032]** En referencia a estas quinasas, la presente invención incluye el uso de isoformas, variantes de ajuste, fragmentos y variantes de secuencia, como se describe con más detalle a continuación.

45

**[0033]** En particular, las quinasas y los sitios que fosforilan preferentemente pueden usarse en procedimientos de cribado de inhibidores de fosforilación o promotores de desfosforilación. Preferentemente, el procedimiento de cribado es para encontrar sustancias que son capaces de inhibir la fosforilación. El procedimiento de cribado puede suponer determinar si una sustancia candidata es capaz de unirse a la quinasa y/o a la proteína tau, por ejemplo, para inhibir o prevenir la fosforilación de la proteína tau en un sitio determinado por la quinasa en cuestión. Este procedimiento puede implicar poner en contacto la sustancia candidata con la quinasa y/o la proteína tau y determinar si se produce la unión y, opcionalmente, determinar la afinidad de la reacción de unión. Alternativa o adicionalmente, el procedimiento puede comprender determinar si una sustancia candidata es capaz de inhibir una quinasa, por ejemplo, para inhibir o prevenir la fosforilación de un sustrato como la proteína tau en un sitio por una de las quinasas, como se describe en este documento. Esta determinación puede comprender poner en contacto la sustancia candidata con la quinasa en cuestión y la proteína tau o un sustrato alternativo (por ejemplo, un fragmento de tau que comprenda una secuencia de aminoácidos alrededor del sitio de fosforilación) y determinar si la sustancia candidata inhibe la quinasa que fosforila el sustrato. La etapa de determinación puede comprender la determinación del grado de inhibición. En situaciones en las que se realice un cribado inicial para identificar sustancias candidatas

50

55

que sean capaces de inhibir la proteína tau o una quinasa, o que sean capaces de inhibir la actividad de una quinasa, el procedimiento puede comprender la etapa adicional de determinar si la propiedad de unión o inhibición de la sustancia candidata es capaz de inhibir la fosforilación de la proteína tau o un fragmento de la misma en presencia de la quinasa.

5

**[0034]** El cribado de sustancias candidatas que tengan estas propiedades pueden emplear la proteína tau, o un fragmento, porción activa o variante de secuencia de la misma que comprenda uno o más de los sitios relevantes de fosforilación. Un ejemplo de proteína tau que se puede emplear de esta forma es un fragmento de tau que comprenda la secuencia de aminoácidos alrededor del sitio de fosforilación.

10

**[0035]** Los sitios y las quinasas que los fosforilan preferentemente son las tirosinas 18 y 310 por Fyn, la tirosina 18 por Syk y las tirosinas 197, 310 y 394 por Abl.

**[0036]** Como consecuencia de estos resultados, se pueden usar los nuevos sitios y quinasas como base de ensayos y procedimientos de ensayo para el cribado de moduladores de la fosforilación de los sitios de la proteína tau para su uso o desarrollo como agentes terapéuticos en el tratamiento de tauopatías. Como primera etapa se pueden analizar las sustancias candidatas para determinar si son inhibidores o promotores de las quinasas descritas en este documento. Opcionalmente, el procedimiento puede comprender alternativa o adicionalmente, determinar si una sustancia candidata es capaz de inhibir la fosforilación de tau por una quinasa y/o favorecer la defosforilación de la tau fosforilada por una fosfatasa (p. ej., una tirosina fosfatasa).

20

**[0037]** En consecuencia, también se describe en este documento el uso de a) una quinasa que es capaz de fosforilar la proteína tau en uno o más de los sitios descritos en este documento, y b) un sustrato de la quinasa, en el que la quinasa y el sustrato se usan para identificar sustancias candidatas que son capaces de inhibir la fosforilación del sustrato por una quinasa, en donde la tirosina quinasa es c-Abl.

25

**[0038]** En la presente invención, la proteína tau que comprende los sitios de fosforilación puede ser sustancialmente la proteína tau o PHF-tau de longitud completa y/o natural, o puede ser un fragmento, porción activa o variante de secuencia de la misma. En otras realizaciones, la presente invención puede emplear una molécula de ácido nucleico correspondiente que codifique la proteína tau. Cuando se emplea una proteína tau que es un fragmento, porción activa o variante de secuencia, el sitio o sitios de fosforilación están presentes con los aminoácidos circundantes de la secuencia de la proteína tau. Preferiblemente, la presente invención emplea la proteína PHF-tau. En la presente invención, la numeración de la proteína tau y PHF-tau sigue la de la secuencia descrita en la figura 1 de Goedert y col. (1989) Neuron 3, 519-526: Multiple isoforms of human microtubule-associated protein Tau: sequences and localisation in neurofibrillary tangles of Alzheimer's Disease Goedert M, Spillantini MG, Rutherford D, Jakes R and Crowther RA.

30

35

**[0039]** Alternativa o adicionalmente, cualquiera de las proteínas tau definidas anteriormente pueden estar fosforiladas en uno o más de los sitios de fosforilación. Esto permite el estudio de los efectos de fosforilación cooperativa de la proteína, esto es, cuando la fosforilación de un sitio depende de cambios en la proteína tau causados por una o más etapas de fosforilación precedentes o simultáneas. De esto modo, en algunas realizaciones de la presente invención, la proteína tau puede incluir uno o más de los sitios de fosforilación conocidos de tau.

40

**[0040]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado de sustancias que son capaces de inhibir la fosforilación de uno o más de los sitios de un sustrato por una quinasa; el procedimiento comprende:

45

a) poner en contacto al menos una sustancia candidata, una quinasa que sea capaz de fosforilar la proteína tau en uno o más de los sitios descritos en este documento y un sustrato de la quinasa;

50

b) determinar si la sustancia candidata inhibe la fosforilación del sustrato por la quinasa y, opcionalmente, el grado de fosforilación; y

c) seleccionar la sustancia candidata que inhibe la fosforilación del sustrato, en donde la quinasa es c-Abl.

**[0041]** El procedimiento descrito en este documento se puede emplear para identificar sustancias candidatas útiles en el tratamiento o desarrollo de compuestos de partida para el tratamiento de tauopatías.

55

**[0042]** En todos los aspectos de la invención, el sustrato puede ser una proteína tau, o comprender un fragmento de la proteína tau, el cual incluye uno o más de los sitios de fosforilación sobre los que actúa la quinasa. Por ejemplo, en el caso de c-Abl, el sustrato puede ser un fragmento de la proteína tau basado en la secuencia de

aminoácidos circundantes a la Tyr 394.

**[0043]** El procedimiento puede implicar adicionalmente la inclusión de un inhibidor de la fosfatasa en la etapa a) para inhibir las fosfatasas que puedan estar presentes en el sistema de desfosforilación de la proteína tau.

5

**[0044]** Los expertos en la materia conocen bien los ejemplos de técnicas adecuadas de cribado para su uso según la presente invención. A modo de ejemplo, se puede realizar un ensayo de cribado basado en células cotransfectando células con el ácido nucleico que codifica tau y el que codifica la tirosina quinasa Abl y, opcionalmente, las tirosina quinasas Fyn y Syk, y determinar el efecto que los compuestos candidatos tienen sobre la fosforilación de tau, en especial en las tirosinas 18 y 310 por Fyn, la tirosina 18 por Syk y las tirosinas 197, 310 y 394 por Abl. Los procedimientos preferidos de cribado pueden suponer el uso de espectroscopía de masas para determinar la fosforilación de los sitios de tau, lo que se describe en detalle a continuación. De forma conveniente, los procedimientos de cribado pueden llevarse a cabo en un formato de ensayo multiplex en el cual se emplea una fase sólida sobre la que se inmovilizan una gran variedad de sustratos (p. ej., en una matriz), siendo los sustratos los correspondientes sitios de fosforilación de la proteína tau. A modo de ejemplo, los sustratos pueden contener fragmentos de la proteína tau. Esto se describe con más detalle a continuación. También se describe en este documento un kit o fase sólida adaptado para realizar un ensayo multiplex de cribado según la presente invención.

**[0045]** El procedimiento puede comprender, habiendo identificado una sustancia candidata según uno de los procedimientos descritos en este documento, la etapa o etapas adicionales de optimización de la sustancia candidata para mejorar una o más de sus propiedades y/o formularla como medicamento.

**[0046]** Los procedimientos descritos en este documento emplean una o más quinasas seleccionadas entre c-Abl, opcionalmente en combinación con Syk o Fyn. No obstante, el procedimiento de cribado puede comprender estudiar el efecto de una o más enzimas adicionales en los sitios de fosforilación de tau. A continuación, en la sección de ensayos multiplex, se proporcionan ejemplos de enzimas adicionales adecuadas para su uso en cualquier aspecto de la invención

**[0047]** En la presente invención, preferiblemente la etapa de detectar la presencia y el grado de fosforilación y desfosforilación de la proteína tau se puede llevar a cabo usando espectroscopía de masas como se describe con más detalle a continuación. Alternativa, o adicionalmente, no se pueden usar agentes de reconocimiento específicos de sitio que son capaces de distinguir entre un sitio que está fosforilado y otro que no lo está. Ejemplos de dichos agentes conocidos en la materia son anticuerpos específicos de sitio, como el anticuerpo monoclonal AT100.

### 35 **Breve descripción de las figuras**

**[0048]**

En la **figura 1** se muestra la secuencia de aminoácidos de la isoforma de tau humana usada para la numeración dada en esta solicitud. Los sitios de fosforilación Y18, Y29, Y197, Y310 e Y394 están indicados en negrita.

En la **figura 2** se muestra la secuencia de aminoácidos de la isoforma p150 de c-Abl humana.

En la **figura 3** se muestra la secuencia de aminoácidos de Syk humana.

En la **figura 4** se muestra la secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de Fyn humana.

45

**[0049]** Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora con más detalle a modo de ejemplo y sin limitaciones.

### **Descripción detallada**

50

#### **Proteínas tau**

**[0050]** Los ensayos y procedimientos de ensayo descritos en este documento pueden emplear proteínas tau, quinasas o fosfatasas naturales o de longitud completa o fragmentos, porciones activas o derivados de las mismas. En el caso de las proteínas tau, el material usado en el ensayo puede no estar fosforilado o estar parcialmente fosforilado como se ha descrito anteriormente.

**[0051]** En la presente invención, los derivados de las proteínas tau, quinasas (especialmente Fyn, Syk y Abl) o fosfatasas tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más restos de aminoácido con respecto a la

secuencia de aminoácidos natural, en una o más adición, inserción, delección y sustitución de uno o más aminoácidos. Por tanto, se incluyen variantes, derivados, alelos, mutantes y homólogos, por ejemplo, de otros organismos. De este modo, un derivado de la proteína tau o de la quinasa puede incluir alteraciones de 1, 2, 3, 4, 5, más de 5 o más de 10 aminoácidos, como sustituciones con respecto a la secuencia natural.

5

**[0052]** Preferiblemente, un fragmento o derivado de una proteína usada en los ensayos descritos en este documento comparte la identidad de secuencia con la correspondiente porción de la secuencia natural relevante de la proteína y preferiblemente tiene al menos aproximadamente el 60%, o el 70%, o el 75%, o el 80%, o el 85%, o el 90% o el 95% de identidad de secuencia. Los fragmentos preferidos comprenden al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o al menos 25 aminoácidos que se corresponden o comparten identidad de secuencia con la proteína tau. Opcionalmente, los fragmentos pueden comprender un fragmento de la proteína tau ligada o conjugada a otros restos, por ejemplo etiquetas de expresión, etiquetas de purificación, grupos que permiten la inmovilización del fragmento o su manipulación de alguna otra forma, o marcajes. Como es bien conocido, la identidad a nivel de aminoácidos generalmente es en términos de identidad de aminoácidos, lo que puede definirse y determinarse mediante el programa TBLASTN de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, que se usa de forma convencional en la técnica. La identidad puede ser sobre la longitud completa del péptido relevante o sobre una secuencia contigua de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50, 75, 100 o más aminoácidos, en comparación con la secuencia de aminoácidos natural relevante. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica un fragmento o derivado puede hibridar con el correspondiente ácido nucleico natural en condiciones rigurosas, por ejemplo, como se describe en libros de texto como Ausubel, Short Protocols in Molecular Biology, 1992 o Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, usando una solución de hibridación que contiene: SSC x5, reactivo de Denhardt x5, SDS al 0,5-1,0%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, pirofosfato sódico al 0,05% y hasta un 50% de formamida. La hibridación se realiza a 37-42 °C durante al menos seis horas. Tras la hibridación, los filtros se lavan como sigue: 1) 5 minutos a temperatura ambiente en SSC x2 y SDS al 1%; 2) 15 minutos a temperatura ambiente en SSC x2 y SDS al 0,1%; 3) de 30 minutos a 1 hora a 37 °C en SSC x1 y SDS al 1%; 4) 2 horas a 42-65 °C en SSC x1 y SDS al 1%, cambiando la solución cada 30 minutos.

**[0053]** Una fórmula común para calcular las condiciones rigurosas requeridas para alcanzar la hibridación entre moléculas de ácido nucleico de una homología de secuencia especificada es (Sambrook y col., 1989):

$$T_m = 81,5 \text{ °C} + 16,6 \text{ Log} [\text{Na}^+] + 0,41 (\% \text{ G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - 600/\text{N.}^\circ \text{ de pb en doble cadena.}$$

**[0054]** Como ilustración de la fórmula anterior, usando  $[\text{Na}^+] = [0,368]$  y formamida al 50%, con un contenido en GC del 42% y un tamaño de sonda promedio de 200 bases, la  $T_m$  es de 57°C. La  $T_m$  de un ADN de doble cadena disminuye 1 a 1,5 °C con cada reducción del 1% en homología. Así, las dianas con más de aproximadamente el 75% de identidad de secuencia se observarían usando una temperatura de hibridación de 42 °C. Dicha secuencia se consideraría sustancialmente homóloga a la secuencia de ácido nucleico de la presente invención.

#### 40 **Procedimiento de cribado para inhibidores y potenciadores**

**[0055]** Es bien conocido que la investigación farmacéutica que lleva a la identificación de nuevos fármacos puede implicar el cribado de un número muy grande de sustancias candidatas, tanto antes como incluso después de que se haya encontrado un compuesto de partida. Este es un factor que hace que la investigación farmacéutica sea muy cara y lleve mucho tiempo. Los medios para ayudar a los procesos de cribado pueden tener una considerable importancia y utilidad comercial.

**[0056]** Como se detalla anteriormente, los procedimientos de cribado de sustancias que son inhibidores de la fosforilación de la proteína tau o promotores de la desfosforilación de la proteína tau se pueden realizar poniendo en contacto una o más sustancias problema con la proteína tau y la quinasa o fosfatasa (como se define en este documento) en un medio de reacción idóneo, y determinando la presencia o el grado de fosforilación o desfosforilación en presencia y ausencia de la sustancia candidata. Una diferencia en la actividad en presencia o ausencia de la sustancia candidata es indicativa de un efecto modulador.

**[0057]** Los ensayos preliminares *in vitro* pueden ir seguidos de ensayos *in vivo*, o pueden realizarse en paralelo con estos.

**[0058]** Por supuesto, el experto en la material diseñará cualquier experimento control apropiado con el que comparar los resultados obtenidos en los ensayos con la sustancia problema.

**[0059]** El rendimiento de un procedimiento de ensayo según la presente invención puede ir seguido del aislamiento, fabricación y/o uso de un compuesto, sustancia o molécula que dé resultados positivos en la pruebas de capacidad para modular la interacción entre uno de los sitios de fosforilación de la proteína tau (según lo definido en este documento) y una quinasa (según lo descrito en este documento) o una fosfatasa.

**[0060]** Los expertos en la materia pueden variar el formato preciso de un ensayo de la invención usando técnicas y conocimientos habituales. Por ejemplo, la interacción entre las sustancias puede estudiarse *in vitro* mediante el marcaje de una con un marcador detectable y poniéndola en contacto con la otra que se ha inmovilizado en un soporte sólido. Los marcajes detectable adecuados, especialmente para sustancias peptídico son <sup>35</sup>S-metionina que se puede incorporar en los péptidos y polipéptidos producidos por tecnología recombinante. Los péptidos y polipéptidos producidos por tecnología recombinante también pueden expresarse como proteína de fusión que contenga un epítopo que se puede marcar con un anticuerpo.

**[0061]** La proteína que se inmoviliza en un soporte sólido se puede inmovilizar usando un anticuerpo frente a esa proteína unido a un soporte sólido o por medio de otras tecnologías que son conocidas de por sí. Una interacción *in vitro* preferida puede utilizar una proteína de fusión que incluya glutatión S-transferasa (GST). Esta se puede inmovilizar sobre microesferas de glutatión agarosa. En un formato de ensayo *in vitro* del tipo descrito anteriormente, se puede analizar un compuesto problema determinando su capacidad para distinguir la cantidad de péptido polipéptido marcado que se une al polipéptido de fusión GST inmovilizado. Esto se puede determinar por medio del fraccionamiento de las microesferas de glutatión-agarosa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). De forma alternativa, las microesferas se pueden lavar para eliminar la proteína no unida y se puede determinar la cantidad de proteína que se ha unido mediante el recuento de la cantidad de marcaje presente en, por ejemplo, un contador de centelleo adecuado.

**[0062]** La cantidad de una sustancia candidata que se puede añadir a un ensayo de la invención normalmente se determinará mediante ensayo y error dependiendo del tipo de compuesto utilizado. Típicamente se pueden utilizar concentraciones desde aproximadamente 0,001 nM a 1 mM o superiores del posible compuesto inhibidor, por ejemplo de 0,01 nM a 100 μM, por ejemplo de 0,1 a 50 μM, como aproximadamente 10 μM. Se pueden usar concentraciones mayores cuando la sustancia problema es un péptido. Incluso una molécula que tiene un efecto débil puede ser un compuesto de partida para investigación y desarrollo adicionales.

**[0063]** La tecnología de biblioteca combinatoria proporciona una forma eficaz de analizar en un número potencialmente grande de diferentes sustancias la capacidad de modular la actividad de un polipéptido. Dichas bibliotecas y su uso son conocidos en la técnica. Los compuestos que se pueden usar pueden ser compuestos químicos naturales o sintéticos usados en los programas de cribado de fármacos. También pueden usarse extractos de plantas que contienen diversos componentes caracterizados o sin caracterizar.

**[0064]** Los anticuerpos dirigidos al sitio de interacción en cualquier proteína forman una clase adicional de posibles compuestos inhibidores. Los anticuerpos inhibidores candidatos pueden caracterizarse y pueden determinarse sus regiones de unión para proporcionar anticuerpos de cadena única y fragmentos de los mismos que sean responsables de interrumpir la interacción. Los anticuerpos también pueden emplearse como agentes de reconocimiento específico de sitio para determinar si se ha producido la fosforilación de un sitio en la proteína tau durante el ensayo.

**[0065]** Los anticuerpos pueden obtenerse usando técnicas que son convencionales en la materia. Entre los procedimientos de producción de anticuerpos se incluyen inmunizar a un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con la proteína o un fragmento de la misma. Los anticuerpos se pueden obtener a partir de animales inmunizados usando cualquiera de las diversas técnicas conocidas en la materia, y cribar usando preferiblemente la unión del anticuerpo al antígeno de interés. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de inmunotransferencia o inmunoprecipitación (Armitage y col., 1992, Nature 357: 80-82). El aislamiento de anticuerpos y/o de las células que producen anticuerpos a partir de un animal puede ir acompañado de una etapa de sacrificio del animal.

**[0066]** Como alternativa o suplemento para inmunizar a un mamífero con un péptido, puede obtenerse un anticuerpo específico de una proteína a partir de una biblioteca producida mediante tecnología recombinante de dominios variables de inmunoglobulina expresados, por ejemplo, usando bacteriófago lambda o bacteriófago filamentoso que despliegan dominios de unión de inmunoglobulina funcionales en sus superficies; por ejemplo, véase el documento WO92/01047. La biblioteca puede ser virgen, esto es, construida a partir de secuencias

obtenidas de un organismo que no ha sido inmunizado con ninguna de las proteínas (o fragmentos) o puede ser una biblioteca construida usando secuencias obtenidas a partir de un organismo que ha estado expuesto al antígeno de interés.

5 **[0067]** Los anticuerpos según la presente invención pueden modificarse de varias formas. De hecho, debe interpretarse que el término «anticuerpo» abarca cualquier sustancia de unión que tiene un dominio de unión con la especificidad requerida. De este modo, la invención abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo moléculas sintéticas y moléculas cuya forma mimetiza la de un anticuerpo, permitiendo a éste unirse a un antígeno o a un epítope.

10

**[0068]** Ejemplos de fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a un antígeno u otro patrón de unión son el fragmento Fab compuesto por los dominios VL, VH, CL y CH1; el fragmento Fd compuesto por los dominios VH y CH1; el fragmento Fv compuesto por los dominios VL y VH de un único brazo del anticuerpo, el fragmento dAb compuesto por un dominio VH; regiones CDR aisladas y fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. También están incluidos fragmentos Fv de cadena única.

15

**[0069]** Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal según la presente invención, puede estar sometido a mutación genética o a otros cambios. Adicionalmente, los expertos en la materia entenderán que un anticuerpo monoclonal puede someterse a las técnicas de la tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original. Estas técnicas pueden implicar la introducción del ADN que codifica la región variable de la inmunoglobulina o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más las regiones del armazón, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0 184 187 A, GB 2 188 638 A o EP 0 239 400 A. El clonaje y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en los documentos EP 0 120 694 A y EP 0 125 023 A.

20

25

**[0070]** Los hibridomas capaces de producir anticuerpos con las características de unión deseadas están dentro del alcance de la presente invención, así como lo están las células hospedadoras, eucariotas o procariotas, que contienen ácidos nucleicos que codifican anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y son capaces de su expresión. La invención también proporciona procedimientos de producción de los anticuerpos que incluyen cultivar una célula capaz de producir el anticuerpo en condiciones en las que se produce el anticuerpo y, preferiblemente, se secreta.

30

35 **[0071]** Las reactividades de los anticuerpos en una muestra pueden determinarse mediante cualquier medio apropiado. Una posibilidad es etiquetarlos con moléculas indicadoras individuales. Las moléculas indicadoras pueden generar directa o indirectamente señales detectables, y preferiblemente cuantificables. La unión de las moléculas indicadoras puede ser directa o indirectamente, covalente, por ejemplo, por medio de un enlace peptídico, o no covalente. La unión a través de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la molécula indicadora. El modo de determinar la unión no es un aspecto de la presente invención y los expertos en la materia son capaces de seleccionar un modo adecuado según sus preferencias y conocimiento general.

40

**[0072]** Otros compuestos candidatos inhibidores pueden basarse en el modelado de la estructura tridimensional de un polipéptido o fragmento peptídico y usando un diseño de fármacos racional para proporcionar posibles compuestos inhibidores con características particulares de forma molecular, tamaño y carga.

45

### **Espectrometría de masas**

50 **[0073]** Se usó una estrategia basada en la CL/EM/EM para descubrir nuevos sitios de fosforilación en la proteína tau aislada de cerebro de pacientes con EA. El llamado PHF-tau se extrajo inicialmente de una preparación estable al calor de material de cerebro humano de pacientes con EA y, posteriormente, se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico. Posteriormente, los fosfopéptidos se separan mediante PAGE-SDS y se mapearon. Se escindieron las bandas teñidas con Coomassie, se redujeron, alquilaron y se digirieron enzimáticamente usando una serie de proteasas como tripsina, quimotripsina y endoproteinasa Asp-N. Las mezclas de péptidos resultantes se analizaron posteriormente mediante CL/EM/EM usando un aparato microanalítico Q-TOF, consiguiéndose la separación de péptidos usando una columna de fase inversa ID PepMap de 75 micras y la elución de los péptidos usando un gradiente de acetonitrilo a una velocidad de flujo de 200 nl/min.

55

**[0074]** La búsqueda en la base de datos frente a archivos indexados personalizados utilizando el algoritmo Mascot (Matrix Science). Todos los espectros EM/EM relativos a los fosfopéptidos se verifican a continuación visualmente para verificar el resultado.

- 5 **[0075]** Se puede usar EM/EM en tándem de péptidos para proporcionar información de la secuencia en virtud de los iones de los fragmentos producidos. La fragmentación se produce generalmente en los enlaces peptídicos, dando lugar a una escalera de iones de secuencia que proporciona un diagnóstico de la secuencia de aminoácidos. La diferencia entre los iones consecutivos en una serie indica la masa del aminoácido en esa posición del péptido. Los tipos de iones más frecuentes son los iones «b» e «y». Los fragmentos que contienen el extremo C-terminal se denominan iones «y», y los fragmentos que contienen el extremo N-terminal se denominan iones «b» (Roepstorff, P., Fohlman, J. J. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, 11, 601). Los péptidos creados mediante proteólisis con tripsina e ionizados mediante electropulverización forman iones con doble carga. Esto se origina debido a la presencia de grupos básicos dentro del péptido, concretamente, el grupo amino alfa del extremo N-terminal y la cadena lateral de la lisina o arginina del extremo C-terminal. Los espectros de EM/EM de dichos péptidos producen generalmente una serie de iones de tipo «y» prominentes en el extremo de masa alta del espectro (Bonner, R., Shushan, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995, 9, 1067-1076). Idealmente, para los fines de secuenciación *de novo*, un set completo de iones «b» e «y» complementarios garantizará un alto nivel de confianza para la secuencia peptídica propuesta. Asimismo, si están presentes los iones del fragmento que representa la secuencia completa del péptido, el sitio de unión del grupo fosfato se puede deducir a partir de la posición y el patrón de estos iones del fragmento. Por tanto, es posible en la mayoría de los casos descubrir el sitio exacto de fosforilación en cada fosfopéptido. En algunos casos se han encontrado incluso espectros de EM/EM heterogéneos. Aquí están representados en el mismo espectro dos (o más) fosfopéptidos distintos. Esto es debido a que cada forma de fosfopéptido tiene el mismo peso molecular y el mismo número de grupos fosfato, pero estos están unidos a aminoácidos diferentes dentro del péptido. Por tanto, ambas forman iones precursores de la misma relación m/z, que posteriormente se seleccionan de forma simultánea mediante el espectrómetro de masas durante el experimento de EM/EM. En tales casos, se hace referencia a los fosfopéptidos en cuestión como «regiómeros».

#### **Ensayos multiplex para el cribado de compuestos**

- 30 **[0076]** En el desarrollo de fármacos es deseable desarrollar ensayos rápidos de alto rendimiento con una interpretación sencilla para mostrar si un compuesto tiene efecto sobre la diana propuesta. En el caso de compuestos que inhiben la función de una enzima, como una quinasa, es posible desarrollar un sustrato artificial para la enzima diana que es modificado por la enzima de forma que el nivel de modificación puede detectarse fácilmente. En presencia de un compuesto inhibidor, el sustrato no se modifica y esto puede detectarse también fácilmente.

- [0077]** En el caso de inhibidores de la fosforilación de tau, es necesario controlar el efecto de la inhibición de proteína quinasas específicas sobre el estado de fosforilación de un gran número de sitios. En un aspecto, es posible preparar sustratos artificiales correspondientes a cada uno de los sitios de fosforilación en tau y evaluar en cada compuesto su capacidad para inhibir la fosforilación de cada sitio independientemente de los otros sitios. En dicho sistema, cada compuesto se añadiría a diferentes pocillos, conteniendo cada pocillo la quinasa diana propuesta, uno de los sustratos artificiales específicos del sitio de fosforilación y un sistema indicador para mostrar la fosforilación, como un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al sustrato, bien en su forma fosforilada o bien en su forma no fosforilada, y cuyo anticuerpo está marcado con un marcador fluorescente, una enzima que convierte un sustrato incoloro en un producto coloreado, o una enzima que promueve la producción de una señal luminiscente. En dicho ensayo es deseable que el sustrato artificial para la diana esté inmovilizado en una superficie sólida de modo que como parte del procedimiento de ensayo cualquier anticuerpo que no haya reaccionado sea eliminado del sistema mediante lavado antes de interpretar el resultado. Dichos ensayos pueden realizarse en pocillos de microvaloración de diversos formatos de habitualmente 96, o habitualmente 384, o incluso más habitualmente 1536 pocillos, o alternativamente pueden realizarse en una micromatriz basada en un soporte sólido como vidrio. Alternativamente, se puede diseñar el efecto de los diferentes inhibidores de quinasas sobre el estado global de fosforilación de tau. En dicho ensayo se puede usar como sustrato una proteína tau de longitud completa que no tenga ninguna fosforilación, o tenga una o más fosforilaciones deseadas. Alternativamente, se puede usar una mezcla de cantidades iguales de todos los sustratos artificiales que representan sitios de fosforilación únicos. En cada ensayo de cribado se determinará el efecto de los compuestos sobre la inhibición de uno, dos o más proteína quinasas con actividad conocida para la fosforilación de tau. Al igual que los ensayos más sencillos descritos anteriormente, el sustrato, la quinasa diana y el compuesto se añaden a un pocillo de una placa de microvaloración y se incuban con tampones apropiados y otros constituyentes que permitan la fosforilación del sustrato en ausencia de un compuesto inhibidor. El estado de fosforilación del sustrato se puede entonces determinar usando una mezcla de

anticuerpos u otras moléculas con especificidad por sitios de fosforilación individuales en la proteína tau, en donde dichos anticuerpos u otras moléculas se marcan cada una con un indicador exclusivo, como un colorante fluorescente o compuestos con propiedades espectrales únicas en el espectro infrarrojo, visible o ultravioleta. Después de eliminar los anticuerpos no unidos al sustrato o sustratos fosforilados, se determinan los niveles de cada indicador específico usando un dispositivo de lectura apropiado, y los niveles de fosforilación de cada sitio específico en la proteína tau se revelan mediante comparación con un control en el que no se añadió inhibidor de la quinasa.

**[0078]** En una realización preferida de dicho ensayo de cribado multiplex, el sustrato es la proteína tau recombinante desfosforilada y la quinasa se selecciona entre CK1, CK2, GSK-3a, GSK-3b, PKA, CDK5, ERK1/2, SAPK1g, SAPK2a, SAPK2b, SAPK3, SAPK4, quinasas de la familia de proteína quinasas activadas por estrés (SAPK) como p38MAPK y JNK, quinasas de la familia MARK como 110K, cdc2, cdk2, PKC, PKN, TTK, PKB, DYRK, PK, CaMKII, PKD o una mezcla de una o más quinasas. Los sistemas indicadores son preferiblemente anticuerpos marcados, normalmente anticuerpos monoclonales, por ejemplo, aquellos que pueden obtenerse a partir de conejos o ratones usando técnicas bien conocidas en la materia. Los marcajes son preferiblemente compuestos fluorescentes o colorimétricos que están covalentemente unidos a los anticuerpos, más preferiblemente nanopartículas fluorescentes o colorimétricas y más preferiblemente nanopartículas con un espectro Raman único.

### Desarrollo de sustancias miméticas

**[0079]** Una vez se hayan encontrado sustancias candidatas en los ensayos y cribados según la presente invención, estas se pueden usar para diseñar compuestos miméticos para el desarrollo de fármacos. El diseño de miméticos de un compuesto farmacéuticamente activo conocido es una técnica conocida para el desarrollo de compuestos farmacéuticos basados en un compuesto de partida. Esto podría ser deseable cuando el compuesto activo es difícil o caro de sintetizar o cuando no es adecuado para un procedimiento de administración en particular, por ejemplo, los péptidos no son principios activos adecuados para composiciones orales ya que tienden a ser degradados rápidamente por las proteasas del tubo digestivo. El diseño, síntesis y análisis de miméticos se usa generalmente para evitar el cribado aleatorio de un gran número de moléculas en busca de una propiedad deseada.

**[0080]** Hay varias etapas que normalmente se siguen en el diseño de un mimético de un compuesto que tiene una propiedad deseada determinada. En primer lugar, se determinan las partes del compuesto en particular que son críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad deseada. En el caso de un péptido, esto puede hacerse variando sistemáticamente los restos de aminoácidos del péptido, por ejemplo, sustituyendo sucesivamente cada resto. Estas partes o restos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como su «farmacóforo».

**[0081]** Una vez que se ha encontrado el farmacóforo, se modela su estructura según sus propiedades físicas, por ejemplo, estereoquímica, enlaces, tamaño y/o carga, usando los datos de una variedad de fuentes, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos X y RMN. En este proceso de modelado pueden usarse el análisis por ordenador, el mapeo de similitud (que modela la carga y/o volumen de un farmacóforo, en lugar de la unión entre los átomos) y otras técnicas .

**[0082]** En una variante de esta técnica se modela la estructura tridimensional del ligando y su patrón de unión. Esto puede ser especialmente útil cuando el ligando y/o la pareja de unión cambian de conformación durante la unión, lo que permite que el modelo tenga en cuenta esto durante el diseño del mimético.

**[0083]** A continuación, se selecciona una molécula molde en la cual pueden injertarse grupos químicos que mimetizan al farmacóforo. La molécula molde y los grupos químicos injertados en esta pueden seleccionarse convenientemente de modo que el mimético se sintetice fácilmente, es probable que sea farmacológicamente aceptable y no se degrade *in vivo*, a la vez que conserva la actividad biológica del compuesto de partida. Entonces, el mimético o miméticos encontrados con esta técnica pueden someterse a cribado para ver si tienen la propiedad deseada o en qué grado exhiben dicha propiedad. A continuación pueden realizarse una optimización o modificación adicional para llegar a uno o más miméticos finales para su ensayo *in vivo* o clínico.

### Inhibidores

**[0084]** El término «inhibidor» se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice completa o parcialmente la expresión o actividad quinasa de una quinasa. Preferiblemente, un inhibidor de quinasa es un inhibidor específico o casi específico que inhibe la expresión o actividad de una quinasa deseada sin afectar a otras quinasas.

**[0085]** Entre los inhibidores de quinasas se incluyen anticuerpos, formas negativas dominantes y moléculas pequeñas inhibitoras.

5 **[0086]** Entre las moléculas pequeñas inhibitoras de la actividad de Abl se incluyen las fenilaminopirimidinas como imatinib o mesilato de imatinib (Glivec/Gleevec™, metanosulfonato de 4-[(4-metil-1-piperacil)metil]-N-[4-metil-3-[4-(3-piridinil)2-pirimidinil(amino)-fenil]benzamida; Novartis); BMS-354825 [n-(2-cloro-6-metilfenil)-2-(6-(4-(2-hidroxi-etil)piperacil-1-il)-2-metilpirimidin-4-ilamino)tiazol-5-carboxamida]; PD 173955 (Parke Davis); piridopirimidinas como PD166326 (Parke Davis) u ON 012380 (Onconova).

10 **[0087]** Entre las moléculas pequeñas inhibitoras de la actividad de Syk se incluyen picetanol (3,4,3',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno); 579711 (3-(1-metil-1H-indol-3-il-metileno)-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-5-sulfonamida, Calbiochem); ER-27319; y BAY61-3606.

15 **[0088]** Entre las moléculas pequeñas inhibitoras de la actividad de Fyn se incluye PP1 (4-amino-5-(4-metilfenil)-7-(*t*-butil)pirazolo[3,4-*d*]pirimidina).

**[0089]** Entre los inhibidores de la expresión de quinasas se incluyen ARN o ARNpi complementario como se describe a continuación, ácido nucleico de triple hélice o ribozimas.

**[0090]** Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deben ser de cadena sencilla y estar compuestas por desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos está diseñada de modo que favorezca la formación de triple hélice mediante las reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren segmentos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra o en un dúplex. Para más información, véase por ejemplo la publicación PCT N.º WO 97/33551, *supra*; Lee y col., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney y col., Science 241: 456 (1988); Dervan y col., Science 251: 1360 (1991).

30 **[0091]** Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad enzimática capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido por la escisión endonucleolítica. El sitio específico de escisión de la ribozima dentro de un posible ARN diana se puede identificar mediante técnicas conocidas. Para más información, véase por ejemplo Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994) y la publicación PCT N.º WO 97/33551 (publicado el 18 de septiembre de 35 1997).

### **Secuencias complementarias**

**[0092]** La expresión de secuencias de ácidos nucleicos que son complementarias a una secuencia codificadora de un gen (ácidos nucleicos «complementarios») puede inhibir la producción del producto proteico del gen. No se sabe exactamente como ocurre esto, pero se cree que las secuencias de ácidos nucleicos complementarias hibridan con el ARNm celular, formando una molécula de doble cadena. La célula no traduce el ARNm en esta forma bicatenaria, por lo que se inhibe la traducción. Los ácidos nucleicos complementarios pueden tener otros efectos, como la inhibición de la transcripción y del ajuste.

45 **[0093]** El término ácido nucleico «complementario» indica una secuencia de ácido nucleico que tiene suficiente complementariedad con la molécula de ARN para el cual el ácido nucleico complementario es específico como para causar la hibridación molecular entre el ácido nucleico complementario y el ARNm, de modo que se inhibe la traducción del ARNm. Dicha hibridación puede ocurrir *in vivo*, esto es, dentro de la célula.

50 **[0094]** Los oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos o mayores y las moléculas que hibridan con el codón de inicio AUG son especialmente eficaces, puesto que son fáciles de sintetizar y probablemente causan menos problemas que moléculas más grandes cuando se introducen en las células.

### 55 **Interferencia por ARN**

**[0095]** La interferencia por ARN (iARN) es un proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales y plantas, iniciado por ARN de doble cadena (ARNdc) que es homólogo en secuencia al gen silenciado. El proceso de iARN está mediado por moléculas cortas de ARN de doble cadena (ARN interferente

pequeño o ARNip). Los ARNip se pueden introducir en una célula como oligonucleótido corto de ARN de 10-15 pb, o como ARNdc más largos que se escinden posteriormente para producir los ARNip. El ARN puede introducirse en la célula como ARN, o puede ser transcrito a partir de un vector de ADN o ARN.

- 5 **[0096]** Se conocen en la técnica procedimientos relacionados con el uso de iARN para silenciar genes en *C. elegans*, *Drosophila*, plantas y mamíferos (Fire A, y col., 1998 Nature 391: 806-811; Fire, A. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., y col., Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. y col., Science 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., y col., Nature 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., y col., Cell 101, 25-33 (2000);  
10 Bernstein, E., y col., Nature 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., y col., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); documentos W00129058 y W09932619 y Elbashir S M, y col., 2001 Nature 411:494-498).

- [0097]** En algunas realizaciones, el ARNip tiene un saliente en uno o ambos extremos de una o más bases de desoxitimidina. El saliente no se tiene que interpretar como parte de la secuencia del ARNip. Cuando está  
15 presente sirve para aumentar la estabilidad del ARNip dentro de las células reduciendo su susceptibilidad a la degradación por nucleasas.

- [0098]** Las moléculas de ARNip pueden sintetizarse mediante técnicas estándar de síntesis en fase sólida o solución que se conocen en la técnica. Los enlaces entre nucleótidos pueden ser enlaces fosfodiéster o alternativas,  
20 por ejemplo, grupos de enlace de fórmula P(O)S, (tioato), P(S)S, (ditioato); P(O)NR'2; P(O)R'; P(O)OR6; CO o CONR'2 en donde R es H (o una sal) o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>) y R6 es alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>) unido a nucleótidos adyacentes a través de -O- o -S-.

- [0099]** Alternativamente, las moléculas de ARNip o moléculas de ARNdc más largas pueden obtenerse con  
25 tecnología recombinante mediante transcripción de una secuencias de ácido nucleico, preferiblemente contenida dentro de un vector como se describe a continuación.

- [0100]** Otra alternativa es la expresión de una molécula de ARN de horquilla corta (ARNhc) en la célula. Los ARNhc son más estables que los ARNip sintéticos. Un ARNhc consiste en repeticiones invertidas cortas separadas  
30 por una secuencia pequeña en bucle. Una repetición invertida es complementaria al gen diana. El ARNhc se procesa entonces en un ARNip que degrada el ARNm del gen diana y suprime la expresión. El ARNhc puede producirse dentro de una célula transfectando la célula con una construcción de ADN que codifique la secuencia de ARNhc bajo el control de un promotor de ARN polimerasa III, como el promotor H1 o 7SK humano. Alternativamente, el ARNhc puede sintetizarse de forma exógena e introducirse directamente en la célula. Preferiblemente, la  
35 secuencia de ARNhc está entre 40 y 100 bases de longitud, más preferiblemente entre 40 y 70 bases de longitud. El tallo de la horquilla tiene preferiblemente entre 19 y 30 pares de bases de longitud. El tallo puede contener pares G-U para estabilizar la estructura de la horquilla.

- [0101]** Se pueden usar bases de nucleótidos modificadas además de las bases naturales, lo que puede  
40 conferir propiedades ventajosas a las moléculas de ARNip que las contengan.

- [0102]** Por ejemplo, las bases modificadas pueden incrementar la estabilidad de la moléculas de ARNip, reduciendo así la cantidad necesaria de silenciamiento. La provisión de bases modificadas también puede  
45 proporcionar moléculas de ARNip que son más estables, o menos, que el ARNip no modificado.

- [0103]** La expresión «base de nucleótido modificada» también abarca a nucleótidos con una base y/o azúcar modificado covalentemente. Por ejemplo, los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos que tienen azúcares que se unen covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos del grupo hidroxilo en la posición 3' y un grupo distinto al grupo fosfato en la posición 5'. De este modo, los nucleótidos modificados también pueden incluir  
50 azúcares sustituidos en 2', como 2'-O-metil-; 2-O-alquil; 2-O-alil; 2'-S-alquil; 2'-S-alil; 2'-fluoro; 2'-halo o 2-azido-ribose, azúcares  $\alpha$ -anoméricos análogos de azúcar carbocíclico; azúcares epiméricos como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa, azúcares furanosa y sedoheptulosa.

- [0104]** Se conocen en la técnica nucleótidos modificados que incluyen purinas y pirimidinas alquiladas,  
55 purinas y pirimidinas aciladas y otros heterociclos. Estas clases de pirimidinas y purinas son conocidas en la técnica e incluyen pseudoisocitosina, N4,N4-etanocitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometil uracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopentil-adenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-

metilguanina, 5-metilaminometil uracilo, 5-metoxi amino metil-2-tiouracilo, -D-manosilqueosina, 5-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-isopenteniladenina, éster de metilo del ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, 2-tiocitosina, 5-metil-2 tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster de metilo del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, queosina, 2-tiocitosina, 5-propiluracilo, 5-propilcitosina, 5-etiluracilo, 5-etilcitosina, 5-butiluracilo, 5-pentiluracilo, 5-pentilcitosina y 2,6-diaminopurina, metilpseudouracilo, 1-metilguanina y 1-metilcitosina.

### **Composiciones farmacéuticas**

10 **[0105]** Tras la identificación de una sustancia que modula o afecta a la fosforilación o desfosforilación de la proteína tau, la sustancia puede estudiarse más en profundidad. Además, puede fabricarse y/o usarse en la preparación, es decir, fabricación o formulación, de una composición tal como un medicamento, composición farmacéutica o fármaco. Estas pueden administrarse a individuos.

15 **[0106]** De este modo, la descripción de este documento se extiende en varios aspectos, no solo a una sustancia identificada usando los ensayos de cribado y procedimientos de ensayo descritos en este documento, sino también a una composición farmacéutica, medicamento, fármaco u otra composición que comprende dicha sustancia, un procedimiento que comprende la administración de dicha composición a un paciente, por ejemplo, para tratar tauopatías, el uso de dicha sustancia en la fabricación de una composición para su administración en el tratamiento de tauopatías y un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica que comprenda mezclar dicha sustancia con un excipiente, vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros componentes.

**[0107]** Las sustancias identificadas como inhibidores de quinasas o promotores de fosfatasa en los ensayos y procedimientos de ensayo de la presente invención, o compuestos o sustancias surgidas a partir del desarrollo u optimización adicional, se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones se pueden emplear para el tratamiento de tauopatías, esto es, afecciones que se caracterizan por ovillos neurofibrilares o agregados de la proteína tau. Las tauopatías son una clase reconocida de afecciones conocidas por los expertos en la materia entre las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17), parálisis supranuclear progresiva (PSP), enfermedad de Pick, degeneración corticobasal y atrofia multisistémica (AMS). Los depósitos intracelulares de tau son normalmente neuronales o gliales y son filamentosos, generalmente en un estado hiperfosforilado en comparación con el nivel de fosforilación en la proteína tau procedente del cerebro humano control. En el caso de la EA, esta proteína tau hiperfosforilada a menudo se denomina filamento helicoidal apareado (PHF) tau porque deriva de los PHF.

35 **[0108]** Estas composiciones pueden incluir, además de una de las sustancias anteriores, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Estos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía oral intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular e intraperitoneal.

**[0109]** Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede incluir un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

**[0110]** Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la dolencia, el principio activo estará en forma de solución acuosa aceptable por vía parenteral que sea apirógena y tenga el pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia están bien capacitados para preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos como cloruro sódico para inyección, inyección de solución de Ringer o inyección de solución de Ringer con lactato. Pueden incluirse cuando sea necesario conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

55 **[0111]** Si es un polipéptido, anticuerpo, péptido, molécula de ácido nucleico, molécula pequeña u otro compuesto farmacéuticamente útil según la presente invención que se administra a un individuo, la administración preferiblemente es en una «cantidad profilácticamente eficaz» o en una «cantidad terapéuticamente eficaz» (como pueda ser el caso, aunque la profilaxis puede considerarse tratamiento), siendo esto suficiente para mostrar beneficios al individuo. La cantidad real administrada y la proporción y tiempo de la administración dependerán de la

naturaleza y gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y de otros médicos, y típicamente considera los trastornos que están siendo tratados, la afección del paciente individual, el sitio de administración, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins. Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial dependiendo de la afección que se va a tratar.

### **Parte experimental**

10

#### *Purificación de PHF-tau a partir de cerebro de pacientes con Alzheimer*

**[0112]** El filamento helicoidal apareado (PHF) tau se purificó a partir de cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer como describen Hanger y col., 1998. Brevemente, se homogenizó el tejido cerebral y se recuperó el PHF-tau insoluble mediante centrifugación diferencial. Tras la solubilización en guanina y la diálisis frente a tampón de renaturalización, PHF-tau se purificó mediante cromatografía de fase inversa e intercambio iónico.

#### *Preparación de formas mutantes de la proteína tau humana*

**[0113]** Para generar las cinco construcciones de tau, cada una con una única tirosina sustituida por fenilalanina, se usó el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange XL (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos). Los cebadores (sintetizados a medida por Sigma-Genosis) fueron los siguientes: para convertir la Tyr-18 en Phe (dando la construcción de tau Y18F), cebador sentido 5'-CAC GCT GGG ACG TTC GGG TTG GGG GAC-3' (cebador A) y cebador complementario 5'-GTC CCC CAA CCC GAA CGT CCC AGC GTG-3'; para convertir la Tyr-29 en Phe (dando Y29F), cebador sentido 5'-GAT CAG GGG GGC TTC ACC ATG CAC CAA G-3' (cebador B) y cebador complementario 5'-C TTG GTG CAT GGT GAA GCC CCC CTG ATC-3'; para convertir la Tyr-197 en Phe (dando Y197F), cebador sentido 5'-GAT CGC AGC GGC TTC AGC AGC CCC GG-3' (cebador C) y cebador complementario 5'-CC GGG GCT GCT GAA GCC GCT GCG ATC-3'; para convertir la Tyr-310 en Phe (dando Y310F), cebador sentido 5'-GGC AGT GTG CAA ATA GTC TTC AAA CCA GTT GAC CTG AG-3' (cebador D) y cebador complementario 5'-CT CAG GTC AAC TGG TTT GAA GAC TAT TTG CAC ACT GCC-3' y para convertir la Tyr-394 en Phe (dando Y394F), cebador sentido 5'-GCG GAG ATC GTG TTC AAG TCG CCA GTG G-3' (cebador E) y cebador complementario 5'-C CAC TGG CGA CTT GAA CAC GAT CTC CGC-3'. Para cada construcción se determinó la secuencia completa de la inserción (Lark Technologies).

**[0114]** Para sustituir las cinco tirosinas por fenilalanina se usó un kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene) con los cinco cebadores A a E (anteriores). Las colonias se secuenciaron y además se identificaron las construcciones en las que se habían sustituido las cinco tirosinas por fenilalanina (TauYtodasF); se encontraron construcciones en las que quedaba una única tirosina que contenían cuatro fenilalanina y solo la Tyr18, la Tyr29 o la Tyr197. Los mutantes que contenían solo la Tyr310 o solo la Tyr394 se generaron a partir de la construcción con todas Phe mediante mutagénesis dirigida a sitio como anteriormente usando los siguientes cebadores: para la Tyr310 solo, cebador sentido 5'-GGC AGT GTG CAA ATA GTC TAC AAA CCA GTT GAC CTG AG-3' y cebador complementario 5'-CT CAG GTC AAC TGG TTT GTA GAC TAT TTG CAC ACT GCC-3'; y para la Tyr394 solo, cebador sentido 5'-GCG GAG ATC GTG TAC AAG TCG CCA GTG G-3' y cebador complementario 5'-C CAC TGG CGA CTT GTA CAC GAT CTC CGC-3'. Las cinco construcciones en la que quedaba una sola Tyr se denominaron Y18solo, Y29solo, etc. y se verificaron sus secuencias codificadoras de tau (Lark Technologies).

#### *Preparación y purificación de tau recombinante humana*

**[0115]** Se usó un plásmido que expresaba la isoforma de tau más larga (2N4R) para preparar y purificar la tau recombinante humana como está previamente descrito (Mulot y col., 1994). Brevemente, se calentó un lisado celular bacteriano que expresaba tau 2N4R y se centrifugó para eliminar las proteínas termolábiles. El sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio y el material precipitado se solubilizó y dializó en tampón antes de la cromatografía de intercambio catiónico. Las proteínas se eluyeron con NaCl y las fracciones que contenían tau se mezclaron y dializaron frente a tampón Mes pH 6,25, DTT 5 mM y se conservaron congeladas.

55

#### *Fosforilación in vitro de tau recombinante por lisado de cerebro de rata*

**[0116]** Se preparó un extracto de cerebro de rata que contenía proteína quinasas activas homogenizando un cerebro de rata en tampón enfriado en hielo (2 ml de tampón por gramo de cerebro) que contenía Tris-HCl 25 mM

pH 7,5, EGTA 5 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, ácido okadaico 2  $\mu$ M, ortovanadato sódico 1 mM e inhibidores de proteasas. El homogeneizado se centrifugó a 100 000xg durante 1 h y se incubó en hielo durante 30 min con ATP 2 mM y ácido okadaico 10  $\mu$ M. Este extracto (sobrenadante de cerebro de rata, SCR) contenía 7 mg/ml de proteína (Bradford).

5

**[0117]** La proteína tau 2N4R recombinante (100  $\mu$ g/ml) se fosforiló incubando con SCR (1,8 mg/ml de proteína) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con  $MgCl_2$  5 mM, ATP 3 mM, EGTA 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, ácido okadaico 10  $\mu$ M, DTT 1 mM e inhibidores de proteasas a 37 °C durante 24 h. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 5 min, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 16 000xg durante 10 min. El sobrenadante que contenía la proteína tau se extrajo mediante aspiración y se analizó mediante inmunotransferencia y espectrometría de masas.

*Fosforilación in vitro de tau recombinante por proteína tirosina quinasas*

**[0118]** La proteína tau recombinante humana (1  $\mu$ g) se incubó con 50 ng de Abl o Syk (Upstate) en 30  $\mu$ l de tampón quinasa (HEPES 50 mM pH 7,4,  $MnCl_2$  10 mM en presencia de ATP 1 mM) durante 30 minutos a 30 °C. Se añadieron 30  $\mu$ l de tampón de la muestra para PAGE-SDS para detener la reacción.

*Fosforilación in vitro de proteína tau recombinante por Lck y unión posterior del dominio SH2 de Fyn*

20

**[0119]** La proteína tau 2N4R recombinante (440  $\mu$ g/ml) se incubó a 30 °C con Lck recombinante purificado (20-100  $\mu$ g/ml), tampón  $\beta$ -glicerofosfato 40 mM pH 7,5, ATP 3 mM,  $MgCl_2$  25 mM,  $MnCl_2$  5 mM, DTT 1 mM, EDTA 100  $\mu$ M, ortovanadato sódico 1 mM e inhibidores de proteasas. Después de 6 h se calentaron los tubos a 100°C durante 5 min, se enfriaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 16 000xg durante 10 min. Se comprobó en los sobrenadantes la fosforilación de las tirosinas mediante inmunotransferencia, usando el anticuerpo antifosfotirosina 4G10 (Upstate, Inc.) y un anticuerpo anti-tau (Dako).

**[0120]** Se analizó la interacción de tau con el dominio SH2 de Fyn incubando la proteína tau con tirosinas fosforiladas o sin fosforilar (5  $\mu$ g/ml) con microesferas de glutatión-Sepharose<sup>®</sup> que contenían 2-5  $\mu$ g de la proteína de fusión GST-Fyn-SH2 o GST como control. Después de mezclar durante 60 min a 4 °C, las microesferas se lavaron tres veces y se analizó mediante inmunotransferencia la proteína tau y la fosfotirosina como anteriormente.

*Digestión proteolítica en gel de la proteína tau*

**[0121]** La proteína PHF-tau o la proteína tau fosforilada *in vitro* se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) y se tiñeron con azul de Coomassie G coloidal. Se escindieron las bandas de proteína correspondientes a tau, se carbamidometilaron y se digirieron con enzimas proteolíticas (tripsina o Asp-N). Los péptidos se extrajeron de los trozos de gel mediante una serie de lavados con acetonitrilo y acuosos, se secaron y se resuspendieron en bicarbonato sódico 50 mM.

40

*Tratamiento con beta amiloide de neuronas y aislamiento de balsas lipídicas*

**[0122]** Los cultivos primarios de neuronas corticales de rata y humanas se trataron con  $A\beta_{25-35}$  o  $A\beta_{1-42}$  fibrilar durante 1-30 min. Las balsas lipídicas se prepararon a partir de cultivos neuronales no tratados control y tratados con  $A\beta$ , raspando las células de un matraz de cultivo de 80 cm<sup>2</sup> en 2 ml de Triton X-100 al 1% en tampón Mes 25 mM pH 6,5 con inhibidores de proteasas. Las células se rompieron con un homogeneizador Dounce. El homogeneizado se mezcló con 2 ml de sacarosa al 90% (p/v) en tampón Mes 25 mM, NaCl 150 mM pH 6,5 y se puso en un tubo de centrifuga de 12 ml. Se formó un gradiente de sacarosa por etapas de 5-35% colocando encima la mezcla del homogenizado con 4 ml de una solución de sacarosa al 35% (p/v) seguido de 4 ml de solución de sacarosa al 5% (p/v). A continuación, se centrifugó a 39 000 rpm durante 18 h en un rotor Beckman SW41. Se recogieron fracciones de 1 ml de la parte superior de cada gradiente. La fracción que contenía las balsas lipídicas se separó en la interfaz entre la capa de sacarosa al 5% (p/v) y la capa de sacarosa al 35% (p/v), fracciones 4 y 5. Las fracciones que contenían las balsas lipídicas se concentraron mezclando dichas fracciones (4 y 5) con 10 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y centrifugando a 39 000 rpm durante 2 h en un rotor Beckman SW41. Se aspiró el sobrenadante y el sedimento residual se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón de la muestra x2. Las inmunotransferencias de las proteínas de las balsas lipídicas se incubaron con anticuerpos anti-flotilina y se corrigió la carga de proteína mediante escaneo de densitometría. La proteína tau se detectó en las balsas lipídicas incubando las inmunotransferencias de proteínas de las balsas lipídicas con un anticuerpo policlonal anti-tau (DAKO).

55

*Fosforilación de los restos de tirosina de la proteína tau en células cultivadas tratadas con pervanadato*

**[0123]** En un primer grupo de experimentos, las células COS-7 se transfectaron de forma transitoria con construcciones de la isoforma más larga de la proteína tau humana con la etiqueta V5 o con mutantes de tau con la etiqueta V5 en los que se había sustituido una tirosina por una fenilalanina (a saber, Y18F, Y29F, Y197F, Y310F e Y394F). En un segundo grupo de experimentos, las células COS-7 se transfectaron de forma transitoria con la construcción tau con la etiqueta V5 (441) o con los mutantes de tau con la etiqueta V5 en los que solo quedaba una tirosina, las otras cuatro tirosinas habían sido sustituidas por fenilalanina (denominadas Y18solo, Y29 solo, Y197solo, Y310solo e Y394solo, según la tirosina que quede). Con el fin de incrementar la fosforilación de las tirosinas de tau, las células se trataron con el inhibidor de la tirosina fosfatasa pervanadato durante 20 minutos. Las células se recogieron en tampón NETF (NaCl 100 mM, EGTA 2 mM, Tris-Cl 50 mM pH 7,4 y NaF 50 mM) con NP-40 al 1%, ortovanadato 2 mM e inhibidores de proteasas. Las muestras se limpiaron previamente con 40 µl de microesferas de proteína G-Sepharose y se realizaron inmunoprecipitaciones con anticuerpos monoclonales anti-V5 preadsorbidos en microesferas de proteína G-Sepharose. Las células se recogieron en tampón de lisis NETF con NP-40 al 1% y se precipitó la proteína tau con un anticuerpo anti-V5. Los inmunoprecipitados resultantes se separaron por duplicado mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Las inmunotransferencias se realizaron en membranas por duplicado usando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 o el anticuerpo TP70 (anticuerpo anti-tau total). Los anticuerpos unidos se visualizaron mediante detección de quimioluminiscencia potenciada. La cuantificación se realizó escaneando las autorradiografías con GS710 Calibrated Imaging Densitometer (Bio-Rad) y la medición de la densidad óptica relativa con el software Quantity One 4.0.3 (Bio-Rad).

*Fosforilación de restos de tirosina de la proteína tau en células cultivadas mediante la coexpresión de las tirosina quinasa Fyn, Src, Abl y Syk*

**[0124]** El ADNc de Fyn fue donado por D. Markby (Sugen, San Francisco), el ADNc de Src procedía de Upstate (Src cDNA allelic pack), los ADNc de Abl y AblΔXB (una forma constitutivamente activa de Abl, con delección de la mayor parte del dominio SH3) eran de Richard A. Van Etten (Molecular Oncology Research Institute, Boston) y el ADNc de Syk fue donado por H. Band (Brigham and Women's Hospital, Boston). Se usaron las células CHO para los experimentos de cotransfección. Las células CHO se transfectaron transitoriamente con construcciones de la isoforma más larga de la proteína tau humana con la etiqueta V5 o con mutantes de tau con la etiqueta V5 en los que se había sustituido una tirosina por una fenilalanina (denominados Y18F, Y29F, Y197F, Y310F e Y394F). En todos los experimentos se cotransfectaron las células con el vector vacío o con el vector de expresión de proteína tirosina quinasa (Fyn, Src, Abl o AblΔXB). La recogida de las células, la inmunoprecipitación y el análisis por inmunotransferencia se realizaron como se describe en la sección «Fosforilación de los restos de tirosina en la proteína tau en células cultivadas tratadas con pervanadato».

**Resultados***Hallazgo de nuevos sitios de fosforilación de tirosinas en PHF-tau*

**[0125]** En la literatura publicada actualmente se conocen 25 sitios de fosforilación (todos son serinas o treoninas) identificados por medio directos en PHF-tau (Hanger y col., 1998; Morishima-Kawashima y col., 1995). Existen 2 o 3 sitios adicionales que se han identificado solo mediante reactividad con anticuerpos. En función del marcaje con anticuerpos, se ha descrito que la tirosina 18 se fosforila en una proporción de la proteína PHF-tau de cerebro de pacientes con EA. Los presentes inventores han encontrado 12 sitios de fosforilación adicionales en PHF-tau, uno de los cuales es un resto de tirosina (Tyr394), dando un total de 37 sitios. También han encontrado que la Tyr394 está fosforilada en la proteína tau aislada de cerebro fetal humano.

*Nuevos sitios de fosforilación de tirosinas de la proteína tau recombinante generada por lisado de cerebro de rata*

**[0126]** La espectrometría de masas de los digeridos proteolíticos de tau que se fosforilaron con el sobrenadante de cerebro de rata demostró la fosforilación de las tirosinas 310 y 394, además de muchas serinas y treoninas.

*Tratamiento de neuronas con Aβ y composición de las balsas lipídicas*

**[0127]** El tratamiento de cultivos primarios de neuronas de rata con Aβ<sub>25-35</sub> y Aβ<sub>1-42</sub> dio lugar a un rápido aumento de la fosforilación de tirosinas de los componentes proteicos neuronales de las balsas lipídicas. No se observó aumento en el contenido de fosfoserinas o de fosfotreoninas de las proteínas de las balsas lipídicas

después del tratamiento con A $\beta$ . El aumento de la fosforilación de tirosinas era concomitante al aumento de la distribución de Fyn, tau y tubulina dentro de las balsas lipídicas. Los niveles de la quinasa de adhesión focal (FAK) aumentaba transitoriamente en las balsas lipídicas en respuesta a A $\beta$ , mientras que los niveles de la proteína clásica de las balsas lipídicas flotilina permanecían invariables. La inhibición de la fosforilación de tirosinas con el inhibidor de tirosina quinasas PP2 anulaba el aumento inducido por A $\beta$  en la fosforilación de tirosinas de las proteínas de las balsas lipídicas y la distribución de tau dentro de las balsas lipídicas.

*Fosforilación de los restos de tirosina de la proteína tau en células cultivadas tratadas con pervanadato*

10 **[0128]** El primer grupo de cinco mutantes en los que se cambió un resto de tirosina por una fenilalanina (Y18F, Y29F, Y197F, Y310F e Y394F) se transfectó en células COS-7 y las células se trataron durante 20 minutos con pervanadato. El análisis mediante inmunotransferencia realizado con la proteína tau inmunoprecipitada usando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 muestra que la construcción mutante Y394F es la única mutación en una sola  
 15 tirosina que tiene como resultado un efecto significativo, reduciendo la fosforilación de tirosina en aproximadamente el 10% respecto al control natural. La fosforilación de tirosina de las construcciones Y18F, Y29F e Y310F no diferían de forma significativa del control natural. Con respecto a la construcción mutante Y197F, debe destacarse que se observó una reducción en la fosforilación de tirosina en dos de los cinco experimentos que se realizaron con esa construcción. Para confirmar estos resultados, se transfectaron las células COS-7 con el segundo grupo de mutantes en los que solo quedaba un resto de tirosina como única tirosina con las otras cuatro sustituidas por fenilalanina  
 20 (Y18solo, Y29solo, Y197solo, Y310solo e Y394solo). El análisis usando anticuerpos anti-fosfotirosina mostró que el pervanadato no podía provocar la fosforilación de tirosina en las construcciones mutante Y18solo, Y29solo e Y310solo, mientras que el pervanadato sí que inducía un aumento en la fosforilación de tirosina de Y394solo, similar al observado en la proteína tau natural. En dos de los cuatro experimentos realizados con la construcción mutante Y197F solo, se detectó una débil pero clara inmunorreactividad con fosfotirosina. En conjunto, estos  
 25 resultados sugieren que la mayoría de la fosforilación de tirosinas de la proteína tau en las células COS-7 tratadas con pervanadato se produce en la tirosina 394.

*Fosforilación de los restos de tirosina de la proteína tau en células cultivadas que sobreexpresan Fyn*

30 **[0129]** La proteína tau natural y el primer grupo de cinco mutantes en los que un resto de tirosina se sustituyó por fenilalanina (Y18F, Y29F, Y197F, Y310F e Y394) se cotransfectaron con el vector vacío o con el vector de expresión de Fyn en células CHO. El análisis mediante inmunotransferencia realizado con la proteína tau inmunoprecipitada usando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 muestra que las construcciones mutantes Y18F e Y310F son las dos mutaciones en una sola tirosina que tienen como resultado un efecto significativo, reduciendo  
 35 cada mutación la fosforilación de tirosina en aproximadamente el 50% respecto al control no mutado. En conjunto, los resultados sugieren que las tirosinas 18 y 310 son los principales sitios de fosforilación de Fyn.

*Fosforilación de los restos de tirosina de la proteína tau en células cultivadas que sobreexpresan Abl*

40 **[0130]** La proteína tau natural y el primer grupo de cinco mutantes en los que un resto de tirosina se sustituyó por fenilalanina (Y18F, Y29F, Y197F, Y310F e Y394) se cotransfectaron con el vector vacío o con el vector de expresión de Abl $\Delta$ XB en células CHO. El análisis mediante inmunotransferencia realizado con la proteína tau inmunoprecipitada usando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 muestra que Y394F es la mutación de tirosina con el efecto más potente de reducción de la fosforilación de tirosina en aproximadamente el 25% del control natural. Las  
 45 construcciones mutantes Y197F e Y310F también tienen un efecto significativo de reducción de la fosforilación de tirosinas en aproximadamente el 70% del control natural cada una. Por el contrario, las construcciones mutantes Y18F e Y29F no mostraban diferencias con respecto al control natural. En conjunto, los resultados sugieren que Abl fosforila principalmente la proteína tau en la tirosina 394 y que las tirosinas 197 y 310 también son fosforiladas por esta quinasa. Por el contrario, Abl no fosforila las tirosinas 18 y 29.

50

*Fosforilación de los restos de tirosina de la proteína tau en neuronas cultivadas que sobreexpresan Syk*

**[0131]** La proteína tau natural y el primer grupo de cinco mutantes en los que un resto de tirosina se sustituyó por fenilalanina (Y18F, Y29F, Y197F, Y310F e Y394) se cotransfectaron con el vector vacío o con el vector de  
 55 expresión de Syk en células CHO. El análisis mediante inmunotransferencia realizado con la proteína tau inmunoprecipitada usando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10 muestra que mutantes únicos de tau (es decir, con una tirosina mutada por fenilalanina, estando presentes las otras cuatro tirosinas) no mostraron reducciones significativas en la fosforilación de las tirosinas de tau. Los mutantes solo con Y18, Y29, Y197 o Y394 pudieron ser fosforilados cada uno al 20-25% del nivel encontrado con la proteína natural, lo que indica que Syk puede fosforilar

la proteína tau en cada uno de estos sitios.

*Unión del dominio SH2 de Fyn a la proteína tau fosforilada en tirosina*

5 **[0132]** Los experimentos de cosedimentación usando proteínas GST-SH2 unidas a microesferas de glutatión demostraron que la proteína tau fosforilada en tirosina, pero no la proteína tau control no fosforilada, podía unirse al dominio SH2 de Fyn (isoforma B).

10 *Uso de STI 571 para determinar si la fosforilación de la proteína tau en las células está catalizada por una quinasa similar a Abl*

15 **[0133]** El compuesto químico STI 571, también conocido como mesilato de imatinib, Gleevec<sup>®</sup>, Glivec, previamente CGP 57148B, nombre químico metanosulfonato de 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil] benzamida, es un conocido inhibidor de proteína tirosina quinasas y un eficaz fármaco anitileucémico. Este es selectivo de Abl, aunque también inhibe un pequeño número de otras proteína tirosina quinasas como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y c-Kit.

20 **[0134]** Se podría hacer un experimento del siguiente modo para confirmar si una quinasa similar a Abl fosforila la proteína tau en células. Se transfectan células COS-7, CHO o SH-SY5Y con una construcción de tau adecuada, por ejemplo, un plásmido que contenga Tau2N4R-V5-His (natural) y después tratarlas durante 48 horas con STI 571 y después con pervanadato 100 micromolar o el control.

25 **[0135]** Después de una hora más de incubación, las células se recogen y los lisados celulares se inmunoprecipitan con un anticuerpo anti-V5 y se analiza mediante inmunotransferencia con el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10. Se esperaría que, como ya se demostró con el compuesto PP2, STI 571 inhibiría la fosforilación en tirosinas de la proteína tau.

**Hipótesis**

30 **[0136]** La hipótesis es que A $\beta$  es neurotóxico para las neuronas a través de un mecanismo que requiere obligatoriamente la implicación de tau y determinadas proteína tirosina quinasas; probablemente, entre las tirosina quinasas candidatas se incluyen Fyn y Abl, aunque pueden ser necesarias otras quinasas. Se contempla un mecanismo en el que la exposición de las neuronas a A $\beta$  induce la activación de una o más de estas tirosina quinasas, que posteriormente fosforilan la proteína tau, lo que genera sitios de unión para otras proteínas de señalización celular incluido, por ejemplo, un sitio de unión SH2 para Fyn. La proteína tau con las tirosinas fosforiladas se une entonces a los componentes de las balsas lipídicas de la membrana celular en cantidades que son patológicas, lo que desencadena procesos de señalización desconocidos, aunque perjudiciales para la célula que causan la neurodegeneración y la muerte celular.

40 **Bibliografía**

**[0137]**

45 Dunah, A.W., Sirianni, A.C., Fienberg, A.A., Bastia, E., Schwarzschild, M.A. y Standaert, D.G. (2004). Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32. *Mol. Pharmacol.* 65,121-129.

Eckert, G.P., Cairns, N.J., Maras, A., Gattaz, W.F. y Müller, W.E. (2000). Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: Specific changes in Alzheimer's disease. *Dementia* 11, 181-186.

50 Girardot, N., Allinquant, B., Langui, D., Laquerriere, A., Dubois, B., Hauw, J.J. y Duyckaerts, C. (2003). Accumulation of flotillin-1 in tangle-bearing neurones of Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 29, 451-461.

Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L., Blackstock, W.P. y 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.* 71,2465-2476.

55 Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A. y Klein, W.L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A $\beta$ 42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6448-6453.

Ledesma, M.D., Abad-Rodriguez, J., Galvan, C., Biondi, E., Navarro, P., Delacourte, A., Dingwall, C. y Dotti, C.G.

- (2003). Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep.* 4, 1190-1196.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H. y Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 111, 3167-3177.
- 5 Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., Fang, S.M., Do, L.H., Andreadis, A., Van Hoesen, G. y Ksiezak-Reding, H. (2004). Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24, 2304-2312.
- Lee, V.M.Y., Goedert, M. y Trojanowski, J.Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121-1159.
- 10 Li, S.H., Yu, Z.X., Li, C.L., Nguyen, H.P., Zhou, Y.X., Deng, C. y Li, X.J. (2003). Lack of huntingtin-associated protein-1 causes neuronal death resembling hypothalamic degeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23, 6956-6964.
- Liu, T., Perry, G., Chan, H.W., Verdile, G., Martins, R.N., Smith, M.A. y Atwood, C.S. (2004). Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *J. Neurochem.* 88, 554-563.
- 15 McDonald, D.R., Brunden, K.R. y Landreth, G.E. (1997). Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signaling and superoxide production in microglia. *J. Neurosci.* 17, 2284-2294.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K. e Ihara, Y. (1995). Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270, 823-829.
- Mulot, S.F.C., Hughes, K., Woodgett, J.R., Anderton, B.H. y Hanger, D.P. (1994). PHF-tau from Alzheimer's brain comprises four species on SDS-PAGE which can be mimicked by in vitro phosphorylation of human brain tau by glycogen synthase kinase-3b. *FEBS Lett.* 349, 359-364.
- 20 Negro, A., Brunati, A.M., Donella-Deana, A., Massimino, M.L. y Pinna, L.A. (2002). Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *FASEB J.* 16, 210-212.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P. y Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6364-6369.
- 25 Scales, T.M.E., Williamson, R., Anderton, B.H. y Reynolds, C.H. Tyrosine phosphorylation of specific sites on tau by Src family kinases. *Neurobiology of Aging* 23, S500-S501. 2002.
- Ref Type: Generic Shirazi, S.K. y Wood, J.G. (1993). The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport* 4, 435-437.
- 30 Subasinghe, S., Unabia, S., Barrow, C.J., Mok, S.S., Aguilar, M.I. y Small, D.H. (2003). Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J. Neurochem.* 84, 471-479.
- Wang, S.S., Rymer, D.L. y Good, T.A. (2001). Reduction in cholesterol and sialic acid content protects cells from the toxic effects of beta-amyloid peptides. *J. Biol. Chem.* 276, 42027-42034.
- 35 Williamson, R., Scales, T., Clark, B.R., Gibb, G., Reynolds, C.H., Kellie, S., Bird, I.N., Varndell, I.M., Sheppard, P.W., Everall, I. y Anderton, B.H. (2002). Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J. Neurosci.* 22, 10-20.
- Yip, C.M., Elton, E.A., Darabie, A.A., Morrison, M.R. y McLaurin, J. (2001). Cholesterol, a modulator of membrane-associated Ab-fibrillogenesis and neurotoxicity. *J. Mol. Biol.* 311, 723-734.
- 40 Zukerberg, L.R., Patrick, G.N., Nikolic, M., Humbert, S., Wu, C.L., Lanier, L.M., Gertler, F.B., Vidal, M., Van Etten, R.A. y Tsai, L.H. (2000). Cdk5 links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* 26, 633-646.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de cribado de sustancias que son capaces de inhibir la fosforilación de una proteína tau por una tirosina quinasa en el que la proteína tau comprende uno o más sitios de fosforilación, comprendiendo el  
5 procedimiento:
- a) poner en contacto al menos una sustancia candidata, la proteína tau y la tirosina quinasa en condiciones en las que la tirosina quinasa es capaz de fosforilar el sitio (o sitios) de la proteína tau en ausencia de la sustancia  
10 candidata;
- b) determinar si la sustancia candidata inhibe la fosforilación y, opcionalmente en qué grado, de la proteína tau en uno o más sitios de la proteína tau por la tirosina quinasa; y
- c) seleccionar la sustancia candidata que inhibe la fosforilación de la proteína tau en uno o más de los sitios;  
15 en el que la tirosina quinasa es c-Abl.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la proteína tau es un filamento helicoidal apareado tau.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína tau es un fragmento o derivado de la proteína tau con la secuencia de aminoácidos de la figura 1.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína tau tiene más del 80% de identidad de secuencia con una proteína tau que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 1.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que c-Abl fosforila la proteína tau en uno o más sitios seleccionados entre el grupo compuesto por Y197, Y 310 e Y394 de la proteína tau.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que c-Abl fosforila la proteína tau en el sitio Y394 de la  
30 proteína tau.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento además comprende el cribado con la tirosina quinasa Fyn de compuestos candidatos capaces de inhibir la fosforilación de una proteína tau por la tirosina quinasa Fyn en el que la proteína tau comprende uno o más sitios de fosforilación,  
35 comprendiendo el procedimiento:
- a) poner en contacto al menos una sustancia candidata, la proteína tau y la tirosina quinasa Fyn en condiciones en las que la tirosina quinasa Fyn es capaz de fosforilar el sitio (o sitios) de la proteína tau en ausencia de la  
40 sustancia candidata;
- b) determinar si la sustancia candidata inhibe la fosforilación y, opcionalmente en qué grado, de la proteína tau en uno o más sitios de la proteína tau por la tirosina quinasa Fyn; y
- c) seleccionar la sustancia candidata que inhibe la fosforilación de la proteína tau en uno o más de los sitios.  
45
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que Fyn fosforila la proteína tau en uno o más sitios seleccionados entre el grupo compuesto por Y18 e Y310 de la proteína tau.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento además  
50 comprende el cribado con la tirosina quinasa Syk de compuestos candidatos capaces de inhibir la fosforilación de una proteína tau por la tirosina quinasa Syk en el que la proteína tau comprende uno o más sitios de fosforilación, comprendiendo el procedimiento:
- a) poner en contacto al menos una sustancia candidata, la proteína tau y la tirosina quinasa Syk en condiciones en las que la tirosina quinasa Syk es capaz de fosforilar el sitio (o sitios) de la proteína tau en ausencia de la  
55 sustancia candidata;
- b) determinar si la sustancia candidata inhibe la fosforilación y, opcionalmente en qué grado, de la proteína tau en uno o más sitios de la proteína tau por la tirosina quinasa Syk; y

c) seleccionar la sustancia candidata que inhibe la fosforilación de la proteína tau en uno o más de los sitios.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que Syk fosforila la proteína tau en el sitio Y18 de la  
5 proteína tau.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que en la etapa de determinar la presencia, ausencia o grado de fosforilación en un o más sitios de la proteína tau se emplea espectroscopía de masas o un agente de reconocimiento específico de sitio que es capaz de distinguir entre un sitio fosforilado o no  
10 fosforilado; en el que dicho agente de reconocimiento específico de sitio es un anticuerpo monoclonal.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el cribado se realiza en un ensayo multiplex empleando una fase sólida sobre la que se inmovilizan una gran variedad de sustratos y en el que el sustrato comprende fragmentos de la proteína tau que comprenden sitios de fosforilación.  
15
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que los sitios de fosforilación son uno o más de los sitios seleccionados entre el grupo compuesto por Y18, Y29, Y197, Y310 e Y394 de la proteína tau.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, comprendiendo el procedimiento de  
20 identificación de una sustancia candidata como inhibidor de dicha tirosina quinasa, la etapa adicional de optimizar la estructura de la sustancia candidata.

**Fig 1**

1 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT  
 51 PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG  
 101 TTAE EAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK  
 151 IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTTPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP  
 201 GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM  
 251 PDLKNVSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV  
 301 PGGGSVQIVY KVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV  
 351 QSKIGSLDNI THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS  
 401 GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

**Fig 2**

```

1   MLEICLKLVG  CKSKKGLSSS  SSCYLEEALQ  RPVASDFEPQ  GLSEAAARWNS
50  KENLLAGPSE  NDPNLFVALY  DFVASGDNTL  SITKGEKLRV  LGYNHNGEWC
101 EAQTKNGQGW  VPSNYITPVN  SLEKHSWYHG  PVSRNAAEYL  LSSGINGSFL
151 VRESESSPGQ  RSISLRYEGR  VYHYRINTAS  DGKLYVSSSES  RFNTLAELVH
201 HHSTVADGLI  TTLHYPAPKR  NKPTVYGVSP  NYDKWEMERT  DITMKHKLGG
251 GQYGEVYEGV  WKKYSLTVAV  KTLKEDTMEV  EEFLKEAAVM  KEIKHPNLVQ
301 LLGVCTREPP  FYIITEFMTY  GNLLDYLREC  NRQEVNAVVL  LYMATQISSA
351 MEYLEKKNFI  HRDLAARNCL  VGENHLVKVA  DFGLSRLMTG  DTYTAHAGAK
401 FPIKWTAPES  LAYNKFSIKS  DVWAFGVLLW  EIATYGMSPY  PGIDLSQVYE
451 LLEKDYRMER  PEGCPEKVYE  LMRACWQWNP  SDRPSFAEIH  QAFETMFQES
501 SISDEVEKEL  GKQGVRGAVS  TLLQAPELPT  KTRTSRRAAE  HRDTTDVPEM
551 PHSKGQGESD  PLDHEPAVSP  LLPRKERGPP  EGGLNEDERL  LPKDKKTNLF
601 SALIKKKKKT  APTPPKRSSS  FREMDGQPER  RGAGEEEGRD  ISNGALAFTP
651 LDTADPAKSP  KPSNGAGVPN  GALRESGGSG  FRSPHLWKKS  STLTSSRLAT
701 GEEEGGGSSS  KRFLRSCSAS  CVPHGAKDTE  WRSVTLPRDL  QSTGRQFDSS
751 TFGGHKSEKP  ALPRKRAGEN  RSDQVTRGTV  TPPPRLVKKK  EEAADEVFKD
801 IMESSPGSSP  PNLTPKPLRR  QTVAPASGL  PHKEEAKEGS  ALGTPAAAEP
851 VTPTSKAGSG  APGGTSKGPA  EESRVRRHKK  SSESPGRDKG  KLSRLKPAPP
901 PPPAASAGKA  GGKPSQSPSQ  EAAGEAVLGA  KTKATSLVDA  VNSDAAKPSQ
951 PG EGLK KPVL  PATPKPQSAK  PSGTPISPAP  VPSTLPSASS  ALAGDQPSST
1001 AFIPLISTRV  SLRKTRQPPE  RIASGAIKKG  VVLDSTEALC  LAISRNSEQM
1051 ASHAVLEAG  KNLYTFCVSY  VDSIQQMRNK  FAFREAINKL  ENNLRELQIC
1101 PATAGSGPAA  TQDFSKLLSS  VKEISDIVQR

```

**Fig 3**

```

1  MASSGMADSA NHLPFFFGNI TREEAEDYLV QGGMSDGLYL LRQSRNYLGG
51  FALSVAHGRK AHHYTIEREL NGTYAIAGGR THASPADLCH YHSQESDGLV
101 CLLKKPFENRP QGVQPKTGPF EDLKENLIRE YVKQTNWNLQG QALEQAIISQ
151 KPQLEKLIAT TAHEKMPWFH GKISREESEQ IVLIGSKTNG KFLIRARDNN
201 GSYALCLLHE GKVLHYRIDK DKTGKLSIPE GKKFDTLWQL VEHYSYKADG
251 LLRVLTVPCQ KIGTQGNVNF GGRPQLPGSH PATWSAGGII SRIKSYSEPK
301 PGHRKSSPAQ GNRQESTVSF NPYPELAPW AADKGPQREA LPMOTEVYES
351 PYADPEEIRP KEVYLDRKLL TLEDKELGSG NEFTVKKGY Y QMKKVKTVA
401 VKILKNEAND PALKDELLAE ANVMQQLDNP YIVRMIGICE AESWMLV MEM
451 AELGPLNKYL QQNRHVKDKN IIELVHQVSM GMKYLEESNF VHRDLAARNV
501 LLVTQHYAKI SDFGLSKALR ADENYYKAQT HGKWPVKWYA PECINYYKFS
551 SKSDVWSFGV LMWEAFSYGQ KPYRGMKGSE VTAMLEKGER MGCPAGCPRE
601 MYDLMNLCWT YDVENRPGFA AVELRLRNY Y DVVN

```

**Fig 4**

```

1   MGCVQCKDKE  ATKLTEERDG  SLNQSSGYRY  GTDPTPQHYP  SFGVTSIPNY
51  NNFHAAGGQG  LTVFEGGVNSS  SHTGTLRTRG  GTGVTLFVAL  YDYEARTEDD
101 LSFHKGEKFQ  ILNSSEGDWW  EARSLLTGET  GYIPSNYVAP  VDSIQAEEWY
151 FGKLGRKDAE  RQLLSFGNPR  GTFLIRESET  TKGAYSLSIR  DWDDMKGDHV
201 KHYKIRKLDN  GGYIITTRAQ  FETLQQLVQH  YSERAAGLCC  RLVVPCHKGM
251 PRLTDLVKKT  KDVWEIPRES  LQLIKRLGNG  QFGEVVMGTW  NGNTKVAIKT
301 LKPGTMSPEP  FLEEAQIMKK  LKHDKLVQLY  AVVSEEPYIY  VTEYMNKGSL
351 LDFLKDGEGR  ALKLPNLVDM  AAQVAAGMAY  IERMNYIHRD  LRSANILVGN
401 GLICKIADFG  LARLIEDNEY  TARQGAKFPI  KWTAPEAALY  GRFTIKSDVW
451 SFGILLTELV  TKGRVPYPGM  NNREVLQVE  RGYRMPCPQD  CPISLHELMI
501 HCWKKDPEER  PTFEYLQSF  EDYFTATEPQ  YQPGENL

```