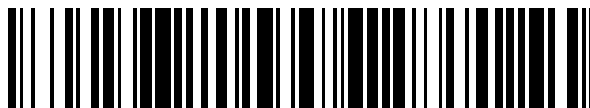


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 885**

21 Número de solicitud: 201530938

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**30.06.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.01.2017**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**22.09.2017**

Fecha de concesión:

**02.10.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**09.10.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070485**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)**

**Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES y  
TETRANEURON S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FRADE LÓPEZ, José María y  
LÓPEZ SÁNCHEZ, Noelia**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Método para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer**

57 Resumen:

Método para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se relaciona con un método in vitro para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad, un método in vitro para diseñar una terapia personalizada en un sujeto que sufre deterioro cognitivo leve y un método in vitro para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad basados en determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente. Asimismo la invención se relaciona con el uso de E2F4 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde E2F4 o la variante se encuentra fosforilado en treonina como marcador de riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer. Por último, la invención se relaciona con un kit que comprende un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 en restos de treonina y el uso de dicho kit.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

ES 2 598 885 B1

## DESCRIPCIÓN

### Método para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer

#### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con métodos para determinar el riesgo de desarrollar Alzheimer, diseñar una terapia personalizada y seleccionar pacientes.

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad de Alzheimer (EA) constituye uno de los trastornos neurodegenerativos con mayor prevalencia en las sociedades occidentales. Hasta la fecha no se conocen terapias que atajen esta dolencia, y la mayoría de los ensayos clínicos que se han diseñado hasta la fecha han estado dirigidos a la inhibición de la producción y/o actividad del péptido beta-amiloide o de la proteína tau hiperfosforilada. Debido al fracaso de los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, sobre todo a raíz de la ausencia de mejora cognitiva obtenida tras el tratamiento con los anticuerpos solanezumab y bapineuzumab, se ha planteado la necesidad de adelantar estos tratamientos hacia fases tempranas de la enfermedad, antes que el proceso neurodegenerativo sea irreversible.

Este tipo de abordaje se está llevando a cabo en la actualidad en pacientes con Alzheimer familiar, una forma rara de Alzheimer que se caracteriza por la existencia de mutaciones que aceleran el proceso neurodegenerativo. No obstante, el mayor porcentaje de pacientes sufre Alzheimer esporádico, un tipo de patología que a día de hoy no es predecible.

Hasta la fecha, los biomarcadores que se han descrito se basan principalmente en técnicas de neuroimagen (por ej., cuantificación de la densidad de placas seniles y de la atrofia en distintas regiones cerebrales, análisis del metabolismo de la glucosa en el cerebro) y de cuantificación de formas solubles de  $\beta$ -amiloide y tau en el líquido cefalorraquídeo o suero sanguíneo de los pacientes (Kang et al., 2014 *Korean J Physiol Pharmacol.* 18: 447-456). Todas estas técnicas se basan, por tanto, en el análisis de productos tardíos de la patología.

Existe la necesidad de identificar marcadores tempranos de Alzheimer no invasivos que permitan realizar el diagnóstico en un estadio lo más inicial posible de la enfermedad y por tanto determinar el riesgo de desarrollar Alzheimer.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad en un sujeto que comprende

- 5        a)        determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- b)        comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia, en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína
- 10 E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con un valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto presenta alto riesgo de desarrollar Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada en un sujeto que sufre deterioro cognitivo leve que comprende

- 15        a)        determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- 20        b)        comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia, en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno
- 25 cognitivo similar a dicha enfermedad.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad que comprende

- 30        a)        determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- b)        comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia,

en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es un candidato a recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de E2F4 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde E2F4 o la variante se encuentra fosforilado en treonina, como marcador de riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 en restos de treonina para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer, para diseñar una terapia personalizada en un sujeto o para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la invención para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad en un sujeto, para diseñar una terapia personalizada en un sujeto que sufre deterioro cognitivo leve o para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1.** Niveles de tetraploidía neuronal en corteza frontal y parietal humana, estimados por citometría de flujo en núcleos celulares frescos positivos para el antígeno NeuN, específico de neuronas. Se observa un incremento en el porcentaje de neuronas tetraploides anterior a la presencia de ovillos neurofibrilares, que en la neocorteza no se detectan hasta los estadios de Braak V-VI, la fase final de la patología donde los pacientes muestran síntomas de la EA. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$  (prueba t de Student).

**Figura 2:** Cuantificación por ELISA, en unidades arbitrarias normalizadas, de los niveles de E2F4 (E2F4) y E2F4 fosforilado en restos Thr (pThr-E2F4) presentes en extractos de corteza cerebral de ratones *wild-type* y APP/PS1 de 8 semanas de edad. \*p<0,05 (prueba t de Student).

5 **Figura 3:** Niveles de tetraploidía neuronal en corteza frontal y parietal de ratones control o APP/PS1 (APP/PS1) de las edades indicadas, estimados por citometría de flujo en núcleos celulares frescos positivos para el antígeno NeuN, específico de neuronas. En los ratones APP/PS1 se observa un incremento en el porcentaje de neuronas tetraploides ya a los 2 meses de edad, anterior a la presencia de placas de  
10  $\beta$ -amiloide (Zhang et al., 2012 *Neurobiol. Aging* 33, 2661-2677). \*p<0,05; \*\*\*p<0,005 (prueba t de Student).

**Figura 4:** Cuantificación por ELISA de las relaciones entre E2F4 fosforilado en restos Thr (pThr-E2F4) y E2F4 total (E2F4) presentes en el suero sanguíneo de ratones *wild-type* y APP/PS1 de 2 (A) y 5 (B) meses de edad. \*p<0,05; \*\*\*p<0,005 (prueba t de  
15 Student).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los inventores de la presente invención han identificado, al factor de transcripción E2F4 fosforilado en restos de treonina como biomarcador de estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer, y por tanto dicho marcador permite predecir el desarrollo de  
20 la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

### Métodos de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad en un sujeto (primer método de la invención) que comprende

- 25 a) determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- b) comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia, en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína  
30 E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con un valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto presenta alto riesgo de desarrollar Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

En una realización particular el sujeto sufre deterioro cognitivo leve.

Por “deterioro cognitivo leve”, también conocido como demencia incipiente o deterioro cognitivo aislado, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una entidad nosológica que pretende describir la sintomatología previa a la demencia. Los individuos afectados presentan daños más allá de lo esperado para su edad y educación, pero que no interfieren significativamente con sus actividades diarias. Está considerado como el límite entre el envejecimiento normal y la demencia.

10 El experto en la materia es capaz de identificar si un sujeto presenta un deterioro cognitivo leve, basándose por ejemplo, en los criterios diagnósticos fijados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM) y en la Clasificación Internacional de Enfermedades que permiten a los médicos realizar su diagnóstico.

15

En una realización particular del primer método de la invención, el sujeto es un humano y la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer o el sujeto es un perro y el trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer es el síndrome de disfunción cognitiva.

20 La expresión “riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad” tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la predisposición, la susceptibilidad, la propensión o la probabilidad de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad. El riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad, generalmente implica que existe un alto o bajo riesgo o un mayor o menor riesgo. Así, un sujeto con riesgo alto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad, tiene una probabilidad de desarrollar dicha enfermedad de al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90%, o al menos un 95%, o al menos un 97%, o al menos un 98%, o al menos un 99%, o al menos un 100%. Del mismo modo, un sujeto con bajo riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad, es un sujeto que tiene al menos una probabilidad de desarrollar dicha enfermedad de al menos un 0%, o al menos un 1%, o al menos un 2%, o al

menos un 3%, o al menos un 5%, o al menos un 10%, o al menos un 20%, o al menos un 30%, o al menos un 40%, o al menos un 49%.

En general, la expresión "predecir el riesgo", "predicción del riesgo", o similares, se refiere al riesgo de que un paciente desarrolle la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad, ya sea alto o bajo. Como se entenderá por los expertos en la materia, la predicción (o el riesgo), aunque sea preferible, no tiene que ser correcta para el 100% de los sujetos a ser evaluados, aunque es preferible que lo sea. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda ser identificada con una mayor probabilidad de tener un determinado resultado. La persona experta en la materia puede determinar sin mayor problema si una parte es estadísticamente significativa utilizando varias herramientas estadísticas bien conocidas de evaluación, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, determinación de valor de p, validación cruzada con índices de clasificación, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o al menos 95%. Los valores de p son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 o inferiores.

El término "enfermedad de Alzheimer o EA" se refiere a un deterioro mental asociado con una enfermedad cerebral degenerativa específica que se caracteriza por la aparición de placas seniles, ovillos neurofibrilares y pérdida neuronal progresiva que se manifiesta clínicamente en deficiencias progresivas de memoria, confusión, problemas de comportamiento, incapacidad de cuidarse por sí mismo, deterioro físico gradual y, por último, la muerte. En formas preferidas de realización, la enfermedad de Alzheimer es enfermedad en cualquiera de los estadios de acuerdo a la escala Braak:

- Estadios I-II: el área cerebral afectada por la presencia de ovillos neurofibrilares se corresponde a la región transentorrinal del cerebro
- Estadios III-IV: el área cerebral afectada se extiende también a zonas de la región límbica como el hipocampo
- Estadios V-VI: el área cerebral afectada implica también la región neocortical

Esta clasificación por estadios neuropatológicos se correlaciona con la evolución clínica de la enfermedad existiendo un paralelismo entre la disminución de la memoria con los cambios neurofibrilares y la formación de placas neuríticas en la corteza entorrinal y el hipocampo (estadios I a IV). Asimismo, la presencia isocortical de estos cambios (estadios V y VI) se correlaciona con alteraciones clínicamente severas. El estado transentorrinal (I-II) corresponde a periodos clínicamente silenciosos de la

enfermedad. El estado límbico (III-IV) corresponde a una EA clínicamente incipiente. El estado neocortical corresponde a una EA completamente desarrollada.

El “síndrome de disfunción cognitiva o SDC” tal y como se usa en la presente invención y que puede ocurrir en cualquier animal de compañía, corresponde a un  
5 estado demencial en el que está comprometido el proceso cognitivo, que puede cursar con sintomatología motora, sensorial o problemas veterinarios. El síndrome de disfunción cognitiva (SDC) del perro, es un desorden neurodegenerativo asociado a la  
10 edad que se caracteriza por provocar un declive en las funciones cerebrales. Al igual que la enfermedad de Alzheimer, se producen depósitos extracelulares de proteína Beta-Amiloide (PBA), pero no depósitos intracelulares de proteína tau. Este depósito de PBA es el resultado final de un gran estrés oxidativo y una mayor formación de formas insolubles de PBA 1- 42, hechos que vendrán determinados la interacción genética y ambiental.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diseñar  
15 una terapia personalizada en un sujeto que sufre deterioro cognitivo leve (segundo método de la invención) que comprende

- a) determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- 20 b) comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia,

en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno  
25 cognitivo similar a dicha enfermedad.

En una realización particular del segundo método de la invención el sujeto es un humano y la terapia es para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o el sujeto es un perro y la terapia es para la prevención y/o el tratamiento del síndrome de disfunción cognitiva.

30 El término “terapia preventiva”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la prevención o conjunto de medidas profilácticas para evitar una enfermedad para prevenir o retrasar la aparición de la sintomatología de la misma. Particularmente, dicho término se refiere a la prevención o el conjunto de medidas para evitar la



aparición o para retrasar la sintomatología clínica asociada a la enfermedad de Alzheimer o a un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad. Resultados clínicos deseados asociados con la administración de dicho tratamiento a un sujeto incluyen pero no se limitan a, la estabilización del estado patológico de la enfermedad, retraso  
5 en la progresión de la enfermedad o mejoría en el estado fisiológico del sujeto.

“Terapia para el tratamiento”, como se usa aquí, se refiere a la recuperación tentativa de un problema de salud, por lo general después de un diagnóstico concretamente de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad. Como tal, no es necesariamente una cura, es decir, una reversión completa de una  
10 enfermedad. Por tanto, “tratamiento” tal como se usa en el presente documento cubre cualquier tratamiento de una enfermedad, un trastorno o un estado de un mamífero, particularmente un ser humano, e incluye inhibir la enfermedad o el estado, es decir, detener su desarrollo; o aliviar la enfermedad o el estado, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el estado o la mejora de uno o más síntomas de la  
15 enfermedad o el estado. La población de sujetos tratados mediante el método incluye un sujeto que padece el estado o la enfermedad indeseable, así como sujetos en riesgo de desarrollar el estado o la enfermedad. Por tanto, un experto en la técnica comprende que un tratamiento puede mejorar el estado del paciente, pero puede no ser una cura completa de la enfermedad.

20 Tratamientos preventivos o curativos adecuados en la enfermedad de Alzheimer o en un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad incluyen pero no se limitan, a inhibidores de colina-esterasa como por ejemplo, clorhidrato de donezepil (Arecept), rivastigmina (Exelon) y galantemina (Reminyl), antagonistas del receptor N-metil D-  
25 aspartato (NMDA) o anticuerpos monoclonales tales como solanezumab y bapineuzumab.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad (tercer método de la invención) que comprende

- 30 a) determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- b) comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia,

en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es un candidato a recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

El término “seleccionar” tal y como se usa aquí, se refiere a la acción de escoger a un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo o curativo de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

En una realización particular del tercer método de la invención el sujeto es un humano y la terapia es para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o el sujeto es un perro y la terapia es para la prevención y/o el tratamiento del síndrome de disfunción cognitiva

El primer, segundo y tercer método de la invención comprenden en una primera etapa determinar en una muestra de un sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente.

Por “muestra” tal y como se usa en la presente invención, se refiere al material biológico aislado de un sujeto. La muestra puede aislarse de cualquier fluido o tejido biológico adecuado, por ejemplo a modo ilustrativo no limitativo, líquido cefalorraquídeo, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, lágrimas, sudor, saliva, orina y heces.

En una realización particular de los métodos de la invención la muestra se selecciona del grupo formado por líquido cefalorraquídeo, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, sangre y células mononucleadas de sangre periférica.

El término “sujeto”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos. En una realización particular, el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza. En otra realización particular, el sujeto es un perro. En una realización más particular, el sujeto sufre deterioro cognitivo leve.

La proteína “E2F4” de humanos corresponde con la proteína identificada como Q16254 en la base de datos de Uniprot (27 Mayo 2015). La proteína E2F4 en perro corresponde con la proteína identificada como J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot

(27 Mayo 2015) y su isoforma identificada como F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot (1 Abril 2015).

En el contexto de la presente invención, el término “variante funcionalmente equivalente de la proteína E2F4” incluye (i) variantes de la proteína E2F4 en las que  
5 uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un resto de aminoácido conservado), en donde tal resto de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético, así como (ii) variantes que comprenden una inserción o una  
10 deleción de uno o más aminoácidos y que desempeñan la misma función que la proteína E2F4, es decir, ser capaz de inhibir la expresión de genes concretamente de genes implicados en la regulación del ciclo celular y replicación de ADN.

Las variantes según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de E2F4 de, al menos, el 50%, al menos el 60%, al  
15 al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y las secuencias específicas de proteína E2F4 definidas anteriormente puede determinarse usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente  
20 conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

El grado de fosforilación de una proteína puede determinarse por cualquier método convencional conocido por los expertos en la materia. Se conocen diversos ensayos  
25 para determinar el estado de fosforilación de una proteína, o el resto de aminoácido que se encuentra fosforilado en una determinada proteína, como por ejemplo los ensayos de actividad quinasa *in vitro* utilizando ATP marcado radioactivamente; la electroforesis bidimensional de las proteínas así fosforiladas y marcadas (que permite analizar cuántos restos de aminoácidos están fosforilados en una proteína);  
30 espectrometría de masas de la proteína previamente purificada cuyo estado de fosforilación se quiere medir; mutagénesis dirigida seguida de ensayo de actividad quinasa *in vitro* con las proteínas purificadas; análisis de fosfo-péptidos que implica la separación en dos dimensiones de una proteína fosforilada tras digestión por tripsina o, el menos complicado técnicamente, Western blot, que contempla el empleo de

anticuerpos contra dicha proteína que reconocen de manera específica el resto de aminoácido o el epítipo de la proteína que se encuentra fosforilado. Las técnicas para detectar restos fosforilados en proteínas son ampliamente conocidas por el experto en la materia y están recogidas en el estado de la técnica. Alternativamente, es posible  
5 realizar una inmunoprecipitación de la proteína E2F4 y determinar mediante Western Blot el nivel de fosforilación total en treoninas o en los residuos de treonina de interés.

En una realización preferida, la determinación de la fosforilación se lleva a cabo mediante la técnica ELISA.

El inmunoensayo conocido como ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos  
10 marcados con enzimas, de manera que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado resulte en la formación de complejos enzimáticamente activos. Debido a que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados en un soporte, los complejos anticuerpo-antígeno están inmovilizados en el soporte y por tanto, pueden ser detectados por la adición de un  
15 sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable, por ejemplo, por espectrofotometría o fluorometría. En una forma preferida, el ensayo ELISA que se emplea en los métodos de la presente invención es un ensayo ELISA sándwich, en donde se emplea un primer anticuerpo (anticuerpo de captura) que se adsorbe sobre un soporte sólido y que es específico para el antígeno a detectar, lo que  
20 permitiría capturar sobre dicho soporte el antígeno a detectar. El ensayo ELISA sándwich requiere el uso de un segundo anticuerpo (anticuerpo de detección) que también es específico para el antígeno que se pretende detectar y que se añade a los complejos anteriormente formados entre el antígeno y el anticuerpo de captura.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término "anticuerpo" pretende incluir tanto  
25 anticuerpos quiméricos o recombinantes como anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales o fragmentos proteolíticos de los mismos, tales como fragmentos, Fab or F(ab')<sub>2</sub>, etc. Además, el ADN que codifica para la región variable del anticuerpo puede insertarse en otros anticuerpos para producir de este modo anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos de cadena sencilla (scFv) pueden ser  
30 polipéptidos compuestos por cadenas sencillas que poseen la capacidad propia de un anticuerpo de unión a un antígeno y que comprenden un par de secuencias de aminoácidos homólogas o análogas a las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina (unión VH-VL o scFv). Los polipéptidos análogos a las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo pueden unirse,

si se desea, a través de un polipéptido de unión. Métodos para la producción de anticuerpos son ampliamente conocidos y están recogidos en el estado de la técnica.

Como entenderá el experto en la materia, puesto que se va a determinar el nivel de fosforilación en restos de treonina de la proteína E2F4 o una variable funcionalmente  
5 equivalente, el ensayo ELISA se puede llevar a cabo mediante un ensayo del tipo ELISA sándwich, en donde el anticuerpo de captura es un anticuerpo específico frente a la proteína E2F4 y en donde el anticuerpo de detección es un anticuerpo específico frente a fosfotreonina o frente a restos concretos de fosfotreonina presentes en la proteína E2F4. Alternativamente, es posible llevar a cabo un ensayo ELISA sándwich  
10 empleando como anticuerpo de captura un anticuerpo anti-fosfotreonina o un anticuerpo específico frente a uno o varios restos concretos de fosfotreonina, con el fin de inmovilizar todas aquellas proteínas con fosforilación en restos de fosfotreonina y un anticuerpo anti-E2F4 como anticuerpo de detección.

Como entenderá el experto en la materia, puesto que se va a determinar el nivel de  
15 fosforilación en restos de treonina de la proteína E2F4 o una variable funcionalmente equivalente, es recomendable cuantificar los niveles globales de la proteína E2F4 de manera que se puedan normalizar los valores de E2F4 fosforilada en treonina. Los niveles de E2F4 se pueden determinar por ejemplo mediante el empleo de un anticuerpo que reconozca E2F4, tal y como los disponibles comercialmente.  
20 Adicionalmente, puesto que se va a determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 es recomendable incluir en los ensayos inhibidores de fosfatasas, de manera que los niveles de fosforilación no se alteren.

En una realización particular de los métodos de la invención, la primera etapa comprende la determinación de la fosforilación del resto de treonina seleccionado del  
25 grupo que consiste en resto de treonina en la posición 248 (Thr248), resto de treonina en la posición 250 (Thr250), resto de treonina en la posición 14 (Thr14), resto de treonina en la posición 163 (Thr163), resto de treonina en la posición 224 (Thr224) y resto de treonina en la posición 333 (Thr333) y combinaciones de los mismos de la proteína E2F4 de humano, o en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación  
30 posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

Tal como aquí se utiliza, el término "posicionalmente equivalente" se refiere a la posición de un aminoácido de una proteína E2F4 que, por alineamiento múltiple de

secuencias de aminoácidos de la proteína E2F4, corresponde a la Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y/o Thr333 de la proteína E2F4 de humano.

El alineamiento múltiple de secuencias puede llevarse a cabo mediante el algoritmo implementado en el programa CLUSTALW2 (empleando los parámetros estándar  
5 (Tipo de alineamiento: "slow"; matriz: Gonnet; "gap open": 10; "gap extensión: 0,1"; KTUP: 1; "Window length: 5"; "Score type: percent"; "Top Diags: 5" y "Pair Gap: 3). En otra forma de realización, el alineamiento múltiple de secuencias se puede llevar a cabo mediante el algoritmo implementado en el programa CLUSTAL OMEGA usando los parámetros estándar (algoritmo HAlign con parámetros por defecto y la "default  
10 transition matrix" es Gonnet, con "gap opening penalti" de 6 bits y "gap extensión" de 1 bit.

En otra realización más particular, los métodos de la invención comprenden la determinación de la fosforilación de uno o más restos de treonina de la proteína E2F4, de humano Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y/o Thr333 o en uno o más restos  
15 de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En una realización más particular, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de uno solo de los restos de treonina seleccionados del grupo formado  
20 por Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333 de la proteína E2F4 de humano, o en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la  
25 fosforilación de dos restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248 y Thr250; Thr248 y Thr14; Thr248 y Thr163; Thr248 y Thr224; Thr248 y Thr333; Thr250 y Thr14; Thr250 y Thr163; Thr250 y Thr224; Thr250 y Thr333; Thr14 y Thr163; Thr14 y Thr224; Thr14 y Thr333; Thr163 y Thr224; Thr163 y Thr333; y Thr224 y Thr333 de la proteína E2F4 de humano, o en dos restos de aminoácidos susceptibles de  
30 fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de tres restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248,Thr250 y Thr14; Thr248,Thr250 y Thr163; Thr248,Thr250 y Thr224; Thr248,Thr250 y Thr333; Thr248,Thr14 y Thr163; Thr248,Thr14 y Thr224; 5 Thr248,Thr14 y Thr333; Thr248,Thr163 y Thr224; Thr248,Thr163 y Thr333; Thr248,Thr224 y Thr333; Thr250,Thr14 y Thr163; Thr250,Thr14 y Thr224; Thr250,Thr14 y Thr333; Thr250,Thr163 y Thr224; Thr250,Thr163 y Thr333; Thr250,Thr224 y Thr333; Thr14,Thr163 y Thr224; Thr14,Thr163 y Thr333; Thr14,Thr224 y Thr333; y Thr163,Thr224 y Thr333 de la proteína E2F4 de humano, o 10 en tres restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de cuatro restos de treonina seleccionados del grupo formado por 15 Thr248,Thr250,Thr14 y Thr163; Thr248,Thr250,Thr14 y Thr224; Thr248,Thr250,Thr14 y Thr333; Thr248,Thr250,Thr163 y Thr224; Thr248,Thr250,Thr163 y Thr333; Thr248,Thr250,Thr224 y Thr333; Thr248,Thr14,Thr163 y Thr224; Thr248,Thr14,Thr163 y Thr333; Thr248,Thr14,Thr224 y Thr333; Thr248,Thr163,Thr224 y Thr333; Thr250,Thr14,Thr163 y Thr224; Thr250,Thr14,Thr163 y Thr333; Thr250,Thr14,Thr224 20 y Thr333; Thr250,Thr163,Thr224 y Thr333; y Thr14,Thr163,Thr224 y Thr333 de la proteína E2F4 de humano, o en cuatro restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

25 En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de cinco restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248,Thr250,Thr14,Thr163 y Thr224; Thr248,Thr250,Thr14,Thr163 y Thr333; Thr248,Thr250,Thr14,Thr224 y Thr333; Thr248,Thr250,Thr163,Thr224 y Thr333; Thr248,Thr14,Thr163,Thr224 y Thr333;y Thr250,Thr14,Thr163,Thr224 y Thr333 de la 30 proteína E2F4 de humano, o en cinco restos de aminoácidos susceptible de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de seis restos de treonina de la proteína E2F4 de humano Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333 o en seis restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación en treonina de la proteína E2F4 de humano tal y como se detecta mediante el empleo de anticuerpos anti-fosfotreonina.

10 En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación media en restos de treonina de la proteína E2F4 de humano. A modo ilustrativo, esta determinación se puede llevar a cabo mediante el aislamiento de la E2F4 humana, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos anti-E2F4 de origen humano, seguido de inmunodetección cuantitativa o semicuantitativa empleando para  
15 ello anticuerpos específicos frente a fosfotreonina

En una realización particular de los métodos de la invención el sujeto es un perro y se determina la fosforilación del resto de treonina seleccionado del grupo que consiste en treonina en la posición 311 (Thr311), treonina en la posición 313 (Thr313), treonina en la posición 76 (Thr76), treonina en la posición 225 (Thr225), treonina en la posición  
20 286 (Thr286), treonina en la posición 391(Thr391), treonina en la posición 40 (Thr40) y combinaciones de los mismos de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante  
25 funcionalmente equivalente.

En otra realización más particular, los métodos de la invención comprenden la determinación de la fosforilación de uno o más restos de treonina de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot Thr311, Thr313, Thr76, Thr225, Thr286, Thr391 y Thr40, o en uno o más restos de un  
30 aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.



En una realización más particular, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de uno solo de los restos de treonina seleccionado del grupo formado por Thr311, Thr313, Thr76, Thr225, Thr286, Thr391 y Thr40 de la E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de dos restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr311 y Thr313; Thr311 y Thr76; Thr311 y Thr225; Thr311 y Thr286; Thr311 y Thr391; Thr311 y Thr40; Thr313 y Thr76; Thr313 y Thr225; Thr313 y Thr286; Thr313 y Thr391; Thr313 y Thr40; Thr76 y Thr225; Thr76 y Thr286; Thr76 y Thr391; Thr76 y Thr40; Thr225 y Thr286; Thr225 y Thr391; Thr225 y Thr40; Thr286 y Thr391; Thr286 y Thr40; y Thr391 y Thr40 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en dos restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de tres restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr311, Thr313 y Thr76; Thr311, Thr313 y Thr225; Thr311, Thr313 y Thr286; Thr311, Thr313 y Thr391; Thr311, Thr313 y Thr40; Thr311, Thr76 y Thr225; Thr311, Thr76 y Thr286; Thr311, Thr76 y Thr391; Thr311, Thr76 y Thr40; Thr311, Thr225 y Thr286; Thr311, Thr225 y Thr391; Thr311, Thr225 y Thr40; Thr311, Thr286 y Thr391; Thr311, Thr286 y Thr40; Thr311, Thr391 y Thr40; Thr313, Thr76 y Thr225; Thr313, Thr76 y Thr286; Thr313, Thr76 y Thr391; Thr313, Thr76 y Thr40; Thr313, Thr225 y Thr286; Thr313, Thr225 y Thr391; Thr313, Thr225 y Thr40; Thr313, Thr286 y Thr391; Thr313, Thr286 y Thr40; Thr313, Thr391 y Thr40; Thr76, Thr225 y Thr286; Thr76, Thr225 y Thr391; Thr76, Thr225 y Thr40; Thr76, Thr286 y Thr391; Thr76, Thr286 y Thr40; Thr76, Thr391 y Thr40; Thr225, Thr286 y Thr391; Thr225, Thr286 y Thr40; Thr225, Thr391 y Thr40; y Thr286, Thr391 y Thr40 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en tres restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de cuatro restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr311,Thr313,Thr76 y Thr225; Thr311,Thr313,Thr76 y Thr286; Thr311,Thr313,Thr76 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr76 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr225 y Thr286; Thr311,Thr313,Thr225 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr225 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr286 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr76,Thr225 y Thr286; Thr311,Thr76,Thr225 y Thr391; Thr311,Thr76,Thr225 y Thr40; Thr311,Thr76,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr76,Thr286 y Thr40; Thr311,Thr76,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr225,Thr286 y Thr40; Thr311,Thr225,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr313,Thr76,Thr225 y Thr286; Thr313,Thr76,Thr225 y Thr391; Thr313,Thr76,Thr225 y Thr40; Thr313,Thr76,Thr286 y Thr391; Thr313,Thr76,Thr286 y Thr40; Thr313,Thr76,Thr391 y Thr40; Thr313,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr313,Thr225,Thr286 y Thr40; Thr313,Thr225,Thr391 y Thr40; Thr313,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr76,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr76,Thr225,Thr286 y Thr40; Thr76,Thr286,Thr391 y Thr40; y Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en cuatro restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de cinco restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr311,Thr313,Thr76,Thr225 y Thr286; Thr311,Thr313,Thr76,Thr225 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr76,Thr225 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr76,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr76,Thr286 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr76,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr225,Thr286 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr225,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr76,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr76,Thr225,Thr286 y Thr40; Thr311,Thr76,Thr225,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr76,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr313,Thr76,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr313,Thr76,Thr225,Thr286 y Thr40; Thr313,Thr76,Thr225,Thr391 y Thr40; Thr313,Thr76,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr313,Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40; y Thr76,Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en cinco restos de aminoácidos

susceptible de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de seis restos de treonina seleccionados del grupo formado por  
 5 Thr311,Thr313,Thr76,Thr225,Thr286 y Thr391; Thr311,Thr313,Thr76,Thr225,Thr286 y Thr40;  
 Thr311,Thr313,Thr76,Thr225,Thr391 y Thr40;  
 Thr311,Thr313,Thr76,Thr286,Thr391 y Thr40; Thr311,Thr313,Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40;  
 Thr311,Thr76,Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40; y  
 10 Thr313,Thr76,Thr225,Thr286,Thr391 y Thr40 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en seis restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

15 En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de siete restos de treonina Thr311,Thr313, Thr76, Thr225, Thr286, Thr391 y Thr40 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o en siete restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por  
 20 alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización particular de los métodos de la invención el sujeto es un perro y se determina la fosforilación del resto de treonina seleccionado del grupo que consiste en posiciones 251 (Thr251), 253 (Thr253), 14 (Thr14), 165 (Thr165), 226 (Thr226), 332  
 25 (Thr332) y 241(Thr241) y combinaciones de los mismos, de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

30 En una realización más particular, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de uno solo de los restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251, Thr253, Thr14, Thr165, Thr226, Thr332 y Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra

proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de dos restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251 y  
 5 Thr253; Thr251 y Thr14; Thr251 y Thr165; Thr251 y Thr226; Thr251 y Thr332; Thr251 y Thr241; Thr253 y Thr14; Thr253 y Thr165; Thr253 y Thr226; Thr253 y Thr332; Thr253 y Thr241; Thr14 y Thr165; Thr14 y Thr226; Thr14 y Thr332; Thr14 y Thr241; Thr165 y Thr226; Thr165 y Thr332; Thr165 y Thr241; Thr226 y Thr332; Thr226 y Thr241; y Thr332 y Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso  
 10 F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en dos restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la  
 15 fosforilación de tres restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251, Thr253 y Thr14; Thr251, Thr253 y Thr165; Thr251, Thr253 y Thr226; Thr251, Thr253 y Thr332; Thr251, Thr253 y Thr241; Thr251, Thr14 y Thr165; Thr251, Thr14 y Thr226; Thr251, Thr14 y Thr332; Thr251, Thr14 y Thr241; Thr251, Thr165 y Thr226; Thr251, Thr165 y Thr332; Thr251, Thr165 y Thr241;  
 20 Thr251, Thr226 y Thr332; Thr251, Thr226 y Thr241; Thr251, Thr332 y Thr241; Thr253, Thr14 y Thr165; Thr253, Thr14 y Thr226; Thr253, Thr14 y Thr332; Thr253, Thr14 y Thr241; Thr253, Thr165 y Thr226; Thr253, Thr165 y Thr332; Thr253, Thr165 y Thr241; Thr253, Thr226 y Thr332; Thr253, Thr226 y Thr241; Thr253, Thr332 y Thr241;  
 25 Thr14, Thr165 y Thr226; Thr14, Thr165 y Thr332; Thr14, Thr165 y Thr241; Thr14, Thr226 y Thr332; Thr14, Thr226 y Thr241; Thr14, Thr332 y Thr241; Thr165, Thr226 y Thr332; Thr165, Thr226 y Thr241; Thr165, Thr332 y Thr241; y Thr226, Thr332 y Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en tres restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de  
 30 secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de cuatro restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251, Thr253, Thr14 y Thr165; Thr251, Thr253, Thr14 y Thr226; Thr251, Thr253, Thr14 y Thr332; Thr251, Thr253, Thr14 y Thr241; Thr251, Thr253, Thr165 y Thr226;

Thr251,Thr253,Thr165 y Thr332; Thr251,Thr253,Thr165 y Thr241;  
 Thr251,Thr253,Thr226 y Thr332; Thr251,Thr253,Thr226 y Thr241;  
 Thr251,Thr253,Thr332 y Thr241; Thr251,Thr14,Thr165 y Thr226; Thr251,Thr14,Thr165  
 y Thr332; Thr251,Thr14,Thr165 y Thr241; Thr251,Thr14,Thr226 y Thr332;  
 5 Thr251,Thr14,Thr226 y Thr241; Thr251,Thr14,Thr332 y Thr241; Thr251,Thr165,Thr226  
 y Thr332; Thr251,Thr165,Thr226 y Thr241; Thr251,Thr165,Thr332 y Thr241;  
 Thr251,Thr226,Thr332 y Thr241; Thr253,Thr14,Thr165 y Thr226; Thr253,Thr14,Thr165  
 y Thr332; Thr253,Thr14,Thr165 y Thr241; Thr253,Thr14,Thr226 y Thr332;  
 Thr253,Thr14,Thr226 y Thr241; Thr253,Thr14,Thr332 y Thr241; Thr253,Thr165,Thr226  
 10 y Thr332; Thr253,Thr165,Thr226 y Thr241; Thr253,Thr165,Thr332 y Thr241;  
 Thr253,Thr226,Thr332 y Thr241; Thr14,Thr165,Thr226 y Thr332; Thr14,Thr165,Thr226  
 y Thr241; Thr14,Thr165,Thr332 y Thr241; Thr14,Thr226,Thr332 y Thr241; y  
 Thr165,Thr226,Thr332 y Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso  
 F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en cuatro restos de aminoácidos  
 15 susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y  
 como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una  
 variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la  
 fosforilación de cinco restos de treonina seleccionados del grupo formado por  
 20 Thr251,Thr253,Thr14,Thr165 y Thr226; Thr251,Thr253,Thr14,Thr165 y Thr332;  
 Thr251,Thr253,Thr14,Thr165 y Thr241; Thr251,Thr253,Thr14,Thr226 y Thr332;  
 Thr251,Thr253,Thr14,Thr226 y Thr241; Thr251,Thr253,Thr14,Thr332 y Thr241;  
 Thr251,Thr253,Thr165,Thr226 y Thr332; Thr251,Thr253,Thr165,Thr226 y Thr241;  
 Thr251,Thr253,Thr165,Thr332 y Thr241; Thr251,Thr253,Thr226,Thr332 y Thr241;  
 25 Thr251,Thr14,Thr165,Thr226 y Thr332; Thr251,Thr14,Thr165,Thr226 y Thr241;  
 Thr251,Thr14,Thr165,Thr332 y Thr241; Thr251,Thr14,Thr226,Thr332 y Thr241;  
 Thr251,Thr165,Thr226,Thr332 y Thr241; Thr253,Thr14,Thr165,Thr226 y Thr332;  
 Thr253,Thr14,Thr165,Thr226 y Thr241; Thr253,Thr14,Thr165,Thr332 y Thr241;  
 Thr253,Thr14,Thr226,Thr332 y Thr241; Thr253,Thr165,Thr226,Thr332 y Thr241; y  
 30 Thr14,Thr165,Thr226,Thr332 y Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de  
 acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en cinco restos de aminoácidos  
 susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y  
 como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una  
 variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de seis restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251, Thr253, Thr14, Thr165, Thr226 y Thr332; Thr251, Thr253, Thr14, Thr165, Thr226 y Thr241; Thr251, Thr253, Thr14, Thr165, Thr332 y Thr241; Thr251, Thr253, Thr14, Thr226, Thr332 y Thr241; Thr251, Thr253, Thr165, Thr226, Thr332 y Thr241; Thr251, Thr14, Thr165, Thr226, Thr332 y Thr241; y Thr253, Thr14, Thr165, Thr226, Thr332, Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en seis restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación de siete restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251, Thr253, Thr14, Thr165, Thr226, Thr332 y Thr241 de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o en siete restos de aminoácidos susceptibles de fosforilación posicionalmente equivalentes de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos o en una variante funcionalmente equivalente.

En otra realización, los métodos de la invención comprenden determinar la fosforilación media en restos de treonina de la proteína E2F4 de perro empleando para ello un anticuerpo anti-fosfotreonina. A modo ilustrativo, esta determinación se puede llevar a cabo mediante el aislamiento de E2F4 de perro, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos anti-E2F4 de perro, seguido de inmunodetección cuantitativa o semicuantitativa empleando para ello anticuerpos específicos frente a fosfotreonina.

En otra realización, los métodos de la invención comprende determinar la fosforilación en treonina de la proteína E2F4 de perro tal y como se detecta mediante el empleo de anticuerpos anti-fosfotreonina.

Una segunda etapa de los métodos de la invención comprende comparar el nivel de fosforilación obtenido en la primera etapa de los métodos con un valor de referencia.

El término “valor de referencia”, como se usa en el presente documento, se refiere a criterios predeterminados usados como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite

- superior o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor mediana, un valor de media, o un valor comparado con un control particular o valor basal. Un valor de referencia se puede basar en un valor de una muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de muestra del sujeto que se analiza, pero en un momento anterior en el tiempo. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tal como de una población de sujetos del grupo coincidente de edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra que se analiza. En una realización particular el valor de referencia para un resto de aminoácido fosforilado en la proteína E2F4 es el nivel de fosforilación de dicho resto de la proteína en una muestra de un sujeto o población de sujetos control, es decir que no presentan ningún trastorno neurodegenerativo, en concreto que no presentan enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- Tras la segunda etapa de comparación y de acuerdo con el primer método de la invención, un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con un valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto presenta alto riesgo de desarrollar Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.
- Según el segundo método de la invención, un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.
- Según el tercer método de la invención, un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es un candidato a recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.
- Por “incremento en el nivel de fosforilación” tal y como se usa en la presente invención se refiere a que el nivel de fosforilación de E2F4 en al menos un resto de treonina es mayor que un valor de referencia. Los niveles de fosforilación se consideran mayores que su valor de referencia cuando es al menos el 1,5%, al menos el 2%, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el

30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el 130%, al menos el 140%, al menos el 150% o más mayores que el valor de referencia.

Asimismo, en el contexto de la presente invención, el nivel de fosforilación disminuye cuando el nivel de fosforilación en una muestra es menor que un valor de referencia. Los niveles de fosforilación se consideran que son menores que su valor de referencia cuando es al menos el 5%, al menos el 10%, al menos 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el 130%, al menos el 140%, al menos el 150% o más menores que el valor de referencia.

15 Uso como marcador de riesgo

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de E2F4 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde E2F4 o la variante se encuentra fosforilado en treonina como marcador de riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer.

20 En una realización particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en la treonina seleccionada del grupo que consiste en treonina en posición 248 (Thr248), treonina en la posición 250 (Thr250), treonina en la posición 14 (Thr14), treonina en la posición 163 (Thr163), treonina en la posición 224 (Thr224), treonina en la posición 333 (Thr333) y combinaciones de las mismas y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización más particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en uno o más restos de treonina de la proteína E2F4, de humano Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y/o Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

30 En una realización más particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en uno solo de los restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer



En otra realización particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en dos restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248 y Thr250; Thr248 y Thr14; Thr248 y Thr163; Thr248 y Thr224; Thr248 y Thr333; Thr250 y Thr14; Thr250 y Thr163; Thr250 y Thr224; Thr250 y Thr333; Thr14 y Thr163; Thr14 y Thr224; Thr14 y Thr333; Thr163 y Thr224; Thr163 y Thr333; y Thr224 y Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en tres restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248, Thr250 y Thr14; Thr248, Thr250 y Thr163; Thr248, Thr250 y Thr224; Thr248, Thr250 y Thr333; Thr248, Thr14 y Thr163; Thr248, Thr14 y Thr224; Thr248, Thr14 y Thr333; Thr248, Thr163 y Thr224; Thr248, Thr163 y Thr333; Thr248, Thr224 y Thr333; Thr250, Thr14 y Thr163; Thr250, Thr14 y Thr224; Thr250, Thr14 y Thr333; Thr250, Thr163 y Thr224; Thr250, Thr163 y Thr333; Thr250, Thr224 y Thr333; Thr14, Thr163 y Thr224; Thr14, Thr163 y Thr333; Thr14, Thr224 y Thr333; y Thr163, Thr224 y Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en cuatro restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248, Thr250, Thr14 y Thr163; Thr248, Thr250, Thr14 y Thr224; Thr248, Thr250, Thr14 y Thr333; Thr248, Thr250, Thr163 y Thr224; Thr248, Thr250, Thr163 y Thr333; Thr248, Thr250, Thr224 y Thr333; Thr248, Thr14, Thr163 y Thr224; Thr248, Thr14, Thr163 y Thr333; Thr248, Thr14, Thr224 y Thr333; Thr248, Thr163, Thr224 y Thr333; Thr250, Thr14, Thr163 y Thr224; Thr250, Thr14, Thr163 y Thr333; Thr250, Thr14, Thr224 y Thr333; Thr250, Thr163, Thr224 y Thr333; y Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en cinco restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr248, Thr250, Thr14, Thr163 y Thr224; Thr248, Thr250, Thr14, Thr163 y Thr333; Thr248, Thr250, Thr14, Thr224 y Thr333; Thr248, Thr250, Thr163, Thr224 y Thr333; Thr248, Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333; y Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización particular, E2F4 es de origen humano y se encuentra fosforilada en seis restos de treonina de la proteína E2F4 de humano Thr248, Thr250, Thr14, Thr163, Thr224 y Thr333 y la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización del uso de E2F4 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde E2F4 o la variante se encuentra fosforilado en treonina como marcador de riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer, la E2F4 es de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot y se encuentra fosforilada en la treonina seleccionada del grupo que consiste en treonina en la posición 311 (Thr311), treonina en la posición 313 (Thr 313), treonina en la posición 76 (Thr76), treonina en la posición 225 (Thr225), treonina en la posición 286 (Thr286), treonina en la posición 391(Thr391), treonina en la posición 40 (Thr40) y combinaciones de las mismas y el trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer es el síndrome de disfunción cognitiva.

En otra realización más particular, E2F4 es de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot y se encuentra fosforilada en uno, dos, tres, cuatro, cinco o los siete restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr311, Thr313, Thr76, Thr225, Thr286, Thr391 y Thr40.

Las posibles combinaciones de los restos de treonina fosforilados de E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot han sido descritas previamente en relación con los métodos de la invención y son igualmente aplicables a este aspecto.

En otra realización del uso de E2F4 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde E2F4 o la variante se encuentra fosforilado en treonina como marcador de riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer, la E2F4 es de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot se encuentra fosforilada en la treonina seleccionada del grupo que consiste en treonina en la posición 251 (Thr251), treonina en la posición 253 (Thr253), treonina en la posición 14 (Thr14), treonina en la posición 165 (Thr165), treonina en la posición 226 (Thr226), treonina en la posición 332 (Thr332) y treonina en la posición 241(Thr241) y combinaciones de las mismas y el trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer es el síndrome de disfunción cognitiva.

En otra realización más particular, E2F4 es de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot y se encuentra fosforilada en uno, dos, tres, cuatro, cinco o los siete restos de treonina seleccionados del grupo formado por Thr251, Thr253, Thr14, Thr165, Thr226, Thr332 y Thr241.

Las posibles combinaciones de los restos de treonina fosforilados de E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot han sido descritas previamente en relación con los métodos de la invención y son igualmente aplicables a este aspecto.

- 5 Los términos descritos anteriormente son igualmente aplicables a este aspecto.

Kit de la invención

- En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 en restos de treonina para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer, para diseñar una terapia personalizada en un sujeto o para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer.
- 10

- Por “kit” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un producto que contiene los distintos reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Materiales adecuados para el empaquetado de los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones.
- 15
- 20
- 25

Por “reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación”, tal y como se emplea en la invención se entiende un compuesto capaz de detectar un resto fosforilado de una proteína.

- 30 En una realización particular, el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 se selecciona del grupo formado por

- 5
- a) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 248 (Thr248) de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 10
- b) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en la posición 250 (Thr250) de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 15
- c) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 14 (Thr14) de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 20
- d) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 163 (Thr163) de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 25
- e) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 224 (Thr224) de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 30
- f) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 333 (Thr333) de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos
- 35

- 5 g) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en Thr de la proteína E2F4 de humano o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 10 h) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 311 (Thr311) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 15 i) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 313 (Thr313) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 20 j) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 76 (Thr76) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 25 k) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 225 (Thr225) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 30 l) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 286 (Thr286) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de
- 35

una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,

5 m) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 391 (Thr391) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente  
10 de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,

n) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 40 (Thr40) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot o de  
15 una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,

o) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en Thr en la  
20 proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot, o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos.

25

En una realización particular, el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 se selecciona del grupo formado por

a) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 251 (Thr251) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de  
30 una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,

- 5
- b) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 253 (Thr253) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 10
- c) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 14 (Thr14) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 15
- d) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 165 (Thr165) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 20
- e) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 226 (Thr226) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 25
- f) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 332 (Thr332) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 30
- 35

- 5 g) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 241 (Thr241) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos,
- 10 h) un reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en Thr en la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot, o de una variante funcionalmente equivalente en un resto de un aminoácido susceptible de fosforilación posicionalmente equivalente de otra proteína E2F4 tal y como se define por alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos.
- 15 Más particularmente el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 248 (Thr248) de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 humana que comprende la posición 248 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.
- 20 En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 250 (Thr250) de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 humana que comprende la posición 250 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.
- 25 En otra realización particular, el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 14 (Thr14) de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 humana que comprende la posición 14 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.
- 30 En otra realización más particular, el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 163 (Thr163) de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 humana que comprende la posición 163 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.



En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 224 (Thr224) de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 humana que comprende la posición 224 y en donde  
5 dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular, el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 333 (Thr333) de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 humana que comprende la posición 333 y en donde  
10 dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en Thr de la proteína E2F4 de humano es un anticuerpo anti-fosfotreonina.

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 311 (Thr311) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 311 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.  
15

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición 313 (Thr313) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 313 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.  
20  
25

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 76 (Thr76) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot es anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 76 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.  
30

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 225 (Thr225) de la

proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot es anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 225 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

- 5 En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 286 (Thr286) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 286 y en donde dicho resto  
10 de Thr se encuentra fosforilado.

- En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 391 (Thr391) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la  
15 secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 391 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

- En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 40 (Thr40) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso J9NSJ4 en la base de datos de Uniprot  
20 es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 40 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular, el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en Thr de la proteína E2F4 de perro es un anticuerpo anti-fosfotreonina.

- 25 En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 251 (Thr251) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 251 y en donde dicho resto de  
30 Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 253 (Thr253) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot

es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 253 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

5 En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 14 (Thr14) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 14 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

10 En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 165 (Thr165) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 165 y en donde dicho resto de  
15 Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 226 (Thr226) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la  
20 secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 226 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 332 (Thr332) de la proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot  
25 es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 332 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización más particular el reactivo capaz de determinar el nivel de fosforilación en el resto de treonina en la posición en la posición 241 (Thr241) de la  
30 proteína E2F4 de perro con número de acceso F1P6Y0 en la base de datos de Uniprot es un anticuerpo que reconoce de forma específica un fosfopéptido que comprende la secuencia de E2F4 de perro que comprende la posición 241 y en donde dicho resto de Thr se encuentra fosforilado.

En otra realización el kit de la invención comprende uno o más reactivos mencionados anteriormente.

Adicionalmente, el kit de la invención comprende un reactivo que es capaz de unirse de forma específica a la proteína E2F4. En una realización más particular, dicho  
5 reactivo es un anticuerpo.

Por "reconocimiento específico o unión específica" tal y como se usa en la presente invención cuando se refiere a un péptido o proteína con un residuo fosforilado, se refiere a que dicho reactivo solo reconoce el péptido o proteína cuando se encuentra fosforilada en el residuo de interés y no muestra reacción cuando no se encuentra  
10 fosforilada. Cuando se refiere a un péptido o proteína independientemente de su nivel de fosforilación, se refiere a que el reactivo es capaz de reaccionar con al menos un epítipo del péptido o la proteína, en contraposición a una interacción no específica.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente invención puede ser un anticuerpo natural policlonal o monoclonal o un anticuerpo no natural, por ejemplo, un anticuerpo  
15 de dominio único, un anticuerpo de cadena única de fragmento variable, un microanticuerpo, etc. Métodos para producir tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos empleados en la invención se marcan con un marcador detectable (por ejemplo, un colorante fluorescente o una  
20 enzima detectable), o son modificados para facilitar la detección (por ejemplo, con biotina para permitir la detección con un avidina o estreptavidina). En otras realizaciones, el reactivo no será directamente marcado o modificado.

En ciertas realizaciones, los kits incluyen los reactivos en la forma de una matriz. La matriz incluye al menos dos reactivos diferentes adecuados para la determinación de  
25 los niveles de fosforilación en uno o más restos de interés unidos a un sustrato en un patrón predeterminado (por ejemplo, una rejilla). En consecuencia, la presente invención proporciona matrices que comprenden los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de fosforilación de uno o más restos de aminoácidos mencionados en la invención.

30 La localización de los diferentes reactivos (los "reactivos de captura") permite la medición de los niveles de fosforilación de un número de diferentes restos de aminoácidos en la misma reacción. Kits que incluyen los reactivos en forma matricial son comúnmente en formato sándwich, por lo que tales kits pueden contener también

reactivos de detección. Normalmente, en el kit se incluyen diferentes reactivos de detección, cada reactivo de detección específicos para un anticuerpo diferente. Los reactivos de detección en tales realizaciones son normalmente reactivos específicos para las mismas proteínas que los reactivos unidos al sustrato (aunque los reactivos de detección típicamente se unen a una porción diferente o en el sitio en la proteína de los reactivos enlazados al sustrato), y son generalmente reactivos de detección por afinidad. Al igual que con los reactivos de detección de cualquier otro formato de ensayo, los reactivos de detección pueden ser modificados con un resto detectable, modificados para permitir la unión de un resto detectable por separado, o sin modificar se. Los kits de tipo matriz que incluyen reactivos de detección que están modificados o no modificados para permitir la unión de un resto detectable también pueden contener restos adicionales detectables (por ejemplo, restos detectables que se unen al reactivo de detección, tales como anticuerpos marcados que se unen sin modificar reactivos de detección o estreptavidina modificada con un resto detectable para la detección de biotina modificados reactivos de detección).

Los anticuerpos pueden provocarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, un hámster o conejo puede inmunizarse con una forma inmunogénica de una proteína E2F4 fosforilada en un resto de treonina concreto (por ejemplo, un fragmento antigénico que puede provocar una respuesta de anticuerpos, por ejemplo un péptido sintético que contiene el aminoácido fosforilado). Técnicas para conferir inmunogenicidad a una proteína o péptido incluyen conjugación con vehículos u otras técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse una porción de peptidilo de un polipéptido en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización puede monitorizarse por la detección de títulos de anticuerpos en plasma o suero. Pueden usarse ELISA estándar u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos.

Tras la inmunización, pueden obtenerse los antisueros reactivos con un polipéptido y, si se desea, aislarse anticuerpos policlonales del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) pueden recogerse de un animal inmunizado y fusionarse por procedimientos de fusión de células somáticas estándar con células inmortalizantes tales como células de mieloma para dar células de hibridoma. Tales técnicas son muy conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma, como la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos, y la técnica del hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos. Las

células de hibridoma pueden cribarse inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con los polipéptidos y los anticuerpos monoclonales aislados.

En otra realización más particular, el reactivo que es capaz de unirse de forma  
5 específica a la proteína E2F4 se encuentra inmovilizado en un soporte.

Los términos descritos anteriormente son igualmente aplicables a este aspecto

#### Uso de los kits de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit de la invención para  
10 determinar el riesgo de un sujeto desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un  
trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad en un sujeto, para diseñar una terapia  
personalizada en un sujeto que sufre deterioro cognitivo leve o para seleccionar un  
paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento  
de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

Los términos descritos anteriormente son igualmente aplicables a este aspecto.

15 La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se  
deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la  
invención.

### **Materiales y métodos**

#### *Ratones*

20 Se emplearon ratones doble transgénicos APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>deltaE9</sup> (APP/PS1)[Fernandez et  
al., 2012 *Mol. Psychiatry* 17, 705-718] y controles C57BL6/J.

#### *Obtención de suero sanguíneo*

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital (2mg/10g de peso corporal), y  
sometidos a la extracción de 0,2-0,5 ml de sangre procedente del ventrículo derecho  
25 mediante una aguja hipodérmica (25G), antes de ser sacrificados por decapitación.  
Las muestras de sangre fueron almacenadas en tubos de ensayo sin heparina, e  
incubadas a 37°C durante 1 hora con el fin de obtener coágulos sanguíneos. Las  
muestras se incubaron posteriormente a 4°C durante al menos 12 h con objeto de  
retraer el coágulo sanguíneo. Seguidamente se retiró el coágulo con cuidado de no  
30 lisar los glóbulos rojos, y las muestras fueron centrifugadas (4.000 rpm) durante 15

minutos a 4°C para eliminar los posibles restos de coagulación. Los sobrenadantes (sueros) se guardaron congelados a -80°C para su posterior uso.

#### *Muestras de tejido*

Se usaron hemicortezas cerebrales de ratones BL6/C57 (Control) y APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>deltaE9</sup> (APP/PS1) [Fernandez et al.,2012 Mol. Psychiatry. 17: 705-718] sacrificados en día 5 postnatal 0 (P0) o a 2 y 5 meses de edad (2m y 5m respectivamente) y conservados a -80°C.

También se usaron muestras de corteza frontal y parietal humanas obtenidas del Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid) y el Banco de Cerebros de la 10 Región de Murcia (Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia) y conservadas a -80°C. Los procedimientos de obtención de las muestras han sido aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Salud Carlos III y el Subcomité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Madrid, Spain).

#### *Preparación de suspensión de núcleos celulares*

15 30-40 mg de corteza humana o una hemicorteza cerebral murina fueron disgregados en un homogeneizador Dounce con 3 ml de tampón fosfato salino (PBS) libre de DNasas, conteniendo Triton X-100 al 0.1% (Sigma-Aldrich, T8787) (PBS-T) e inhibidor de proteasas cOmplete mini EDTA free (Roche Applied Science, 11 836 170 001) según indicaciones del fabricante. El homogeneizado así obtenido fue centrifugado a 20 4°C durante 2 min a 200g. El volumen del sobrenadante así obtenido fue ajustado a 12 ml con PBS-T y centrifugado a 4°C durante 4 min a 400g. El pellet así obtenido fue mantenido en hielo en un volumen total de 900 µl de PBS-T durante 20 min y posteriormente resuspendido suavemente mediante pipeteo.

#### *Marcaje inmunofluorescente de la suspensión nuclear*

25 Los núcleos de la suspensión nuclear fueron inmuno-marcados con el anticuerpo específico neuronal anti-NeuN (clon A60, Millipore, mab377). Una alícuota de 400 µl de la suspensión nuclear (ver arriba) a la que se le incorporaron 0.5 mg/mL albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, A4503) y 10% de suero bovino (Life Technologies, 16170-086) fue incubada durante 12h a 4°C con los anticuerpo primario 30 anti-NeuN a la dilución 1:800 y secundario anti-mouse IgG-alexa 488 a la dilución 1:500. Otra alícuota fue incubada en las mismas condiciones sin el anticuerpo primario, constituyendo el control negativo. Tras la incubación con los anticuerpos la

muestra fue filtrada (filtro de nylon de poro 30 µm), su volumen ajustado a 600 µl con PBS conteniendo ioduro de propidio y RNasa para una concentración final de 50 µg/mL y 25 µg/mL respectivamente.

#### *Citometría de flujo*

- 5 La cuantificación del porcentaje de neuronas 4C fue llevada a cabo mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACSAria (BD Biosciences) y su laser de excitación de argón (488). La emisión ioduro de propidio incorporado al ADN y la señal del fluoróforo Alexa-488 asociado al marcaje con anti-NeuN se detectaron con los filtros de emisión BP 530/30 y BP 616/23 respectivamente. La selección de las
- 10 distintas poblaciones analizadas siguió el método descrito por López-Sánchez y Frade *J. Neurosci.* 33: 7488-7500,2013.

#### *Análisis estadístico*

- Los análisis de Citometría fueron realizados con al menos cuatro individuos de cada grupo replicados al menos tres veces en ratón y dos veces en humanos. La
- 15 significación estadística se analizó mediante la prueba t de Student.

#### *Cuantificación de E2F4 y E2F4 fosforilado en Thr mediante ELISA*

- Se preparó una solución del anticuerpo policlonal de conejo anti-E2F4 (Ref. AP09986PU-N; Acris) a 20 µg/ml en TBS (50 mM Tris-HCl, pH7,5; 150 mM NaCl). Se añadieron 50 µl de la solución anterior sobre el fondo de cada pocillo de una placa de
- 20 96 pocillos Microtest™ (Ref. 351177; BectonDickinson). Se usaron al menos seis pocillos por cada punto experimental, tres de ellos para cuantificar los niveles relativos de E2F4 y los tres restantes para cuantificar la forma fosfoThr-E2F4. En paralelo se añadieron 50 µl de TBS sobre el fondo de otros seis pocillos para obtener el valor de fondo del análisis. Finalmente, la placa se cubrió con un plástico adhesivo, y se
- 25 incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se retiraron las soluciones de los pocillos, los cuales fueron lavados dos veces con 200 µl de TBS cada vez. Seguidamente se añadieron 150 µl de TBS conteniendo un 3% de albúmina de suero bovino (tampón de bloqueo) sobre el fondo de cada pocillo, y se cubrió la placa con un plástico adhesivo. La placa se incubó entonces durante al menos 2 h a temperatura ambiente. Tras esta
- 30 incubación se retiraron las soluciones de los pocillos, los cuales fueron lavados dos veces con 200 µl de TBS cada vez. Seguidamente se prepararon diluciones del suero sanguíneo en tampón de bloqueo (dilución 1/10), y se añadieron 50 µl de cada dilución



sobre el fondo de los pocillos recubiertos con el anticuerpo anti-E2F4 policlonal de conejo, así como sobre los pocillos incubados con TBS. Posteriormente se cubrieron las placas con un plástico adhesivo, siendo incubadas durante al menos 4 h a temperatura ambiente. Tras retirar las diluciones de suero de los pocillos, éstos fueron

5 lavados cuatro veces con 200 µl de TBS cada vez. Seguidamente se preparó una dilución 1/1.000 (en tampón de bloqueo) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-E2F4, clon LLF4-2 (Ref. MABE160; Millipore). Esta solución se empleó para evaluar los niveles de E2F4 en el suero. También se preparó otra dilución 1/1.000 (en tampón de bloqueo) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfoThr (clon 20H6.1) (Ref. 05-10 1923; Millipore). Esta solución se empleó para estimar los niveles relativos de fosfoThr-E2F4 en el suero. Tras añadir 50 µl de estas soluciones sobre el fondo de los pocillos que les correspondía (para cuantificar E2F4 o fosfoThr-E2F4), las placas fueron cubiertas con un plástico adhesivo e incubadas toda la noche a 4°C. Transcurrido este periodo, se retiraron las soluciones de los pocillos y éstos fueron

15 lavados cuatro veces con 200 µl de TBS. Entonces se preparó una dilución 1/2.000 (en tampón de bloqueo) de Goat Anti-Mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (Ref.170-6516; BioRad), y se añadieron 50 µl de esta solución sobre el fondo de todos y cada uno de los pocillos de análisis. Entonces se cubrió la placa con un plástico adhesivo, y se incubó al menos durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se retiraron

20 las soluciones de los pocillos y éstos fueron lavados ocho veces con 200 µl de TBS. Posteriormente se disolvió una tableta de ABTS (Ref. 11 112 422 001; Roche) en 50 ml de buffer para ABTS (Ref. 11 112 597 001; Roche), y se añadieron 150 µl de esta solución sobre el fondo de todos y cada uno de los pocillos de análisis, así como sobre tres pocillos sin tratar para estimar el valor del blanco. La placa fue incubada entonces

25 en torno a 15-45 min, a temperatura ambiente y la densidad óptica a 405 nm fue cuantificada en los distintos pocillos usando un lector de ELISA. Tras sustraer el blanco, se restaron los valores obtenidos en los pocillos tratados con el anticuerpo policlonal de conejo anti-E2F4 de los obtenidos en los pocillos incubados inicialmente con TBS. Los valores de fosfoThr-E2F4 así obtenidos se dividieron finalmente entre

30 los obtenidos para E2F4.

#### **Ejemplo 1-Análisis de los niveles de fosforilación en residuos Thr de E2F4 en suero sanguíneo de ratones APP/PS1**

El cerebro de los enfermos de Alzheimer sufre un proceso de tetraploidización similar al que ocurre de manera natural durante el desarrollo embrionario en sus neuronas y

35 que precede a los daños neuropatológicos que definen la patología (Fig. 1).

Cuando se estudia la corteza cerebral de ratones transgénicos APP/PS1, se observa que la corteza cerebral de estos ratones muestra un incremento significativo en los niveles de fosforilación de E2F4 en restos Thr cuando se compara con ratones control (Fig. 2). Este fenómeno ya se observa en ratones de ocho semanas, es decir, mucho  
5 antes de que se detecten acumulaciones de péptido  $\beta$ -amiloide y otras alteraciones neuropatológicas en esta línea murina, que tienen lugar a partir de los 3,5 meses de edad (Zhang et al., 2012 *Neurobiol. Aging* 33: 2661-2677). Además, este incremento de fosforilación es concomitante con el proceso de tetraploidización neuronal que se observa en la corteza cerebral de estos ratones, (Fig. 3). Por tanto, la fosforilación de  
10 E2F4 y la tetraploidización neuronal serían los eventos más tempranos de que tenemos noticia, previos a la EA.

Se puede observar cómo los niveles de fosfoThr-E2F4 aumentan significativamente en el suero de los ratones APP/PS1 de 2 meses de edad (Fig. 4A), justo cuando se observa que la tetraploidía neuronal se ve incrementada sustancialmente (Fig. 3). Por  
15 el contrario, los niveles de fosfoThr-E2F4 disminuyen significativamente en el suero de los ratones APP/PS1 cuando estos ratones tienen 5 meses de edad (Fig. 4B) y el proceso de tetraploidización ya se ve muy disminuido (Fig. 3).

Por tanto, el aumento de los niveles de E2F4 fosforilado en Thr en muestras de un paciente puede ser empleado para el diagnóstico de la EA (enfermedad de Alzheimer).  
20 Además, dado que el aumento de los niveles de E2F4 fosforilado en Thr se produce en un momento de la enfermedad anterior a la aparición de los síntomas, es posible usar este marcador como pronóstico para determinar el riesgo de que un sujeto desarrolle la enfermedad de Alzheimer. Además, esto puede llevarse a cabo de forma mínimamente invasiva dado que los niveles de E2F4 fosforilado en Thr pueden  
25 detectarse en plasma y tejidos periféricos.

## REIVINDICACIONES

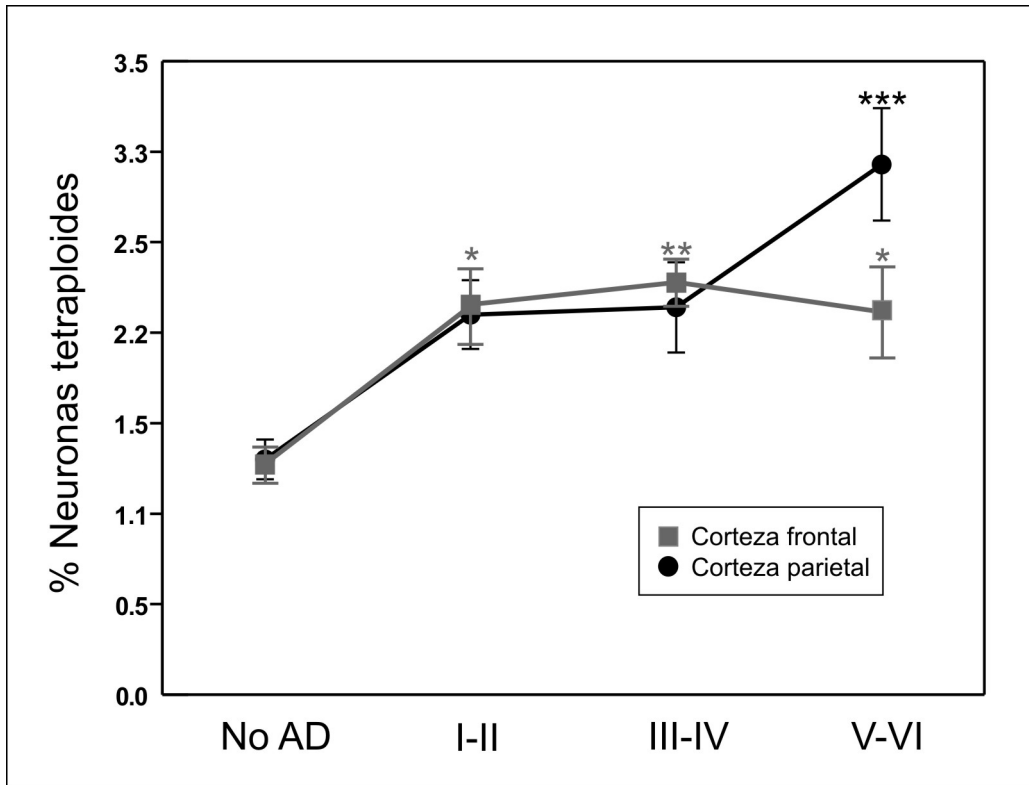
1. Método *in vitro* para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad en un sujeto que comprende
  - 5 a) determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
  - b) comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia, en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con un valor  
10 de referencia, es indicativo de que dicho sujeto presenta alto riesgo de desarrollar Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.
  
2. Método según la reivindicación 1 en donde el sujeto sufre deterioro cognitivo leve.
  
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 o 2 en donde el sujeto es un humano y la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer o en donde el sujeto es un perro y el trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer es el síndrome de disfunción cognitiva.
  
- 20 4. Método *in vitro* para diseñar una terapia personalizada en un sujeto que sufre deterioro cognitivo leve que comprende
  - a) determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
  - b) comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia,  
25 en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es susceptible de recibir una terapia para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.
  
- 30 5. Método según la reivindicación 4 en donde el sujeto es un humano y la terapia es para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o en donde el sujeto es un perro y la terapia es para la prevención y/o el tratamiento del síndrome de disfunción cognitiva.

35

6. Método *in vitro* para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad que comprende
- 5 a) determinar en una muestra del sujeto el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente y
- b) comparar el nivel de fosforilación obtenido en a) con un valor de referencia, en donde un incremento en el nivel de fosforilación en restos de treonina en la proteína E2F4 o en una variable funcionalmente equivalente comparado con el valor de referencia, es indicativo de que dicho sujeto es un candidato a recibir una terapia
- 10 para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.
7. Método según la reivindicación 6 en donde el sujeto es un humano y la terapia es para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o en donde el
- 15 sujeto es un perro y la terapia es para la prevención y/o el tratamiento del síndrome de disfunción cognitiva
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde la muestra se selecciona del grupo de líquido cefalorraquídeo, suero sanguíneo, plasma sanguíneo,
- 20 sangre y células mononucleadas de sangre periférica.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el nivel de fosforilación se determina mediante ELISA.
- 25 10. Uso de E2F4 o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde E2F4 o la variante se encuentra fosforilado en treonina como marcador de riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a la enfermedad de Alzheimer.
- 30 11. Uso del kit que comprende un reactivo capaz determinar el nivel de fosforilación de la proteína E2F4 en restos de treonina para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad en un sujeto, para diseñar una terapia personalizada en un sujeto que
- 35 sufre deterioro cognitivo leve o para seleccionar un paciente susceptible de ser tratado con una terapia para la prevención y/o tratamiento de Alzheimer o de un trastorno cognitivo similar a dicha enfermedad.

12. Uso del kit según la reivindicación 11 que comprende adicionalmente un reactivo que es capaz de unirse de forma específica a la proteína E2F4.
- 5 13. Uso del kit según la reivindicación 12 en donde el reactivo que es capaz de unirse de forma específica a la proteína E2F4 es un anticuerpo.
- 10 14. Uso del kit según las reivindicaciones 12 o 13 en donde el reactivo que es capaz de unirse de forma específica a la proteína E2F4 se encuentra inmovilizado en un soporte.

Fig. 1



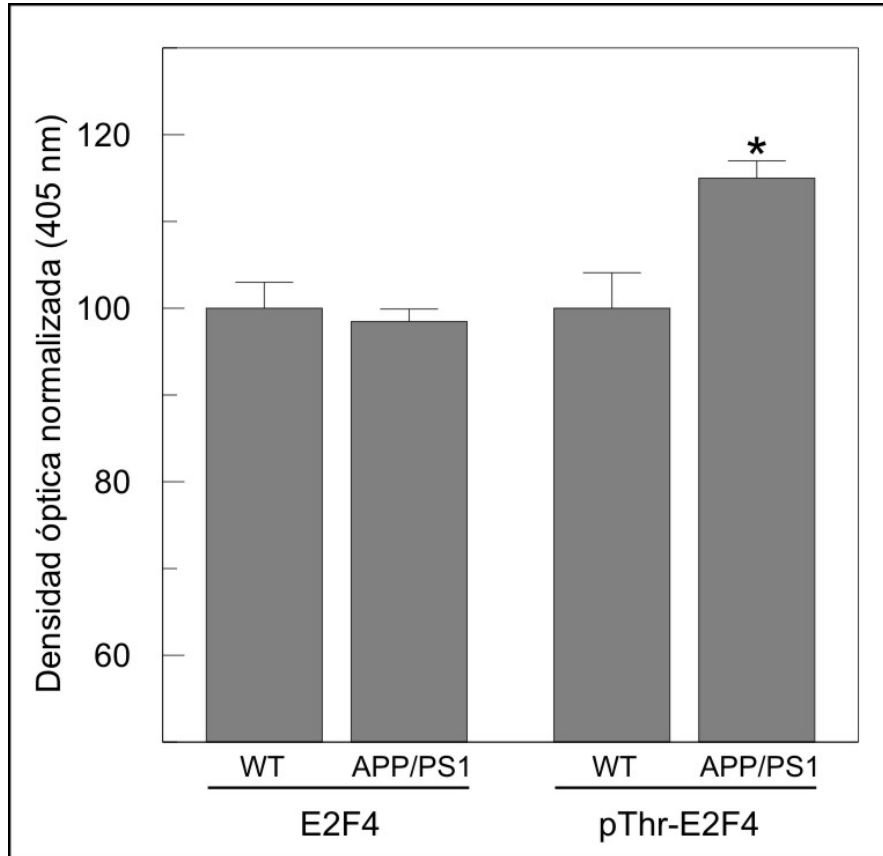


Fig. 2

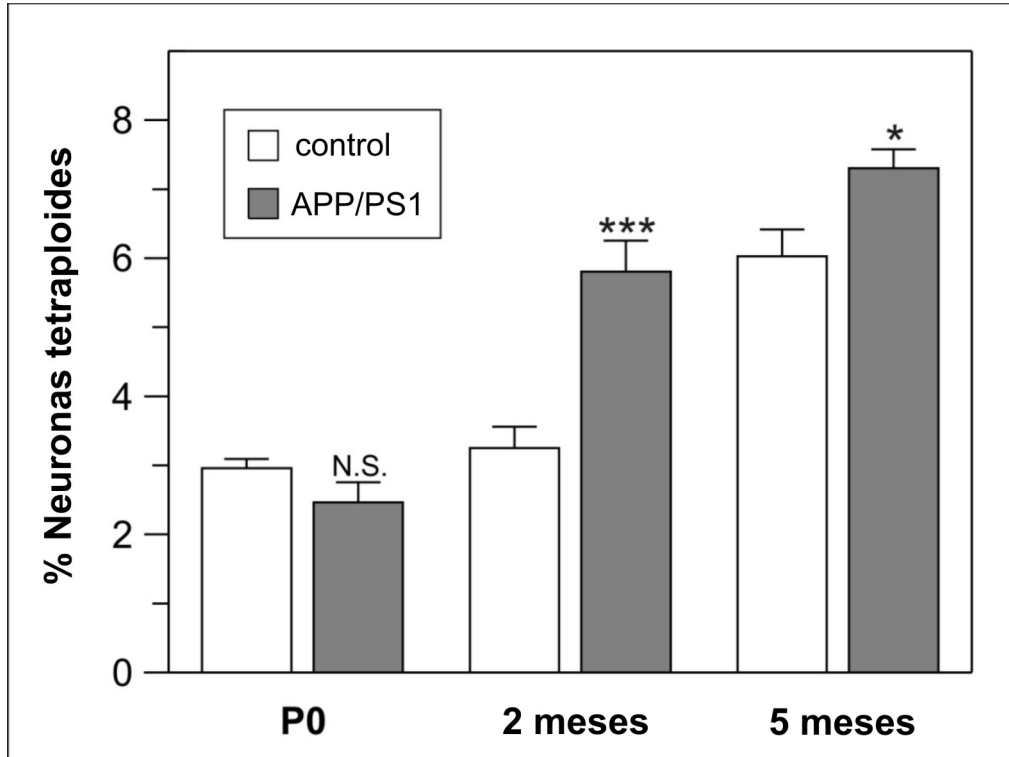


Fig. 3



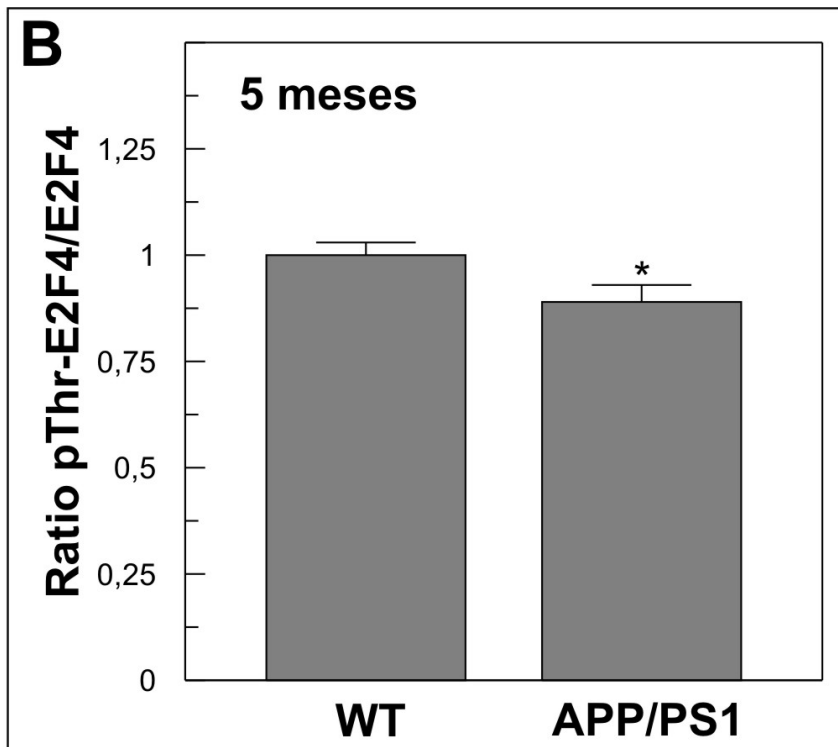
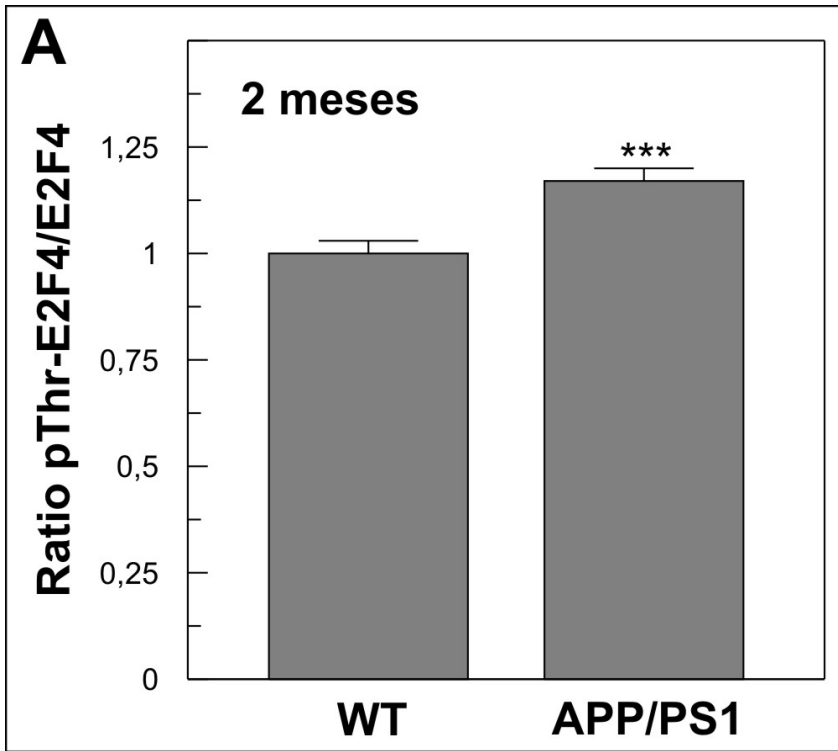


Fig. 4