



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 286 911**

② Número de solicitud: 200303031

⑤ Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **22.12.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.2007**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Cantabria**  
**Avda. de los Castros, s/n**  
**39300 Santander, Cantabria, ES**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑦ Inventor/es: **Zabala Otaño, Juan Carlos;**  
**Ávila de Grado, Jesús;**  
**Villegas Sordo, Juan Carlos;**  
**López Fanarraga, Mónica;**  
**Abad Lloret, Xabier y**  
**Gómez Ramos, Alberto**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de identificación de compuestos inhibidores del proceso de polimerización de filamentos tau tipo PHFs y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de identificación de compuestos inhibidores del proceso de polimerización de filamentos tau tipo PHFs y sus aplicaciones.

La presente invención presenta un procedimiento de identificación compuestos reguladores, preferentemente inhibidores, del proceso de polimerización de filamentos tau tipo PHFs, basado en un modelo celular eucariota transformado mediante ingeniería genética, que expresa una forma proteica de tau mutante que se comporta como hiperfosforilada, preferentemente la forma tau<sup>VLW</sup>, que condene mutaciones en las posiciones G272V, de P301L, y de R406W. Otros objetos de la presente invención lo constituyen un modelo celular transformado por un sistema o vector de expresión tau<sup>VLW</sup>, construcciones genéticas tau<sup>VLW</sup> y los sistemas de expresión tau<sup>VLW</sup> necesarios para la expresión de dicha proteína tau hiperfosforilada y para la formación de los filamentos tipo PHFs. Estos compuestos podrán ser utilizados en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de otras enfermedades neurodegenerativas denominadas Taupatías.

ES 2 286 911 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de compuestos inhibidores del proceso de polimerización de filamentos tau tipo PHFs y sus aplicaciones

**Sector de la técnica**

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina y en concreto en el área del descubrimiento de nuevos compuestos terapéuticos de patologías humanas neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer u otras tautopatías. De forma más particular la patente se refiere a procedimientos de formación del proceso de polimerización o ensamblaje de filamentos tau tipo PHF para la elaboración de procedimientos de identificación de compuestos terapéuticos.

**Estado de la técnica**

El sistema nervioso (SN) es ciertamente el órgano más complejo y menos conocido del cuerpo humano. Esto es en parte debido a su gran número de células, y a la gran variedad de éstas. No obstante, si sólo considerásemos estos aspectos del SN lo podríamos comparar con algunos otros sistemas. La característica que lo hace único, es que en el SN sus componentes celulares principales, las neuronas, establecen entre sí y con sus dianas contactos muy precisos que confieren una increíble diversidad funcional y estructural al sistema. Desgraciadamente, el tejido nervioso se caracteriza también por su muy limitada capacidad de reparación y reposición celular. Este hecho conlleva un aumento progresivo de alteraciones celulares resultando a largo plazo en la aparición de enfermedades de tipo neurodegenerativo tardío. Así pues, en sociedades como la nuestra donde el desarrollo sanitario ha mejorado notablemente la calidad de vida de sus ciudadanos prolongando su longevidad por encima de los 70-80 años, patologías neurodegenerativas del tipo enfermedad de Alzheimer, representan una de las más graves preocupaciones sociales y económicas del presente y futuro.

La enfermedad de Alzheimer fue descrita por primera vez en 1906 por un psiquiatra alemán, Alois Alzheimer. Esta enfermedad de aparición esporádica a principios del siglo XX donde la vida media era de alrededor de 50 años, es hoy en día una de nuestra grandes preocupaciones sociales dado que aproximadamente el 10% de los mayores de 65 años, y casi el 50% de los mayores de 85 presentan esta patología, caracterizada por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas (demencia). Se trata, por tanto, de una de las enfermedades con mayor impacto sociosanitario tanto en la actualidad como en el futuro, y para la cual no existe ningún tratamiento eficaz.

Desde el punto de vista histopatológico, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de dos tipos de depósitos proteicos anormales, los ovillos neurofibrilares y las placas amiloides y, en zonas específicas de la corteza cerebral de los pacientes y, finalmente, por la atrofia de las regiones cerebrales afectadas, que resulta de la masiva pérdida de sinapsis y neuronas.

Tau es una colección de proteínas asociadas a microtubulos (MAPs) que se expresan desde un único gen en el cromosoma 17. Recientemente se identificaron numerosas mutaciones en el gen de tau en pacientes con demencias frontotemporales y Parkinson ligado al cromosoma 17. Este hecho corrobora genéticamente la importancia de la implicación de tau en enfermedades como Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares (NFT, del inglés *neurofibrillary tangles*) son agregados intracelulares de filamentos helicoidales apareados (*paired helical filaments* PHFs) y filamentos rectos (*straight filaments*, SFs), constituidos fundamentalmente por formas hiperfosforiladas de la proteína tau. Estos filamentos de tau se encuentran no sólo en los ovillos neurofibrilares sino también en el interior de neuritas distróficas.

La proteína tau hiperfosforilada se acumula en el citoplasma de las neuronas afectadas y da origen a la formación de ovillos neurofibrilares. En este sentido, hay que indicar la correlación existente entre el número de ovillos neurofibrilares y el grado de demencia en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, así como la coincidencia en los patrones de progresión de la patología de la enfermedad de Alzheimer y los depósitos en las regiones afectadas. La importancia de la proteína tau está fuertemente favorecida por el hecho de que los acúmulos de tau también aparecen, en ausencia de placas amiloides, en otras enfermedades neurodegenerativas denominadas Taupatías que incluyen: la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (CBD), la enfermedad de Pick (PD) y la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17). Además, el descubrimiento de mutaciones autosómicas dominantes en el gen de tau que están ligadas a distintas familias con FTDP-17 constituye una prueba inequívoca de que las alteraciones en la proteína tau son suficientes para causar una degeneración neuronal en la corteza cerebral y dar lugar a los síntomas típicos de una demencia.

En consecuencia, se ha propuesto una versión modificada de la hipótesis de la cascada del amiloide postulando que la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide induciría la imperforación de la proteína tau, la cual sufriría un cambio conformacional que llevaría a su agregación y posterior disfunción y muerte celular. La aparición de taupatías se podría explicar asimismo por un cambio conformacional en la proteína tau, que podría ser inducido en estos casos por mutaciones o por otros factores ambientales (Figura 1).

En el hombre, el gen de la proteína tau se localiza en el cromosoma 17 y se traduce, en el sistema nervioso central, en una familia de 6 proteínas derivadas por splicing alternativo de un transcrito primario común. Las isoformas de tau difieren en el número de dominios de unión a tubulina que contienen (de 31-32 aminoácidos); tres en el caso de 3L,

3S y 3, o cuatro en 4L, 4S y 4 en su extremo C-terminal, o dos (3L, 4L), uno (3S, 4S) o ningún (3, 4) inserto de 29 aminoácidos cada uno en el extremo N-terminal. Los dos insertos del extremo amino-terminal (1 y 2) están codificados por el exón 2 y 3 respectivamente. Siendo aparentemente el exón 10 el que tiene más afinidad por los heterodímeros de tubulina y el que aumenta la estabilidad microtubular. Algunos estudios funcionales han indicado que la proteína tau podría estar implicada en la regulación del ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, principalmente dentro de los axones neuronales donde la proteína tau es más abundante. La interacción de tau con los microtúbulos se ve regulada mediante procesos de fosforilación, a mayor fosforilación, menos tau unida a microtúbulos.

Por ello, se considera que la fosforilación de la proteína tau es uno de los mecanismos más importantes que regulan la dinámica de los microtúbulos, sobre todo en los axones. A favor de esta hipótesis está el hecho de que la organización y estabilidad de los microtúbulos en células no-neurales que expresan tau mediante transfección se modifica al fosforilarse la proteína tau cuando se realiza una co-transfección con una proteína quinasa. Además, la fosforilación de la proteína tau podría modular su asociación a membranas celulares, pudiendo estar implicada en la modulación de algunos procesos de transducción de señales.

La fosforilación normal de la proteína tau está regulada durante el desarrollo del organismo. Así, la proteína tau se encuentra mucho más fosforilada en el cerebro embrionario y fetal que en el cerebro de mamíferos adultos. Algo similar se ha descrito para la fosforilación de otras MAPs. Estos datos han llevado a la hipótesis de que el estado fosforilado de las MAPs (incluyendo tau) típico del cerebro embrionario podría ser útil para mantener unos microtúbulos dinámicos, que son necesarios para el crecimiento axonal, mientras que el estado desfosforilado típico del cerebro de mamíferos adultos favorecería una mayor estabilidad de los microtúbulos, lo cual podría ser importante para la maduración y el mantenimiento de axones y dendritas.

La proteína tau se hiperfosforila de manera anormal en los cerebros de pacientes afectados con la enfermedad de Alzheimer o con taupatías, siendo esta forma alterada de la proteína el mayor componente de los PHFs y SFs. En cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer, y otras taupatías, la forma hiperfosforilada de tau se encuentra tanto en forma soluble como polimerizada en PHFs y SFs.

La hiperfosforilación de la proteína tau es uno de los sucesos más tempranos que se observan en los cerebros de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer siendo posiblemente responsable de la desestabilización de los microtúbulos en las neuronas afectadas. De hecho, la proteína tau hiperfosforilada aislada de los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer no se une a los microtúbulos *in vitro*, careciendo de la capacidad de estimular el ensamblaje y la estabilización de los mismos. Se cree que tau hiperfosforilado presente como proteína soluble (o micro-agregada) en las neuronas afectadas en los primeros estadios de la enfermedad sería el precursor de los agregados fibrilares. Estudios de microscopia electrónica han revelado que los microtúbulos desaparecen progresivamente de las neuronas afectadas, siendo reemplazados por haces de fibras de tau durante el curso de la enfermedad.

Puesto que los microtúbulos están implicados en el transporte bidireccional de orgánulos entre el cuerpo neuronal y los terminales sinápticos, la despolimerización de los microtúbulos causada por la hiperfosforilación de la proteína tau resultaría en una inhibición del transporte, conduciendo a una degeneración progresiva de las sinapsis y posterior muerte neuronal. No obstante, se ha sugerido que la desorganización de los microtúbulos en la enfermedad de Alzheimer y las taupatías no sería simplemente la consecuencia de la pérdida de la función normal de la proteína tau, sino que tau hiperfosforilado actuaría también como un elemento "tóxico" en el citoplasma neuronal. Es decir, la hiperfosforilación induciría un cambio conformacional en la proteína tau que llevaría no sólo a la pérdida de la función normal de la misma sino también a una ganancia de una nueva función tóxica. En este sentido, se ha sugerido que la forma hiperfosforilada de tau, o micro-agregados de la misma, podrían actuar secuestrando proteínas celulares. esenciales, causando de esta manera una progresiva disfunción que finalmente podría llevar a la muerte celular.

De hecho, se ha demostrado que tau hiperfosforilado es capaz de interactuar *in vitro* con otras proteínas, incluyendo al tau normal y a otras MAPs, secuestrándolas en micro-agregados y bloqueando su asociación a los microtúbulos y, por ello, provocando la despolimerización masiva de los microtúbulos.

Otra consecuencia importante de la hiperfosforilación de la proteína tau, y de su consiguiente cambio conformacional, es su mayor resistencia a la acción de proteasas, lo cual disminuye su tasa de recambio celular y favorece su acumulación. Además, se ha demostrado que la hiperfosforilación también favorece la agregación de la proteína tau. Mientras que la hiperfosforilación de la proteína tau (que se produciría en respuesta a la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide) sería responsable del cambio conformacional de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer, la aparición de formas mal plegadas de la proteína tau puede ocurrir en respuesta a otros factores, incluyendo mutaciones en el propio gen de tau tal y como sucede en los casos de FTDP-17. El esquema de la Figura 1 ilustra esta posibilidad. De acuerdo con este esquema, las mutaciones en el gen de tau y la acumulación de péptido  $\beta$ -amiloide podrían tener un efecto sinérgico, lo cual ha sido comprobado en un modelo murino transgénico.

La función biológica de la proteína tau se viene investigando desde hace tiempo. Así por ejemplo, un ratón deficiente en tau producido mediante "gene targeting" fue caracterizado (Harada A., Oguchi K., Okabe S., Kuno J., Terada S., Ohshima T., Sato-Yoshitake R., Takei Y., Noda T. and Hirokawa N. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. Nature 369, 488-491). Sin embargo, no se observó ninguna gran diferencia con el ratón original, probablemente, debido a la redundancia de la función del tau con la de otras proteínas asociadas a microtubulos neuronales (MAPs) (Ditella M. C., Feiguin F., Cam N., Kosik K. S. and Caceres A. (1996) MAPIB/TAU

funcional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109, 467-477). Así, para un conocimiento más claro de la función de tau, se han realizado también numerosos experimentos *in vivo*, por ejemplo con células que expresaban tau en cultivos celulares no neuronales. En células no neuronales transfectadas con el cDNA para tau, se consiguió la estabilización de los microtubulos, la formación de haces y la aparición de extensiones citoplasmáticas (Kanai Y., Takemura R., Oshima T., Mori H., Ihara Y., Yanagisawa M., Masaki T. and Hirokawa N. (1989) Expression of multiple tau isoforms and microtubule bundle formation in fibroblasts transfected with a single tau cDNA. *J Cell Biol* 109, 1173-1184; Medina M., Montejo de Garcini E. and Avila J. (1995) The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells. *Mol. Cell. Biochem* 148, 79-88).

Un modelo más claro para estudiar la acción de tau en microtúbulos en ausencia de MAPs neuronales ha sido proporcionado estudiando la expresión del gen de tau desde un vector baculoviral en células Sf9 de insecto. Esta expresión da lugar a la formación de extensiones citoplásmicas largas (Knops J., Kosik K. S., Lee G., Pardee J. D., Cohen-Gould L. and McConlogue L. (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 114, 725-733; Frappier T. F., Georgieff I. S., Brown K. and Shelanski M. L. (1994) tau regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *J Neurochem* 63, 2288-2294) que se asemejan a algunas características de los microtubulos axonales (Baas P. W., Pienkowski T. P., Cimbalknik K. A., Toyama K., Bakalis S., Ahmad F. J. and Kosik K. S. (1994) Tau Confers Drug Stability But Not Cold Stability to Microtubules in Living Cells. *J Cell Sci* 107, 135-143).

Un acercamiento similar fue utilizado para estudiar la función de otras MAPs (LeClerc N., Kosik K. S., Cowan N., Pienkowski T. P. and Baas P. W. (1993) Process formation in Sf9 cells induced by the expression of a microtubule associated protein 2C-like construct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6223-6227; Boucher M., Belanger D., Beaulieu C. and Leclerc N. (1999) Tau-mediated process outgrowth is differentially altered by the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells. *Cell Motility Cytoskel* 42, 257-273).

Además, usando el sistema del baculovirus se observó que la sobreexpresión de la forma normal de tau confería estabilidad microtubular al tratamiento con determinadas drogas pero no al frío (Baas P. W., Pienkowski T. P., Cimbalknik K. A., Toyama K., Bakalis S., Ahmad F. J. and Kosik K. S. (1994) Tau Confers Drug Stability But Not Cold Stability to Microtubules in Living Cells. *J Cell Sci* 107, 135-143). También, la función de la tau mutada en el residuo 337 (V337M) se ha estudiado con este sistema (Frappier T., Liang N. S., Brown K., Leung C. L., Lynch T., Liem R. H. K. and Shelauski M. L. (1999) Abnormal microtubule packing in processes of SF9 cells expressing the FTDP-17 V337M tau mutation. *Febs Lett* 455, 262-266) pero en este caso no se describió la formación de polímeros filamentosos.

La proteína tau en forma hiperfosforilada parece ser el componente principal de las estructuras aberrantes, filamentos helicoidales pareados (PHFs) encontrados en el cerebro de los pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Grundke-Iqbal L, Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S. and Wisniewski H. M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084-6089). En las células de insecto Sf9 tau puede ser fosforilado en algunas sitios que lo son en las formas de tau aisladas de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Mailliot C., Bussiere T., Caillet-Boudin M. L., Delacourte A. and Buee L. (1998) Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. *Neurosci Lett* 255, 13-16; Biernat J. and Mandelkow E. M. (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* 10, 727-740). Ahora bien, no existe ninguna descripción acerca de la formación de PHFs mediante la utilización de este sistema a pesar de que en este sistema tau se puede fosforilar de la misma manera que en otros.

## Descripción de la invención

### Breve descripción

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y/o determinación de compuestos reguladores, preferentemente inhibidores, del proceso de ensamblaje o polimerización de filamentos tau tipo PHFs, basado en un modelo celular eucariota transformado mediante ingeniería genética, que expresa una forma proteica de tau mutante que se comporta como hiperfosforilada, preferentemente la forma tau<sup>VLW</sup>, que contiene mutaciones en las posiciones G272V, de P301L, y de R406W (SEQ ID NO 2).

Otros objetos de la presente invención lo constituyen un modelo o cultivo celular transformado por un sistema o vector de expresión tau<sup>VLW</sup>, que contiene la construcción genética tau<sup>VLW</sup> que permite la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup> y la formación de los PHFs, construcciones genéticas tau<sup>VLW</sup> y los sistemas o vectores de expresión tau<sup>VLW</sup> (por ejemplo, el plásmido pFastBac<sup>VLW</sup>) necesarios para la expresión de dicha proteína tau hiperfosforilada, en un modelo celular eucariota, y para la formación de los filamentos o agregados tipo PHFs, y que contienen, al menos, una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína tau<sup>VLW</sup>, preferentemente la SEQ ID NO 1.

Finalmente, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso del procedimiento de identificación y de los distintos objetos necesarios para su desarrollo de la presente invención (construcciones genéticas, vectores de expresión y modelos celulares) para la identificación de nuevos compuestos reguladores. Estos compuestos podrán ser utilizados en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de otras enfermedades neurodegenerativas denominadas Taupatías.

### Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que, usando un modelo celular eucariota, la expresión de una forma mutada, que se comporta como una forma hiperfosforilada, parece ser esencial para la agregación de tau en filamentos PHFs similares a los observados en los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

En las condiciones de las pruebas realizadas, una alta expresión de proteína tau salvaje (tau42) da lugar a la aparición de extensiones citoplásmicas y a la formación de agregados amorfos. La expresión de forma proteica tau<sup>VLM</sup> también da lugar a la aparición de extensiones citoplásmicas pero los agregados encontrados son filamentos de aspecto similar a aquellos encontrados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (PHFs). A partir de lo descrito en esta invención se pueden producir modelos celulares eucariotas mediante su transformación genética con un gen mutado de tau, que permite que la forma proteica se encuentre en un estado de hiperfosforilación dando lugar al proceso de formación de filamentos de tau tipo PHFs, y su uso para el análisis farmacológico de compuestos que afecten a su formación y/o eliminación.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y/o determinación de compuestos reguladores, preferentemente inhibidores, del proceso de ensamblaje o polimerización de filamentos tau tipo PHFs, en adelante procedimiento de identificación de la presente invención, basado en un modelo celular eucariota transformado mediante ingeniería genética., que expresa una forma proteica de tau mutante que se comporta como hiperfosforilada, preferentemente la forma tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>, y que está constituido por los siguientes pasos:

- i) preparación de un modelo celular eucariota transformado mediante un sistema o vector de expresión génica tau<sup>V<sup>LW</sup></sup> que contiene una construcción genética tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>, que permite la expresión de una forma proteica de tau hiperfosforilada, y la formación de filamentos tau PHFs en condiciones adecuadas,
- ii) adición de los potenciales compuestos inhibidores de la polimerización de filamentos tau, objeto del procedimiento de identificación,
- iii) determinación del efecto sobre la capacidad de polimerización o ensamblaje de dichos filamentos tau, e
- iv) identificación de compuestos inhibidores de la polimerización de filamentos tau en el caso que dicha capacidad de polimerización o ensamblaje los filamentos tau se reduzca o desaparezca.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “identificación y/o determinación compuestos reguladores” se refiere no sólo a la identificación de nuevos compuestos reguladores del proceso de ensamblaje o polimerización de filamentos tau, preferentemente inhibidores, sino también a la determinación y comparación de la actividad inhibidora de compuestos ya conocidos.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “forma proteica de tau que se comporta como hiperfosforilada”, se refiere preferentemente a la forma tau<sup>V<sup>LW</sup></sup> con las tres mutaciones en las posiciones G272V, de P301L, y de R406W (SEQ ID NO 2).

El término “construcción genética tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, la región codificante de una forma proteica de tau hiperfosforilada, preferentemente la proteína tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>, y otras secuencias que permiten la regulación de dicha expresión génica. Por otro lado, el término “región codificante de una forma proteica de tau hiperfosforilada” tal como se utiliza en la presente invención comprende, además de las secuencias de nucleótidos descritas, otras secuencias análogas a éstas. Tal como se utiliza en la presente invención el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que puede ser aislada o construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos codificantes aquí descritas, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una molécula de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos descrita. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

En la presente invención el término “sistema de expresión génica tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>” se refiere a un sistema o vector de expresión génica que comprende la construcción genética tau<sup>V<sup>LW</sup></sup> de la presente invención con al menos, un promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés (tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bacmidios, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Múltiples sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales

## ES 2 286 911 A1

conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de identificación de la presente invención en el que el modelo celular transformado consiste en un cultivo de células de insecto, por ejemplo Sf9, transformado por un sistema de baculovirus recombinante que contiene la construcción genética tau<sup>VLW</sup>, que permite la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup> y la formación de los PHFs.

Otro objeto particular de la presente invención es el procedimiento de identificación de la invención en el que la determinación de la polimerización o autoensamblaje de tau se realiza mediante el aislamiento de los PHFs y su visualización posterior mediante inmunomicroscopía electrónica con anticuerpos adecuados (ver ejemplo 1.2).

Otro objeto particular de la presente invención. es el procedimiento. de identificación de la invención en el que la determinación de la polimerización o autoensamblaje de tau se realiza mediante la determinación cuantitativa de los agregados PHFs por western blot con anticuerpos adecuados (ver Ejemplo 2, Figura 7).

Otro objeto de la presente invención lo constituye un modelo o cultivo celular transformado por un sistema o vector de expresión tau<sup>VLW</sup>, que contiene la construcción genética tau<sup>VLW</sup> que permite la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup> y la formación de los PHFs y que es un elemento necesario para la realización del procedimiento de identificación de la presente invención. Una realización particular de la presente invención lo constituye un modelo o cultivo celular transformado mediante ingeniería genética que consiste. en cultivo de células de insecto, preferentemente Sf9, transformado por un sistema de baculovirus recombinante, que permite la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup> y la formación de los PHFs.

De igual forma, son objetos de la presente invención las construcciones genéticas tau<sup>VLW</sup> y los sistemas o vectores de expresión tau<sup>VLW</sup> (por ejemplo, el plásmido pFastBac<sup>VLW</sup>) necesarios para la expresión de dicha proteína tau hiperfosforilada, en un modelo celular eucariota, y parada formación de los filamentos o agregados tipo PHFs, y que contienen, al menos, una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína tau<sup>VLW</sup>, preferentemente la SEQ ID NO 1. Esta secuencia SEQ ID NO 1 es un fragmento de la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína tau<sup>VLW</sup> (SEQ ID NO 2) que incluye a título ilustrativo las mutaciones de tau<sup>VLW</sup>.

Finalmente, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso del procedimiento de identificación y de los distintos objetos necesarios (construcciones genéticas, vectores de expresión y modelos celulares) para su desarrollo de la presente invención para la identificación de nuevos compuestos reguladores, preferentemente inhibidores, de la polimerización de tau o para la determinación de los niveles de dicha capacidad inhibidora de compuestos ya conocidos.

Estos compuestos candidatos a ser evaluados como reguladores del proceso de ensamblaje de tau pueden ser producidos, por ejemplo por microorganismos como bacterias o levaduras, por plantas, producidos por síntesis química o por ingeniería genética; pudiendo ser de origen natural o artificial.

Estos compuestos podrán ser utilizados en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o de otras enfermedades neurodegenerativas denominadas Taupatias que incluyen: la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (CBD), la enfermedad de Pick (PD) y la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17).

### Breve descripción de las figuras

#### Figura 1

*Esquema del proceso de la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide*

La acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide induciría la hiperfosforilación de la proteína tau por alguna de las quinasas conocidas. Como consecuencia de esto, la proteína tau sufriría un cambio conformacional que llevaría a su agregación y a la posterior disfunción y muerte celular.

#### Figura 2

*Análisis por inmunofluorescencia de células de insecto Sf9 transformadas*

Se observan células de insecto que expresan la proteína tau42 (A) y tau mutante tau<sup>VLW</sup> (B) así como la formación de extensiones citoplasmáticas. En la figura se aprecia el resultado de una inmunofluorescencia en la que se utiliza el anticuerpo anti  $\alpha$ -tubulina DM1A.

Figura 3

*Análisis inmunocitoquímico de células de insecto Sf9 transformadas con la forma mutada tau<sup>VLW</sup>*

5 Detalle de la expresión de tau mutante mediante inmunocitoquímica donde se puede apreciar como algunas células que sobreexpresan la proteína alterada no forman extensiones citoplasmáticas con el anticuerpo anti-tau humano T14.

Figura 4

10 *Western blot de extractos de células de insecto Sf9 expresando la forma salvaje de tau42 y mutante tau<sup>VLW</sup>*

Semicuantificación mediante inmunodetección con el anticuerpo anti-tau 7.51 y utilizando un anticuerpo anti-tubulina como control.

15 Figura 5

*La sobreexpresión de tau42 en células Sf9 provoca la formación de agregados amorfos y no de PHFs*

20 Los paneles A y B muestran microfotografías de extractos insolubles en sarcosil en el caso de células Sf9 que expresan la variante normal de tau42 teñidos levemente con el anticuerpo AT8 (flechas en panel A) y no teñidos con el anticuerpo 7.51 (panel B).

Figura 6

25 *Inmunomicroscopía electrónica de PHFs en extractos de cultivos de células Sf9 infectados con baculovirus recombinantes con el gen de tau mutado (tau<sup>VLW</sup>)*

30 Se utilizan diferentes anticuerpos anti-tau. Los dos primeros paneles superiores muestran filamentos PHFs decorados con el anticuerpo AT8 en ausencia (panel izquierdo) o presencia (panel derecho) del inhibidor de cdk5 butirolactona-I. Los paneles inferiores muestran filamentos PHFs decorados con los anticuerpos Br133 y Br134.

Figura 7

35 *Cuantificación de la acción de diferentes inhibidores de proteínas quinasas en la formación de filamentos intracelulares de tau en células que sobreexpresan la proteína tau<sup>VLW</sup>*

C, control; Li, Litio y But, butirolactona I.

**Ejemplos de realización de la invención**

40 **Ejemplo 1**

*La expresión en un modelo eucariota de la forma proteica tau<sup>VLW</sup> produce filamentos que se asemejan a los PHFs*

45 1.1.- *Obtención del sistema de expresión tau<sup>VLW</sup>, baculovirus, y del modelo celular transformado con tau<sup>VLW</sup>*

50 Los genes de las diferentes proteínas candidatas (tau y el mutante triple) se donaron en vectores especiales para su transposición al genoma de baculovirus como se describe más adelante. El cDNA correspondiente a la isoforma más larga humana de tau que contiene el exon 10 y los exones 2 y 3 (Goedert M., Spillantini M. G., Jakes R., Rutherford D. and Crowther R. A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3, 519-526) con o sin mutaciones en las posiciones G272V, de P30IL, y de R406W, fueron digeridos de los vectores de mamíferos pSGT42 y pSGTVLW (Lim F., Hernandez F., Lucas J. J., Gomez-Ramos P., Moran M. A. and Avila J. (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. Mol Cell Neurosci 18, 702-714) con XbaI y XhoI, e insertados en el plásmido pFastBacI, el vector utilizado para la transposición al genoma de baculovirus de los genes seleccionados, cortado con las mismas endonucleasas de restricción para crear los plásmidos: pFastBacTau<sup>42</sup> (que contiene la secuencia del cDNA de tau original) y pFastBac<sup>VLW</sup> (que contiene la secuencia del cDNA para tau con las tres mutaciones descritas anteriormente). Los plásmidos recombinantes fueron utilizados para transformar las células competentes de DH10BAC para la transposición de los genes seleccionados a los vectores con el genoma del Bámido. Los recombinantes del Bámido fueron identificados mediante selección en las placas de X-Gal y de IPTG de aquellas colonias que reciben el transposón dentro del fragmento del gen LacZ y el DNA del Bámido con el inserto apropiado se identificó mediante PCR utilizando oligonucleótidos del baculovirus y específicos para cada gen. El DNA del Bámido se aisló, se purificó y se transfectó a monocapas de células de insecto Sf9 mediante la utilización de los reactivos A y B de Pharmingen.

65 La muestra viral fue recogida después de 96 horas y su título viral de los baculovirus fue amplificado mediante sucesivos pases sobre cultivos de células Sf9 según las recomendaciones del fabricante (Life Technologies) hasta obtener un título apropiado.

## ES 2 286 911 A1

Las células de insecto Sf9 (Invitrogen) fueron infectadas con el baculovirus que contenía el cDNA (que expresa la isoforma más larga de tau42 presente en el sistema nervioso central humano) con o sin las mutaciones descritas anteriormente. Una vez obtenidos los virus con un título apropiado se procedió al estudio de las cinéticas de producción de proteína en función de la relación MOI (virus/célula). Las células productoras de las proteínas de interés se recogieron y lavaron congelándose a -70°C hasta su procesamiento y ensayos posteriores.

### 1.2.- Formación de agregados en células de insecto infectadas con baculovirus con tau42 y tau<sup>VLW</sup>

La influencia de la expresión de estas proteínas, tau y tau<sup>VLW</sup>, en células de insecto infectadas con los baculovirus descritos anteriormente, se evaluó mediante estudios de inmunofluorescencia. Para la realización de los estudios de inmunofluorescencia las células Sf9 fueron sembradas sobre cubres de cristal pretratados con polilisina a una concentración de 10 µg/ml y se infectaron según se describe arriba. Los cubres fueron incubados durante 48 y 72 horas desde la infección, se lavaron con el tampón salino PBS y se fijaron durante 5 minutos en metanol frío (-20°C), transferidos a acetona absoluta fría (-20°C) durante 5 minutos, secados al aire, y después rehidratados en PBS que contenía 0,05% (vol/vol) de Tween-20 (Kuriyama R., Dragas-Granoic S., Maekawa T., Vassilev A., Khodjakov A. and Kobayashi H. (1994) Heterogeneity and microtubule interaction of the CHO1 antigen, a mitosis-specific kinesin-like protein. Analysis of subdomains expressed in insect sf9 cells. J Cell Sci 107, 3485-3499). Los anticuerpos primarios fueron incubados en PBS que contenía 0.05% Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS, se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 45 minutos, lavadas otra vez tres veces en PBS, y finalmente montadas usando el reactivo de FluorSave (Calbiochem).

Tanto las expresiones del gen tau42 como del tau<sup>VLW</sup> producen, en ambos casos, un cambio morfológico de las células de insecto infectadas (Figuras 2 y 3). Estas células presentan una morfología redondeada amplia con algunos procesos largos que se asemejan a las neuritas observadas en algunos modelos neuronales de cultivos (Figuras 2 y 3).

En los cultivos infectados con baculovirus que permiten la expresión de la proteína tau42 ó de la proteína mutante tau<sup>VLW</sup> no se encontraron grandes diferencias en el número de células que presentaban procesos o en la longitud de estos procesos cuando se compararon ambos cultivos (Figura 2 paneles A y B). También, se observó que una expresión enorme de la proteína tau<sup>VLW</sup> puede dar lugar a una disminución de la extensión de procesos celulares, según se desprende de las pruebas de la reacción del tau<sup>VLW</sup> con el anticuerpo tau14 (Figura 3).

Además, la sobreexpresión de cada proteína, tau42 y tau<sup>VLW</sup>, se detectó mediante geles de SDS de los respectivos extractos tenidos con azul de Coomassie y también mediante "western blot" utilizando anticuerpos específicos como se indica a continuación. Las células Sf9 infectadas fueron recogidas en 48 ó 72 horas después de la infección, lavadas con PBS, y resuspendidas en tampón de carga de electroforesis 2X. La mezcla fue calentada hasta 100°C durante 5 minutos. Los geles de electroforesis desnaturizantes se realizaron al 10% (SDS-PAGE), una vez terminada la electroforesis fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas para evitar una interacción no específica con leche en polvo desnatada al 5% en PBS y 0,05% del detergente Tween 20. Los anticuerpos primarios fueron utilizados en este mismo tampón de bloqueo e incubado con las membranas durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación con los anticuerpos secundarios unidos a HRP (DakoA/S, Carpintería, CA), las proteínas fueron detectadas usando el reactivo de detección ECL (Perkin Elmer Life Sciences, Oak Brook, IL). En ambos casos, la infección de las células Sf9 con baculovirus recombinantes conteniendo el cDNA para tau42 ó bien la forma mutada tau<sup>VLW</sup>, produjo una expresión enorme de la proteína según se determina mediante Western blot (Figura 4).

En los ensayos de Western blot y en los de inmunofluorescencia microscópica se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios de tau: según la enumeración de residuos de la isoforma humana más larga de tau de 441 aminoácidos:

- el antisuero Br133 anti-tau de conejo (proporcionado por Dr. C.M. Wishek) reconoce un epitopo que está situado en el extremo N-terminal
- El epitopo reconocido por el antisuero Br134 anti-tau de conejo (proporcionado por el Dr. C.M. Wishek) está situado en el extremo C-terminal,
- El anticuerpo AT8 (Innogenetics) reconoce la proteína de tau cuando el residuo Ser-202 esta fosforilado,
- El anticuerpo AT180 (Innogenetics), y
- El anticuerpo tau14 (laboratorios de Zymed) dirigido al epitopo que está situado dentro de la secuencia de aminoácidos comprendida entre los residuos 141-178 y no es dependiente del estado de fosforilación de tau.

Las fuentes de otros anticuerpos usados son: oro coloidal de 10 nm conjugado con cabra anti-ratón o conjugado con cabra anti-conejo (BioCell Research Laboratories), Alexa-488 de cabra anti-ratón y cabra anti-conejo Alexa-594 (Molecular Probes).

El método utilizado para el aislamiento de filamentos de tau a partir de las células infectadas Sf9 fue una modificación del método de aislamiento de PHFs de Greenberg *et al* (Greenberg S. G. and Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc.



Natl. Acad. Sci. USA 87, 5827-5831). Así,  $2 \times 10^7$  células infectadas fueron recogidas por centrifugación, lavados con PBS y homogenizadas en 0,5 ml del tampón siguiente: 10 mM Tris, 1mM EGTA, 0,8 M NaCl, 10% de sucrosa, pH 7,4. Después de una centrifugación a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante fue retirado y guardado y el precipitado fue homogeneizado con 0,5 ml del tampón anterior y centrifugada a 20.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes fueron combinados, ajustados a 1% (wt/vol) de N-laurilsarcosina y 1% (vol/vol) 2-mercaptoetanol, e incubados a 37° C durante 2,5 horas mientras se mezclaban en un incubador orbital. Todos los pasos siguientes fueron hechos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 92000 x g durante 40 minutos, los filamentos contenidos en el precipitado fueron homogeneizados en 0,5 ml del buffer anterior con 1% (wt/vol) de CHAPS y 1% (vol/vol) de 2-mercaptoetanol, centrifugado otra vez a 92000 x g y el nuevo precipitado resuspendido finalmente en 50  $\mu$ l del buffer con 1% (vol/vol) de 2-mercaptoetanol.

La formación de agregados y filamentos en estas células de insecto se evaluó mediante técnicas de microscopía a e inmunomicroscopía electrónica tal como se indica a continuación. Para probar la presencia de filamentos aislados, 10  $\mu$ l de las muestras obtenidas como se describe en el apartado anterior fueron colocados en una rejilla recubiertas de carbón durante 2 minutos y después sombreadas con 2% (w/v) de acetato de uranilo durante 1 minuto. La microscopia electrónica de transmisión fue realizada en un microscopio electrónico modelo 1200EX de JEOL funcionando en 100 kV. La microscopia inmunoelectrónica fue realizada después de la adsorción de 10  $\mu$ l de las muestras para microscopia electrónica a las rejillas recubiertas de carbón y tras incubar el primer anticuerpo (1/100) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un intensivo lavado del primer anticuerpo, las rejillas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1/40) conjugado con las partículas de oro con diámetro 10-nm. Finalmente, las muestras fueron sombreadas con 2% de acetato de uranilo durante 1 minuto. La transmisión microscópica electrónica fue realizada en un microscopio electrónico modelo 1200EX de JEOL funcionando a 100 kV.

Una muestra obtenida de esta manera en el caso de la proteína tau42 expresada en células de insecto produjo la formación de agregados de polímeros amorfos que no siendo filamentos pueden visualizarse mediante técnicas de microscopia e inmunomicroscopía electrónica (Figura 5). Estos agregados se identifican usando los anticuerpos (ab) contra tau, el ab Br133 ó el ab AT8, no obstante ninguna reacción se obtuvo con el ab 7,51. Estos resultados sugieren que la agregación de estos polímeros ocurre por la región de interacción con la tubulina presente en tau, puesto que el epitopo reconocido por el ab 7,51 está dentro de esta región. Por el contrario, la expresión de la forma proteica tau<sup>VLW</sup> mediante la infección de las células SD con baculovirus recombinante conteniendo el cDNA portador del gen mutado tau<sup>VLW</sup> produjo la formación de los filamentos PHFs de tau (Figura 6).

En la Figura 6 (panel superior) se muestran los filamentos teñidos con diferentes anticuerpos contra tau en forma fosforilada como AT8 y AT180 (no se muestra) a partir de extractos de cultivos de células Sf9 infectados con baculovirus recombinantes con el gen alterado tau<sup>VLW</sup>. También se observó como estos filamentos no se tiñen con el anticuerpo ab 7,5 (no se muestra). Este resultado se puede explicar porque el epitopo para este anticuerpo está enmascarado en los filamentos de una manera similar a como ocurre en el caso de PHFs aislados de pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Goedert M., Jakes R., Crowther R. A., Cohen P., Vanmechelen E., Vandermeeren M. and Cras P. (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J* 301 (Pt 3), 871-877). Los filamentos también fueron reconocidos con dos anticuerpos policlonales que reconocen los extremos del C-terminal (Br 134) y del N-terminal (Br 133) (Figura 6, panel inferior).

Por otro lado, la expresión de la proteína alterada tau<sup>VLW</sup>, determinada por análisis de Western Blot produjo una reacción más alta en este caso con algunos de los anticuerpos que reaccionan con la versión de la proteína fosforilada (AT8), esta reacción disminuye tras el tratamiento con litio (no se muestra). Esta diferencia en la expresión de la proteína tipo salvaje de tau y el mutado tau<sup>VLW</sup> teñidos con anticuerpos que reconocen tau fosforilado en las células Sf9 sugiere una posible diferencia en sus niveles de fosforilación. Este hecho podría ser determinante a la hora de explicar porque en un caso se obtienen filamentos y en el otro caso no. Así, esta fosforilación podría influir no tanto en la agregación de las dos formas de tau, tau42 y tau<sup>VLW</sup>, sino en la forma y características de estos agregados de tau, puesto que en ambos casos existen agregados.

## Ejemplo 2

*Uso de dicho procedimiento de formación de filamentos PHFs en la evaluación de compuestos terapéuticos inhibidores de dichos PHFs*

Si la diferencia en la forma de los agregados y por tanto en la formación de los filamentos se debiera al diferente grado de fosforilación de la proteína tipo salvaje (tau42) y la versión mutada (tau<sup>VLW</sup>), los inhibidores de proteínas quinasas implicadas en la hiperfosforización de tau podrían prevenir la formación de los filamentos de tau<sup>VLW</sup>.

Existen dos proteínas quinasas bastante bien caracterizadas que han sido implicadas en esta modificación de tau, quinasa I (GSK3) y quinasa II (cdk5) (Hanger D. P., Hughes K., Woodgett J. R., Brion J. P. and Anderton B. H. (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147, 58-62; Baumann K., Mandelkow E. M., Biernat J., Pivnicaworms H. and Mandelkow E. (1993) Abnormal Alzheimer-Like Phosphorylation of Tau-Protein by Cyc 1 independent Kinases Cdk2 and Cdk5. *FEBS Lett* 336, 417-424). Por ello, se analizó la expresión de tau<sup>VLW</sup> en presencia del litio (un inhibidor de GSK3) o en presencia de butirolactona I (un inhibidor de cdk5).

## ES 2 286 911 A1

El litio, un inhibidor para GSK3 (Muñoz-Montano J. R., Moreno F. J., Avila J. and Diaz-Nido J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. FEBS Lett 411,183-188; Alvarez G., Muñoz-Montano J. R., Satrustegui J., Avila J., Bogonez E. and Díaz-Nido J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. FEBS Lett. 453, 260-264) se obtuvo de Merck, y la butyrolactona I, un inhibidor para cdk5, fue obtenido de Calbiochem.

Las células *Spodoptera frugiperda* Sf9 fueron cultivadas a 27°C en una botella de cultivo en suspensión en medio Grace (Gibco), suplementado con un 10% de suero vacuno fetal, 100 µg/ml Penicilina-Streptomycin y 0,05% (vol/vol) de ácido plurónico F68 (Gibco). Los cultivos en monocapas o en suspensión de las células Sf9 fueron infectados con los baculovirus recombinantes, que permiten la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup>, a una determinada multiplicidad que varió entre 2 y 8 m.o.i. (relación del número de virus al número de células). Las muestras fueron tomadas en 48 y 72 horas desde la infección y el nivel de la expresión de tau fue determinado midiendo la reacción con el anticuerpo 7,51 por Western Blot tal como se indicó anteriormente. La cuantificación de la señal quemiluminiscente se llevó a cabo utilizando un escaneado densitométrico con el Software GS-710 (Bio-Rad, Riclunond, CA.).

El litio fue añadido al medio de cultivo a una concentración final de 20 mM durante 4 horas. La butyrolactona fue disuelta en dimetilsulfóxido y añadido al medio de cultivo a una concentración final de 1 µM durante 4 horas. Las células de control fueron incubadas con el mismo volumen de medio en cada caso.

La Figura 7 muestra como respecto al control (el extracto sarcosil-insoluble antes del tratamiento con los inhibidores de quinasas) se observa una disminución de la formación de los filamentos de tau bajo el tratamiento con litio. En cambio, en presencia de butyrolactona I, la cantidad total de filamentos no se modificó. Este resultado sugiere que la fosforilación por GSK3 de tau<sup>VLW</sup> facilita su agregación en filamentos que se asemejan a los encontrados en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

La diferencia principal observada entre la tau<sub>42</sub>, sin mutaciones, con respecto a la tau<sup>VLW</sup> reside en que cuando se expresan en las células Sf9 la tau<sup>VLW</sup> aparece estar en forma hiperfosforilada. Esta hiperfosforilación aparece por tanto como consecuencia de esas mutaciones. La explicación a este fenómeno bien podría ser que se produzca un mal reconocimiento por las fosfatasa celulares de la proteína alterada como consecuencia de las mutaciones. Como consecuencia de todo esto la proteína alterada tau<sup>VLW</sup> no podría ser desfosforilada y acabe siendo hiperfosforilada. Como alternativa más improbable se podría sugerir en una diferente afinidad de las quinasas y/o fosfatasas implicadas en la fosforilación/desfosforilación de tau en el caso del sistema celular utilizado. Hay que indicar que estas hipótesis se presentan a título de discusión sin pretender establecer ningún modelo que pueda limitar el alcance de la presente invención.

Tau puede ser fosforilada por varias quinasas pero GSK3 (tau quinasa I) es probablemente la que presenta un potencial más alto de modificación dado que para GSK3 existen muchos residuos fosforilables en la molécula de tau (Reynolds C. H., Betts J. C., Blackstock W. P., Nebreda A. R. and Anderton B. H. (2000) Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences *in vitro* between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. J. Neurochem. 74, 1587-1595; Sperber B. R., Leight S., Goedert M. and Lee V. M. Y. (1995) Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. Neuroscience Letters 197, 149-153). Trabajos anteriores han indicado que el litio bloquea la fosforilación de tau por GSK3 (Muñoz-Montano J. R., Moreno F. J., Avila J. and Diaz-Nido J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. FEBS Lett 411,183-188) en células neuronales en cultivo. También, en células en cultivo se sugirió (Perez M., Hernandez F., Gomez-Ramos A., Smith M., Perry G. and Avila J. (2002) Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. Eur J Biochem 269,1484-1489) una correlación posible entre la falta de fosforilación de tau por GSK3 y la agregación de tau. Otras variantes de tau, como aquellas que sufrieron el cambio V337M, afectan a la organización microtubular cuando se manifiestan en las células Sf9 (Frappier T., Liang N. S., Brown K., Leung C. L., Lynch T., Liem R. H. K. and Shelauski M. L. (1999) Abnormal microtubule packing in processes of SF9 cells expressing the FTDP-17 V337M tau mutation. FEBS Lett 455, 262-266) pero en ese caso no se describió la formación de polímeros filamentosos.

En resumen, en la presente invención se ha descubierto que tal fosforilación podría tener implicaciones en las características morfológicas de los agregados de tau, puesto que tau con un nivel más bajo de fosforilación puede también agregar aunque con una morfología amorfa. Estos resultados apoyan la hipótesis anterior de que la fosforilación de tau podría dar lugar a un cambio de conformación que podría permitir la formación de polímeros fibrilares.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de identificación y/o determinación de compuestos reguladores, preferentemente inhibidores, del proceso de ensamblaje o polimerización de filamentos tau tipo PHFs:

i) preparación de un modelo celular eucariota transformado mediante un sistema o vector de expresión génica tau<sup>VLW</sup> que contiene la secuencia ID NO 1, que permite la expresión de una forma proteica de tau hiperfosforilada, y la formación de filamentos tau PHFs en condiciones adecuadas,

10 ii) adición de los potenciales compuestos reguladores, preferentemente inhibidores, de la polimerización de filamentos tau, objeto del procedimiento de identificación,

15 iii) determinación del efecto sobre la capacidad de polimerización o ensamblaje de dichos filamentos tau tipo PHFs.

2. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el modelo celular transformado consiste en un cultivo de células de insecto, transformado por un sistema de baculovirus recombinante que contiene la secuencia ID NO 1.

20 3. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de la polimerización o autoensamblaje de tau se realiza mediante el aislamiento de los PHFs y su visualización posterior mediante inmunomicroscopía electrónica con anticuerpos adecuados.

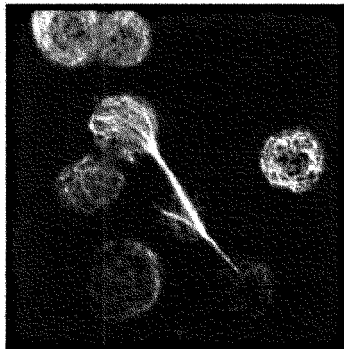
25 4. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la determinación de la polimerización o autoensamblaje de tau se realiza mediante la determinación cuantitativa de los agregados PHFs por western blot con anticuerpos adecuados.

30 5. Modelo o cultivo celular eucariota transformado mediante ingeniería genética necesario para la realización del procedimiento según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque contiene un sistema o vector de expresión tau<sup>VLW</sup>, que contiene la construcción genética tau<sup>VLW</sup>, que permite la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup> y la formación de los PHFs.

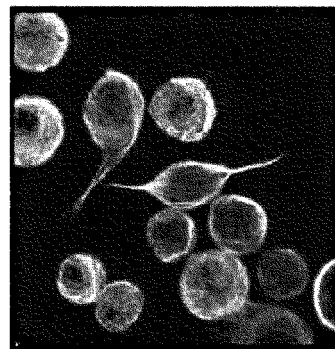
35 6. Modelo o cultivo celular eucariota según la reivindicación 5 **caracterizado** porque consiste en cultivo de células de insecto, preferentemente Sf9, transformado por un sistema de baculovirus recombinante, que permite la expresión de la proteína tau<sup>VLW</sup> y la formación de los PHFs.

40 7. Una construcción genética tau<sup>VLW</sup> y sistema o vector de expresión que la contenga, que codifique la proteína de secuencia SEQ ID NO 2 **caracterizado** porque contiene la secuencia SEQ ID NO 1.

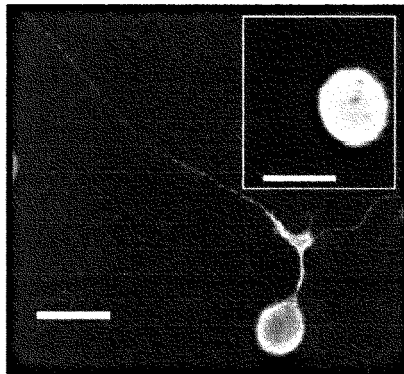
**A**



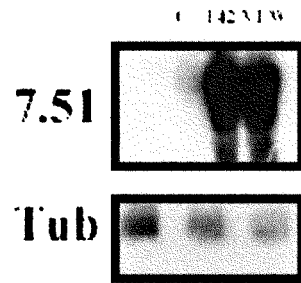
**B**



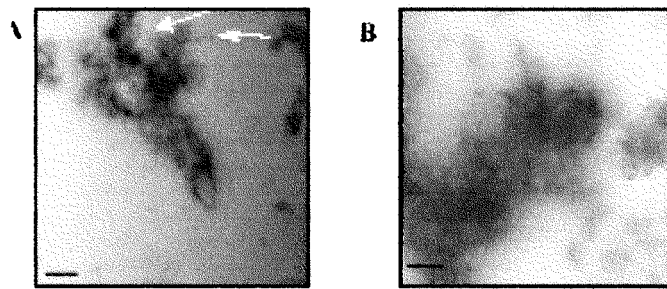
**Figura 2**



**Figura 3**

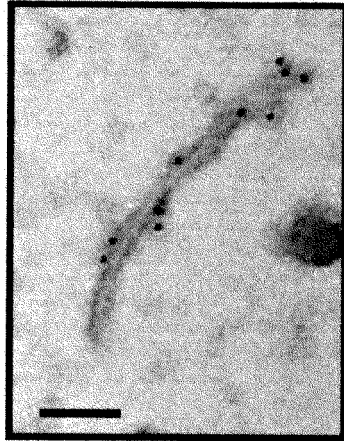


**Figura 4**

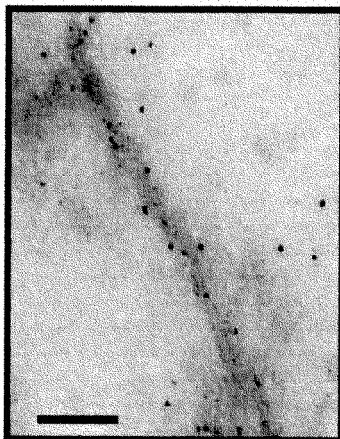


**Figura 5**

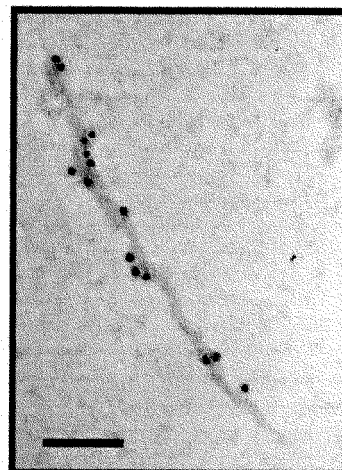
**AT8**



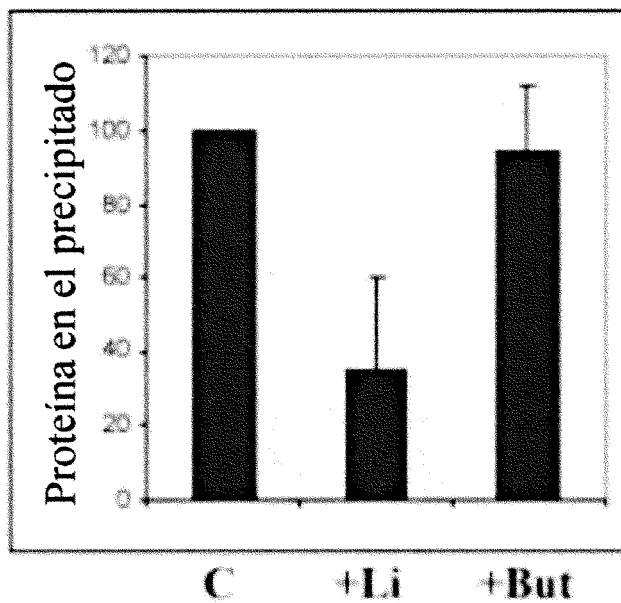
**Br133**



**Br134**



**Figura 6**



**Figura 7**

# ES 2 286 911 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

5 <120> PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS INHIBIDORES DEL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN DE FILAMENTOS TAU TIPO PHFs Y SUS APLICACIONES

10 <130> Filamentos PHFs

<160> 2

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 480

20 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

25 <223> Secuencia parcial de tauVLW

<220>

<221> mutation

<222> (34)..(36)

30 <223> G272V

<220>

<221> mutation

35 <222> (121)..(123)

<223> P301L

<220>

40 <221> mutation

<222> (436)..(438)

<223> R406W

45 <400> 1

ggctccactg agaacctgaa gcaccagccg ggagggcgga aggtgcagat aattaataag 60

50 aagctggatc ttagcaacgt ccagtc caag tgtggctcaa aggataatat caaacacgtc 120

ccgggaggcg gcagtgtgca aatagtctac aaaccagttg acctgagcaa ggtgacctcc 180

55 aagtgtggct cattaggcaa catccatcat aaaccaggag gtggccaggt ggaagtaaaa 240

tctgagaagc ttgacttcaa ggacagagtc cagtcgaaga ttgggtccct ggacaatatic 300

60 acccacgtcc ctggcggagg aaataaaaag attgaaaccc acaagctgac cttccgcgag 360

aacgccaaaag ccaagacaga ccacggggcg gagatcgtgt acaagtcgcc agtgggtgtct 420

ggggacacgt ctccacggca tctcagcaat gtctcctcca ccggcagcat cgacatggta 480

65

<210> 2



## ES 2 286 911 A1

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial sequence

5

<220>

<223> Proteína tauVLW

<220>

10

<221> MUTAGEN

<222> (272)..(272)

<223> G272V

15

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (301)..(301)

20

<223> P301L

<220>

<221> MUTAGEN

<222> (406)..(406)

25

<223> R406W

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 286 911 A1

<400> 2

5 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly  
1 5 10 15  
Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His  
20 25 30  
10 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu  
35 40 45  
15 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser  
50 55 60  
Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val  
65 70 75 80  
20 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu  
85 90 95  
25 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro  
100 105 110  
Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val  
115 120 125  
30 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly  
130 135 140  
35 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro  
145 150 155 160  
Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro  
165 170 175  
40 Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly  
180 185 190  
45 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser  
195 200 205  
50 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys  
210 215 220  
Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys  
225 230 235 240

55

60

65

# ES 2 286 911 A1

	Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val	245	250	255
5	Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly	260	265	270
10	Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln	275	280	285
15	Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly	290	295	300
20	Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser	305	310	315
25	Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln	325	330	335
30	Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser	340	345	350
35	Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn	355	360	365
40	Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala	370	375	380
45	Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser	385	390	395
50	Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser	405	410	415
55	Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val	420	425	430
60	Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu	435	440	



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 286 911

② Nº de solicitud: 200303031

③ Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0153340 A2 (UPJOHN CO; GURNEY MARK E; ABRAHAM IRENE) 26.07.2001, tabla 2; páginas 8-9; reivindicaciones 4,14.	1-7
X	WO 9957129 A1 (MAYO FOUNDATION; HUTTON MICHAEL L; HEUTINK PETER; GOATE) 11.11.1999, tabla 1; páginas 8,11-16.	7
X	VON BERGEN M. et al. "Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure". The Journal of Biological Chemistry. 21.12.2001. Vol. 276, Nº 51, páginas 48165-48174.	7
X	VOGELSBERG-RAGAGLIA V. et al. "Distinct FTDP-17 missense mutations in Tau produce Tau aggregates and other pathological phenotypes in transfected CHO cells". Molecular Biology of the Cell. Dic 2000. Vol.11, páginas 4093-4104.	7
X	FRAPPIER T. et al. "Abnormal microtubule packing in processes of SF9 cells expressing the FTDP-17 V337M tau mutation". FEBS Letters. 23.07.1999. Vol. 455, Nº 3, páginas 262-266.	5,6

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la  
misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación  
de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha  
de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.09.2007

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K 14/435** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)