

## **PERFILES DE TAU FOSFORILADA Y BETA AMILOIDE EN CSF COMO BIOMARCADORES DE TAUOPATÍAS**

### **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

**1** Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/169,193, presentada el 31 de marzo de 2021, cuya descripción se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

### **CAMPO**

**2** La presente descripción abarca el uso de las especies de tau y beta amiloide en el CSF para medir características patológicas y/o síntomas clínicos de tauopatías 3R y 4R para diagnosticar y/o elegir tratamientos apropiados para una enfermedad determinada.

### **ANTECEDENTES**

**3** La proteína tau asociada a los microtúbulos (MAPT, por sus siglas en inglés, o tau) desempeña un papel esencial en la morfología y fisiología de las neuronas. Tau tiene seis isoformas diferentes de la proteína completa y experimenta varias modificaciones postraduccionales posibles que incluyen acetilación, glicosilación y fosforilación. La fosforilación es importante para regular la función normal de tau en la estabilización axonal y puede ocurrir en más de 80 residuos diferentes. Sin embargo, la fosforilación excesiva de tau parece aumentar la probabilidad de agregación de tau en filamentos helicoidales pareados (PHF, por sus siglas en inglés) y ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) insolubles intracelulares, que están compuestos principalmente de tau hiperfosforilado.

**4** Los ovillos neurofibrilares intracelulares en la corteza cerebral son una característica patológica definitoria de la enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés) y se correlacionan con el inicio de síntomas clínicos mucho después de la aparición de placas  $\beta$ -amiloides ( $A\beta$ ) extracelulares, que comienzan a desarrollarse dos décadas antes del inicio de síntomas. En la AD, la p-tau soluble y la tau no fosforilada se duplican en el líquido cefalorraquídeo (CSF,

por sus siglas en inglés). Se ha planteado que estos cambios reflejan los efectos de la muerte neuronal (neurodegeneración) al liberar pasivamente tau y NFT en el CSF. Sin embargo, en otras tauopatías con patología de NFT y neurodegeneración (p. ej., parálisis supranuclear progresiva, degeneración lobular frontotemporal tau) significativas, los niveles de CSF de p-tau soluble y tau total no aumentan.

**5** Otras tauopatías o enfermedades neurodegenerativas, tales como parálisis supranuclear progresiva (PSP, por sus siglas en inglés), síndrome corticobasal (CBS, por sus siglas en inglés) y demencia frontotemporal (FTD, por sus siglas en inglés), actualmente no tienen biomarcadores de CSF o formación de imágenes y el diagnóstico principalmente depende de la evaluación clínica finalmente confirmada después de la autopsia cerebral. No queda claro si otras tauopatías inducen modificaciones de p-tau en ausencia de patología amiloide.

**6** En consecuencia, sigue existiendo una necesidad en la técnica de métodos mejorados para los diagnósticos clínicos confiables y precisos de tauopatías, con implicaciones para el diseño e implementación de ensayos clínicos.

## **SUMARIO**

**7** Entre los diversos aspectos de la presente descripción se proporcionan métodos para cuantificar la fosforilación de tau en residuos de aminoácidos específicos y, opcionalmente, cuantificar especies de A $\beta$  para diagnosticar a un sujeto, guiar decisiones de tratamiento y seleccionar sujetos para ensayos clínicos.

**8** Un aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40, en donde un aumento en el valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 normal discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de un estado sano.

**9** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40, en donde una disminución del valor de pT217/T217 y un aumento del valor de A $\beta$  42/40 discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de la enfermedad de Alzheimer.

**10** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de compuesto pT217/T217 x A $\beta$  42/40, en donde el valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de la enfermedad de Alzheimer, tauopatía 4R y un estado sano. En algunas modalidades, un valor aumentado de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 cuantificado en la etapa (b) en relación con un valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en una población de control sana discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de un estado sano. En algunas modalidades, un valor aumentado de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 cuantificado en la etapa (b) en relación con un valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en una población con enfermedad de Alzheimer discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de AD. En algunas modalidades, un valor aumentado pT217/T217 x A $\beta$  42/40 cuantificado en la etapa (b) en relación con un valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en una población de tauopatía 4R discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de una tauopatía 4R.

**11** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una demencia frontotemporal (FTD) esporádica, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181, en donde el valor de pT181/T181 discrimina

una FTD esporádica de la enfermedad de Alzheimer, tauopatías de FTD no esporádica y un estado sano. En algunos, un valor disminuido de pT181/T181 cuantificado en la etapa (b) en relación con un valor de pT181/T181 en una población con enfermedad de Alzheimer discrimina una FTD esporádica de la enfermedad de Alzheimer. En algunas modalidades, un valor disminuido de pT181/T181 cuantificado en la etapa (b) en relación con un valor de pT181/T181 en una población de control sana discrimina una FTD esporádica de un estado sano. En alguna modalidad, un valor disminuido de pT181/T181 cuantificado en la etapa (b) en relación con un valor de pT181/T181 en una población con tauopatía FTD no esporádica discrimina una FTD esporádica de una tauopatía FTD no esporádica.

**12** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para diagnosticar a un sujeto que tiene un síntoma de enfermedad de Alzheimer, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT217/T217 y un valor A $\beta$  42/40; y (b) diagnosticar que el sujeto tiene demencia frontotemporal (FTD) o un riesgo aumentado de FTD cuando un aumento en el valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 normal se detecta en relación con un valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 en una población de control sana. En algunas modalidades, el método comprende además determinar un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40, en donde un valor compuesto aumentado en relación con un control sano indica que el sujeto tiene FTD o un riesgo aumentado de FTD. En algunas modalidades, el sujeto se diagnostica como un portador de la mutación *MAPT* R406W.

**13** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para diagnosticar a un sujeto que tiene un síntoma de enfermedad de Alzheimer, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT217/T217 y un valor A $\beta$  42/40; y (b) diagnosticar que

sujeto tiene demencia frontotemporal (FTD) o un riesgo aumentado de FTD cuando una disminución del valor de pT217/T217 y un aumento en el valor de A $\beta$  42/40 se detecta en relación con un valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 en una población con enfermedad de Alzheimer. En algunas modalidades, el método comprende además determinar un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40, en donde un valor compuesto aumentado en relación con una población con enfermedad de Alzheimer indica que el sujeto tiene FTD o un riesgo aumentado de FTD. En algunas modalidades, el sujeto se diagnostica como un portador de la mutación *MAPT* R406W.

**14** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para diagnosticar a un sujeto que tiene un síntoma de enfermedad de Alzheimer, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (b) diagnosticar que el sujeto tiene demencia frontotemporal (FTD) esporádica o un riesgo aumentado de FTD esporádica cuando se detecta una disminución en el valor de pT181/T181 en relación con un valor de pT181/T181 en una población de control sana.

**15** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para diagnosticar a un sujeto que tiene un síntoma de enfermedad de Alzheimer, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (b) diagnosticar que el sujeto tiene demencia frontotemporal (FTD) esporádica o un riesgo aumentado de FTD esporádica cuando se detecta una disminución en el valor de pT181/T181 en relación con un valor de pT181/T181 en una población con enfermedad de Alzheimer.

**16** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para medir progresión de la enfermedad de tauopatía *MAPT* R406W en un sujeto, el método comprende generalmente (a) proporcionar una primera muestra de

sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la primera muestra procesada, el valor de pT217/T217, y el valor A $\beta$  42/40; (b) proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra, en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau y A $\beta$  como en la etapa (a) y cuantificar, en la segunda muestra procesada, un valor de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40; y (c) calcular la diferencia entre el valor cuantificado de pT217/T217 y el valor de A $\beta$  42/40 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde una diferencia estadísticamente significativa en el valor de pT217/T217 cuantificado, y el valor de A $\beta$  42/40 en la segunda muestra indica la progresión de la enfermedad del sujeto.

**17** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para medir la progresión de la enfermedad de tauopatía *MAPT* R406W en un sujeto, el método comprende generalmente (a) proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la primera muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; (b) proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra, en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau y A $\beta$  como en la etapa (a) y cuantificar, en la segunda muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y (c) calcular la diferencia entre el valor compuesto cuantificado pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde una diferencia estadísticamente significativa en el valor compuesto cuantificado pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en la segunda muestra indica la progresión de la enfermedad del sujeto.

**18** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para medir la progresión de la enfermedad de demencia frontotemporal (FTD) esporádica en un sujeto, el método comprende generalmente (a) proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada de un sujeto, en donde la primera

muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más ptau y cuantificar, en la primera muestra procesada, un valor de pT181/T181; (b) proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra, en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para la misma especie ptau como en la etapa (a) y cuantificar, en la segunda muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (c) calcular la diferencia entre el valor cuantificado de pT181/T181 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde una diferencia estadísticamente significativa en el valor cuantificado de pT181/T181 en la segunda muestra indica progresión de la enfermedad del sujeto.

**19** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para tratar a un sujeto que lo necesita, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT217/T217 y un valor A $\beta$  42/40; y (b) administrar una composición farmacéutica al sujeto cuando un aumento en el valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 normal se detecta en relación con un valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 en una población de control sana. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende una terapia para FTD.

**20** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para tratar a un sujeto que lo necesita, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT217/T217 y un valor A $\beta$  42/40; y (b) administrar una composición farmacéutica al sujeto cuando se detecta una disminución en el valor de pT217/T217 y un incremento en el valor de A $\beta$  42/40 en relación con el valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 en una población con enfermedad de Alzheimer. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende una terapia para FTD.

**21** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para tratar a un sujeto que lo necesite, el método comprende generalmente (a)

proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$  y cuantificar, en la muestra procesada, un compuesto de pT217/T217 x valor de A $\beta$  42/40; y (b) administrar una composición farmacéutica al sujeto cuando un aumento en el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 es el valor compuesto relativo detectado de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en una población de control sana, en una población con enfermedad de Alzheimer o en una población con tauopatía 4R. En alguna modalidad, la composición farmacéutica comprende una terapia para FTD.

**22** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para tratar a un sujeto que lo necesite, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más ptau y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (b) administrar una composición farmacéutica al sujeto cuando se detecta una disminución en el valor de pT181/T181 en relación con un valor de pT181/T181 en una población de control sana, en una población con enfermedad de Alzheimer o en una población con tauopatía de FTD no esporádica. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende una terapia para FTD esporádica.

**23** En cada uno de los aspectos anteriores, en ciertas modalidades, el tratamiento no incluye un agente terapéutico para reducir o prevenir que una deposición de A $\beta$  y/o tratamiento altere o estabilice la cantidad de las especies de ptau cuantificadas.

**24** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40; y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para FTD cuando el valor de pT217/T217 aumenta y el valor de A $\beta$  42/40 es aproximadamente el mismo que el de una población de control sana.

**25** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para la terapia de AD o Ab cuando el valor de pT217/T217 aumenta y el valor de A $\beta$  42/40 es aproximadamente el mismo que el de una población de control sana.

**26** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para FTD cuando el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 aumenta en relación con una población de control sana.

**27** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para AD cuando el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 aumenta en relación con una población AD.

**28** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, en donde el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para una terapia para

FTD esporádica cuando el valor de pT181/T181 disminuye en relación con una población de control sana.

**29** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, en donde el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para AD cuando el valor compuesto de pT181/T181 disminuye en relación con una población AD.

**30** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una enfermedad de Alzheimer, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT153/T153, en donde el valor de pT153/T153 discrimina la enfermedad de Alzheimer de una tauopatía no AD y un estado sano. En algunas modalidades, un valor de pT153/T153 aumentado en relación con el de una población de control sana y una población de tauopatía de enfermedad que no es Alzheimer se discriminan de la enfermedad de Alzheimer de una tauopatía no AD y un estado sano.

**31** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT153/T153 y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para una terapia para AD cuando el valor de pT153/T153 aumenta en relación con una población de control sana o una población con tauopatía no AD.

**32** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida

de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT151/T151; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para una terapia para tauopatía no AD cuando el valor de pT153/T153 aumenta en relación con una población con tauopatía no AD.

**33** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una enfermedad de Alzheimer, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT111/T111, en donde el valor de pT111/T111 discrimina la enfermedad de Alzheimer de una tauopatía no AD y un estado sano. En algunas modalidades, un aumento del valor de pT111/T111 en relación con una población de control sana y una población de tauopatía de la enfermedad que no es Alzheimer discriminan de la enfermedad de Alzheimer de una tauopatía no AD y un estado sano.

**34** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT111/T111 y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para una terapia para AD cuando el valor de pT111/T111 aumenta en relación con una población de control sana o una población de tauopatía no AD.

**35** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT111/T111 y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para una terapia para tauopatía no AD cuando el valor de pT111/T111 aumenta en relación con una población con tauopatía no AD.

**36** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una tauopatía, el método comprende generalmente (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT205/T205, en donde el valor de pT205/T205 discrimina una tauopatía y un estado sano. En algunas modalidades, un aumento del valor de pT205/T205 discrimina una tauopatía y un estado sano.

**37** Otro aspecto de la presente descripción abarca un método para discriminar una tauopatía, el método comprende (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT208/T208, en donde el valor de pT208/T208 discrimina una tauopatía y un estado sano. En algunas modalidades, un aumento del valor de pT208/T208 discrimina una tauopatía y un estado sano.

**38** Estos y otros aspectos e iteraciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

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

**39** El expediente de la solicitud contiene al menos una fotografía a color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de solicitud de patente con fotografías a color después de la solicitud y el pago de la tarifa correspondiente.

**40** La **Figura 1A, Figura 1B, Figura 1C, Figura 1D, Figura 1E y Figura 1F** muestran los portadores de MAPT R406W poseen un pT217/T217 de CSF aumentado sin patología amiloide. La **Figura 1A** muestra que todas las muestras (n = 252) se trazaron en el análisis de cuadrante usando los cortes calculados en la cohorte WashU-A (corte A $\beta$  42/40 de CSF = 0,086, corte pT217/T217 de CSF = 4,76). Las **Figura 1B-Figura 1E** muestran gráficos circulares que muestran el número de participantes en cada grupo clasificado clínicamente para cada cuadrante: II (**Figura 1B**), I (**Figura 1C**), III (**Figura 1D**), y IV (**Figura 1E**). CSF, líquido cefalorraquídeo. La **Figura 1F** muestra un diagrama

de flujo de la cohorte analizada en este estudio. La cohorte WashU-A incluye controles de AD y con coincidencia de edad con un subconjunto (n=48) que tiene datos de formación de imágenes de PiB-PET. Este subconjunto y un corte de PiB-PET de 0,18 se usaron para determinar la positividad amiloide de las medidas de inmunoprecipitación y espectrometría de masa (IP/MS) del Ab 42/40 de CSF (corte 0,086). A continuación, se usó todo el CSF de la WashU-A para determinar el corte de pT217/T217 de CSF de IP/MS de 4,76. Los cortes de las concentraciones de CSF de pT181, pT217, tau total, y la relación de pT181/T181 fueron 44,79, 222,4, 754,7 y 15,75, respectivamente. La cohorte de WashU-A (n=85), WashU-B (n=88), y Montpellier (n=79) se analizaron para determinar Ab 42/40 y pT217/T217 de CFS de IP/MS en análisis de cuadrante (total n=252). Las muestras se categorizaron en el cuadrante I-IV usando los cortes para la positividad determinada de amiloide y ptau. AMC: control con coincidencia de edad, YNC: control normal de Young, CBS: síndrome corticobasal, PSP: Parálisis supranuclear progresiva, bvFTD: demencia frontotemporal de variante de comportamiento.

**41** La **Figura 2A**, **Figura 2B**, **Figura 2C** y **Figura 2C** muestran el A $\beta$  42/40 de CSF, el pT217/T217 de CSF y los biomarcadores compuestos para el diagnóstico de AD y los portadores de la mutación MAPT R406W. La **Figura 2A** muestra que el A $\beta$  42/40 de CSF disminuye significativamente en la AD (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). La **Figura 2B** muestra que el pT217/T217 de CSF aumenta significativamente en la AD (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). La **Figura 2C** muestra que el pT217/T217 de CSF  $\times$  A $\beta$  42/40 de CSF aumenta significativamente en la AD en comparación con el grupo de control y tauopatía 4R que consiste principalmente en tauopatía 4R (PSP, CBS, FTD-MAPT P301L) y un subconjunto de bvFTD esporádico (puede contener FTD-TDP, FTD-FUS y tauopatía 3R. ANOVA,  $p < 0,0001$ ). Esto también aumenta significativamente en los portadores de MAPT R406W en comparación con el control (ANOVA,  $p < 0,0001$ ) y el grupo de la tauopatía 4R (ANOVA,  $p = 0,0001$ ). La **Figura 2A** muestra que el pT217/T217 de CSF dividido entre el A $\beta$  42/40 de CSF, aumenta significativamente en la AD (ANOVA,  $p < 0,0001$ ). CSF, fluido cefalorraquídeo; AD, enfermedad de Alzheimer;

PSP, parálisis supranuclear progresiva; CBS, síndrome corticobasal; bvFTD, demencia frontotemporal de variante del comportamiento.

**42** La **Figura 3A, Figura 3B, Figura 3C, Figura 3D, Figura 3E, Figura 3F, Figura 3G, Figura 3H, Figura 3I, Figura 3J, Figura 3K, y Figura 3L** muestran análisis ROC de A $\beta$  42/40 de CSF, tau y ptau del CSF de IP/MS. La **Figura 3A** muestra que la relación de A $\beta$  42/40 de CSF aumenta significativamente en participantes PET-PiB+ amiloide en la cohorte Wash-A (n=48). La **Figura 3B** muestra que el A $\beta$  42/40 de CSF puede diferenciar individuos PET-PiB+ amiloide de PiB- amiloide (AUC = 0,9207, p<0,0001). (**Figura 3C, Figura 3E, Figura 3G, Figura 3I, Figura 3K**) la relación de pT217/T217 de CSF, pT217 de CSF, T181 de CSF, concentraciones totales de tau de CSF, relación de pT181/T181 de CSF aumentan significativamente en participantes amiloide+ definidos por la relación A $\beta$  42/40 de CSF en la cohorte Wash-A (n=85). (**Figura 3D, Figura 3F, Figura 3H, Figura 3J, Figura 3L**) la relación de pT217/T217 de CSF, pT217 de CSF, T181 de CSF, concentraciones de tau totales del CSF, relación de pT181/T181 de CSF puede diferenciar individuos A $\beta$  42/40 positivo de CSF (amiloide +) de A $\beta$  42/40 negativo de CSF (amiloide –) con AUC = 0,983, 0,949, 0,816, 0,693, 0,934, respectivamente. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

**43** La **Figura 4** muestra el análisis del cuadrante mediante el diagnóstico. Los gráficos circulares muestran los cuadrantes (I, II, III, IV) donde se ubican los participantes de cada grupo de enfermedad.

**44** Las **Figura 5A, Figura 5B, y Figura 5C** muestran formación de imágenes de PET de amiloide y tau por cuadrante. La **Figura 5A** muestra que la formación de imágenes de PET amiloide medida por PiB SUVR aumenta significativa y gradualmente en el cuadrante II>III>IV (ANOVA, p<0,0001). La **Figura 5B** muestra que la formación de imágenes de PET amiloide medida por AV45 SUVR aumenta significativa y gradualmente en el cuadrante II>III>IV (ANOVA, p<0,0001). La **Figura 5C** muestra que la formación de imágenes de PET tau medida por AV1451 SUVR aumenta solo en el cuadrante II (ANOVA,

$p < 0,0001$ ). No hubo participante con datos de formación de imágenes en el cuadrante I. ANOVA  $*p < 0,05$   $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ .

**45** La **Figura 6** representa gráficamente que A $\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF se correlacionan en el cuadrante III y IV. El pT217/T217 de CSF se correlaciona negativamente con el Ab 42/40 de CSF en el cuadrante III y IV por debajo del corte para la positividad de ptau (correlación de Pearson  $r = 0,556$ ,  $p < 0,0001$ ).

**46** La **Figura 7A**, **Figura 7B**, **Figura 7C** y **Figura 7D** gráficamente representa la Subcategoría del diagnóstico que se muestra a partir de la **Figura 2**. La **Figura 7A** muestra que el A $\beta$  42/40 de CSF disminuye significativamente en la AD y la AD focal. La **Figura 7B** muestra que el pT217/T217 de CSF aumenta significativamente en la AD y la AD focal. La **Figura 7C** muestra que el pT217/T217 de CSF x A $\beta$  42/40 de CSF, aumenta significativamente en la AD y portadores de la mutación *MAPT* R406W. La **Figura 7D** muestra el pT217/T217 de CSF dividido entre el A $\beta$  42/40 de CSF, aumenta significativamente en la AD y la AD focal. ANOVA  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ .

**47** La **Figura 8A**, **Figura 8B**, **Figura 8C** y **Figura 8D** representan gráficamente los análisis del cuadrante usando Ab 42/40 de CSF y tau total y ptau de CSF. Las concentraciones de CSF de pT217 (**Figura 8A**), pT181 (**Figura 8B**), tau total (**Figura 8C**) no separan portadores de la mutación *MAPT* R406W u otros grupos. La **Figura 8A** muestra que la relación de pT181/T181 de CSF no se separa de los portadores de la mutación *MAPT* R406W. Sin embargo, el bvFTD esporádico puede tener un pT181/T181 de CSF menor en el cuadrante IV.

**48** La **Figura 9A**, **Figura 9B**, **Figura 9C** y **Figura 9D** representan gráficamente el tau y ptau total de CSF de IP/MS en subgrupos de tauopatías. La **Figura 9A** y **Figura 9B** muestran que la AD ha aumentado significativamente las concentraciones de pT217 y pT181 de CSF. La **Figura 9C** muestra que tau total de CSF aumenta significativamente en AMC, AD, AD focal, CBS PSP continuo que en YNC. La **Figura 9D** muestra bvFTD esporádica que contiene FTLD-tau,

FTLD-TDP, FTLD-FUS tiene pT181/T181 de CSF significativamente menor que R406W (\* $p < 0,05$ ), AMC (\*\* $p < 0,001$ ) y AD/AD focal (\*\*  $p < 0,0001$ ).

**49** La **Figura 10A** y **Figura 10B** muestran que bvFTD esporádica que contiene FTLD-tau, FTLD-TDP, FTLD-FUS pueden separarse del control, AD y otras tauopatías con pT181/T181 de CSF. La **Figura 10A** muestra que la bvFTD esporádica (bvFTD) que contiene FTLD-tau, FTLD-TDP, FTLD-FUS tiene una relación de A $\beta$  42/40 de CSF mayor y pT181/T181 de CSF menor que el control, AD y tauopatías que contienen CBS, PSP y MAPT-FTD (portadores de la mutación P301L y R406W). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . La **Figura 10B** muestra valores de diagnóstico del pT181/T181 de CSF en la separación de bvFTD de otra cohorte. La bvFTD esporádica se puede separar del control (AUC = 0,752) y PSP, CBS, y MAPT-FTD (AUC = 0,707).

**50** La **Figura 11** muestra toda la gran parte de los participantes identificados como CBD o PSP que tienen pT217/T217 mayor que el observado en muestras de AD.

**51** La **Figura 12** muestra los valores de pT181/T181 en las tauopatías AD y no AD.

**52** La **Figura 13** muestra los valores de pT205/T205 en las tauopatías AD y no AD.

**53** La **Figura 14** muestra los valores de pS208/S208 en las tauopatías AD y no AD.

**54** La **Figura 15** muestra los valores de pT111/T111 en las tauopatías AD y no AD.

**55** La **Figura 16** muestra los valores de pT153/T153 en las tauopatías AD y no AD.

**56** La **Figura 17** muestra que la FTD esporádica que contiene FTD-tau, FTD-ALS, FTD-FUS se puede separar del control, AD y otras tauopatías con pT181/T181 de CSF. La FTD esporádica (sFTD, por sus siglas en inglés) tiene una relación de Ab 42/40 de CSF más alta y pT181/T181 de CSF más baja que otra cohorte en los análisis de cuadrantes. La sFTD tiene pT181/T181 de CSF significativamente más bajo que R406W (\* $p < 0,05$ ), AMC (\*\* $p < 0,001$ ) y AD/AD

focal (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). La sFTD tiene pT181/T181 de CSF significativamente más bajo que el control, AD y CBS, PSP y FTD-MAPT familiar (fFTD, por sus siglas en inglés). La sFTD se puede separar del control (AUC = 0,75) y PSP, CBS y fFTD (AUC = 0,72)

**57** La **Figura 18** muestra que los portadores de *MAPT* R406W tienen pT217/T217 de CSF aumentado sin patología amiloide y la FTD esporádica tiene pT181/T181 disminuido. Todas las muestras (n=265) se sometieron a análisis de cuadrante con relación de Ab 42/40 de CSF en el eje x y tau de CSF en el eje y. pT217/T217 de CSF aumenta en los portadores de la mutación *MAPT* R406W. (corte de Abeta 42/40 de CSF = 0,086, corte de pT217/T217 de CSF = 4,755. La concentración absoluta de pT217 de CSF no separa portadores de la mutación *MAPT* R406W. El pT181/T181 de CSF disminuye en FTD esporádica. La concentración absoluta de pT181 de CSF no separa la FTD esporádica. Tau total no separa ningún grupo.

**58** La **Figura 19** muestra que los portadores de *MAPT* R406W tienen pT217/T217 aumentado sin patología amiloide y la FTD esporádica tiene pT181/T181 disminuido. La pT217/T217 es mejor que la concentración de pT217 sola para separar los portadores de *MAPT* R406W. La pT181/T181 es mejor que la concentración de pT181 sola para separar la FTD esporádica que no contiene portadores de *MAPT* R406W y P301L. La edad en la cohorte de enfermedad diferente - tau total de CSF depende parcialmente de la edad.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

**59** La agregación de proteína tau en los ovillos neurofibrilares en el sistema nervioso central contribuye a la etiología de determinados trastornos neurodegenerativos, incluida la enfermedad de Alzheimer (AD). Si bien aún no se comprende completamente el mecanismo de la desestabilización de tau, se ha encontrado hiperfosforilación de la proteína tau en los agregados de tau. La presente descripción abarca el uso de los métodos para cuantificar la fosforilación de tau en residuos específicos de aminoácidos para diagnosticar tauopatías, guiar las decisiones de tratamiento, seleccionar sujetos para ensayos clínicos, y evaluar

la eficacia clínica de ciertas intervenciones terapéuticas. Otros aspectos e iteraciones de la invención se describen con más detalle a continuación.

## **I. Definiciones**

**60** Para que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, primero se definen algunos términos. A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado habitualmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenecen las modalidades de la invención. Muchos métodos y materiales similares, modificados o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse al poner en práctica las modalidades de la presente invención sin experimentación innecesaria, los materiales y métodos preferidos se describen en la presente descripción. Al describir y reivindicar las modalidades de la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones que se establecen a continuación.

**61** El término “aproximadamente”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la variación de la cantidad numérica que puede producirse, por ejemplo, en técnicas y equipos de medición típicos, con respecto a cualquier variable cuantificable, lo que incluye, pero no se limita a, masa, volumen, tiempo, distancia y cantidad. Asimismo, dados los procedimientos de manejo de sólidos y líquidos usados en el mundo real, es probable que se produzcan errores y variaciones involuntarios por diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes usados para elaborar las composiciones o llevar a cabo los métodos y lo similar. El término “aproximadamente” también abarca estas variaciones, que pueden alcanzar hasta  $\pm 5\%$ , pero también pueden ser de  $\pm 4\%$ ,  $3\%$ ,  $2\%$ ,  $1\%$ , etc. Ya sea que se encuentren o no modificadas por el término “aproximadamente”, las reivindicaciones incluyen equivalentes de las cantidades.

**62** Un anticuerpo, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo completo como se entiende en la técnica, es decir, que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, y también a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tiene una región de unión al antígeno, lo que

incluye, pero no se limita a, fragmentos de anticuerpos tales como Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos de dominio único, Fv y Fv monocatenario. El término anticuerpo también se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. Las técnicas para preparar y usar diversos constructos y fragmentos de anticuerpos son muy conocidas en la técnica. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también son muy conocidos en la técnica (ver, p. ej., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; que se incorpora a la presente descripción como referencia en su totalidad).

**63** Como se usa en la presente descripción, el término “aptámero” se refiere a un polinucleótido, generalmente un ARN o ADN que tiene una actividad biológica útil en términos de actividad bioquímica, reconocimiento molecular o atributos de unión. Usualmente, un aptámero tiene una actividad molecular tal como la unión a una molécula diana en un epítipo (región) específico. Generalmente está aceptado que un aptámero, que es específico para la unión a un polipéptido, puede sintetizarse y/o identificarse mediante métodos de evolución *in vitro*. Los medios para preparar y caracterizar aptámeros, incluidos los métodos de evolución *in vitro*, son muy conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, US 7,939,313, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

**64** El término “A $\beta$ ” se refiere a péptidos derivados de una región en el extremo carboxílico de una proteína más grande llamada proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés). El gen que codifica APP está ubicado en el cromosoma 21. Existen muchas formas de A $\beta$  que pueden tener efectos tóxicos: los péptidos A $\beta$  típicamente son secuencias con una longitud de 37-43 aminoácidos, aunque pueden tener truncamientos y modificaciones que cambian su tamaño global. Pueden encontrarse en compartimentos solubles e insolubles, en formas monoméricas, oligoméricas y agregadas, intracelular o extracelularmente, y pueden formar complejos con otras proteínas o moléculas. Los efectos adversos o tóxicos de los A $\beta$  pueden atribuirse a cualquiera de las formas mencionadas anteriormente, así como a otras que no se describen

específicamente. Por ejemplo, dos de tales isoformas de A $\beta$  incluyen A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42; la isoforma A $\beta$ 42 es particularmente fibrilógena o insoluble y se asocia a enfermedades. El término “A $\beta$ ” típicamente se refiere a una pluralidad de especies de A $\beta$  sin discriminar entre especies de A $\beta$  individuales. Las especies de A $\beta$  específicas se identifican por el tamaño del péptido, p. ej., A $\beta$ 42, A $\beta$ 40, A $\beta$ 38 etc.

**65** Como se usa en la presente descripción, el término “valor de A $\beta$ 42/A $\beta$ 40” significa la relación de la cantidad de A $\beta$ 42 en una muestra obtenida de un sujeto en comparación con la cantidad de A $\beta$ 40 en la misma muestra.

**66** La “amiloidosis A $\beta$ ” se define como depósito de A $\beta$  anormal desde el punto de vista clínico en el cerebro. Cuando se determina que un sujeto tiene amiloidosis A $\beta$ , se lo denomina en la presente descripción “con amiloide positivo”, mientras que cuando se determina que un sujeto no tiene amiloidosis A $\beta$ , se lo denomina en la presente descripción “con amiloide negativo”. Existen indicadores aceptados de la amiloidosis A $\beta$  en la técnica. En el momento de esta descripción, la amiloidosis A $\beta$  se mide directamente mediante obtención de imágenes de amiloide (p. ej., PET con PiB, florbetapir u otros métodos de obtención de imágenes conocidos en la técnica) o indirectamente por una disminución de A $\beta$ 42 en el líquido cefalorraquídeo (CSF, por sus siglas en inglés) o una disminución de la relación A $\beta$ 42/40 en el CSF. La formación de imágenes mediante [ $^{11}\text{C}$ ]PiB-PET con puntuación de la media de potencial de unión cortical (MCP, por sus siglas en inglés) >0,18 es un indicador de amiloidosis A $\beta$ , como lo es la concentración de A $\beta$ 42 en el líquido cefalorraquídeo (CSF) de aproximadamente 1 ng/ml medido mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masa (IP/MS)). Alternativamente, puede usarse una relación límite para el A $\beta$ 42/40 en el CSF que maximice la precisión al predecir la positividad de amiloide según lo determinado mediante PET con PIB. Los valores tales como estos, u otros conocidos en la técnica y/o usados en los ejemplos, pueden usarse solos o en combinación para confirmar clínicamente la amiloidosis A $\beta$ . Ver, por ejemplo, Klunk W E et al. Ann Neurol 55(3) 2004, Fagan A M et al. Ann Neurol, 2006, 59(3), Patterson et. al, Annals of Neurology, 2015, 78(3): 439-453 o Johnson et al., J. Nuc. Med., 2013, 54(7): 1011-1013, cada una de las cuales se incorpora de esta

manera como referencia en su totalidad. Los sujetos con amiloidosis A $\beta$  pueden ser sintomáticos o no, y los sujetos sintomáticos pueden satisfacer o no los criterios clínicos de una enfermedad asociada a la amiloidosis A $\beta$ . Ejemplos no taxativos de síntomas asociados a la amiloidosis A $\beta$  pueden incluir deterioro de la función cognitiva, alteraciones de la conducta, alteraciones de la función del lenguaje, desregulación emocional, convulsiones, demencia y alteraciones en la estructura o función del sistema nervioso. Enfermedades asociadas a la amiloidosis A $\beta$  incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer (AD), angiopatía amiloide cerebral (CAA, por sus siglas en inglés), demencia con cuerpos de Lewy y miositis por cuerpos de inclusión. Los sujetos con amiloidosis A $\beta$  tienen un mayor riesgo de presentar una enfermedad asociada a la amiloidosis A $\beta$ .

**67** Un “signo clínico de amiloidosis A $\beta$ ” se refiere a una medición del depósito de A $\beta$  conocida en la técnica. Los signos clínicos de amiloidosis A $\beta$  pueden incluir, pero no se limitan a, depósito de A $\beta$  identificado mediante obtención de imágenes de amiloide (p. ej., PET con PiB, florbetapir u otros métodos de obtención de imágenes conocidos en la técnica) o por una disminución de A $\beta$ 42 o de la relación A $\beta$ 42/40 en el líquido cefalorraquídeo (CSF). Ver, por ejemplo, Klunk WE et al. Ann Neurol 55(3) 2004 y Fagan AM et al. Ann Neurol 59(3) 2006, cada una de las cuales se incorpora de esta manera como referencia en su totalidad. Los signos clínicos de amiloidosis A $\beta$  también pueden incluir mediciones del metabolismo de A $\beta$ , en particular mediciones del metabolismo de A $\beta$ 42 únicamente o en comparación con mediciones del metabolismo de otras variantes de A $\beta$  (p. ej., A $\beta$ 37, A $\beta$ 38, A $\beta$ 39, A $\beta$ 40 y/o A $\beta$  total), como se describe en las patentes de los EE. UU. Núms. de serie 14/366,831, 14/523,148 y 14/747,453, cada una de las cuales se incorpora de esta manera como referencia en su totalidad. Se describen métodos adicionales en Albert et al. Alzheimer’s & Dementia 2007 Vol. 7, págs. 170-179; McKhann et al., Alzheimer’s & Dementia 2007 Vol. 7, págs. 263-269; y Sperling et al. Alzheimer’s & Dementia 2007 Vol. 7, págs. 280-292, cada una de las cuales se incorpora de esta manera como referencia en su totalidad. Es importante destacar que un sujeto con

signos clínicos de amiloidosis A $\beta$  puede tener o no síntomas asociados al depósito de A $\beta$ . Sin embargo, los sujetos con signos clínicos de amiloidosis A $\beta$  tienen un mayor riesgo de presentar una enfermedad asociada a la amiloidosis A $\beta$ .

**68** Un “candidato para la obtención de imágenes de amiloide” se refiere a un sujeto que ha sido identificado por un médico como una persona para la que puede estar clínicamente indicada la obtención de imágenes de amiloide. Como ejemplo no taxativo, un candidato para la obtención de imágenes de amiloide puede ser un sujeto con uno o más signos clínicos de amiloidosis A $\beta$ , uno o más síntomas asociados a placas de A $\beta$ , uno o más síntomas asociados a CAA o combinaciones de estos. Un médico puede recomendar obtención de imágenes de amiloide para tal sujeto para dirigir su cuidado asistencial. Como otro ejemplo no taxativo, un candidato para la obtención de imágenes de amiloide puede ser un participante potencial en un ensayo clínico para una enfermedad asociada a la amiloidosis A $\beta$  (ya sea un sujeto del grupo de control o un sujeto del grupo de prueba).

**69** Un “síntoma asociado a placas de A $\beta$ ” o un “síntoma asociado a CAA” se refiere a cualquier síntoma causado por o asociado a la formación de placas de amiloide o CAA, respectivamente, que están compuestas por agregados fibrilares ordenados regularmente llamados fibrillas de amiloide. Síntomas asociados a placas de A $\beta$  ilustrativos pueden incluir, pero no se limitan a, degeneración neuronal, deterioro de la función cognitiva, deterioro de la memoria, alteraciones de la conducta, desregulación emocional, convulsiones, alteraciones en la estructura o función del sistema nervioso y un mayor riesgo de presentación o empeoramiento de enfermedad de Alzheimer o CAA. La degeneración neuronal puede incluir un cambio en la estructura de una neurona (incluidos cambios moleculares tales como acumulación intracelular de proteínas tóxicas, agregados de proteínas, etc. y cambios a niveles macro tales como cambio en la forma o longitud de axones o dendritas, cambio en la composición de la funda de mielina, pérdida de la funda de mielina, etc.), un cambio en la función de una neurona, una pérdida de función de una neurona, muerte de una neurona o cualquier combinación de estos. El deterioro de la función cognitiva puede incluir, pero no se

limita a, dificultades en cuanto a memoria, atención, concentración, lenguaje, pensamiento abstracto, creatividad, función ejecutiva, planificación y organización. Las alteraciones de la conducta pueden incluir, pero no se limitan a, agresión física o verbal, impulsividad, disminución de la inhibición, apatía, disminución de la iniciativa, cambios en la personalidad, abuso de alcohol, tabaco o fármacos y otros comportamientos relacionados con las adicciones. La desregulación emocional puede incluir, pero no se limita a, depresión, ansiedad, manía, irritabilidad e incontinencia emocional. Las convulsiones pueden incluir, pero no se limitan a, convulsiones tónicoclónicas generalizadas, convulsiones parciales complejas y convulsiones no epilépticas psicógenas. Las alteraciones en la estructura o función del sistema nervioso pueden incluir, pero no se limitan a, hidrocefalia, parkinsonismo, trastornos del sueño, psicosis, alteraciones del equilibrio y la coordinación. Esto puede incluir alteraciones motoras tales como monoparesia, hemiparesia, tetraparesia, ataxia, balismos y temblor. Esto también puede incluir pérdida o disfunción sensorial, que incluye sensibilidad olfativa, táctil, gustativa, visual y auditiva. Asimismo, esto puede incluir alteraciones del sistema nervioso autónomo tales como disfunción intestinal y vesical, disfunción sexual, desregulación de la presión arterial y de la temperatura. Finalmente, esto puede incluir alteraciones hormonales atribuibles a la disfunción del hipotálamo y la glándula pituitaria tales como deficiencias y desregulación de la hormona de crecimiento, hormona estimulante de la tiroides, hormona luteinizante, hormona estimulante de los folículos, hormona liberadora de gonadotropinas, prolactina y otras muchas hormonas y moduladores.

**70** Como se usa en la presente descripción, el término “sujeto” se refiere a un mamífero, preferentemente a un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates, ganado, roedores y mascotas. Un sujeto puede estar a la espera de cuidado médico o tratamiento, puede estar recibiendo cuidado médico o tratamiento o puede haber recibido cuidado médico o tratamiento.

**71** Como se usa en la presente descripción, el término “población de control”, “población normal” o una muestra de un sujeto “sano” se refiere a un

sujeto, o grupo de sujetos, del cual se determina clínicamente que no tiene una tauopatía o amiloidosis A $\beta$ , ni una enfermedad clínica asociada a la amiloidosis A $\beta$  (que incluye, pero no se limita a, enfermedad de Alzheimer), basado en resultados de pruebas cualitativas o cuantitativas.

**72** Como se usa en la presente descripción, el término “muestra de sangre” se refiere a una muestra biológica derivada de la sangre, preferentemente sangre periférica (o circulante). La muestra de sangre puede ser sangre completa, plasma o suero, aunque típicamente se prefiere el plasma.

**73** El término “isoforma”, como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquiera de varias formas diferentes de las mismas variantes de proteínas, que surgen debido al corte y empalme alternativo del ARNm que codifica la proteína, modificación postraducciona de la proteína, procesamiento proteolítico de la proteína, variaciones genéticas y recombinación somática. Los términos “isoforma” y “variante” se usan indistintamente.

**74** El término “tau” se refiere a una pluralidad de isoformas codificadas por el gen MAPT (u homólogo de este), así como a especies de este que están truncadas en el extremo C *in vivo*, truncadas en el extremo N *in vivo*, que tienen modificaciones postraduccionales *in vivo* o cualquier combinación de estas. Como se usa en la presente descripción, los términos “tau” y “proteína tau” y “especie de tau” pueden usarse indistintamente. En muchos animales, que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates, roedores, peces, ganado bovino, anfibios, cabras y gallinas, tau es codificada por el gen MAPT. En animales donde el gen no se identifica como MAPT, puede identificarse un homólogo mediante métodos muy conocidos en la técnica.

**75** En los seres humanos, existen seis isoformas de tau que se generan mediante corte y empalme alternativo de los exones 2, 3 y 10 del MAPT. Estas isoformas varían en longitud de 352 a 441 aminoácidos. Los exones 2 y 3 codifican insertos de 29 aminoácidos cada uno en el extremo N (denominado N) y las isoformas de tau humana completa pueden tener ambos insertos (2N), un inserto (1N) o ningún inserto (0N). Todas las isoformas de tau humana completa también tienen tres repeticiones del dominio de unión a los microtúbulos

(denominadas R). La inclusión del exón 10 en el extremo C da lugar a la inclusión de un cuarto dominio de unión a los microtúbulos codificado por el exón 10. Por lo tanto, las isoformas de tau humana completa pueden comprender cuatro repeticiones del dominio de unión a los microtúbulos (con el exón 10 incluido: R1, R2, R3 y R4) o tres repeticiones del dominio de unión a los microtúbulos (sin incluir el exón 10: R1, R3 y R4). La tau humana puede tener modificaciones postraduccionales o no. Por ejemplo, se conoce en la técnica que tau puede someterse a fosforilación, ubiquitinación, glicosilación y glicación. La tau humana también puede o no procesarse proteolíticamente *in vivo* en el extremo C, en el extremo N o en el extremo C y el extremo N. Por consiguiente, el término “tau humana” abarca las isoformas 2N3R, 2N4R, 1N3R, 1N4R, 0N3R y 0N4R, así como especies de estas que están truncadas en el extremo C *in vivo*, truncadas en el extremo N *in vivo*, que tienen modificaciones postraduccionales *in vivo* o cualquier combinación de estas. El corte y empalme alternativo del gen que codifica tau se produce similarmente en otros animales.

**76** El término “tau de MTBR”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína tau, o una pluralidad de proteínas tau, que comprende dos o más aminoácidos de la región de unión a los microtúbulos (MTBR) de tau (p. ej., aminoácidos 244-368 de tau-441, etc.).

**77** Una enfermedad asociada al depósito de tau en el cerebro se denomina en la presente descripción “tauopatía”. El término “depósito de tau” incluye todas las formas de depósitos de tau patológica que incluyen, pero no se limitan a, ovillos neurofibrilares, hilos de neurópilo y agregados de tau en neuritas distróficas. Las tauopatías conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, parálisis supranuclear progresiva (PSP, por sus siglas en inglés), demencia pugilística, encefalopatía traumática crónica, demencia frontotemporal y parkinsonismo relacionados con el cromosoma 17, enfermedad de Lytico-Bodig, complejo Parkinson-demencia de Guam, demencia con predominancia de ovillos, ganglioglioma y gangliocitoma, meningioangiomas, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalopatía por plomo, esclerosis tuberosa, enfermedad de Hallervorden-Spatz, lipofuscinosis, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal

(CBD, por sus siglas en inglés), enfermedad argirofílica granulosa (AGD, por sus siglas en inglés), degeneración lobular frontotemporal (FTLD, por sus siglas en inglés), enfermedad de Alzheimer (AD) y demencia frontotemporal (FTD).

**78** Las tauopatías se clasifican por el predominio de las isoformas de tau que se encuentran en los depósitos de tau patológica. Aquellas tauopatías con depósitos de tau compuestos predominantemente por tau con tres MTBR se denominan “tauopatías 3R”. La enfermedad de Pick es un ejemplo no taxativo de una tauopatía 3R. A modo de aclaración, los depósitos de tau patológica de algunas tauopatías 3R pueden ser una mezcla de isoformas de tau 3R y 4R con predominancia de isoformas 3R. Se cree que generalmente los ovillos neurofibrilares intracelulares (es decir, depósitos de tau) en cerebros de sujetos con enfermedad de Alzheimer contienen cantidades aproximadamente iguales de isoformas 3R y 4R. Aquellas tauopatías con depósitos de tau compuestos predominantemente por tau con cuatro MTBR se denominan “tauopatías 4R”. PSP, CBD y AGD son ejemplos no taxativos de tauopatías 4R, como lo son algunas formas de FTLD. Notablemente, los depósitos de tau patológica en cerebros de algunos sujetos con casos de FTLD confirmada genéticamente, tales como algunos portadores de mutaciones V334M y R406W, muestran una mezcla de isoformas 3R y 4R.

**79** Un signo clínico de una tauopatía puede ser agregados de tau en el cerebro, que incluyen, pero no se limitan a, ovillos neurofibrilares. En la técnica se conocen métodos para detectar y cuantificar agregados de tau en el cerebro (p. ej., PET de tau usando ligandos específicos de tau tales como [<sup>18</sup>F]THK5317, [<sup>18</sup>F]THK5351, [<sup>18</sup>F]AV1451, [<sup>11</sup>C]PBB3, [<sup>18</sup>F]MK-6240, [<sup>18</sup>F]RO-948, [<sup>18</sup>F]PI-2620, [<sup>18</sup>F]GTP1, [<sup>18</sup>F]PM-PBB3, y [<sup>18</sup>F]JNJ64349311, [<sup>18</sup>F]JNJ-067), etc.).

**80** Los términos “tratar”, “para tratar” o “tratamiento” como se usan en la presente descripción, se refieren a la prestación de cuidado médico de un profesional capacitado y autorizado a un sujeto que lo necesita. El cuidado médico puede ser una prueba diagnóstica, un tratamiento terapéutico y/o una medida profiláctica o preventiva. El objetivo de los tratamientos terapéuticos y profilácticos es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico o enfermedad/trastorno no

deseados. Resultados clínicos beneficiosos o deseados de tratamientos terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estabilización (es decir, ausencia de empeoramiento) de la enfermedad, un retraso o una ralentización de la progresión de la enfermedad, mejoría o atenuación de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia prevista si no se recibe tratamiento. Quienes necesitan tratamiento incluye aquellos que ya presentan la enfermedad, afección o trastorno, así como aquellos propensos a presentar la enfermedad, afección o trastorno o aquellos en los que se prevendrá la enfermedad, afección o trastorno. Por consiguiente, un sujeto que necesita tratamiento puede presentar síntomas o signos clínicos de la enfermedad o no.

**81** La expresión “terapia para tau” se refiere colectivamente a cualquier agente de formación de imágenes, tratamiento terapéutico y/o medida profiláctica o preventiva prevista para, o usada con, sujetos con riesgo de presentar una tauopatía, o sujetos con diagnóstico clínico de una tauopatía. Ejemplos no taxativos de agentes de formación de imágenes incluyen agentes de formación de imágenes funcionales (p. ej., fluorodesoxiglucosa, etc.) y agentes de formación de imágenes moleculares (p. ej., compuesto B de Pittsburgh, florbetaben, florbetapir, flutemetamol, ligandos específicos de tau radiomarcados, anticuerpos marcados con radionúclidos, etc.). Ejemplos no taxativos de agentes terapéuticos incluyen inhibidores de colinesterasa, antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA, por sus siglas en inglés), antidepresivos (p. ej., inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antidepresivos atípicos, aminocetonas, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y norepinefrina, antidepresivos tricíclicos, etc.), inhibidores de la gamma-secretasa, inhibidores de la beta-secretasa, anticuerpos anti-A $\beta$  (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos), anticuerpos anti-tau (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos), células madre, suplementos alimenticios (p. ej., agua de litio, ácidos grasos omega-3 con ácido lipoico, triglicéridos de cadena larga, genistina, resveratrol, curcumina y extracto de

semilla de uva, etc.), antagonistas del receptor de serotonina 6, inhibidores de MAPK p38alfa, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante, inmunoterapias pasivas, vacunas activas (p. ej., CAD106, AF20513, etc.), inhibidores de la agregación de proteína tau (p. ej., TRx0237, cloruro de metiltioninio, etc.), terapias para mejorar el control de la glucemia (p. ej., insulina, exenatida, liraglutida pioglitazona, etc.), agentes antiinflamatorios, inhibidores de la fosfodiesterasa 9A, agonistas del receptor sigma-1, inhibidores de quinasas, activadores de la fosfatasa, inhibidores de la fosfatasa, antagonistas de los receptores de la angiotensina, agonistas parciales de los receptores CB1 y/o CB2 de endocannabinoides, agonistas de los receptores adrenérgicos  $\beta$ -2, agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina, inhibidores de glutaminil-péptido ciclotransferasas, inhibidores selectivos de la producción de APP, inhibidores de monoaminoxidasa B, antagonistas de los receptores de glutamato, agonistas de los receptores AMPA, estimulantes del factor de crecimiento nervioso, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, agentes neurotróficos, agonistas de los receptores muscarínicos M1, moduladores de los receptores de GABA, agonistas de PPAR-gamma, moduladores de proteínas asociadas a los microtúbulos, antagonistas del calcio, agentes antihipertensivos, estatinas y cualquier combinación de estos.

**82** La expresión “terapias de A $\beta$ ” se refiere colectivamente a cualquier agente de formación de imágenes o agente terapéutico previsto para, o usado con, sujetos en riesgo de presentar amiloidosis A $\beta$  o AD, sujetos a los que se les diagnosticó amiloidosis A $\beta$ , o sujetos a los que se les diagnosticó AD.

**83** “Se desvían significativamente de la media” se refiere a valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar, con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media.

## **II. Medición de la fosforilación de tau y A $\beta$ en una muestra biológica**

**84** Los métodos de la presente descripción comprenden proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto, aislar tau y/o A $\beta$ , y

medir la fosforilación de tau en uno o más residuos de aminoácidos, A $\beta$ 40 A $\beta$ 42 y opcionalmente una o más proteínas.

**85** Muestras biológicas adecuadas incluyen una muestra de sangre o una muestra de líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenidas de un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. Un sujeto humano puede estar a la espera de cuidado médico o tratamiento, puede estar recibiendo cuidado médico o tratamiento o puede haber recibido cuidado médico o tratamiento. En diversas modalidades, un sujeto humano puede ser un sujeto sano, un sujeto con riesgo de presentar una enfermedad neurodegenerativa, un sujeto con signos y/o síntomas de una enfermedad neurodegenerativa o un sujeto al que se le diagnosticó una enfermedad neurodegenerativa. En otras modalidades, la enfermedad neurodegenerativa puede ser una tauopatía. En ejemplos específicos, la tauopatía puede ser enfermedad de Alzheimer (AD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (CBD) o degeneración lobular frontotemporal (FTLD). En otras modalidades, el sujeto es un animal de laboratorio. En una modalidad adicional, el sujeto es un animal de laboratorio modificado genéticamente para expresar tau humana y opcionalmente una o más proteínas humanas adicionales (p. ej., A $\beta$  humana, ApoE humana, etc.).

**86** El CSF pudo haber sido obtenido mediante punción lumbar con o sin un catéter permanente de CSF. Pueden agruparse múltiples muestras de sangre o CSF recolectadas simultáneamente del sujeto. La sangre pudo haber sido recolectada por venopunción con o sin un catéter intravenoso o por punción digital (o el equivalente de esta). Una vez recolectadas, las muestras de sangre o CSF pudieron haber sido procesadas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (p. ej., centrifugación para eliminar células completas y residuos celulares; uso de aditivos diseñados para estabilizar y preservar la muestra antes de la prueba analítica; etc.). Las muestras de sangre o CSF pueden usarse inmediatamente o pueden congelarse y almacenarse indefinidamente. Antes de su uso en los métodos descritos en la presente descripción, la muestra biológica también pudo haber sido modificada, si hubiera sido necesario o deseado, para incluir inhibidores de proteasas, patrones internos marcados con isótopos,

detergentes y agentes caótopos y/o para reducir otros analitos (p. ej., péptidos de proteínas, metabolitos).

**87** El tamaño de la muestra usado puede variar dependiendo del tipo de muestra, la salud del sujeto del que se obtuvo la muestra y los analitos que se analizarán (además de tau). Los volúmenes de las muestras de CSF pueden ser de aproximadamente 0.01 ml a aproximadamente 5 ml, o de aproximadamente 0.05 ml a aproximadamente 5 ml. En un ejemplo específico, el tamaño de la muestra puede ser de aproximadamente 0.05 ml a aproximadamente 1 ml de CSF. Los volúmenes de las muestras de plasma pueden ser de aproximadamente 0.01 ml a aproximadamente 20 ml.

**88** Puede usarse el marcado con isótopos como un estándar interno para justificar la variabilidad durante todo el procesamiento de muestras y opcionalmente para calcular una concentración absoluta. Generalmente, se añade un estándar interno marcado con isótopos antes del procesamiento significativo de muestras y puede añadirse más de una vez si es necesario.

**89** En la presente descripción se describen múltiples estándares internos marcados con isótopos. Todos tienen un marcador con isótopos pesados incorporado en al menos un residuo de aminoácido. Puede usarse una o más isoformas de tau y/o A $\beta$  de longitud completa. Alternativamente o adicionalmente, también pueden usarse isoformas con modificaciones postraduccionales y/o fragmentos peptídicos, como se conoce en la técnica. En términos generales, los residuos de aminoácidos marcados que se incorporan deberían aumentar la masa del péptido sin afectar sus propiedades químicas y el cambio en la masa al que da lugar la presencia de los marcadores con isótopos debe ser suficiente para permitir que el método de espectrometría de masa distinga el patrón interno (IS, por sus siglas en inglés) de las señales del analito endógeno. Como se muestra en la presente descripción, marcadores con isótopos pesados adecuados incluyen, pero no se limitan a  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . Típicamente, usualmente es suficiente aproximadamente 1-10 ng de patrón interno.

**90** Una muestra de tau aislada, como se usa en la presente descripción, se refiere a una composición que comprende tau, en donde tau se ha

purificado a partir de sangre o líquido cefalorraquídeo (CSF) obtenido de un sujeto. En las muestras de tau aisladas de la presente descripción, tau se ha purificado parcial o completamente a partir de sangre o CSF. Los métodos para purificar tau a partir de sangre o CSF son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, precipitación selectiva, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, y purificación por afinidad. Los métodos adecuados concentran tanto el tau fosforilado como el tau no fosforilado de la sangre o el CSF.

**91** Por lo tanto, los métodos de la actual descripción pueden comprender una etapa en donde se reducen una o más proteínas de una muestra. El término “reducir” significa disminuir en cantidad o número. Por consiguiente, una muestra reducida de una proteína puede tener cualquier cantidad de la proteína que pueda medirse como menor que la cantidad en la muestra original, lo que incluye que no haya cantidad alguna de la proteína.

**92** Pueden reducirse proteínas de una muestra mediante un método que se dirige específicamente a una o más proteínas, por ejemplo, mediante reducción de la afinidad, extracción en fase sólida u otro método conocido en la técnica. La reducción dirigida de una proteína, o de múltiples proteínas, puede usarse en situaciones en las que se desea el análisis posterior de esa proteína (p. ej., identificación, cuantificación, análisis de modificaciones postraduccionales, etc.). Por ejemplo, pueden identificarse y cuantificarse péptidos A $\beta$  mediante métodos conocidos en la técnica después de la reducción de la afinidad de A $\beta$  con un agente de unión al epítipo adecuado. En otro ejemplo no taxativo, puede determinarse el estado de la apolipoproteína E (ApoE) mediante métodos conocidos en la técnica después de la reducción de la afinidad de ApoE y de la identificación de la isoforma de ApoE. También puede usarse reducción dirigida para aislar otras proteínas para análisis posteriores que incluyen, pero no se limitan a, apolipoproteína J, sinucleína, proteína precursora del amiloide soluble, macroglobulina alfa-2, S100B, proteína básica de mielina, una interleucina, TNF, TREM-2, TDP-43, YKL-40, VILIP-1, NFL, proteína priónica, pNFH y DJ-1.

**93**

En algunas modalidades, puede existir reducción dirigida mediante reducción de la afinidad. La reducción de la afinidad se refiere a métodos que reducen una proteína de interés de una muestra en función de sus propiedades de unión a una molécula específicas. Típicamente, la molécula es un ligando unido a un soporte sólido, tal como una microesfera, resina, placa de cultivo de tejidos, etc. (denominado ligando inmovilizado). La inmovilización de un ligando en un soporte sólido también puede existir después de que se produce la interacción ligando-proteína. Ligandos adecuados incluyen anticuerpos, aptámeros y otros agentes de unión al epítipo. La molécula también puede ser un polímero u otro material que absorba selectivamente una proteína de interés. Como ejemplo no taxativo, puede usarse polihidroximetileno sustituido por alcohol graso oxetilizado (p. ej., PHM-L LIPOSORB, Sigma Aldrich) para absorber selectivamente lipoproteínas (incluso ApoE) de suero. Pueden combinarse dos o más agentes de reducción de la afinidad para reducir múltiples proteínas simultáneamente o en secuencia.

**94**

Alternativamente, pueden reducirse proteínas de una muestra mediante un método más general, por ejemplo, mediante ultrafiltración o precipitación de proteínas con un ácido, un disolvente orgánico o una sal. En términos generales, estos métodos se usan para reducir de manera fiable proteínas de alta abundancia y alto peso molecular, que a su vez enriquece proteínas y péptidos de bajo peso molecular y/o baja abundancia (p. ej., tau, A $\beta$ , etc.).

**95**

En algunas modalidades, pueden reducirse proteínas de una muestra mediante precipitación. A modo de resumen, la precipitación comprende añadir un agente de precipitación a una muestra y mezclar completamente, incubar la muestra con agente de precipitación para precipitar proteínas y separar las proteínas precipitadas mediante centrifugación o filtración. Después, el sobrenadante resultante puede usarse en aplicaciones posteriores. La cantidad del reactivo necesaria puede determinarse experimentalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Agentes de precipitación adecuados incluyen ácido perclórico, ácido tricloroacético, acetonitrilo, metanol y lo similar. En una

modalidad ilustrativa, se reducen proteínas de una muestra mediante precipitación ácida. En una modalidad adicional, se reducen proteínas de una muestra mediante precipitación ácida usando ácido perclórico.

**96** Pueden combinarse dos o más métodos de uno de los abordajes anteriores o de ambos para reducir múltiples proteínas simultáneamente o en secuencia. Por ejemplo, pueden reducirse selectivamente (reducción dirigida) una o más proteínas seguido de reducción de proteínas de alta abundancia / alto peso molecular. Alternativamente, pueden reducirse proteínas de alta abundancia / alto peso molecular en primer lugar, seguido de reducción dirigida de una o más proteínas. En aun otra alternativa, pueden reducirse proteínas de alta abundancia / alto peso molecular en primer lugar, seguido de una primera tanda de reducción dirigida de una o más proteínas y después una segunda tanda de reducción dirigida de una o más proteínas diferentes que las seleccionadas en la primera tanda. Otras iteraciones resultarán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

**97** En una modalidad ilustrativa, las muestras de tau aisladas de la presente descripción comprenden tau que se purificó a partir de sangre o CSF mediante purificación por afinidad. La purificación por afinidad se refiere a métodos que purifican una proteína de interés en función de sus propiedades de unión específicas a un ligando inmovilizado. Típicamente, un ligando inmovilizado es un ligando unido a un soporte sólido, tal como una microesfera, resina, placa de cultivo de tejidos, etc. Los ligandos adecuados se unen específicamente tanto a tau fosforilado como no fosforilado. En un ejemplo, un ligando adecuado puede unirse a un epítipo dentro del dominio medio de tau. En otro ejemplo, un ligando adecuado puede unirse a un epítipo dentro del extremo N de tau, preferentemente, dentro de los aminoácidos 1 a 35 de tau. En otro ejemplo, un ligando adecuado puede unirse a un epítipo dentro de la MTBR de tau. En otro ejemplo, un ligando adecuado puede unirse a un epítipo dentro del extremo C de tau. En aun otras modalidades, tau puede purificarse por afinidad a partir de sangre o CSF usando dos o más ligandos inmovilizados. En un ejemplo, un ligando inmovilizado se une a un epítipo dentro del extremo N de tau y otro

ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del dominio medio de tau. En otro ejemplo, un ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro de la MTBR de tau y otro ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del dominio medio de tau. En otro ejemplo, un ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del extremo C de tau y otro ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del dominio medio de tau. En otro ejemplo, un ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del extremo C de tau y otro ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del extremo N de tau. En otro ejemplo, un ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro de la MTBR de tau y otro ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del extremo N de tau. En otro ejemplo, un ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro de la MTBR de tau y otro ligando inmovilizado se une a un epítopo dentro del extremo C de tau. En cada una de las modalidades anteriores, el ligando puede ser un anticuerpo o un aptámero.

**98** En cada una de las modalidades anteriores, el agente de unión al epítopo puede comprender un anticuerpo o un aptámero. En algunas modalidades, el agente de unión al epítopo que se une específicamente a amiloide beta es HJ5.1, o es un agente de unión al epítopo que se une al mismo epítopo que HJ5.1 y/o inhibe competitivamente HJ5.1. En algunas modalidades, el agente de unión al epítopo que se une específicamente a que se une específicamente a un epítopo dentro de los aminoácidos 1 a 103 de tau-441, inclusive, es HJ8.5 o es un agente de unión al epítopo que se une al mismo epítopo que HJ8.5 y/o inhibe competitivamente HJ8.5. En algunas modalidades, el agente de unión al epítopo que se une específicamente a que se une específicamente a un epítopo dentro de los aminoácidos 104 a 221 de tau-441, inclusive, es Tau1 o es un agente de unión al epítopo que se une al mismo epítopo que Tau1 y/o inhibe competitivamente Tau1. En la técnica se conocen métodos para identificar epítopos a los que se une específicamente un anticuerpo y ensayos para evaluar la inhibición competitiva entre dos anticuerpos.

**99** La fosforilación de aminoácidos específicos (es decir, “sitios”) en tau da como resultado isoformas de tau fosforiladas (p-tau). Los métodos de la presente descripción proporcionan medios para medir la estequiometría de la

fosforilación en uno o más aminoácidos específicos de tau. En algunas modalidades, métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en uno o más residuos seleccionados entre T111, S113, T181, S199, S202, S208, T153, T175, T205, S214, T217 y T231. En algunas modalidades, los métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en uno o más residuos seleccionados de T111, T181, T153, y T217. En otras modalidades, los métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en uno o más residuos seleccionados de T181, y T217. En otras modalidades, los métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en uno o más residuos que incluyen T217. En otras modalidades, los métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en uno o más residuos que incluyen T181. En otras modalidades, los métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en dos o más residuos que incluyen T181 y T217. En otras modalidades, los métodos de la presente descripción comprenden medir la fosforilación de tau en tres o más residuos que incluyen T181 y T217.

**100** Los solicitantes desarrollaron un método de espectrometría de masas (MS) altamente sensible y específico usando un monitoreo de reacción paralelo (PRM, por sus siglas en inglés) para descubrir los sitios de fosforilación de tau y cuantificar inicialmente la abundancia de sitios de fosforilación en proteínas tau aisladas. Sin embargo, la presente descripción no se limita a ningún método en particular para evaluar cuantitativamente la fosforilación de tau específica de un sitio. Los métodos adecuados deben discriminar las isoformas de tau que difieren solo en el estado de fosforilación de un único aminoácido, discriminar las isoformas de p-tau fosforiladas en diferentes aminoácidos y cuantificar cambios en la fosforilación que se producen en sitios específicos independientemente del cambio global en la tau total. En los ejemplos se detallan tres enfoques para cuantificar los cambios en la estequiometría de fosforilación que ocurren en sitios específicos independientemente del cambio global en el tau total; 1) comparación relativa entre isómeros de péptidos fosforilados, que puede usarse para calcular la abundancia relativa de cada péptido fosforilado que

comparte la misma secuencia; 2) normalización de péptidos fosforilados con cualquier péptido de la proteína tau como referencia; y 3) cuantificación absoluta usando patrones internos sintéticos marcados para cada péptido fosforilado y no fosforilado, donde los valores de cuantificación absolutos para cada péptido fosforilado se normalizan con cualquier valor de cuantificación absoluto obtenido para cualquier péptido de la proteína tau. Para los tres abordajes se usa normalización interna para comparar los cambios relativos en la fosforilación para cada sitio. También pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica.

**101** En una modalidad ilustrativa, la fosforilación de tau específica de un sitio se mide mediante espectrometría de masa de alta resolución. En la técnica se conocen tipos adecuados de espectrómetros de masa. Estos incluyen, pero no se limitan a, espectrómetros de masa de cuadrupolo, tiempo de vuelo, trampa iónica y Orbitrap, así como híbridos que combinan diferentes tipos de analizadores de masas en una arquitectura (p. ej., espectrómetro de masa Orbitrap Fusion™ Tribrid™ de ThermoFisher Scientific). El procesamiento adicional de una muestra de tau aislada puede ocurrir antes del análisis de MS. Por ejemplo, tau puede digerirse proteolíticamente. Las proteasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tripsina, Lys-N, Lys-C y Arg-N. Cuando se usa purificación por afinidad para producir una muestra de tau aislada, la digestión puede realizarse después de la elución de tau del ligando inmovilizado o mientras la tau está unida. Después de una o más etapas de depuración, pueden separarse péptidos de tau digeridos mediante un sistema de cromatografía líquida interconectado con un espectrómetro de masa de alta resolución. El sistema de cromatografía puede optimizarse mediante experimentación habitual para producir un patrón de LC-MS deseado. Puede usarse una amplia variedad de técnicas de LC-MS para el análisis cuantitativo de la fosforilación de tau específica de un sitio. Ejemplos no taxativos incluyen monitorización de reacciones seleccionadas, monitorización de reacciones en paralelo, detección de iones seleccionados y captación independiente de datos. Como se mencionó anteriormente, todas las evaluaciones cuantitativas de la fosforilación de tau específica de un sitio deben

justificar los cambios globales en la tau total. En una modalidad ilustrativa, se usa un protocolo de espectrometría de masa descrito en los Ejemplos.

**102** "Tau total", como se usa en la presente descripción, se refiere a todas las isoformas de tau en una muestra determinada. La tau puede encontrarse en compartimentos solubles e insolubles, en formas monoméricas y agregadas, en estructuras ordenadas o desordenadas, intracelular y extracelularmente, y pueden formar complejos con otras proteínas o moléculas. Por consiguiente, la fuente de la muestra biológica (p. ej., tejido cerebral, CSF, sangre, etc.) y cualquier procesamiento posterior de la muestra biológica afectará la totalidad de las isoformas de tau en una muestra determinada.

**103** La tau total puede medirse al monitorear la abundancia de péptidos de tau no modificados. Para cada sitio de tau fosforilado, un péptido tau que comparte la secuencia de aminoácidos común con el péptido de interés fosforilado puede usarse preferentemente para medir el nivel de tau total, pero puede usarse cualquier péptido de la secuencia tau. La medición de péptidos tau puede realizarse por espectrometría de masas y la precisión de la medición puede mejorarse usando estándares internos marcados como referencia. Alternativamente, la tau total puede medirse mediante inmunoanálisis u otro método que cuantifique la concentración de tau.

### **III. Usos de mediciones de ptau y A $\beta$**

**104** La presente descripción abarca, además, el uso de mediciones de especies de ptau y A $\beta$  (p. ej., pT217/T217, pT181/T181, y A $\beta$  42/40) en sangre o CSF como biomarcadores de características patológicas y/o síntomas clínicos de tauopatías para diagnosticar, determinar la etapa, elegir tratamientos apropiados para una etapa de enfermedad dada, y modificar un régimen de tratamiento dado (p. ej., cambiar una dosis, cambiar a una modalidad de fármaco o tratamiento diferente, etc.). El rasgo patológico puede ser un aspecto de la patología de tau (p. ej., la cantidad de depósito de tau, la presencia/ausencia de una modificación postraducciona, la cantidad de una modificación postraducciona, etc.). Alternativamente, o además de la deposición de tau, una

característica patológica puede ser independiente de tau. Por ejemplo, la deposición amiloide beta ( $A\beta$ ) en el cerebro o en las arterias del cerebro cuando la tauopatía es la enfermedad de Alzheimer. El síntoma clínico puede ser demencia, según se mide por un instrumento clínicamente validado (p. ej., MMSE, CDR-SB, etc.), o cualquier otro síntoma clínico asociado con la tauopatía. También se contempla el uso de mediciones de especies de ptau y  $A\beta$  en sangre o CSF como biomarcadores de otras características patológicas y síntomas clínicos conocidos en la técnica para tauopatías 3R y 4R. Favorablemente, las especies de ptau y  $A\beta$  que incluyen, pero no se limitan a, pT217/T217, pT181/T181, y  $A\beta$  42/40, no solo discriminan un estado patológico de un estado sano, sino también discriminan entre las diversas tauopatías.

**105** Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método para medir la patología relacionada con tauopatía en un sujeto, el método comprende cuantificar uno o más especies de ptau y  $A\beta$  en una muestra biológica obtenida de un sujeto, tal como una muestra de sangre o una muestra de CSF, en donde la(s) cantidad(es) del especies de ptau y  $A\beta$  cuantificadas es/son una representación de la patología relacionada con tauopatía en el cerebro del sujeto. La tauopatía puede ser una tauopatía 3R, una tauopatía mixta 3R/4R o una tauopatía 4R. La patología relacionada con la enfermedad puede ser la deposición de tau, la modificación postraducciona de tau, las placas amiloides en el cerebro y/o las arterias del cerebro u otra característica patológica conocida en la técnica. El sujeto puede o no tener síntomas clínicos de la tauopatía. En modalidades preferidas, al menos una especie de ptau cuantificada es pT217. En modalidades adicionales, dos o más especies de ptau cuantificadas son pT217 y pT181. En aun otras modalidades, las especies  $A\beta$  cuantificadas son especies  $A\beta$  40 y  $A\beta$  42. En aun otras modalidades, se cuantifican pT217/T217 y  $A\beta$  42/40 y opcionalmente pT181/T181. En aun otras modalidades, se cuantifica un valor compuesto de pT217/T217 x  $A\beta$  42/40.

**106** En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar a un sujeto que tiene un síntoma de una tauopatía, el método comprende cuantificar una o más especies de ptau y  $A\beta$  en una muestra

biológica obtenida de un sujeto, tal como una muestra de sangre o una muestra de CSF, y diagnosticar una tauopatía cuando las especies de ptau y A $\beta$  cuantificadas se desvían de una población de control que no tiene signos o síntomas clínicos de una tauopatía y es negativo para amiloide según se midió por la formación de imágenes de PET y/o medición de A $\beta$ 42/40 en CSF o se desvían o son similares a la misma ptau o especies Ab cuantificadas de una población diagnosticada con una tauopatía 3R, una tauopatía mixta 3R/4R, o una tauopatía 4R. En modalidades preferidas, al menos una especie de ptau cuantificada es pT217. En modalidades adicionales, dos o más especies de ptau cuantificadas son pT217 y pT181. En aun otras modalidades, las especies A $\beta$  cuantificadas son especies A $\beta$  40 y A $\beta$  42. En aun otras modalidades, se cuantifican pT217/T217 y A $\beta$  42/40 y opcionalmente pT181/T181. En aun otras modalidades, se cuantifica un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40.

**107** En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para medir la estabilidad de la enfermedad de tauopatía en un sujeto, el método comprende cuantificar una o más especies de ptau y A $\beta$  en una primera muestra biológica obtenida de un sujeto y después en una segunda muestra biológica obtenida del mismo sujeto en un momento posterior (p. ej., semanas, meses o años más tarde), y al calcular la diferencia entre especies de ptau y A $\beta$  cuantificadas entre las muestras, en donde un aumento estadísticamente significativo en las especies de ptau cuantificadas en la segunda muestra indica progresión de la enfermedad, una disminución estadísticamente significativa en las especies de ptau cuantificadas en la segunda muestra indica una mejora de la enfermedad, y ningún cambio indica una enfermedad estable. La tauopatía puede ser una tauopatía 3R, una tauopatía mixta 3R/4R o una tauopatía 4R. El sujeto puede o no tener síntomas clínicos de enfermedad, y puede o no estar recibiendo un terapia para tau. En algunos ejemplos, se administra una terapia para tau una o más veces al sujeto en el período de tiempo entre la recolección de la primera y segunda muestra biológica, y la medida de la estabilidad de la enfermedad es una indicación de la efectividad, o la falta de esta, de la terapia para tau. En modalidades preferidas, al menos una especie de ptau cuantificada es pT217. En

modalidades adicionales, dos o más especies de ptau cuantificadas son pT217 y pT181. En aun otras modalidades, las especies  $A\beta$  cuantificadas son especies  $A\beta$  40 y  $A\beta$  42. En aun otras modalidades, se cuantifican pT217/T217 y  $A\beta$  42/40 y opcionalmente pT181/T181. En aun otras modalidades, se cuantifica un valor compuesto de pT217/T217 x  $A\beta$  42/40.

**108** En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto con una tauopatía, el método comprende cuantificar uno o más especies de ptau y  $A\beta$  en una muestra biológica obtenida de un sujeto, tal como una muestra de sangre o una muestra de CSF; y proporcionar una terapia para tau al sujeto para mejorar una medición de la patología relacionada con la enfermedad o un síntoma clínico, en donde el sujeto tiene una especie ptau cuantificada al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar, con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir, difiere en  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$ , o  $1,5\sigma$ , respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control no tiene signos clínicos o síntomas de una tauopatía y que es el negativo a amiloide, según se midió por la formación de imágenes de PET y/o medición  $A\beta$ 42/40 en el CSF. Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media como criterio para tratar a un sujeto. La tauopatía puede ser una tauopatía 3R, una tauopatía mixta 3R/4R o una tauopatía 4R. La medición de la patología relacionada con la enfermedad puede ser la deposición de tau según se mide por formación de imágenes de PET, la modificación postraducciona de tau, según se mide por espectrometría de masas u otro método adecuado, placas amiloides en el cerebro o las arterias del cerebro, según se mide por formación de imágenes de PET, placas amiloides según se mide por  $A\beta$ 42/40 en el CSF u otras características patológicas conocidas en la técnica. El síntoma clínico puede ser demencia, según se mide por un instrumento clínicamente validado (p. ej., MMSE, CDR-SB, etc.) u otros síntomas clínicos conocidos en la técnica para tauopatías 3R y 4R. En

modalidades preferidas, al menos una especie de ptau cuantificada es pT217. En modalidades adicionales, dos o más especies de ptau cuantificadas son pT217 y pT181. En aun otras modalidades, las especies A $\beta$  cuantificadas son especies A $\beta$  40 y A $\beta$  42. En aun otras modalidades, se cuantifican pT217/T217 y A $\beta$  42/40 y opcionalmente pT181/T181. En aun otras modalidades, se cuantifica un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40. Muchas terapias de tau se dirigen a un cambio patofisiológico específico. Por ejemplo, las terapias dirigidas a A $\beta$  generalmente están diseñadas para disminuir la producción de A $\beta$ , antagonizar la agregación de A $\beta$  o aumentar la eliminación de A $\beta$  del cerebro; Las terapias dirigidas a tau se diseñan, generalmente, para alterar los patrones de fosforilación de tau, antagonizar la agregación de tau (antagonismo general de tau o antagonismo de una isoforma de tau específica), o aumentar la depuración de NFT; una variedad de terapias están diseñadas para reducir la inflamación del SNC o la resistencia a la insulina en el cerebro; etc. Sin embargo, no todas las tauopatías comparten los mismos cambios patofisiológicos. Por lo tanto, la eficacia de estas diversas terapias de tau puede mejorarse administrándolas a sujetos que se identifican correctamente como que tienen una tauopatía 3R, una tauopatía mixta 3R/4R o una tauopatía 4R.

**109** Muestras biológicas adecuadas y métodos para medir la fosforilación de especies de tau y A $\beta$  se describen en las **Sección II**, cuyas descripciones se incorporan en esta sección por referencia.

**110** En una modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217, y el valor de A $\beta$  42/40; en donde el valor de pT217/T217, y valor de A $\beta$  42/40 discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de la enfermedad de Alzheimer y un estado sano.

**111** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método

comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y el valor de A $\beta$  42/40; en donde un aumento en el valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 normal discrimina una tauopatía *MAPT* R406W desde un estado sano. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la media en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que tienen al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir, 1  $\sigma$ , 1,3  $\sigma$ , 1,5  $\sigma$  o 1,5  $\sigma$ , respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía. En modalidades alternativas, un sujeto puede no presentar una mutación génica conocida por causar una tauopatía.

**112** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y el valor de A $\beta$  42/40; en donde una disminución en el valor de pT217/T217 y un aumento del valor de A $\beta$  42/40 discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de AD. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la media en una población de control sin placas amiloides en

el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir,  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$  o  $1,5\sigma$  respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población con AD con placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía. En modalidades alternativas, un sujeto puede no presentar una mutación génica conocida por causar una tauopatía.

**113** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; en donde el valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de enfermedad de Alzheimer, tauopatía 4R y un estado sano.

**114** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; en donde un valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 aumentado discrimina una tauopatía *MAPT* R406W desde un estado sano. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la

media en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir,  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$  o  $1,5\sigma$  respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía.

**115** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; en donde un valor de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 aumentado discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de AD. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la media en una población de AD con placas amiloides cerebrales según se midió por formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir,  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$  o  $1,5\sigma$  respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población con AD con placas amiloides en el cerebro según se midió por la

formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía.

**116** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una tauopatía *MAPT* R406W, el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; en donde un valor de pT217/T217 x A $\beta$ 42/40 aumentado discrimina una tauopatía *MAPT* R406W de una tauopatía 4R. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la media en una población de tauopatía 4R sin placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir, 1  $\sigma$ , 1,3  $\sigma$ , 1,5  $\sigma$  o 1,5  $\sigma$  respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de tauopatía 4R sin placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía.

**117** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una demencia frontotemporal esporádica

(FTD), el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT181/T181, en donde el valor de pT181/T181 discrimina una FTD esporádica de la enfermedad de Alzheimer, otras tauopatías y un estado sano.

**118** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una demencia frontotemporal esporádica (FTD), el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT181/T181, en donde un valor de pT181/T181 disminuido discrimina una FTD esporádica de la enfermedad de Alzheimer. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la media en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir,  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$  o  $1,5\sigma$  respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población con AD con placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía. En modalidades alternativas, un sujeto puede no presentar una mutación génica conocida por causar una tauopatía.

**119**

En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una demencia frontotemporal esporádica (FTD), el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT181/T181, en donde un valor de pT181/T181 disminuido discrimina una FTD esporádica de un estado sano. En un aspecto, el (los) cambio(s) calculado(s) se desvía(n) significativamente de la media en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que tienen al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir,  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$  o  $1,5\sigma$ , respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se mide por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía. En modalidades alternativas, un sujeto puede no presentar una mutación génica conocida por causar una tauopatía.

**120**

En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para discriminar una demencia frontotemporal esporádica (FTD), el método comprende proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT181/T181, en donde un valor de pT181/T181 disminuido discrimina una FTD esporádica de un estado sano. En un aspecto, el o los

cambio(s) calculado(s) se desvían significativamente de la media en una población de tauopatía FTD no esporádica sin placas amiloides en el cerebro, según se midió por la formación de imágenes de PET. “Se desvían significativamente de la media” incluye valores que se encuentran al menos 1 desviación estándar, preferentemente al menos 1,3 desviaciones estándar o con mayor preferencia al menos 1,5 desviaciones estándar o aun con mayor preferencia al menos 2 desviaciones estándar, mayor o menor que la media (es decir,  $1\sigma$ ,  $1,3\sigma$ ,  $1,5\sigma$  o  $2\sigma$  respectivamente, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de tauopatía FTD no esporádica sin placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET). Además de usar un umbral (p. ej., al menos 1 desviación estándar mayor o menor que la media), en algunas modalidades puede usarse el grado de cambio mayor o menor que la media para diagnosticar a un sujeto. Puede obtenerse una muestra de un sujeto que puede o no tener un diagnóstico clínico. En modalidades adicionales, un sujeto puede presentar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía. En modalidades alternativas, un sujeto puede o no portar una mutación génica conocida para causar una tauopatía.

**121** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para medir la progresión de la enfermedad de tauopatía *MAPT* R406W en un sujeto, el método comprende proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217, y el valor de A $\beta$  42/40; proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra (p. ej., días, semanas, meses), en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217, y el valor de A $\beta$  42/40; y calcular la diferencia entre el valor cuantificado de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde una diferencia estadísticamente significativa en el valor de pT217/T217

cuantificado, y el valor de A $\beta$  42/40 en la segunda muestra indica la progresión de la enfermedad del sujeto.

**122** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para medir la progresión de la enfermedad de tauopatía *MAPT* R406W en un sujeto, el método comprende proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217, y el valor de A $\beta$  42/40; proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra (p. ej., días, semanas, meses), en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217, y el valor de A $\beta$  42/40; y calcular la diferencia entre el valor cuantificado de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde ninguna diferencia estadísticamente significativa en el valor de pT217/T217 cuantificado, y el valor de A $\beta$  42/40 en la segunda muestra indica la estabilidad de la enfermedad del sujeto.

**123** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para medir la progresión de la enfermedad de tauopatía *MAPT* R406W en un sujeto, el método comprende proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra (p. ej., días, semanas, meses), en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y calcular la diferencia entre el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 cuantificado en la segunda muestra y la primera muestra, en donde una diferencia estadísticamente significativa en el valor compuesto de

pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en la segunda muestra indica la progresión de la enfermedad del sujeto.

**124** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para medir la progresión de la enfermedad de tauopatía *MAPT* R406W en un sujeto, el método comprende proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra (p. ej., días, semanas, meses), en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau y A $\beta$ ; y cuantificación, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y calcular la diferencia entre el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 cuantificado en la segunda muestra y la primera muestra, en donde ninguna diferencia estadísticamente significativa en el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 cuantificado en la segunda muestra indica la estabilidad de la enfermedad del sujeto.

**125** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para medir la progresión de la enfermedad de demencia frontotemporal esporádica (FTD) en un sujeto, el método comprende proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra (p. ej., días, semanas, meses), en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y calcular la diferencia entre el valor cuantificado de pT181/T181 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde una diferencia estadísticamente significativa en el valor compuesto de pT181/T181 cuantificado en la segunda muestra indica progresión de la enfermedad del sujeto.

**126**

En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para medir la progresión de la enfermedad de demencia frontotemporal esporádica (FTD) en un sujeto, el método comprende proporcionar una primera muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la primera muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT181/T181; proporcionar una segunda muestra de sangre o CSF procesada obtenida del sujeto después de la primera muestra (p. ej., días, semanas, meses), en donde la segunda muestra de sangre o CSF se enriquece para las mismas especies de ptau; y cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y calcular la diferencia entre el valor cuantificado de pT181/T181 en la segunda muestra y la primera muestra, en donde no hay una diferencia estadísticamente significativa en el valor de pT181/T181 cuantificado en la segunda muestra indica la estabilidad de la enfermedad del sujeto.

**127**

Alternativamente o además de usar una medición de la fosforilación de tau específica de un sitio y especies de A $\beta$  y opcionalmente con una medición de la tau total, en cualquiera de las modalidades anteriores, puede usarse una relación calculada a partir de los niveles de fosforilación medidos o una relación calculada a partir de los niveles de fosforilación y tau total medidos. Ambos abordajes se detallan en los ejemplos. También pueden usarse operaciones matemáticas además de una relación. Por ejemplo, en los ejemplos se usan valores de fosforilación de tau específicos de un sitio en diversos modelos estadísticos (p. ej., regresiones lineales, curvas de LME, curvas de LOESS, etc.) junto con otros biomarcadores conocidos (p. ej., estado de *MAPT*, estado de la APOE  $\epsilon$ 4, edad, sexo, puntuaciones de pruebas cognitivas, puntuaciones de pruebas funcionales, etc.). La selección de mediciones y la elección de operaciones matemáticas puede optimizarse para maximizar la especificidad del método. Por ejemplo, la precisión del diagnóstico puede evaluarse mediante área bajo la curva ROC y en algunas modalidades, se establece un valor de AUC ROC de 0.7 o mayor como un umbral (p. ej., 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, etc.).

**128**

Las placas de amiloide en el cerebro en seres humanos se miden habitualmente mediante tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) de amiloide. Por ejemplo, la obtención de imágenes mediante PET con compuesto B de Pittsburgh (PiB, por sus siglas en inglés) con  $^{11}\text{C}$  de placas de  $\text{A}\beta$  cortical se usa comúnmente para detectar patología de placas de  $\text{A}\beta$ . La relación de valor de captación estandarizado (SUVR, por sus siglas en inglés) en PET con PiB cortical identifica de manera fiable placas de  $\text{A}\beta$  cortical significativas y se usa para clasificar sujetos como con PIB positivo ( $\text{SUVR} \geq 1.25$ ) o negativo ( $\text{SUVR} < 1.25$ ). Por consiguiente, en las modalidades anteriores, una población de control sin placas de amiloide en el cerebro según lo determinado mediante obtención de imágenes con PET puede referirse a una población de sujetos que tiene una SUVR en PET con PiB cortical  $< 1.25$ . También pueden usarse otros valores de unión con PiB (p. ej., media de potencial de unión cortical) o análisis de regiones de interés además de la región cortical para clasificar sujetos como con PIB positivo o negativo. También pueden usarse otros agentes de formación de imágenes mediante PET.

**129**

En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y  $\text{A}\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y valor de  $\text{A}\beta$  42/40; y (c) administrar un tratamiento al sujeto para alterar la patología de tau, en donde la muestra de sangre o CSF procesada del sujeto ha cuantificado el valor de pT217/T217 y valor de  $\text{A}\beta$  42/40, que difiere en aproximadamente  $1,5 \sigma$  o más, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control que no tiene signos o síntomas clínicos de una tauopatía y es negativo a amiloide según se midió por la formación de imágenes de PET, y en donde la cantidad del valor cuantificado de pT217/T217 es una representación de la patología de tau en un cerebro de un sujeto. En algunas modalidades, la administración de un tratamiento al sujeto para alterar la patología de tau altera o estabiliza la cantidad de las especie de ptau

cuantificadas. En algunas modalidades, el tratamiento es una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de colinesterasa, un antagonista de N-metil-D-aspartato (NMDA), un antidepresivo (p. ej., un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, un antidepresivo atípico, una aminocetona, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y norepinefrina, un antidepresivo tricíclico, etc.), un inhibidor de la gamma-secretasa, un inhibidor de la beta-secretasa, un anticuerpo anti-A $\beta$  (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de este), un anticuerpo anti-tau (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de este), un anticuerpo anti-TREM2 (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de este), un agonista de TREM2, células madre, suplementos alimenticios (p. ej., agua de litio, ácidos grasos omega-3 con ácido lipoico, triglicéridos de cadena larga, genistina, resveratrol, curcumina y extracto de semilla de uva, etc.), un antagonista del receptor de serotonina 6, un inhibidor de MAPK p38alfa, un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante, una inmunoterapia pasiva, una vacuna activa (p. ej., CAD106, AF20513, etc.), un inhibidor de la agregación de proteína tau (p. ej., TRx0237, cloruro de metiltioninio, etc.), una terapia para mejorar el control de la glucemia (p. ej., insulina, exenatida, liraglutida pioglitazona, etc.), un agente antiinflamatorio, un inhibidor de la fosfodiesterasa 9A, un agonista del receptor sigma-1, un inhibidor de quinasas, un activador de la fosfatasa, un inhibidor de la fosfatasa, un antagonista de los receptores de la angiotensina, un agonista parcial de los receptores CB1 y/o CB2 de endocannabinoides, un agonista de los receptores adrenérgicos  $\beta$ -2, un agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina, un agonista inverso de 5-HT<sub>2A</sub>, un antagonista de los receptores adrenérgicos de alfa-2c, un agonista de los receptores 1A y 1D de 5-HT, un inhibidor de glutaminil-péptido ciclotransferasas, un inhibidor selectivo de la producción de APP, un inhibidor de monoaminoxidasa B, un antagonista de los receptores de glutamato, un agonista del receptor AMPA, un estimulante del factor de crecimiento nervioso, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, un agente neurotrófico, un agonista del receptor muscarínico M1, un modulador del receptor GABA, un agonista de PPAR-gamma, un modulador de proteínas asociadas a los

microtúbulos, un bloqueador del canal de calcio, un agente antihipertensivo, una estatina y cualquier combinación de estos. En una modalidad ilustrativa, una composición farmacéutica puede comprender un inhibidor de quinasas. Inhibidores de quinasas adecuados pueden inhibir quinasas de mil un aminoácidos (TAOK, por sus siglas en inglés), CDK, GSK-3 $\beta$ , MARK, CDK5 o Fyn. En otra modalidad ilustrativa, una composición farmacéutica puede comprender un activador de la fosfatasa. Como ejemplo no taxativo, un activador de la fosfatasa puede aumentar la actividad de la proteína fosfatasa 2A. En algunas modalidades, el tratamiento es una composición farmacéutica que comprende una terapia dirigida a tau, que incluye, pero no se limita a ingredientes farmacéuticos activos que alteran los patrones de fosforilación de tau, antagonizan la agregación de tau o aumentan la eliminación de isoformas y/o agregados de tau patológica. En algunas modalidades, el tratamiento es un anticuerpo anti-A $\beta$ , un anticuerpo anti-tau, un anticuerpo anti-TREM2, un agonista de TREM2, un inhibidor de la gamma-secretasa, un inhibidor de la beta-secretasa, un inhibidor de quinasas, un activador de la fosfatasa, una vacuna o un inhibidor de la agregación de proteína tau. En una modalidad, un aumento del valor de pT217/T217 y un valor de A $\beta$  42/40 en relación con un control sano indica que el sujeto se trata con una terapia *MAPT* R406W. En otra modalidad, una disminución del valor de pT217/T217 y un aumento del valor de A $\beta$  42/40 en relación con una población de AD indica que el sujeto se trata con una terapia *MAPT* R406W o terapia de tau. En aun otra modalidad, un aumento del valor de pT217/T217 y una disminución del valor de A $\beta$  42/40 relativo a una población *MAPT* R406W indica que el sujeto se trata con una terapia para AD. En aun otra modalidad, un aumento en el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 en relación con una población de control o población de AD indica que el sujeto se trata con una terapia para tau.

**130** En otra modalidad específica, la presente descripción proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita, en donde el método comprende (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, el valor de

pT181/T181; y (c) administrar un tratamiento al sujeto para alterar la patología de tau, en donde la muestra de sangre o CSF procesado del sujeto ha cuantificado especies de tau de MTBR, o relaciones de las especies de tau de MTBR cuantificadas, que difieren en aproximadamente  $1,5 \sigma$  o más, donde  $\sigma$  es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control que no tiene signos clínicos o síntomas de una tauopatía y es negativo a amiloides según se midió por la formación de imágenes de PET y en donde la cantidad de especies de ptau cuantificadas es una representación de la patología de tau en un cerebro de un sujeto. En algunas modalidades, la administración de un tratamiento al sujeto para alterar la patología de tau altera o estabiliza la cantidad de las especies de ptau. En algunas modalidades, el tratamiento es una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de colinesterasa, un antagonista de N-metil-D-aspartato (NMDA), un antidepresivo (p. ej., un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, un antidepresivo atípico, una aminocetona, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y norepinefrina, un antidepresivo tricíclico, etc.), un inhibidor de la gamma-secretasa, un inhibidor de la beta-secretasa, un anticuerpo anti-A $\beta$  (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de este), un anticuerpo anti-tau (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de este), un anticuerpo anti-TREM2 (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de este), un agonista de TREM2, células madre, suplementos alimenticios (p. ej., agua de litio, ácidos grasos omega-3 con ácido lipoico, triglicéridos de cadena larga, genistina, resveratrol, curcumina y extracto de semilla de uva, etc.), un antagonista del receptor de serotonina 6, un inhibidor de MAPK p38alfa, un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante, una inmunoterapia pasiva, una vacuna activa (p. ej., CAD106, AF20513, etc.), un inhibidor de la agregación de proteína tau (p. ej., TRx0237, cloruro de metiltioninio, etc.), una terapia para mejorar el control de la glucemia (p. ej., insulina, exenatida, liraglutida pioglitazona, etc.), un agente antiinflamatorio, un inhibidor de la fosfodiesterasa 9A, un agonista del receptor sigma-1, un inhibidor de quinasas, un activador de la fosfatasa, un inhibidor de la fosfatasa, un

antagonista de los receptores de la angiotensina, un agonista parcial de los receptores CB1 y/o CB2 de endocannabinoides, un agonista de los receptores adrenérgicos  $\beta$ -2, un agonista de los receptores nicotínicos de acetilcolina, un agonista inverso de 5-HT<sub>2A</sub>, un antagonista de los receptores adrenérgicos de alfa-2c, un agonista de los receptores 1A y 1D de 5-HT, un inhibidor de glutaminil-péptido ciclotransferasas, un inhibidor selectivo de la producción de APP, un inhibidor de monoaminoxidasa B, un antagonista de los receptores de glutamato, un agonista del receptor AMPA, un estimulante del factor de crecimiento nervioso, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, un agente neurotrófico, un agonista de los receptores muscarínicos M1, un modulador del receptor GABA, un agonista de PPAR-gamma, un modulador de proteínas asociadas a los microtúbulos, un bloqueador del canal de calcio, un agente antihipertensivo, una estatina y cualquier combinación de estos. En una modalidad ilustrativa, una composición farmacéutica puede comprender un inhibidor de quinasas. Inhibidores de quinasas adecuados pueden inhibir quinasas de mil un aminoácidos (TAOK, por sus siglas en inglés), CDK, GSK-3 $\beta$ , MARK, CDK5 o Fyn. En otra modalidad ilustrativa, una composición farmacéutica puede comprender un activador de la fosfatasa. Como ejemplo no taxativo, un activador de la fosfatasa puede aumentar la actividad de la proteína fosfatasa 2A. En algunas modalidades, el tratamiento es una composición farmacéutica que comprende una terapia dirigida a tau, que incluye, pero no se limita a ingredientes farmacéuticos activos que alteran los patrones de fosforilación de tau, antagonizan la agregación de tau o aumentan la eliminación de isoformas y/o agregados de tau patológica. En algunas modalidades, el tratamiento es un anticuerpo anti-A $\beta$ , un anticuerpo anti-tau, un anticuerpo anti-TREM2, un agonista de TREM2, un inhibidor de la gamma-secretasa, un inhibidor de la beta-secretasa, un inhibidor de quinasas, un activador de la fosfatasa, una vacuna o un inhibidor de la agregación de proteína tau. En una modalidad, una disminución en el valor de pT181/T181 en relación con un control sano indica que el sujeto se trata con una terapia para FTD esporádica o terapia tau.

**131** En cada una de las modalidades anteriores, una composición farmacéutica puede comprender un agente de formación de imágenes. Ejemplos

no limitantes de agentes de formación de imágenes incluyen agentes de formación de imágenes funcionales (p. ej., fluorodesoxiglucosa, etc.) y agentes de formación de imágenes moleculares (p. ej., compuesto B de Pittsburgh, florbetaben, florbetapir, flutemetamol, anticuerpos marcados con radionúclidos, etc.).

**132** En cada una de las modalidades anteriores, los métodos pueden incluir además cuantificar uno o más de pT205/T205, pT208/T208, pT111/T111, pT153/T153, o cualquier combinación de estos.

#### **IV. Ensayos clínicos**

**133** Otro aspecto de la presente descripción es un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, en particular un ensayo clínico para una terapia para A $\beta$  o tau, siempre que se hayan cumplido todos los demás criterios para el ensayo clínico. En una modalidad, un método para un método para seleccionar a un sujeto en un ensayo clínico puede comprender (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40; y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para *tauopatía MAPT R406W* cuando el valor de pT217/T217 aumenta y valor de A $\beta$  42/40 es aproximadamente el mismo que una población de control sano y el sujeto no tiene placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET. En otra modalidad, un método para un método para seleccionar a un sujeto en un ensayo clínico puede comprender (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, el valor de pT217/T217 y valor de A $\beta$  42/40; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para AD (o terapia de A $\beta$ ) cuando el valor de pT217/T217 aumenta y valor de A $\beta$  42/40 es aproximadamente el mismo que una población de control sano y el sujeto no tiene placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET.

**134** En otra modalidad, un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, en particular un ensayo clínico para una terapia con A $\beta$  o tau, siempre que se hayan cumplido todos los demás criterios para el ensayo clínico. En una modalidad, un método para un método para seleccionar a un sujeto en un ensayo clínico puede comprender (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para tauopatía MAPT R406W cuando el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 aumenta en relación con una población de control sana. En otra modalidad, un método para un método para seleccionar a un sujeto en un ensayo clínico puede comprender (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau y A $\beta$ ; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para AD cuando el valor compuesto de pT217/T217 x A $\beta$  42/40 aumenta en relación con una población AD.

**135** En otra modalidad, un método para seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, en particular un ensayo clínico para una terapia con A $\beta$  o tau, siempre que se hayan cumplido todos los demás criterios para el ensayo clínico. En una modalidad, un método para un método para seleccionar a un sujeto en un ensayo clínico puede comprender (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de pT181/T181; y (c) seleccionar al sujeto en un ensayo clínico para una terapia para FTD esporádica cuando el valor de pT181/T181 disminuye en relación con una población de control sana. En otra modalidad, un método para un método para seleccionar a un sujeto en un ensayo clínico puede comprender (a) proporcionar una muestra de sangre o CSF procesada obtenida de un sujeto, en donde la muestra de sangre o CSF se enriquece para una o más especies de ptau; (b) cuantificar, en la muestra procesada, un valor de

pT181/T181; y (c) excluir al sujeto en un ensayo clínico para AD cuando el valor compuesto de pT181/T181 disminuye en relación con una población AD. La frase “una población de control sin placas amiloides en el cerebro según se midió por la formación de imágenes de PET” se define en la **Sección III**.

**136** Alternativamente o además de usar una medición de la fosforilación de tau específica de un sitio, opcionalmente con una medición de tau total, en cualquiera de las modalidades anteriores, puede usarse una relación calculada a partir del (de los) nivel(es) de fosforilación medidos o una relación calculada a partir del (de los) nivel(es) de fosforilación y tau total medidos. Una relación calculada a partir de los niveles de fosforilación medidos puede ser una relación entre pT181 y pT205, pT217 y pT205, o pT181 y pT217. Una relación calculada a partir de los niveles de fosforilación medidos y tau total puede ser una relación entre pT181 y tau total, p-T205 y tau total, o pT217 y tau total. También pueden usarse operaciones matemáticas además de una relación. Por ejemplo, en los ejemplos se usan valores de fosforilación de tau específicos de un sitio en diversos modelos estadísticos (p. ej., regresiones lineales, curvas de LME, curvas de LOESS, etc.) junto con otros biomarcadores conocidos (p. ej., estado de la APOE  $\epsilon$ 4, edad, sexo, puntuaciones de pruebas cognitivas, puntuaciones de pruebas funcionales, etc.).

**137** El diseño de ensayos clínicos para las terapias para AD y FTD se puede ayudar en gran medida mediante los métodos descritos en la presente. Muchos ensayos clínicos están diseñados para probar la eficacia de agentes de formación de imágenes o agentes terapéuticos que se dirigen a un cambio fisiopatológico específico que se produce antes del inicio de los síntomas de AD. Como se analizó anteriormente en la **Sección III**, la eficacia de estos diversos agentes se puede mejorar al administrar los agentes a sujetos que tienen ciertos niveles de fosforilación de tau específicos del sitio, según se mide por los métodos descritos en la presente descripción e ilustrados. Similarmente, ensayos clínicos que seleccionan sujetos con síntomas de la patología de A $\beta$  o la patología única de tau también se beneficiaría de ser capaz de discriminar con precisión la patología de un afiliado para determinar si la eficacia está asociada con un estado

de enfermedad particular. Por consiguiente, medir los niveles de fosforilación de tau como se describe en la presente descripción antes de seleccionar un sujeto en un ensayo clínico, en particular en un brazo de tratamiento de un ensayo clínico, puede dar como resultado ensayos más pequeños y/o resultados mejorados. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción pueden desarrollarse y usarse como un diagnóstico complementario para un agente terapéutico.

**138** En cada una de las modalidades anteriores, un sujeto puede inscribirse en un grupo de tratamiento del ensayo clínico. El “tratamiento” se define anteriormente. Se puede administrar a los sujetos inscritos en el grupo de tratamiento de un ensayo clínico una composición farmacéutica. En algunas modalidades, una composición farmacéutica puede comprender un agente de formación de imágenes. Los ejemplos no limitantes de agentes de formación de imágenes incluyen agentes de formación de imágenes funcionales (p. ej., fluorodesoxiglucosa, etc.) y agentes de formación de imágenes moleculares (p. ej., compuesto B de Pittsburgh, florbetaben, florbetapir, flutemetamol, anticuerpos marcados con radionúclidos, etc.). Alternativamente, una composición farmacéutica puede comprender un ingrediente farmacéutico activo. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos incluyen inhibidores de colinesterasa, antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA, por sus siglas en inglés), antidepresivos (p. ej., inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antidepresivos atípicos, aminocetonas, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y norepinefrina, antidepresivos tricíclicos, etc.), inhibidores de la gamma-secretasa, inhibidores de la beta-secretasa, anticuerpos anti-A $\beta$  (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos), anticuerpos anti-tau (incluidos fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de estos), células madre, suplementos alimenticios (p. ej., agua de litio, ácidos grasos omega-3 con ácido lipoico, triglicéridos de cadena larga, genistina, resveratrol, curcumina y extracto de semilla de uva, etc.), antagonistas del receptor de serotonina 6, inhibidores de MAPK p38alfa, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante, inmunoterapias pasivas, vacunas activas

(p. ej., CAD106, AF20513, etc.), inhibidores de la agregación de proteína tau (p. ej., TRx0237, cloruro de metiltioninio, etc.), terapias para mejorar el control de la glucemia (p. ej., insulina, exenatida, liraglutida pioglitazona, etc.), agentes antiinflamatorios, inhibidores de la fosfodiesterasa 9A, agonistas del receptor sigma-1, inhibidores de quinasas, activadores de la fosfatasa, inhibidores de la fosfatasa, antagonistas de los receptores de la angiotensina, agonistas parciales de los receptores CB1 y/o CB2 de endocannabinoides, agonistas de los receptores adrenérgicos  $\beta$ -2, agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina, agonistas inverso de 5-HT<sub>2A</sub>, antagonistas de los receptores adrenérgicos de alfa-2c, agonistas de los receptores 1A y 1D de 5-HT,, inhibidores de glutaminil-péptido ciclotransferasas, inhibidores selectivos de la producción de APP, inhibidores de monoaminoxidasa B, antagonistas de los receptores de glutamato, agonistas del receptor AMPA, estimulantes del factor de crecimiento nervioso, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, agentes neurotróficos, agonistas de los receptores muscarínicos M1, moduladores del receptor GABA, agonistas de PPAR-gamma, moduladores de proteínas asociadas a los microtúbulos, bloqueadores del canal de calcio, agentes antihipertensivos, estatinas y cualquier combinación de estos. En una modalidad ilustrativa, una composición farmacéutica puede comprender un inhibidor de quinasas. Inhibidores de quinasas adecuados pueden inhibir quinasas de mil un aminoácidos (TAOK, por sus siglas en inglés), CDK, GSK-3 $\beta$ , MARK, CDK5 o Fyn. En otra modalidad ilustrativa, una composición farmacéutica puede comprender un activador de la fosfatasa. Como ejemplo no taxativo, un activador de la fosfatasa puede aumentar la actividad de la proteína fosfatasa 2A.

**139** En cada una de las modalidades anteriores, un sujeto puede o no ser sintomático. Un “sujeto asintomático”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un sujeto que no presenta signos o síntomas de una tauopatía. Alternativamente, un sujeto puede presentar signos o síntomas (p. ej., pérdida de memoria, extravío de objetos, cambios en el estado de ánimo o en la conducta, etc.), pero no presentar suficiente disfunción cognitiva o funcional para un diagnóstico clínico. Un sujeto sintomático o asintomático puede tener amiloidosis A $\beta$ ; sin embargo, no es necesario que se sepa previamente que existe

amiloidosis A $\beta$  para el tratamiento. En aun otras modalidades, un sujeto puede tener AD. En cualquiera de las modalidades mencionadas anteriormente, un sujeto puede portar una de las mutaciones génicas conocidas por causar una tauopatía hereditaria. En modalidades alternativas, un sujeto puede no portar una mutación génica conocida por causar tauopatía hereditaria.

**140** Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la técnica sabrán que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación representan técnicas que los inventores descubrieron que funcionan correctamente en la práctica de la invención. Sin embargo, con la actual descripción, los expertos en la técnica sabrán que pueden realizar cambios en las modalidades específicas que se describen y de todas maneras obtener un resultado afín o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, toda la materia establecida o mostrada en las figuras adjuntas debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitante.

## **EJEMPLOS**

**141** Los siguientes ejemplos ilustran diversas iteraciones de la invención. Los expertos en la técnica sabrán que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación representan técnicas que los inventores descubrieron que funcionan correctamente en la práctica de la invención. Sin embargo, con la actual descripción, los expertos en la técnica sabrán que pueden realizar cambios en las modalidades específicas que se describen y de todas maneras obtener un resultado afín o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, toda la materia establecida o mostrada en las figuras adjuntas debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitante.

### **Ejemplo 1 - *MAPT* R406W aumenta la fosforilación de tau T217 en ausencia de patología amiloide**

**142** La hiperfosforilación de tau en treonina 217 (pT217) en el líquido cefalorraquídeo (CSF) se ha ligado recientemente a la amiloidosis temprana y podría servir como un biomarcador altamente sensible para la

enfermedad de Alzheimer (AD). Sin embargo, queda poco claro si otras tauopatías inducen modificaciones de pT217. Para determinar si la modificación pT217 es específica para AD, el pT217 de CSF se midió en la AD y otras tauopatías.

**143** Uso de inmunoprecipitación y métodos de espectrometría de masa, ocupación de la fosforilación del CSF T217 (pT217/T217) y relación amiloide -beta ( $A\beta$ ) 42/40 se comparó en individuos cognitivamente normales y aquellos con parálisis supranuclear progresiva de AD sintomática, síndrome corticobasal y demencia frontotemporal esporádica y familiar.

**144** Las personas con AD tenían pT217/T217 alto y  $A\beta$ 42/40 bajo de CSF. En contraste, los individuos cognitivamente normales y la mayoría de aquellos con tauopatías 4R tenían un pT217/T217 bajo y  $A\beta$  42/40 normal de CSF. Se identificó un subgrupo de individuos con pT217/T217 de CSF aumentado y relación de  $A\beta$  42/40 normal, la mayoría de los cuales fueron *portadores de la mutación MAPT R406W*. Se compararon las precisiones de diagnóstico de  $A\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF solo y en combinación. Se muestra que el pT217/T217 de CSF  $\times$   $A\beta$  42/40 de CSF es un biomarcador compuesto sensible que puede separar los portadores de *MAPT R406W* de individuos cognitivamente normales y aquellos con otras tauopatías.

**145** *MAPT R406W* es una mutación de tau que conduce a la tauopatía 3R+4R similar a la AD, pero sin neuropatología amiloide. Por lo tanto, el presente ejemplo indica que ese cambio en la relación de pT217/T217 de CSF no es específico para la AD y posteriormente puede reflejar fisiopatología de tau común en las tauopatías de 3R+4R.

**146** La enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza por la deposición de la placa del péptido amiloide - beta 42 ( $A\beta$  42) y agregación de tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares, placas neuríticas, e hilos de neurópilo en el cerebro. La disminución concomitante en la relación de  $A\beta$  42/40 y el aumento de las especies tau fosforilada (ptau) en el líquido cefalorraquídeo (CSF) se han usado como biomarcadores para la amiloidosis de AD y como sustitutos de la neuropatología de tau de AD, respectivamente. La creciente evidencia sugiere que la fosforilación de tau de CSF en la treonina 217 medida como concentración

absoluta (pT217) o como ocupación de la fosforilación (pT217/T217) es un biomarcador específico y más sensible para la AD, supera la medida bien establecida del nivel de ptau de CSF en treonina 181 (pT181). El aumento del nivel de pT181 de CSF está fuertemente asociado con el aumento de la concentración total de tau de CSF y se asume que refleja la neuropatología de tau. Sin embargo, pT217 y pT217/T217 de CSF se correlacionan más fuertemente con la neuropatología amiloide medida por tomografía por emisión de positrones (PET) del compuesto amiloide B de Pittsburgh (PiB) que el total de tau de CSF. Además, pT217 puede predecir el comienzo de los síntomas clínicos de AD en familias con mutaciones AD mejor que pT181. Por lo tanto, queda poco claro si la hiperfosforilación en T217 es una consecuencia temprana y directa de la amiloidosis o si es un marcador corriente abajo de la patología tau. En este contexto, tampoco queda claro si el pT217/T217 de CSF cambia en las tauopatías primarias en ausencia de patología amiloide.

**147** Otras enfermedades de demencia neurodegenerativas asociadas con la neuropatología tau, que incluyen parálisis supranuclear progresiva (PSP), síndrome corticobasal (CBS) y demencia frontotemporal de variante de comportamiento (bvFTD), actualmente no tienen biomarcadores de formación de imágenes o CSF. El diagnóstico depende principalmente de la evaluación clínica, que puede confirmarse después de la autopsia cerebral. La falta de biomarcadores *in vivo* confiables desafía los diagnósticos clínicos precisos, con implicaciones para el diseño y la implementación de ensayos clínicos. Estudios anteriores, en su mayoría que miden concentraciones absolutas de pT181 de CSF usando inmunoensayos, sugirieron que los aumentos en pT181 son específicos de la AD. Sin embargo, el cambio global en la concentración de isoformas de tau de CSF pueden contribuir a la concentración absoluta de pT181 sin cambio relativo en la fosforilación de pT181. La ocupación de la fosforilación de pT181 medida como la relación de pT181/T181 es esencial para interpretar completamente los cambios en el pT181 de CSF. Además, algunos estudios recientes que usan inmunoensayos y espectrometría de masas (MS) mostraron que un aumento en la concentración de pT217 de CSF es específico para la AD y

no se observa en otras enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los estudios previos a menudo no tienen en cuenta la neuropatología amiloide que aumenta frecuentemente con la edad y en muchas enfermedades neurodegenerativas.

**148** Para evaluar el efecto de la fosforilación de tau en tauopatías no AD, que incluyen PSP, CBS y bvFTD, ptau de CSF y A $\beta$  de CSF se midieron usando inmunoprecipitación secuencial (IP) y MS. Se calcularon las relaciones de pT217/T217 y pT181/T181 de CSF para diferenciar los cambios de la fosforilación de tau de la variación de tau total de CSF. La relación de A $\beta$  42/40 de CSF se calculó dentro del mismo participante y se usó como sustituto para la neuropatología amiloide. Se analizó una cohorte de controles con coincidencia de edad (AMC) cognitivamente normal e individuos con AD sintomática, PSP, CBS, y FTD esporádica y familiar. La correlación entre ptau de CSF y las relaciones de A $\beta$  42/40 de CSF se evaluó en cada grupo de enfermedad y evaluó la relevancia de diagnóstico evaluada de ptau de CSF sola y en combinación con A $\beta$  42/40 de CSF para evaluar su capacidad para discriminar individuos con AD sintomática de aquellos con otras enfermedades de demencia neurodegenerativas.

### *Resultados*

**149** *Participantes y flujo de trabajo del estudio:* Las características demográficas y clínicas de los participantes se resumen en la **Tabla 1**. Para los fines de los análisis, las cohortes de estudio se dividieron en varios grupos. El grupo “AD” (n = 80) incluyó a pacientes con AD “típica” clínicamente predominantemente amnésica (n = 66) y aquellas con variantes focales (n = 14). Los portadores de mutación bvFTD *MAPT* R406W (n = 5) se agruparon como “R406W”. Todas las enfermedades neurodegenerativas distintas a la AD, y los portadores de mutación *MAPT* R406W se agruparon como “tauopatía 4R” (n = 74). Este grupo incluyó individuos con PSP (n = 16), CBS (n = 15), CBS-PSP continuo (n = 7), portadores de mutación esporádica bvFTD (n = 28), y bvFTD *MAPT* P301L (n = 3), que principalmente fueron tauopatías 4R con tau de 4R como isoforma primaria en los agregados cerebrales. Nótese que la bvFTD esporádica se enumeró bajo el grupo de “tauopatía 4R”; sin embargo, fueron patológicamente no

confirmados y podrían contener FTLD-tau, FTLD-TDP43, FTLD-FUS, y pequeña cantidad de tauopatía 3R tal como enfermedad de Pick. A continuación, se descubrió que uno de estos participantes tenía mutación C9orf72. Los controles cognitivamente normales se nombraron “Control” (n = 98) e incluyeron AMC (n = 64), YNC (n = 26), y pacientes con tumores cerebrales (n = 8) que eran cognitivamente normales.

**Tabla 1: Características demográficas y clínicas de los participantes.**

| Grupos        | AD (n = 80)   |                                     | Tauopatía 4R <sup>1</sup> (n = 74) |                        |                          |                            |               |
|---------------|---------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------|
| Subcategorías | AD (n = 66)   | AD focalizada <sup>2</sup> (n = 14) | PSP (n = 16)                       | CBS (n = 15)           | CBS PSP continuo (n = 7) | bvFTD (N = 36)             |               |
|               |               |                                     |                                    |                        |                          | bvFTD3 esporádica (n = 28) | P301L (n = 3) |
| Edad ± SEM    | 74,5 ± 1,9    | 66,7 ± 2,2                          | 71,0 ± 2,6                         | 68,6 ± 2,6             | 70,7 ± 1,4               | 62,1 ± 1,3                 | 37,2 ± 3,6    |
| Edad promedio | 73,3 ± 0,9    |                                     | 64,5 ± 1,3                         |                        |                          |                            |               |
| Sexo (M/F)    | 34/32         | 8 de junio                          | 7 de septiembre                    | 9 de junio             | 3 de abril               | 16/12                      | Mar-00        |
| WashU-A       | 41            | 0                                   | 0                                  | 0                      | 0                        | 0                          | 0             |
| WashU-B       | 11            | 0                                   | 6                                  | 3                      | 0                        | 6                          | 3             |
| Montpellier   | 14            | 14                                  | 10                                 | 12                     | 7                        | 22                         | 0             |
| Grupos        | R406W (n = 5) | Control (N = 98)                    |                                    |                        |                          | Todo (n = 252)             |               |
| Subcategorías |               | AMC (n = 64)                        | YNC (n = 26)                       | Tumor cerebral (n = 8) |                          | Total                      |               |
|               | R406W (n = 5) |                                     |                                    |                        |                          |                            |               |
| Edad ± SEM    | 54,8 ± 6,5    | 73,3 ± 0,8                          | 42,4 ± 2,4                         | 50,2 ± 2,6             |                          | 66,8 ± 0,8                 |               |
| Edad promedio |               | 63,4 ± 1,6                          |                                    |                        |                          |                            |               |
| Sexo (M/F)    | 3 de febrero  | 32/32                               | 19 de julio                        | 4 de abril             |                          | 123/129                    |               |
| WashU-A       | 0             | 44                                  | 0                                  | 0                      |                          |                            | 85            |
| WashU-B       | 5             | 20                                  | 26                                 | 8                      |                          |                            | 88            |
| Montpellier   | 0             | 0                                   | 0                                  | 0                      |                          |                            | 79            |

AD, enfermedad de Alzheimer; PSP, parálisis supranuclear progresiva; CBS, síndrome corticobasal; bvFTD, demencia frontotemporal de variante de comportamiento; AMC, controles con coincidencia de edad; YNC, controles normales de Young CSF, líquido cefalorraquídeo.

<sup>1</sup> Para el propósito de los análisis, todas las enfermedades neurodegenerativas distintas a la AD que incluye PSP, CBS, CBS PSP continuo, bvFTD esporádica y portadores de mutación de FTD MAPT P301L, que son principalmente tauopatías 4R agrupadas como “tauopatías 4R”

<sup>2</sup> La AD focalizada se define como individuos con fenotipo predominante de lenguaje, comportamiento, visuoespacial, de apraxia con biomarcadores de CSF de AD. Se categoriza como “AD”.

<sup>3</sup> La bvFTD esporádica se enumera bajo el grupo “tauopatía 4R”; sin embargo, puede contener casos de FTD-TDP43, FTD-FUS y tauopatía 3R no diagnosticados. Después, se encontró que N = 1 tenía la mutación C9orf72.

**150** Los individuos en los grupos de YNC (42,3 ± 2,4), tumor cerebral (50,2 ± 2,6) y MAPT P301L (37,2 ± 3,6) fueron menores que AMC (73,0 ± 0,8) y participantes con enfermedades neurodegenerativas que incluyen AD (73,3

$\pm 0,9$ ), CBS ( $68,6 \pm 2,6$ ), CBS PSP continuo ( $70,7 \pm 1,4$ ), PSP ( $71,0 \pm 2,6$ ) y bvFTD esporádica ( $62,1 \pm 1,3$ ) (**Tabla 1**).

**151** Todas las 252 muestras de referencia de CSF y 8 muestras de seguimiento de CSF se midieron con métodos IP/MS secuenciales para las concentraciones de A $\beta$  42, A $\beta$  40, pT217, T217, pT181, y T181 de CSF. Se calcularon las relaciones de A $\beta$  42/40, pT217/T217, pT181/T181 de CSF. El flujo de trabajo usado para clasificar los diferentes grupos clínicos se describe en la **Figura 1F**.

**152** *Determinación de los cortes para A $\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF de IP/MS:* Para definir el corte de positividad amiloide para A $\beta$  42/40 de CSF medido por IP/MS, los resultados de PiB-PET amiloide se usaron de 48 participantes en la cohorte WashU-A (corte 0,18; **Figura 1F, Tabla 1**). A $\beta$  42/40 de CSF disminuyó significativamente en la cohorte amiloide-PiB+ (**Figura 3A**). Se realizó un análisis de curva ROC y se seleccionó un valor de índice de Youden de 0,086 como un corte para el A $\beta$  42/40 de CSF para maximizar la discriminación entre las cohortes (área bajo la curva [AUC] = 0,921,  $p < 0,0001$ ; **Figura 3B**).

**153** Determinar el corte de la anomalía de ptau para el pT217/T217 de CSF, los valores A $\beta$  42/40 de CSF en pacientes amiloide-PiB+ se usaron de la cohorte WashU-A (**Figura 1F**). A otro subconjunto de 37 participantes con solo MS se añadió mediciones de A $\beta$  42/40 de CSF. El pT217/T217 de CSF aumentó significativamente en individuos amiloides+ basado en las mediciones de PiB-PET y A $\beta$  42/40 de CSF (**Figura 3C**). Se realizó un análisis de curva ROC y se calculó un valor de índice de Youden de 4.76 como un corte para pT217/T217 de CSF (AUC = 0,983,  $p < 0,0001$ ; **Figura 3D**).

**154** Los mismos análisis ROC se realizaron para las concentraciones de pT217, pT181, tau total de CSF y la ocupación de la fosforilación en T181 (pT181/T181. **Figuras 3E–3L**). La AUC para cada uno de estos biomarcadores fue 0,949 (pT217), 0,816 (pT181), 0,698 (tau total) y 0,934 (pT181/T181), respectivamente, lo que respalda el hallazgo anterior de que pT217/T217 de CSF es un biomarcador discriminativo superior de AD.

**155** Asociación entre A $\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF de IP/MS: Para evaluar la relación entre A $\beta$  42/40 y pT217/T217 de CSF de IP/MS, ambas relaciones se representaron para cada uno de los 255 participantes. En función de los cortes de 0,086 y 4,8 calculados para el A $\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF, respectivamente, los cuadrantes se definieron de la siguiente manera: I (amiloide-, ptau+), II (amiloide+, ptau+), III (amiloide+, ptau-), e IV (amiloide-, ptau-) (**Figuras 1A–1E, Figura 3B**).

**156** En el cuadrante II (amiloide+, ptau+), 88 % (73/83) de los individuos se identificaron clínicamente como AD (**Figura 1B**). En general, el 91 % (73/80) de individuos con AD se trazaron en II (**Figura 4A**). Siete participantes identificados clínicamente como AD se dividieron en cuadrante I (n = 3), III (n = 1), y IV (n = 3, **Figuras 1B–1D**). Un subconjunto de controles (AMC [n = 5], CBS [n = 2], PSP [n = 2] y bvFTD [n = 1]) también se asignaron al cuadrante II (**Figuras 1A y 1B**).

**157** Ochenta y cuatro por ciento (82/98) de los controles se trazaron en IV y el 55 % (82/150) de los individuos en IV fueron controles (**Figura 1E, Figura 4B**). Ochenta por ciento (12/15) de CBS y el 81 % (13/16) de PSP también estaban en IV (**Figura 4C y 4D**), así como el 71% (5/7) de CBS PSP continuo.

**158** El A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF se asociaron negativamente y mostraron una curva en forma de L (**Figura 1**). Para comprender mejor la asociación dinámica entre el perfil de A $\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF en el contexto del continuo de AD, se evaluó la carga amiloide y se midió con formación de imágenes de PiB -PET y AV45-PET y agregación de tau mediante la formación de imágenes de AV1451-PET en un subconjunto de participantes (**Figura 5**). La agregación de A $\beta$  medida por ambos trazadores de PET aumentó gradualmente y significativamente desde el cuadrante IV, III a II (**Figuras 5A y 5B**). Todos los controles en el cuadrante III fueron AMC (**Figura 1A**) y ninguno pertenece a YNC (edad<64). Sin embargo, dentro de la AMC, no hubo una diferencia significativa en la edad del cuadrante III ( $74,8 \pm 2,4$ ) y del cuadrante IV ( $72,4 \pm 0,6$ ). Estos sugieren que los individuos en el cuadrante III con positividad

amiloide pueden definirse como AD presintomática sin fosforilación anormal de tau. En contraste, la agregación de tau medida por AV1451 -PET solo aumentó en el cuadrante II (**Figura 5C**), lo que respalda el cambio de A $\beta$  42/40 de CSF y PET amiloide antes de PET de pT217/T217 y tau de CSF. Es importante destacar que se observó una correlación negativa significativa entre el A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF en los cuadrantes III y IV (ptau-) incluyendo la mayoría de los controles, PSP, CBS y bvFTD (**Figura 6**).

**159** Los portadores de *MAPT* R406W han aumentado la relación de pT217/T217 sin patología amiloide: El cuadrante I (amiloide-, ptau+) se llenó con individuos con bvFTD, PSP, aD o CBS (**Figura 1C**). Curiosamente, 45 % (5/11) eran bvFTD, y todos, excepto uno (80 %, 4/5) fueron portadores de la mutación *MAPT* R406W (**Figura 4F, Tabla 2**). Todos (5/5) los portadores de la mutación *MAPT* R406W analizados en este estudio fueron amiloide negativos (cuadrantes I y IV), lo que respalda la ausencia de neuropatología amiloide en los portadores de *MAPT* R406W (**Tabla 2**). Solo uno de cinco portadores de la mutación *MAPT* R406W que estaban en sus 40s y asintomáticos en todo el estudio fueron pT217/T217 de CSF negativos (cuadrante IV) tanto en el valor de referencia como en el de seguimiento; todos los otros *portadores de la mutación MAPT R406W* fueron pT217/T217 de CSF positivos (cuadrante I) independientemente de su estado pre/sintomático. Un participante (núm. 5) que fue asintomático al inicio y desarrolló demencia en la visita de seguimiento 4 años después tenía el pT217/T217 de CSF justo por debajo del umbral al inicio (cuadrante IV), pero el pT217/T217 de CSF aumentó en el seguimiento (cuadrante I), lo que sugiere que los cambios longitudinales en este biomarcador podrían reflejar la progresión de la enfermedad. En comparación, otros cinco participantes con visitas de seguimiento dentro de 1 año (1 PSP en el cuadrante I, 2 CBS y 2 AMC en el cuadrante IV) permanecieron en el mismo cuadrante entre el inicio y el seguimiento. Estos resultados sugieren que aumentar la edad y la aparición de síntomas se asocian con aumentos en el pT217/T217 de CSF en *portadores de la mutación MAPT R406W*.

**Tabla 2: Demografía y resumen de los valores de biomarcadores para portadores de la mutación MAPT R406W.**

| Participante       | Cuadrante | Sintomático/Asintomático                 | Edad            | Sexo | A $\beta$ 42/40 de CSF<br>(corte= 0,086) | pT217/T217 de CSF<br>(corte= 4,76) | pT217/T217 de CSF x A $\beta$ 42/40 de CSF<br>(corte para R406W versus control = 0,50) |
|--------------------|-----------|------------------------------------------|-----------------|------|------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Núm. 1             | IV        | Sin demencia                             | 40              | M    | 0,142                                    | 3,69                               | 0,524                                                                                  |
|                    | IV        | Sin demencia                             | 41              |      | 0,152                                    | 3,75                               | 0,572                                                                                  |
| Núm. 2             | I         | Sin demencia                             | 40              | M    | 0,13                                     | 5,28                               | 0,688                                                                                  |
| Núm. 3             | I         | Sin demencia                             | 52              | F    | 0,127                                    | 5,3                                | 0,671                                                                                  |
|                    | I         | Sin demencia                             | 55              |      | 0,132                                    | 5,86                               | 0,774                                                                                  |
| Núm. 4             | I         | Sintomáticas                             | 64              | F    | 0,121                                    | 5,47                               | 0,659                                                                                  |
| Núm. 5             | IV        | Asintomático, otro primario              | 69              | F    | 0,108                                    | 4,73                               | 0,513                                                                                  |
|                    | I         | Sintomáticas                             | 73              |      | 0,102                                    | 5,14                               | 0,522                                                                                  |
| Promedio (edad<50) | II, 2 IV  | Sin demencia                             | 40,3 $\pm$ 0,40 | -    | 0,142 $\pm$ 0,0064                       | 4,2 $\pm$ 0,52                     | 0,595 $\pm$ 0,049                                                                      |
| Promedio (edad>50) | 4I, 1 IV  | Sin demencia. Sintomático, otro primario | 63,0 $\pm$ 4,1  | -    | 0,118 $\pm$ 0,0056                       | 5,3 $\pm$ 0,19                     | 0,628 $\pm$ 0,049                                                                      |
| Promediar todos    | -         | -                                        | 54,5 $\pm$ 4,8  | -    | 0,127 $\pm$ 0,0059                       | 4,9 $\pm$ 0,28                     | 0,615 $\pm$ 0,049                                                                      |

**160**

*Valores de diagnóstico de A $\beta$  42/40, pT217/T217 y*

*biomarcadores compuestos CSF de IP/MS en AD y portadores de la mutación MAPT R406W:* A continuación, el rendimiento de diagnóstico de A $\beta$  42/40 CSF y pT217/T217 de CSF de IP/MS se comparó, con biomarcadores compuestos que consisten en pT217/T217 multiplicado por A $\beta$  42/40 de CSF y pT217/T217 de CSF dividido entre A $\beta$  42/40 (**Figura 2, Tabla 3, Figura 7**). Para este análisis, se compararon los cuatro grupos clínicos definidos previamente ("AD", "R406W", "tauopatía 4R" y "Control"). La relación de A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF usado solo únicamente separa AD de los otros tres grupos (**Figura 2A y 2B**). Sin embargo, el grupo R406W tenía un biomarcador compuesto A $\beta$  42/40  $\times$  pT217/T217 de CSR significativamente aumentado en comparación con lo observado en los grupos de control y tauopatía 4R (**Figura 2C**). Este biomarcador compuesto demostró una excelente capacidad para separar el grupo R406W de la tauopatía 4R (AUC = 0,948) y los grupos de Control (AUC = 0,961). Cuando se usó este biomarcador compuesto, el 100 % de portadores de la mutación MAPT R406W estaban por encima del corte de 0,50 para R406W versus control (**Tabla 3**). pT217/T217 de CSF dividido entre A $\beta$  42/40 de CSF realizado de manera similar al A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF solo, y podría no distinguir R406W de otros grupos (**Figura 2D, Tabla 3**).

**Tabla 3: Precisión de diagnóstico de combinaciones de biomarcadores de A $\beta$  42/40 de CSF y pT217T217 de CSF para AD y FTD - MAPT R406W.**

| Prueba                                                  | Grupos de diagnóstico    | n por grupo | AUC   | CI del 95 %        | Valor de P | % de sensibilidad | % de especificidad | Corte     |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|-------------|-------|--------------------|------------|-------------------|--------------------|-----------|
| A $\beta$ 42/40 de CSF                                  | AD vs. R406W             | 80 vs. 8    | 0,977 | 0,9464 a<br>1,000  | <0.0001    | 100,0             | 96,3               | > 0,09853 |
|                                                         | AD vs. tauopatía 4R      | 80 vs. 74   | 0,949 | 0,9088 a<br>0,9885 | <0.0001    | 94,6              | 90,0               | > 0,07678 |
|                                                         | Control vs. AD           | 100 vs. 80  | 0,926 | 0,8830 a<br>0,9687 | <0.0001    | 90,0              | 90,0               | < 0,07669 |
|                                                         | Control vs. R406W        | 100 vs. 8   | 0,599 | 0,4197 a<br>0,7778 | 0,3541     | 75,0              | 46,0               | > 0,1204  |
|                                                         | Control vs. tauopatía 4R | 100 vs. 74  | 0,556 | 0,4701 a<br>0,6421 | 0,2065     | 59,5              | 56,0               | > 0,1231  |
|                                                         | Tauopatía 4R vs. R406W   | 74 vs. 8    | 0,554 | 0,3578 a<br>0,7504 | 0,617      | 55,4              | 62,5               | < 0,1265  |
| pT217/T217 de CSF                                       | Control vs. AD           | 100 vs. 80  | 0,952 | 0,9163 a<br>0,9868 | <0.0001    | 96,3              | 93,0               | > 4,355   |
|                                                         | AD vs. tauopatía 4R      | 80 vs. 74   | 0,947 | 0,9114 a<br>0,9818 | <0.0001    | 88,3              | 96,3               | < 4,335   |
|                                                         | Control vs. R406W        | 100 vs. 8   | 0,898 | 0,8256 a<br>0,9706 | 0,0002     | 100,0             | 76,0               | > 3,675   |
|                                                         | AD vs. R406W             | 80 vs. 8    | 0,894 | 0,8253 a<br>0,9622 | 0,0003     | 100,0             | 80,0               | < 5,915   |
|                                                         | Tauopatía 4R vs. R406W   | 74 vs. 8    | 0,872 | 0,7986 a<br>0,9449 | 0,0006     | 81,8              | 100,0              | < 3,670   |
|                                                         | Control vs. tauopatía 4R | 100 vs. 74  | 0,539 | 0,4518 a<br>0,6253 | 0,3795     | 18,2              | 94,0               | < 2,345   |
| pT217/T217 de CSF x A $\beta$ 42/40 de CSF              | Control vs. R406W        | 100 vs. 8   | 0,960 | 0,9235 a<br>0,9965 | <0.0001    | 100,0             | 94,0               | < 0,4989  |
|                                                         | Tauopatía 4R vs. R406W   | 74 vs. 8    | 0,934 | 0,8802 a<br>0,9880 | <0.0001    | 90,5              | 100,0              | < 0,5078  |
|                                                         | Control vs. AD           | 100 vs. 80  | 0,813 | 0,7471 a<br>0,8791 | <0.0001    | 71,3              | 86,0               | < 0,4295  |
|                                                         | AD vs. tauopatía 4R      | 80 vs. 74   | 0,783 | 0,7080 a<br>0,8583 | <0.0001    | 85,1              | 68,8               | < 0,4356  |
|                                                         | AD vs. R406W             | 80 vs. 8    | 0,719 | 0,6069 a<br>0,8306 | 0,0421     | 100,0             | 60,0               | < 0,5100  |
|                                                         | Control vs. tauopatía 4R | 100 vs. 74  | 0,534 | 0,4474 a<br>0,6213 | 0,4394     | 75,7              | 36,0               | > 0,3316  |
| pT217/T217 de CSF dividido entre A $\beta$ 42/40 de CSF | AD vs. R406W             | 80 vs. 8    | 0,964 | 0,9249 a<br>1,000  | <0.0001    | 100,0             | 93,8               | < 73,04   |
|                                                         | AD vs. tauopatía 4R      | 80 vs. 74   | 0,954 | 0,9182 a<br>0,9906 | <0.0001    | 93,2              | 95,0               | < 67,60   |
|                                                         | Control vs. AD           | 100 vs. 80  | 0,950 | 0,9129 a<br>0,9874 | <0.0001    | 95,0              | 95,0               | < 69,77   |
|                                                         | Tauopatía 4R vs. R406W   | 74 vs. 8    | 0,797 | 0,6868 a<br>0,9078 | 0,006      | 85,1              | 75,0               | < 37,95   |
|                                                         | Control vs. R406W        | 100 vs. 8   | 0,771 | 0,6608 a<br>0,8817 | 0,0109     | 75,0              | 82,0               | > 39,93   |
|                                                         | Control vs. tauopatía 4R | 100 vs. 74  | 0,534 | 0,4469 a<br>0,6218 | 0,4394     | 85,1              | 24,0               | < 35,43   |

**161** *Las concentraciones totales de tau y ptau de CSF de IP/MS no son biomarcadores eficientes para los portadores de MAPT R406W: Ni pT217, pT181, tau total de CSF ni la ocupación de fosforilación en T181 (pT181/T181)*

fueron tan eficientes como el biomarcador compuesto pT217/T217 de CSF  $\times$  A $\beta$  42/40 de CSF para separar a los portadores de la mutación *MAPT* R406W de individuos con otras enfermedades de demencia neurodegenerativas (**Figura 8**, **Figura 9**). El pT181/T181 de CSF disminuyó significativamente en la bvFTD esporádica (que incluye FTLD-tau, FTLD-TDP43 y FTLD-FUS) en comparación con AD, AMC, y portadores de la mutación *MAPT* R406W (**Figura 8D**, **Figura 9D**). Cuando se reagrupa, el pT181/T181 de CSF fue capaz de separar el grupo de bvFTD esporádica de AD (AUC = 0,959), control (AUC = 0,752) y otras tauopatías que incluyen CBS, PSP y FTD-MAPT que incluye R406W y P301L (AUC = 0,707. **Figura 10**). Sin embargo, la especificidad y sensibilidad del pT181/T181 de CSF para separar la bvFTD esporádica de otras tauopatías y el control no fue tan alta como las de pT217/T217 de CSF para identificar los portadores de la mutación *MAPT* R406W.

#### *Análisis*

**162**            *Los portadores de la mutación MAPT R406W tienen un pT217/T217 aumentado sin patología de amiloide:* El pT217/T217 de CSF se correlaciona fuertemente con la patología amiloide medida por PET amiloide en la AD, pero no demostró si pT217/T217 era una lectura para la patología amiloide en CSF o la patología de tau. Este ejemplo mostró una correlación específica entre el A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF en individuos con AD sintomática. Incluso en AD presintomática, el A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF se correlacionan cuando se observan cambios ligeros en la fosforilación, consistentes con informes previos que muestran una correlación entre PiB - PET y pT217/T217 de CSF. Ni el A $\beta$  42/40 de CSF ni el pT217/T217 de CSF se alteraron en otras tauopatías, que incluyen PSP, CBS y la mayoría de FTD esporádicas y familiares. Sin embargo, se descubrió que los portadores de la mutación *MAPT* R406W tienen el pT217/T217 de CSF aumentado independiente de la patología amiloide, lo que demuestra que el pT217/T217 de CSF aumentado es, de hecho, un biomarcador de la modificación del tau patológico común para AD demencia asociada a *MAPT* R406W y que la patología amiloide no es un requisito previo para esta modificación. Esto sugiere que existe una patología de tau común

corriente abajo de la AD y portadores de la mutación *MAPT* R406W, que resultan en cambios específicos de la fosforilación de tau en el cerebro, conduciendo a un aumento en el pT217/T217 de CSF. Alternativamente, dos mecanismos distintos ascendentes, uno que incluye deposición amiloide y el segundo que involucra la mutación *MAPT* R406W podrían conducir a la activación de una ruta similar, lo que conduce finalmente a la hiperfosforilación y agregación de tau.

**163** *Similitud de la mutación MAPT R406W para AD:* La patología relacionada a la mutación *MAPT* R406W comparte múltiples similitudes neuropatológicas y clínicas con la AD. A diferencia de otros portadores de la mutación *MAPT*, los portadores de la mutación *MAPT* R406W tienen edades posteriores en el inicio de los síntomas, con síntomas clínicos que incluyen la aparición de pérdida de memoria, en promedio, a mediados de los 50 con progresión lenta. La mayoría de mutaciones *MAPT* patológicas tales como P301L se ubican en o alrededor del exón 10 y típicamente conducen a la agregación de la isoforma de tau 4R, lo que da como resultado tauopatías 4R. En contraste, las mutaciones *MAPT*, tales como R406W y V337M se ubican en el extremo C de la proteína tau en un dominio común a las isoformas de tau 3R y 4R, lo que da como resultado patologías cerebrales mixtas 3R+4R. La mutación *MAPT* R406W, como AD, puede por lo tanto clasificarse como una tauopatía 3R+4R y está diferenciada de otras tauopatías 4R (CBS, PSP, bvFTD relacionados con mutaciones de *MAPT* ubicadas en el exón 10) o 3R (enfermedad de Pick).

**164** Las estructuras de filamentos en los agregados de tau se han resuelto recientemente mediante microscopía de crió-electrón para diferentes tauopatías tales como la AD y la encefalopatía crónica traumática (CTE) (3R +4R), CBS (4R) y enfermedad de Pick (3R). Consistente con los hallazgos neuropatológicos, los dominios tau compartidos por las isoformas 3R e 4R están involucrados en los agregados de tau de AD y CTE, mientras que los dominios específicos de 4R y 3R están, respectivamente, involucrados en la degeneración corticobasal y los agregados de la enfermedad de Pick. Aunque no se cuenta con tales datos estructurales para *MAPT* R406W, AD, *MAPT* R406W, y V337M tienen estructuras de filamentos helicoidales pareadas, y los trazadores Tau PET de AD

tales como AV1451 se unen a cierta medida en los portadores de la mutación *MAPT R406W* y V337M pero no en otras tauopatías, lo que sugiere que los agregados de tau en estas tauopatías 3R+4R tienen características similares. Sin embargo, aún queda por abordar cómo la hiperfosforilación en T217 contribuye o se asocia con la formación del filamento helicoidal pareado. Estudios previos sugieren que el T217 de CSF se hiperfosforila en las primeras etapas presintomáticas de AD, y es detectable más de 20 años antes de la aparición de síntomas clínicos, mientras que los agregados de tau detectados por la formación de imágenes de PET aumentan cerca de la aparición de los síntomas. El presente ejemplo proporciona que en las tauopatías 3R+4R que incluyen portadores de la mutación *MAPT R406W*, (1) el pT217/T217 del CSF se vuelve anormal antes de la aparición de los síntomas cuando comienza la formación de filamentos helicoidales pareados con tau, pero está por debajo del límite de detección mediante formación de imágenes de PET con tau seguidas de cambios evidentes en la formación de imágenes Tau PET; o, (2) la hiperfosforilación de T217 de CSF no está directamente asociada con la formación de ovillos neurofibrilares, sino que refleja un metabolismo celular anormal que afecta a tau y conduce finalmente a la agregación de tau.

**165**            *El biomarcador compuesto del pT217/T217 de CSF × Aβ 42/40 de CSF sirve como un biomarcador sensible para los portadores de la mutación MAPT R406W:* Se evaluaron los valores de diagnóstico del pT217/T217 de CSF y el Aβ 42/40 de CSF solos y en combinación. Los niveles de pT217/T217 de CSF se aumentaron en portadores de la mutación *MAPT R406W*. Sin embargo, el grado de aumento fue mucho más pequeño en comparación con el de AD y los portadores de la mutación *MAPT R406W* no pudieron separarse de los grupos de Control o tauopatía 4R que incluyen PSP, CBS, bvFTD esporádica y FTD-MAPT P301L por pT217/T217 de CSF solo (**Figura 2A, 2B, Figura 6**). Estudios previos han indicado un aumento de las concentraciones de pT181 de CSF y plasma en algunos casos de portadores de la mutación *MAPT R406W*, pero el aumento fue leve. Estos son consistentes con la sensibilidad insuficiente obtenida de este estudio usando las concentraciones de CSF de pT181, pT217 u ocupaciones de

fosforilación en T181 y T217 (pT181/T181 y pT217/T217) como biomarcadores R406W. A través del análisis del cuadrante, se demostró que tanto el pT217/T217 de CSF como el A $\beta$  42/40 de CSF son necesarios para distinguir a los portadores de la mutación *MAPT* R406W con alta precisión. También se demostró que un biomarcador compuesto, el pT217/T217 de CSF  $\times$  A $\beta$  42/40 de CSF contenía suficiente sensibilidad y especificidad para distinguir los portadores de la mutación *MAPT* R406W de los controles y las tauopatías 4R (**Figura 2C**, **Figura 7C**. AUC = 0,934, 0,960, respectivamente). Esto es comparable con la alta especificidad y sensibilidad del A $\beta$  42/40 de CSF y el pT217/T217 de CSF para distinguir la AD de los controles (AUC = 0,926, 0,952, respectivamente). Una combinación de las relaciones de A $\beta$  42/40 y pT217/T217 de CSF podría usarse en ensayos futuros para seleccionar los portadores de la mutación *MAPT* R406W y posiblemente otras tauopatías 3R+4R tales como V337M. Además, las medidas longitudinales de pT217/T217 de CSF podrían reflejar la progresión de la enfermedad, lo que sugiere que el A $\beta$  42/40 de CSF, el pT217/T217 de CSF y los biomarcadores compuestos pueden servir como nuevas lecturas sensibles en los ensayos clínicos del fármaco contra tauopatías que pueden evaluar el acoplamiento diana en portadores de la mutación *MAPT* R406W.

#### **166** *El pT181/T181 de CSF disminuye en la bvFTD esporádica:*

Estudios previos que usan inmunoensayos mostraron resultados mixtos en pacientes con bvFTD, PSP y CBS que no muestran cambios o muestran cambios leves en el tau total o pT181 de CSF. De acuerdo con múltiples informes, el presente ejemplo no mostró diferencias significativas en las concentraciones de tau total de CSF o pT181 de CSF solo entre los grupos de bvFTD, PSP, CBS y control. Sin embargo, calculando las ocupaciones de fosforilación dentro del mismo participante, se demostró que el pT181/T181 de CSF disminuye significativamente en bvFTD esporádica. Esto puede lograrse normalizando los cambios en pT181 por T181, lo que da cuenta de cualquier aumento fisiológico en pT181 como aumentos de tau total, y variabilidades individuales tales como edad, sexo y genotipo. La especificidad y sensibilidad del biomarcador pT181/T181 de CSF para identificar la bvFTD esporádica a partir de controles u otras tauopatías

(AUC<0,8) no fueron tan altas como un biomarcador compuesto, pT217/T217 de CSF  $\times$  A $\beta$  42/40 de CSF, para identificar los portadores de la mutación *MAPT* (AUC>0,9). Esto puede deberse a la heterogeneidad del cohorte de bvFTD esporádica que incluye FTLD-tau, FTLD-TDP y FTLD-FUS.

#### *Métodos*

**167** *Estudios humanos:* Todos los estudios fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional en la Universidad de Washington en St. Louis, MO, EE. UU. y el Comité de Ética del Montpellier University Hospital (CSF-NeuroBANK #DC-2008-417 en el centro de recursos NFS 96-900 CHU certificado BB-0033-00031 [<http://www.biobanques.eu>]). Todos los participantes o sus delegados dieron su consentimiento para la recolección y el intercambio de muestras de biofluidos. Los criterios de exclusión incluyeron contradicción con punciones lumbares (LPs) o catéteres lumbares que incluyen un trastorno de la sangre, anticoagulación activa e infección activa. La autorización para manejar datos personales se otorgó por la Autoridad de Protección de Datos Francesa (CNIL) bajo el número 1709743 v0,

**168** El AMC y los individuos con AD leve se reclutaron en el Knight Alzheimer Disease Research Center (ADRC) en Washington University School of Medicine como parte de estudios de cinética de marcado de isótopos estables (SILK). Los AMC son voluntarios que se inscribieron con fines de investigación y son cognitivamente normales. Esto incluyó dos cohortes distintas de participantes sintomáticos (WashU-A y WashU- B). Los individuos de la cohorte WashU-A participó en estudios de catéter lumbar de 36 horas. Los individuos de la cohorte WashU-B participaron en el estudio de SILK que implicó cinco LP durante 4 meses. Los individuos fueron diagnosticados mediante la evaluación clínica y clasificados de acuerdo con la calificación de demencia clínica (CDR). Además de las entrevistas del paciente y la fuente colateral, se revisaron los datos de formación de imágenes de PET cerebral y los resultados de CSF de diagnóstico si estaban disponibles. Esta cohorte incluye pacientes con AD clínicos que no tenían biomarcadores consistentes con AD, que se clasificaron como demencia no AD. La cohorte WashU-A además, se clasificó con positividad de PET amiloide basada

en formación de imágenes de PiB. Los controles normales de Young (YNC) entre las edades de 18–64 sin trastornos neurológicos diagnosticados actualmente, fueron denominados Voluntarios para la Salud en la Universidad de Washington. Los pacientes con tumor cerebral fueron referidos del Barnes Jewish Hospital. Los pacientes con PSP, CBS y bvFTD esporádica fueron referidos del Memory Diagnostic Center y Movement Disorders Clinics afiliados. Los portadores de las mutaciones MAPT P301L y R406W fueron evaluados clínicamente localmente en la Universidad de Washington y referidos del Estudio de Evaluación Longitudinal de la demencia Frontotemporal Familiar (LEFFTDS; [allftd.org/artfl-lefftds](http://allftd.org/artfl-lefftds); PI NG del sitio). Ocho participantes (1 PSP, 3 MAPT R406W, 2 CBS y 2 AMC) tuvieron recolección repetida de LP y CSF.

**169** Los participantes del Montpellier fueron referidos del Memory Resources and Research Center of Montpellier. Se clasificaron en AD, CBS, PSP, bvFTD y CBS- PSP continuo basado en formación de imágenes clínicas, neuropsicológicas, cerebrales y evaluaciones de seguimiento. Los biomarcadores de CSF de las concentraciones de A $\beta$ 42, tau, pT181 también se midieron con el Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y se calculó la relación de A $\beta$ 42/40. La AD se diagnostica de acuerdo con los criterios aceptados y basado en la clasificación ATN todos los participantes con AD tenían al menos dos biomarcadores anormales de CSF. Esto incluye el fenotipo focal de AD que se refiere al fenotipo predominante de lenguaje, comportamiento, visuoespacial, de apraxia con biomarcadores de CSF de AD. Algunos casos de ADA de endofenotipo PPA se incluyeron en el fenotipo focal de AD (n = 5). El CBS y PSP fueron diagnosticados de acuerdo con los criterios internacionales. La bvFTD se puede atribuir a la degeneración lobular frontotemporal (FTLD)-tau, FTLD-TDP y FTLD-FUS. Algunos endofenotipos de lenguaje de FTLD se incluyeron en bvFTD (n = 3). El CBS PSP continuo incluyó pacientes con fenotipos clínicos de CBS que evolucionaron en PSP durante el seguimiento.

**170** *Recolección de CSF:* El CSF de individuos con AD y AMC en la cohorte WashU-A se recolectó mediante un catéter como se describió anteriormente. El CSF de AMC e individuos con AD, PSP, CBS y bvFTD

sintomáticos en la cohorte WashU-B se obtuvo mediante LP con recolección por gravedad y centrifugación como se describió anteriormente. El CSF de familias de la mutación *MAPT* se recolectaron de acuerdo con el protocolo estandarizado en el Centro de biomarcador en Escuela de Medicina de la Universidad de Washington. El CSF de individuos con tumores cerebrales se obtuvo mediante drenaje lumbar usando un catéter antes o después de la cirugía.

**171** El CSF de la cohorte del Montpellier se recolectó usando el protocolo estandarizado para la recolección, centrifugación y almacenamiento en el Resources and Research Center of Montpellier. Brevemente, se usó la aguja atraumática para LP, con CSF recolectado en tubo de polipropileno de 10 ml y tubos Eppendorf de proteína baja de unión. El CSF no se centrifugó antes de la extracción de alícuotas y el almacenamiento a -80 °C. Las concentraciones de tau y pT181 de CSF se midieron usando el ELISA X-MAP tipo sándwich INNOTEST disponible comercialmente estandarizado siguiendo las instrucciones de Fujirebio. El Aβ 42 y Aβ 40 de CSF se midieron usando ELISA tipo sándwich INNOTEST de Fujirebio.

**172** *Métodos secuenciales de IP y MS para Aβ y Tau de CSF:* El Aβ de CSF se analizó como se describió anteriormente con las siguientes modificaciones. Se preparó una mezcla maestra que contiene detergente y reactivos caotrópicos (1 % de NP-40 final, 5 mmol/l guanidina, cóctel de inhibidor de proteasa) y estándares internos para tau (tau recombinante 2N4R marcado con <sup>15</sup>N) y Aβ (Aβ 40 y 42 sintético marcado con <sup>15</sup>N) se prepararon en tubos Axygen de baja unión (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE. UU., MCT-175). Se añadió 500–1000 µL de CSF y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo Aβ de dominio medio HJ5.1. Después del lavado, las muestras se digirieron con proteasa LysN, se desalaron y se analizaron mediante el espectrómetro de masa Xevo TQ-S (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.).

**173** El tau y ptau de CSF se analizaron como se describió anteriormente con las siguientes modificaciones. Las muestras de CSF inmunoprecipitadas post-HJ5.1 que contienen estándares internos de tau se inmunoprecipitaron secuencialmente con anticuerpos de dominio medio de Tau1 y

de extremo N de tau HJ8.5. Después del lavado, las muestras se digirieron con tripsina, se desalaron y se analizaron en el espectrómetro de masa Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.). El método MS que mide pT217 y pT181 se describió previamente.

**174** *Formación de imágenes de PET de Tau y amiloide:* Se realizaron mediciones de formación de imágenes de PiB-PET amiloide, AV45-PET y Tau AV1451-PET en un subconjunto de participantes con AD y AMC del Knight ADRC de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington. Los datos se recolectaron y procesaron como se describió anteriormente.

### **Ejemplo 2 - Comparación de pTau en tauopatías no AD: CARGA vs. UCSF vs. NCRAD vs. CTRL en comparación con Ovillos**

**175** La fosforilación en T217 aumenta con amiloide-beta como se informó anteriormente. La fosforilación anormal de tau se definió como valores por encima del corte definido por muestras de participantes en los grupos: amiloide beta negativo (AB-), cognitivamente normal (CN), controles normales de Young (YNC), metástasis cerebral (BM) o control (CTRL)).

**176** Teniendo en cuenta este criterio, la fosforilación anormal de tau se observó en una gran proporción de participantes con degeneración corticobasal (CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), enfermedad de Pick (PiD). Esta tendencia se observa para CBD y PSP en 3 cohortes independientes (UCSF, NCRAD, ovillos). Los valores observados están en el mismo rango que los participantes amiloides positivos sin síntomas clínicos (AB+ CDR0). Además, las mutaciones MAPT N279K, S305S, V337M, 10+16 parecen inducir ptau217 anormal de CSF. R406W como se muestra anteriormente tiene también ptau anormal 217. Por lo tanto, un aumento del ptau217 junto con Abeta 42/40 normal de CSF parece ser útil para identificar participantes con riesgo de tauopatía no AD (**Figura 11**).

**177** La **Figura 12** muestra que ptau181 no es suficientemente sensible para detectar el cambio de la fosforilación de tau en tauopatías no AD. Sin embargo, se observó un ptau181 menor en muestras de TDP. Además, como se muestra en las **Figuras 17-19**, la FTD esporádica (que incluye FTD-tau, FTD-

FUS, FTD-TDP43) tiene una relación de pT181/T181 de CSF disminuida. Por lo tanto, pT181/T181 puede separar la FTD esporádica de otras tauopatías cuando se mide la relación.

**178** Como se muestra en la **Figura 13**, ptau205 está aumentado principalmente en sintomático amiloide positivo (AB+ CDR >0) y AD. N279K, S305S, V337M y R406W pero no 10+16 están anormalmente fosforilados como se encuentran para ptau217. Algunas tauopatías no AD (CBD, PSP y enfermedad de Pick) podrían ser ligeramente más altas que los grupos de control, pero este sitio probablemente sería menos sensible que ptau217.

**179** pTau208 se asocia con ptau217 en la cohorte CARGA pero parece ser relativamente menor en AD en comparación con lo que se observó para ptau217. N279K, S305S, V337M y R406W pero no 10+16 están anormalmente fosforilados. Algunas tauopatías no AD (CBD, PSP y enfermedad de Pick) podrían ser ligeramente más altas que los grupos de control, pero este sitio probablemente sería menos sensible que ptau217 (**Figura 14**).

**180** La **Figura 15** muestra que ptau111 se asocia con ptau217 en la cohorte CARGA pero parece ser relativamente menor en AD en comparación con lo que se observó para ptau217. No se observa fosforilación anormal para tauopatías no AD como CBD, PSP o mutación de MAPT encontradas hiperfosforiladas para ptau217. Esto podría sugerir que ptau111 es realmente específica de AD y podría usarse para diferenciar tauopatías AD de tauopatías no AD que normalmente se fosforilan por ptau217.

**181** Como se muestra en la **Figura 16**, como con ptau111, ptau153 se asocia con ptau217 en la cohorte de CARGA pero parece ser relativamente menor en AD en comparación con lo que se observó para ptau217. No se observa fosforilación anormal para tauopatías no AD como CBD, PSP o mutación *MAPT* encontradas hiperfosforiladas para ptau217. Esto sugiere que ptau153 es realmente específico de AD y podría usarse para diferenciar tauopatías AD de tauopatías no AD que normalmente se fosforilan por ptau217.