

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 552**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06762778 .6**
96 Fecha de presentación: **24.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1910841**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO IN VITRO PARA LA DIAGNOSIS DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.**

30 Prioridad:
01.08.2005 DE 102005036094

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
**B.R.A.H.M.S GMBH
NEUENDORFSTRASSE 25
16761 HENNIGSDORF, DE**

72 Inventor/es:
**BERGMANN, Andreas;
ERNST, Andrea y
HAMPEL, Harald**

74 Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 369 552 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento *in vitro* para la diagnosis de enfermedades neurodegenerativas.

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento *in vitro* para la diagnosis de enfermedades neurodegenerativas, y en particular, de enfermedades de demencia tales como la enfermedad de Alzheimer.

10 **[0002]** Dentro del marco de la presente invención el concepto de “diagnóstico” (o “diagnosis”) se usa como concepto general para determinaciones médicas que según el estado clínico del paciente al que se le efectúa la determinación pueden estar basadas en distintos planteamientos y sirven en particular para la detección y la detección precoz, la determinación del grado de severidad y la valoración evolutiva, y también la valoración evolutiva como acompañamiento a la terapia y la prognosis de la futura evolución de una enfermedad. A este respecto tiene además particular importancia el hecho de que un diagnóstico puede ser también un diagnóstico negativo, en el que en vista de la no detectabilidad de una determinada característica típica de enfermedad, como p. ej. la no determinabilidad de un biomarcador asociado a la enfermedad en cuestión en una muestra de sangre de un paciente, se excluye con fiabilidad la existencia de una determinada enfermedad.

20 **[0003]** Para el diagnóstico negativo son también de gran valor biomarcadores que pueden encontrarse incrementados en varias distintas enfermedades y por consiguiente aún no permiten en solitario y por sí solos diagnóstico positivo alguna de una enfermedad específica; si bien por regla general y cuando se añadan adicionales parámetros clínicos o bioquímicos pueden también ser decisivos para el diagnóstico positivo.

25 **[0004]** Las enfermedades de cuya diagnosis se ocupa la presente invención son enfermedades neurodegenerativas crónicas de etiología no infecciosa que evolucionan más bien lentamente, y son en particular enfermedades de demencia presenil.

30 **[0005]** Se califican de enfermedades de demencia (demencia) en general las enfermedades para las que una característica común es la pérdida de capacidades intelectuales adquiridas, y ante todo de la memoria y del nivel de personalidad normal como consecuencia de lesiones cerebrales. Las enfermedades de demencia son enfermedades de carácter crónico que por regla general evolucionan con relativa lentitud. Si surgen fenómenos de demencia en la mediana edad y antes de la edad avanzada, se les califica de enfermedades de demencia presenil, y entre las mismas se distinguen sobre la base de los síntomas y de las modificaciones cerebrales patológicas que se dan típicamente para las mismas en particular las siguientes enfermedades, o mejor dicho los siguientes grupos de enfermedades:

35 **[0006]** La **demencia de Alzheimer (AD)** (enfermedad de Alzheimer; Morbus Alzheimer) es la enfermedad de demencia neurodegenerativa más frecuente y constituye los 2/3 de todos los casos de demencia. La AD se distingue por tres importantes características patológicas, que por cierto no son detectables con seguridad más que *post mortem*: La formación de placas amiloides y de haces neurofibrilares, así como la pérdida de células nerviosas (para la sinopsis, véase 19; los datos de referencias de la literatura que se dan en la descripción en forma de números se refieren a la lista de referencias de la literatura que se da a continuación de la descripción). Las placas amiloides constan de agregados extraneuronales de la proteína β -amiloide, mientras que los haces de neurofibrillas contienen principalmente proteína tau y neurofilamentos. Se presume que la formación de placas de neurofibrillas es la causa de la necrosis de células nerviosas.

45 **[0007]** Los síntomas más importantes de la AD son los crecientes trastornos de la capacidad de concentración y de la capacidad de razonamiento con irritabilidad relativamente persistente, yendo estos síntomas acompañados de otros trastornos menos específicos que dificultan la delimitación entre la AD y otras formas de demencia.

50 **[0008]** La **demencia con corpúsculos de Lewy** (dementia with lewy-bodies: DLB) es después de la demencia de Alzheimer la segunda causa más común de enfermedad demencial. Neuropatológicamente la DLB está caracterizada por la aparición de los llamados corpúsculos de Lewy en el tronco cerebral y en la corteza. Estos corpúsculos de Lewy constan predominantemente de agregados de la proteína presináptica α (α -sinucleína) y ubiquitina. La patología de los corpúsculos de Lewy puede en distinta medida estar asociada a las modificaciones neuropatológicas típicas del Parkinson y del Alzheimer. Así, también en la DLB se produce la formación de beta-amiloide y de placas seniles, pero no se producen haces de neurofibrillas (para la sinopsis, véase 14). También en el cerebro de pacientes con Morbus Parkinson hay corpúsculos de Lewy, si bien en una distinta distribución.

55 **[0009]** Son síntomas centrales de DLB un trastorno cognitivo progresivo, episodios de confusión mental con un fluctuante estado de atención y de conciencia, el parkinsonismo, y frecuentes caídas y síncope (desmayos de corta duración del tipo de un ataque). La sensibilidad y especificidad de los criterios diagnósticos presentan en todos casos una alta especificidad, pero en parte una muy baja sensibilidad. Esto significa que en la cotidianidad clínica a menudo no se diagnostica la DLB.

- 5 **[0010]** La **demencia frontotemporal (FTD)** se denomina también enfermedad de Pick y supone aproximadamente el 20% de las enfermedades de demencia presenil. La FTD está en parte condicionada genéticamente y se cuenta entre las llamadas tauopatías, que se distinguen por una sobreexpresión o subexpresión de un subtipo de proteína tau o por la expresión de una proteína tau mutada. Neuropatológicamente se produce una atrofia local de la corteza frontal y/o temporal, así como de la sustantia nigra y de los ganglios basales. Esto trae como consecuencia trastornos del habla diversamente pronunciados, una modificación del carácter y excentricidades del comportamiento. En total la FTD es subdiagnosticada con una sensibilidad de un 93% para una especificidad de tan sólo un 23%, representando la AD el diagnóstico erróneo más frecuente.
- 10 **[0011]** Se agrupan bajo el concepto de **demencia vascular (vascular dementia; VAD)** enfermedades en las que es provocada una demencia debido a trastornos de la perfusión en el cerebro. Hay distintos tipos de VAD, de los cuales la demencia con infartos múltiples (MID) y la VAD subcortical (también denominada enfermedad de Binswanger) representan las formas más frecuentes.
- 15 **[0012]** En el caso de la enfermedad de Binswanger se trata de una evolución demencial lentamente progresiva que patológicamente está caracterizada por lesiones cerebrovasculares en la sustancia cerebral blanca. Clínicamente esto redundando en excentricidades del comportamiento tales como agitación, irritabilidad, depresión y euforia, así como en un ligero trastorno de la memoria.
- 20 **[0013]** La demencia con infartos múltiples se produce gradualmente como consecuencia de varias pequeñas apoplejías cerebrales, también llamadas ataques isquémicos transitorios (TIA), que condujeron al perecimiento de tejido cerebral en la corteza y/o en regiones subcorticales. Las apoplejías cerebrales también pueden haber pasado totalmente desapercibidas, siendo la demencia en este caso la primera consecuencia perceptible. En caso de haber una MID, se produce una disminución escalonada de capacidades cognitivas, combinada con severas depresiones, saltos de humor y epilepsia.
- 25 **[0014]** Un diagnóstico de enfermedades de demencia se efectúa hoy en día preponderantemente sobre la base de exámenes neuropsicológicos y de la observación del desarrollo de la enfermedad y de su evolución, recurriendo a criterios de exclusión para determinadas formas de demencia. Estos exámenes dan en muchísimos casos resultados ambiguos que aclaran las cifras anteriormente mencionadas para las formas de demencia subdiagnosticadas o los casos diagnosticados incorrectamente. Naturalmente, las modificaciones del cerebro típicas de enfermedad no pueden constatarse directamente en pacientes vivientes, y los exámenes con aparatos médicos de las funciones cerebrales p. ej. mediante tomografía de rayos X o tomografía de resonancia magnética nuclear son aparatosos y caros.
- 30 **[0015]** Para la diagnosis del Alzheimer publicaron el Instituto Ronald y Nancy Reagan de la Asociación de Alzheimer y el Grupo de Trabajo del NIA (NIA = Instituto Nacional del Envejecimiento) directrices para los criterios que se establecen para un biomarcador ideal para la detección de la AD (7). En el caso ideal el biomarcador debe satisfacer los criterios siguientes:
- 35 1. Debería ser cerebro-específico y detectar una característica fundamental de la neuropatología de estas enfermedades.
 40 2. Debería darse una sensibilidad diagnóstica y una especificidad de al menos un 80%.
 3. La modificación morbo-específica del biomarcador debería manifestarse en un estadio lo más precoz posible de la enfermedad, para poder comenzar con la adopción de adecuadas medidas terapéuticas (9).
- 45 **[0016]** Hasta la fecha no hay sin embargo biomarcador alguno al que pueda recurrirse en la cotidianidad clínica en la sangre o en el líquido cerebroespinal con suficiente seguridad para el diagnóstico precoz y diferencial de la AD y que satisfaga todos los criterios anteriormente mencionados. Actualmente se investigan diversos potenciales candidatos a marcadores, entre los cuales se encuentran marcadores de inflamación tales como la IL-6 y el TNF α , marcadores para el estrés oxidativo tales como la 3-nitrotirosina, así como marcadores que van asociados a características modificaciones patológicas de la AD, tales como el amiloide β , que constituye un componente principal de las placas amiloides, y la proteína tau, que constituye un componente esencial de los haces de neurofibrillas (véase la sinopsis en 7; 26).
- 50 **[0017]** Hay una necesidad actual de suplementarios y válidos métodos de examen que proporcionen hallazgos de laboratorio y se basen en una determinación de sustancias adecuadas como biomarcadores para enfermedades de demencia, y en particular para la demencia de Alzheimer (AD), en muestras de sangre y de plasma y en pacientes en los que exista la sospecha de presencia de una enfermedad de demencia, y en particular de AD, para un diagnóstico positivo y/o para un diagnóstico negativo de exclusión.
- 55 **[0018]** La presente invención aporta un método de examen de este tipo en forma de un procedimiento *in vitro* para la detección, para la determinación del grado de severidad y para la valoración evolutiva y la prognosis de enfermedades neurodegenerativas, con el cual se determina en un fluido biológico de un paciente que padece de una enfermedad neurodegenerativa o en el cual se tiene la sospecha de la existencia de una enfermedad de este tipo la presencia y/o concentración de un péptido parcial de proadrenomedulina fisiológicamente inactivo, y sobre la base de la detectada
- 60

presencia y/o concentración o de la ausencia del determinado péptido parcial se sacan conclusiones con respecto a la existencia, a la evolución y al grado de severidad de la enfermedad neurodegenerativa o con respecto al éxito de una terapia de la enfermedad neurodegenerativa.

5 **[0019]** Se describen en las reivindicaciones dependientes 2 a 10 ventajosos y preferidos perfeccionamientos de un procedimiento según la reivindicación 1.

10 **[0020]** La presente invención está basada en consideraciones de los inventores en el sentido de aplicar para el mejoramiento de la diagnosis de enfermedades de demencia el conocimiento de que las formas conocidas de la demencia presenil que se han aclarado más detalladamente al comienzo van también acompañadas (en distinta medida) de procesos inflamatorios y lesiones endoteliales que se consideran esenciales para el desarrollo, los síntomas y la evolución de enfermedades de demencia, por lo cual las enfermedades neurodegenerativas pueden también considerarse como enfermedades neuroinflamatorias.

15 **[0021]** Así, el Morbus Alzheimer está caracterizado por, entre otras cosas, la aparición de reacciones inflamatorias locales crónicas en el cerebro con participación de distintas proteínas inflamatorias tales como factores de complemento, proteínas de fase aguda y citoquinas proinflamatorias (7, 26).

20 **[0022]** Los procesos inflamatorios desempeñan también un papel en la aparición de demencias vasculares (VAD). Los niveles de TNF α , TGF β , IL-6 y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) están claramente incrementados en los pacientes con VAD (23, 24).

25 **[0023]** También en la DLB parecen desempeñar un papel procesos inflamatorios. Así, en el cerebro de pacientes con DLB está incrementado el número de células microgliales activadas, y en determinadas regiones cerebrales tales como la amígdala y el hipocampo son sobreexpresadas citoquinas proinflamatorias tales como el TNF α .

[0024] Para la aparición de reacciones inflamatorias en el cerebro de pacientes con FTD hay por el contrario tan sólo aisladas indicaciones.

30 **[0025]** Partiendo (I) de la hipótesis de que los procesos neuroinflamatorios que van ligados a enfermedades de demencia conducen a trastornos de la perfusión, y en particular también a trastornos de la microcirculación del cerebro, y (II) de que en tal medida hay una similitud con enfermedades cardiovasculares que van ligadas a trastornos de la perfusión o a trastornos de la microcirculación (4) del tejido cardiaco, así como (III) de hallazgos analíticos que ponen de manifiesto que en tales enfermedades cardiovasculares es detectable una incrementada formación del fuerte vasodilatador adrenomedulina, entre otras cosas, así como finalmente (IV) aprovechando la posibilidad de determinar la formación o la liberación fisiológica de adrenomedulina de manera fiable y de forma clínicamente válida con ayuda de un nuevo tipo de inmunoensayo de la solicitante que mide la concentración de un péptido parcial de proadrenomedulina de la región media (MR-proADM; ID SEC N $^{\circ}$: 2), investigaron los inventores la cuestión de si también en pacientes con enfermedades de demencia, y en particular en pacientes en los que fue diagnosticada con alta probabilidad demencia de Alzheimer (AD) y que por lo demás no padecían de enfermedad alguna conocida ligada a una incrementada producción de adrenomedulina pueden detectarse en el plasma incrementadas concentraciones del péptido parcial de proadrenomedulina de la región media (MR-proADM) anteriormente mencionado.

35
40

45 **[0026]** Los resultados de medición que se describen a continuación en la parte experimental y que fueron obtenidos en muestras de plasma con EDTA (EDTA = ácido etilendiaminotetraacético) de personas normales aparentemente sanas y de pacientes con Alzheimer no dieron una clara correlación diagnósticamente significativa entre las concentraciones halladas para el péptido parcial de proadrenomedulina de la región media (MR-proADM; ID SEC N $^{\circ}$: 2) y la existencia de síntomas de demencia que hubiesen conducido al diagnóstico de "probable Alzheimer".

50 **[0027]** A pesar de que los exámenes se limitaban hasta la fecha a muestras de plasma de pacientes con Alzheimer, los inventores parten de la base de que (posiblemente con distintas típicas gamas de concentraciones) también en otras formas de demencia neuroinflamatorias, y en particular en la demencia vascular (VAD) y en la demencia con corpúsculos de Lewy (DLB), tendrían que ser detectables incrementos de las concentraciones de MR-proADM en plasmas de pacientes. Esta suposición se ve en particular apoyada también por más recientes mediciones de la solicitante para las concentraciones del biomarcador procalcitonina en el fluido cerebroespinal (CSF), que documenta un emparentamiento detectable inmunodiagnósticamente de las enfermedades mencionadas (véase la copia impresa de las piezas de la solicitud distribuida al público DE 10 2005 034 174.8, solicitud del 21.08.2005).

55

60 **[0028]** El procedimiento de determinación para concentraciones de MR-proADM en plasma de pacientes que se aplica para las mediciones que se describen en la parte experimental se basa en un ensayo inmunoluminométrico tipo sándwich no competitivo que se describe más en detalle en la WO 2004/090546 A1 (o EP 1 488 209 A1) de la solicitante, en particular en los párrafos 5 $^{\circ}$ y 6 $^{\circ}$ de la parte experimental, así como en (21). Para completar lo que se expone en la presente solicitud se hace explícitamente referencia a lo que se expone en general sobre la problemática

de la determinación de adrenomedulina en muestras de pacientes y a las aclaraciones sobre la realización de los ensayos en la WO 2004/090546 A1 (no publicada) y en (21).

5 **[0029]** La adrenomedulina (ADM) es una hormona peptídica que consta de 52 aminoácidos y que en su biosíntesis es formada a partir de un péptido precursor más largo de 185 aminoácidos (ID SEC N°: 1). La biosíntesis de la adrenomedulina se produce, como en otras hormonas peptídicas, primeramente como preprohormona en ribosomas ligados a membrana (Golgi). Tras disociación de la secuencia señal N-terminal hidrofóbica que consta de 21 aminoácidos mediante peptidasas señal y plegamiento del propéptido que queda en el lumen del retículo endoplasmático los propéptidos son empaquetados en vesículas en el aparato de Golgi y transportados a la membrana celular (20). Durante el transporte tiene lugar el procesamiento de los propéptidos a hormonas maduras por prohormona convertasas en secuencias de aminoácidos mayormente dibásicas (1). Por medio de diversos estímulos tiene lugar entonces la liberación de los péptidos maduros fisiológicamente activos (hormonas peptídicas) al espacio extracelular y respectivamente al plasma. Tras su liberación, los péptidos maduros activos son habitualmente inactivados con rapidez por proteólisis y/o son retirados del torrente circulatorio por fijación a sus receptores. Por consiguiente, tienen en la mayoría de los casos tan sólo unos cortos tiempos de vida media fisiológicos. Así, se determinó para la ADM un tiempo de vida media de tan sólo 22 minutos en el plasma (15).

20 **[0030]** La adrenomedulina es expresada en altas concentraciones por células endoteliales vasculares (22) en la médula suprarrenal, en el páncreas, en la aurícula del corazón, en los pulmones y en el intestino delgado (10), así como en el cerebro (18). La ADM presenta diversas actividades biológicas (se encuentra una reciente sinopsis en 2). Así, la ADM conduce al descenso de la presión sanguínea, a una incrementada excreción de sodio y a un aumento del flujo sanguíneo renal. La ADM inhibe además la secreción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica) de la hipófisis, así como la secreción de HCl de la mucosa gastrointestinal. La ADM posee además propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

25 **[0031]** El precursor de la ADM preproadrenomedulina (ID SEC N°: 1) contiene además de la propia ADM otros segmentos o péptidos parciales a los que pertenece otro péptido activo, que es el péptido de 20 aminoácidos del extremo N-terminal de la proadrenomedulina (PAMP), que presenta asimismo propiedades hipotensivas, es decir, reductoras de la presión sanguínea (12). Un péptido parcial C-terminal de 33 aminoácidos (aminoácidos 153-185 de la preproADM; véase p. ej. la representación en 21) al que se denomina adrenotensina, que ha sido investigado menos detenidamente, es según los hallazgos efectuados hasta la fecha asimismo vasoactivo (vasoconstrictor).

30 **[0032]** La determinabilidad analítica de la propia ADM se ve mermada por su corto tiempo de vida media, por su acción autocrina y paracrina y además por el enmascaramiento de la hormona por una proteína de unión a ADM (5) y por sus extremas propiedades físicas (adherencia a las superficies vasculares). Por consiguiente no es posible una cuantificación directa, reproducible y fiable y adecuada a efectos rutinarios de la ADM en la sangre de pacientes.

35 **[0033]** Tan sólo la constatación de que hay también en la sangre un fragmento de pro-ADM estable, o sea el ya anteriormente mencionado preproADM 4592 o MR-proADM (ID SEC N°: 2; véanse también la WO 2004/090546 A1 y 21), que es formado en una proporción estequiométrica con respecto a los más importantes de los péptidos pro-ADM activos ADM y PAMP pero es inactivo y estable, con lo cual era posible su cuantificación en forma válida y reproducible mediante inmunoensayo, trajo consigo un innovador progreso para la fiable determinación de la formación y liberación de ADM mediante medición de un biomarcador en sangre y en plasma.

40 **[0034]** Los resultados sobre los que se informa en la presente solicitud, que arrojan un significativo incremento de la concentración mensurable en plasma del MR-proADM en pacientes con Alzheimer, pueden interpretarse como confirmación de la hipótesis de trabajo de que en general en una lesión endotelial o lesión de la microcirculación debida a enfermedad se observa una incrementada producción de ADM, que es mensurable en forma de incrementada concentración de MR-proADM en plasma. En las enfermedades de demencia se trata de un menoscabo de la microcirculación en el cerebro, mientras que en las enfermedades cardiovasculares el afectado es el tejido cardíaco.

45 **[0035]** Los significantes incrementos de las concentraciones de MR-proADM mensurables en plasma detectadas a base de un relativamente pequeño colectivo de 20 pacientes con enfermedades cardiovasculares (insuficiencia cardíaca), que se presentan en la WO 2004/090546, pudieron ser plenamente confirmados en el entretanto en más extensivas investigaciones con un mayor colectivo de 232 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (CHF; también digestive heart failure). Así las concentraciones de MR-proADM mensurables de los pacientes, determinadas con un ensayo tipo sándwich según la WO 2004/090546 con una sensibilidad funcional de ensayo (CV interensayo < 20%) de 0,12 nmoles/l, se correlacionan claramente con la severidad de la respectiva insuficiencia cardíaca. Mientras que la media para las concentraciones en plasma de MR-proADM en personas de control sanas (264 personas) se determinó como de 0,33 ± 0,07 nmoles/l (estando la gama de valores situada entre los 0,10 y los 0,64 nmoles/l), la media para los pacientes con CHF era de 0,8 ± 0,55 nmoles/l y aumentaba con la severidad de la enfermedad (clasificadas según la clasificación de la NVHA en las Clases I, II, III y IV; concentraciones medias de MR-proADM en nmoles/l para la Clase I 0,41 ± 0,15; para la Clase II 0,61 ± 0,31; Para la Clase III, 0,77 ± 0,44; para la Clase IV 1,35 ± 0,77). Un aumento de los valores de MR-proADM demostró ser además un marcador de prognosis con valor diagnóstico para la esperanza de

supervivencia de un paciente con insuficiencia cardiaca (un incremento de los valores de MR-proADM resultó ser un marcador de prognosis para malas probabilidades de supervivencia con una proporción de riesgo (hazard ratio) de 1,181 por cada 0,1 nmoles/l, $p < 0,0001$).

5 **[0036]** Se aclara a continuación más detalladamente la invención a base de resultados de medición y de una figura. La **Figura 1** muestra los resultados de la medición de la concentración de MR-proADM en plasmas con EDTA de personas de control sanas, habiendo sido la evaluación efectuada según dos grupos de edad, y de pacientes con el diagnóstico de "probable demencia de Alzheimer".

10 Parte Experimental

Descripción de los Ensayos

15 **[0037]** La medición del pre-proADM 45-92 de la región media (MR-proADM; ID SEC N°: 2) en el plasma se hizo con un ensayo inmunoluminométrico tipo sándwich en esencia tal como se describe en la parte experimental de la WO 2004/090546 o de la correspondiente EP 1 488 209 A1 o en (21) o (16).

20 **[0038]** Y en concreto se introdujeron en los tubitos recubiertos con el segundo anticuerpo y se incubaron con mezcla (a 170-300 rpm) por espacio de 2 horas a temperatura ambiente 10 μ l de muestra/calibrador y 200 μ l de indicador (primer anticuerpo marcado). Luego se decantó la fase líquida y los tubitos se lavaron cuatro veces con 1 ml de solución de lavado LUMitest (de la B.R.A.H.M.S. Aktiengesellschaft, de Hennigsdorf, Alemania). A continuación de ello se midió la quimioluminiscencia fijada por espacio de 1 seg. por cada tubito con un luminómetro LB952T (de Berthold, de Wildbad, Alemania).

25 **[0039]** En mediciones de control se comprobó que el MR-proADM debía medirse en plasmas con EDTA, puesto que en suero se obtienen valores claramente más bajos que los que se obtienen en plasma con EDTA, y también en plasma con heparina y en plasma con citrato se obtienen valores desviados que harían necesaria otra calibración.

Medición del MR-proADM en el plasma de controles sanos y de pacientes con una probable demencia de Alzheimer

30 **[0040]** Para la determinación de un valor de referencia para la concentración del MR-proADM se efectuó una medición en plasma con EDTA de 264 personas de control sanas que no padecían de enfermedad neurodegenerativa alguna ni de cualquier otra enfermedad detectable (enfermedades cardiovasculares; severa infección o inflamación) y para los cuales es sabido que en los mismos puede medirse un incremento de la ADM o de un péptido parcial proADM. Para el grupo de control se determinó una media de $0,33 \pm 0,07$ nmoles/l (la gama de valores iba desde 0,10 hasta 0,64 nmoles/l) de MR-proADM. En una valoración de las personas de control según grupos de edad se obtuvo para el grupo de edad de los $38,3 \pm 13,9$ años una media de $0,337$ nmoles/l, y para el grupo de edad seleccionado de $69,0 \pm 4,8$ años se obtuvo una media de $0,392$ nmoles/l (véase la Figura 1).

40 **[0041]** Como colectivo de pacientes sirvieron pacientes con fenómenos de demencia, para los cuales se había establecido el diagnóstico de "probable demencia de Alzheimer". Como media para el grupo de pacientes se obtuvo un valor de $0,624$ nmoles/l.

45 **[0042]** Se muestran en la Fig. 1 las concentraciones de MR-proADM medidas en el plasma de controles sanos y de pacientes con una probable demencia de Alzheimer.

50 **[0043]** La concentración de MR-proADM está claramente incrementada en los pacientes con una probable demencia de Alzheimer. Los pacientes con Alzheimer pueden aquí diferenciarse de los controles sanos con una especificidad de un 95% (referida a los controles sanos más jóvenes con una edad de $38,3 \pm 13,9$) y de un 82% (referida a controles sanos agrupados según la edad con una edad de $69,0 \pm 4,9$) y con una sensibilidad de un 89%.

55 **[0044]** Si bien se observa una incrementada producción de ADM, medida como concentración de MR-proADM en plasma, no tan sólo en enfermedades de demencia, sino también en otras enfermedades (sepsis; enfermedades cardiovasculares/insuficiencia cardiaca; si bien éstas son por regla general distinguibles de las enfermedades de demencia de manera sencilla) y el MR-proADM no es por consiguiente un parámetro específico del cerebro, debido a la alta especificidad y sensibilidad en pacientes con AD la determinación de MR-proADM es muy adecuada a efectos de diagnóstico positivo de AD de apoyo y en particular también para el diagnóstico negativo (diagnóstico de exclusión), pudiendo unas concentraciones normales de MR-proADM en el plasma de un paciente excluir con muy alta probabilidad un diagnóstico de AD cuando con respecto a dicho paciente se tenga sospecha de existencia de AD.

Literatura**[0045]**

- 5 1. BEINFELD M. C. (1998). Prohormone and proneuropeptide processing. Recent progress and future challenges. *Endocrine* 8:1-5
2. BELTOWSKI J., JAMROZ A. (2004). Adrenomedullin - what do we know 10 years since its discovery? *Polish Journal of Pharmacology* 56: 5-27
- 10 3. BUNTON D.C., PETRIE M.C., HILLIER C., JOHNSON F., MCMURRAY J.J.V. (2004). The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacology & Therapeutics* 103:179-201
- 15 4. CHU D.Q., SMITH D.M., BRAIN S.D.(2001). Studies of the microvascular effects of adrenomedullin and related peptides. *Peptides* 22:1881-1886
5. ELSASSER T. H., KAHL S., MARTINEZ A., MONTUENGA L. M., PIO R., CUTTITTA F. (1999). Adrenomedullin Binding Protein in the Plasma of Multiple Species: Characterization by Radioligand Blotting. *Endocrinology* 140 (10): 4908-4911
- 20 6. ENDO T. (2001). A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 22:1693-1711
- 25 7. FRANK R. A., GALASKO D., HAMPEL H., HARDY J., DE LEON M. J., MEHTA P. D., ROGERS J., SIEMERS E., TROJANOWSKI J. Q. (2003). Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 24: 521-536
- 30 8. GELDMACHER D. S. (2004). Dementia with Lewy bodies: diagnosis and clinical approach. *Cleveland clinic Journal of Medicine* 71:789-800
- 35 9. GROWDON J. H., SELKOE D. J., ROSES A., TROJANOWSKI J. Q., DAVIES P., APPEL S. et al. [Working Group Advisory Committee].(1998). Consensus report of the Working Group on Biological Markers of Alzheimer's Disease. [Ronald und Nancy Reagan Institute of the Alzheimer's Association and National Institute on Aging Working Group on Biological Biomarkers of Alzheimer's Disease]. *Neurobiology of Aging* 19: 109-116
- 40 10. ICHIKI Y., KITAMURA K., KANGAWA K., KAWAMOTO M., MATSUO H., ETO T. (1994). Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Letters* 338:6-10
- 45 11. KIS B., ABRAHAM C.S., DELI M.A., KOBAYASHI H., WADA A., NIWA M., YAMASHITA H., UETA Y. (2001). Adrenomedullin in the cerebral circulation. *Peptides* 22:1825-1834
12. KITAMURA K., KANGAWA K., ISHIYAMA Y., WASHIMINE H., ICHIKI Y., KAWAMOTO M., MINAMINO N., MATSUO H., ETO T. (1994). Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Letters* 351(1): 35-37
- 50 13. KITAMURA K., KANGAWA K., ETO T. (2002). Adrenomedullin and PAMP: Discovery, Structures, and Cardiovascular Functions. *Microsc. Res. Tech.* 57:3-13.
14. MCKEITH I. G. (2002). Dementia with lewy bodies. *British Journal of Psychiatry* 180: 144-147
- 55 15. MEERAN K., O'SHEA D., UPTON P. D., SMALL C. J., GHATEI M. A., BYFIELD P. H., BLOOM S. R. (1997). Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:95-100
- 60 16. MORGENTHALER N. G., STRUCK J., ALONSO C., BERGMANN A. (2005). Measurement of mid regional proadrenomedullin (MR-proADM) in plasma with an immunoluminometric assay. *Clinical Chemistry* 51:10, 1823-1829
17. M. GARY NICHOLLS, JOHN G. LAINBURY, LYNLEY K. LEWIS, DAVID O. MCGREGOR, A. MARK RICHARDS, RICHARD W. TROUGHTON, TIMOTHY G. YANDLE (2001). Bioactivity of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in man. *Peptides* 22 1745-1732.
18. SATOH F., TAKAHASHI K., MUR-AKAMI O., TOTSUNE K., SONE M., OHNEDA M., ABE K., MIURA Y., HAYASHI Y., SASANO H. (1995). Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma,

ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(5):1750-2

19. SELKOE D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741-766

5 20. STROUD R. M., WALTER P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. *Current Opinion Structure Biology* 9:754-9

10 21. STRUCK J., CHEN T., MORGENTHALER N. G., BERGMANN A. (2004). Identification of an adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. *Peptides* 25: 1369-1372

22. SUGO S., MINAMINO N., KANGAWA K., MIYAMOTO K., KITAMURA K., SAKATA J., ETO T., MATSUO H. (1994). Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 201 (3) :1160-6

15 23. TARKOWSKI E. (2002). Cytokines in dementias. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy* 1: 193-200

24. TARKOWSKI E., LILJEROTH A. M., MINTHON L., TARKOWSKI A., WALLIN A., BLENNOW K. (2003). Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Research Bulletin* 61: 255-260

20 25. TAYLOR M.M., SAMSON W.K. (2001). Adrenomedullin and central cardiovascular regulation. *Peptides* 22: 1803-1807

25 26. TEUNISSEN C. E., DE VENDE J., STEINBUSCH H. W. M., DE BRUIJN C. (2002). Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging* 23:485-508

LISTADO DE SECUENCIAS

[0046]

30 <110> B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft

<120> Porcedimiento in vitro para la diagnosis de enfermedades neurodegenerativas

35 <130> 4657 PCT

<150> DE 10 2005 036 094.7

<151> 2005-08-01

<160> 2

40 <170> Patentin versión 3.2

<210> 1

<211> 185

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 369 552 T3

5 Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
1 5 10 15

Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala Ser Glu Phe Arg Lys
20 25 30

10 Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
35 40 45

15 Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
50 55 60

20 Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
85 90 95

25 Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
100 105 110

30 Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
115 120 125

35 Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Pro Ser Lys Ile Ser Pro Gln
130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
145 150 155 160

40 Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
165 170 175

45 Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
180 185

50 <210> 2
<211> 48
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 2

60 Glu Leu Arg Met Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ala Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala
20 25 30

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para la detección, para determinación del grado de severidad y para la valoración evolutiva y la prognosis de enfermedades neurodegenerativas, **caracterizado por el hecho de que** en un fluido biológico de un paciente que padece de una enfermedad neurodegenerativa o del que se tiene la sospecha de la existencia de una enfermedad de este tipo se determina la presencia y/o la concentración de un péptido parcial de proadrenomedulina fisiológicamente inactivo, y sobre la base de la constatada presencia y/o concentración o de la ausencia del determinado péptido parcial se sacan conclusiones con respecto a la existencia, a la evolución, al grado de severidad o al éxito de una terapia de la enfermedad neurodegenerativa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** el procedimiento de determinación es un procedimiento de determinación inmunodiagnóstico.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** se determina en el plasma de un paciente un péptido parcial de proadrenomedulina de la región media (MR-proADM; ID SEC N°: 2) que presenta los aminoácidos 45-92 de la preadrenomedulina completa (ID SEC N°: 1).
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 o 3, **caracterizado por el hecho de que** el procedimiento de determinación inmunodiagnóstica es un inmunoensayo del tipo sándwich.
- 25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por el hecho de que** la enfermedad neurodegenerativa es una enfermedad de demencia presenil que está seleccionada de entre los miembros de un grupo que consta de la demencia de Alzheimer (AD), la demencia con corpúsculos de Lewy (DLB), la demencia frontotemporal (FTD) y diversas formas de la demencia vascular (VD).
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** se ejecuta dentro del marco de la diagnosis del Alzheimer.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por el hecho de que** se ejecuta dentro del marco de una determinación multiparamétrica en la que se determina al mismo tiempo al menos otro parámetro bioquímico o fisiológico con valor diagnóstico para el respectivo cuadro de enfermedad, y en la que se obtiene un resultado de medición en forma de un conjunto de al menos dos magnitudes de medición, que se valora para el diagnóstico de precisión de la enfermedad neurodegenerativa.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado por el hecho de que** dentro del marco de la determinación multiparamétrica además de la determinación del péptido parcial de proadrenomedulina se determina al menos otro parámetro bioquímico que se selecciona de entre los miembros de los grupos que constan de los mediadores inflamatorios, los componentes del complemento, las citoquinas, las quimioquinas, los coagulantes sanguíneos y los factores fibrinolíticos, las proteínas de fase aguda y los compuestos radicales.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado por el hecho de que** la determinación multiparamétrica se efectúa como determinación simultánea mediante un dispositivo de medición con tecnología de chips o mediante un dispositivo de medición inmunocromatográfica.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por el hecho de que** la evaluación del complejo resultado de medición de la determinación multiparamétrica se hace con ayuda de un programa de ordenador.

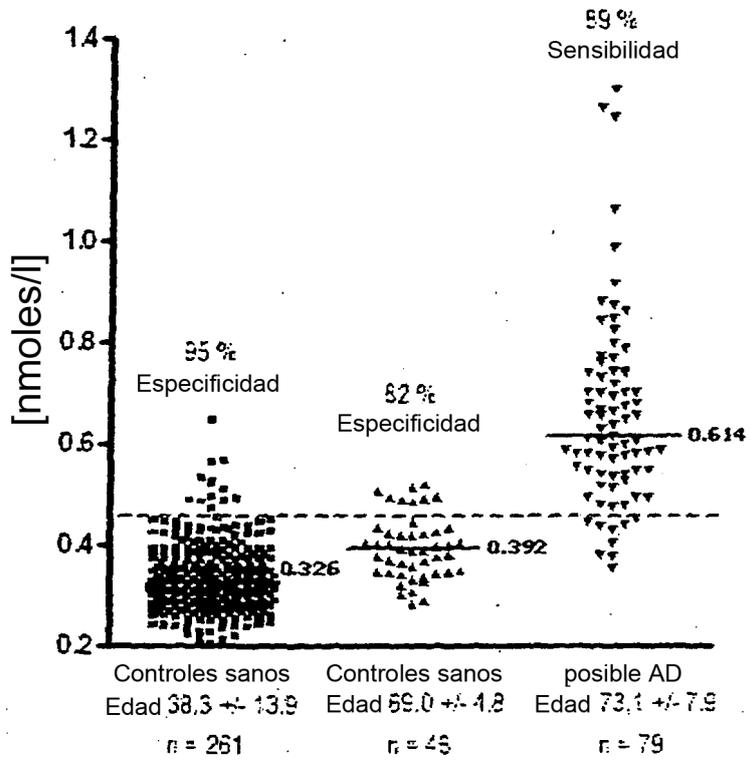


Figura 1