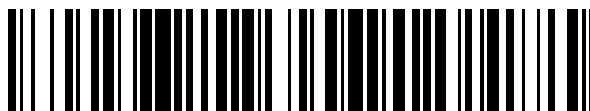


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 491**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04767370 .2**
96 Fecha de presentación: **17.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1639139**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

30 Prioridad:
20.06.2003 FR 0307501

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2011

73 Titular/es:
AVENTIS PHARMA S.A.
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR

72 Inventor/es:
MACE, Sandrine;
RICARD, Sylvain;
COUSIN, Emmanuelle;
PRADIER, Laurent;
BENAVIDES, Jesus y
DELEUZE, Jean-François

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 370 491 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos de detección de la enfermedad de Alzheimer

La presente invención se refiere a métodos de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer. Se refiere igualmente a los equipos de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.

- 5 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a una gran proporción de la población de mayor edad. Esta enfermedad se caracteriza a nivel clínico por la pérdida de las funciones cognitivas, y a nivel neuropatológico por la presencia en el cerebro de depósitos neurofibrilares intracelulares y de depósitos extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) que forma las placas amiloides. Las placas amiloides están compuestas mayoritariamente por péptidos $A\beta$ de 40 ó 42 aminoácidos que se generan por un proceso proteolítico de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP). Los depósitos extracelulares de $A\beta$ son específicos de la enfermedad de Alzheimer. Representan la característica precoz e invariable de todas las formas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo las formas familiares.

- 15 Las formas familiares de la enfermedad aparecen de manera relativamente precoz (entre 40 y 60 años). Parecen ser debidas, al menos en parte, a mutaciones en el gen del APP y en los genes de la presenilina-1 (PS1) y de la presenilina-2 (PS2). Las mutaciones en esos tres genes inducen cambios en la proteólisis del APP, que conduce a una superproducción de $A\beta$ y a la aparición precoz de la patología y de los síntomas que son similares a los de las formas esporádicas de la enfermedad de Alzheimer.

- 20 Una conexión entre el colesterol y la enfermedad de Alzheimer fue establecida igualmente a partir de estudios epidemiológicos y de los resultados de estudios bioquímicos y de biología celular recientes (véase revista Hartmann, T. (2001) TINS 24 : S45-48). Una tasa elevada de colesterol en edad adulta, así como una tensión arterial elevada incrementan significativamente el riesgo de enfermedad de Alzheimer (Kivipelto et al., 2001 Br Med J. 322 : 1447).

Por el contrario, un riesgo muy disminuido se registró en la población bajo tratamiento con los agentes hipocolesterolemiantes de tipo estatinas (Wolozin et al. (2000) Arch Neurol. 57 : 1439; Jick et al. (2000) Lancet 356 : 1627).

- 25 La conexión molecular parece haber sido establecida recientemente. *En vitro* y *en vivo*, una tasa elevada de colesterol aumenta la producción del péptido $A\beta$ y acelera la aparición de placas amiloides (Sparks et al. (1994) Exp. Neurol. 126 : 88-94; Refolo et al. (2000) Neurobiol. Dis. 7 : 321-331; Puglielli et al. (2001) Nat. Cell Biol. 3 : 905; (Shie et al., 2002) Neuroreport 13 : 455), mientras que los inhibidores de la vía de síntesis del colesterol las disminuyen (Simons et al. (1998) PNAS USA 95 : 6460-6464; Fassbender et al. (2001) PNAS USA 98 : 5856 Refolo et al. (2001) Neurobiol. Dis. 8 : 890-899).

- 35 A pesar de los avances significativos, el cuerpo médico está siempre confrontado a la falta de moléculas realmente eficaces contra la enfermedad de Alzheimer. Paleacu et al, Clin. Neuropharm. Vol 25, págs.313-317 (2002) describe especialmente la utilización de un cierto tipo de tratamiento para los síntomas del comportamiento de la enfermedad de Alzheimer. Una de las razones de esta falta reside en la dificultad de encontrar dianas que permitan una selección de alta calidad de moléculas susceptibles de ejercer una acción terapéutica contra esta enfermedad.

Por otra parte, la detección precoz de esta enfermedad resulta determinante con el fin de aportar un tratamiento antes de que se manifiesten los primeros síntomas, altamente invalidantes para los enfermos.

- 40 Además, por el hecho de las variadas formas de esta enfermedad resulta necesario seleccionar el tratamiento en función, por una parte de los individuos a tratar y, por otra parte de la molécula susceptible de ser utilizada para el tratamiento. Esta razón farmacogenómica o farmacogenética resulta cada vez más importante.

La proteína ABCA2 es una proteína perteneciente a la numerosa familia de los transportadores de colesterol de tipo ABC (ATP binding cassette). Este transportador se expresa específicamente en el cerebro.

- 45 La clonación del gen ABCA2 fue descrita en 2000 por Zhao et al (Biochem. J., 350, 865-872). La secuencia es además objeto de la solicitud PCT WO 01/14414, depositada por la sociedad ACTIVEPASS PHARMACEUTICALS. Diversas hipótesis se formulan en esta solicitud en cuanto al papel del ABCA2, pero sin que ningún resultado las llegue a apoyar.

La solicitud de PCT WO 02/064781 cita en cuanto a ella a una conexión entre un transportador ABC y la expresión de la proteína precursora del amiloide.

- 50 Ya han sido identificados diversos polimorfismos del gen ABCA2. Sus secuencias son accesibles particularmente en la base de datos dbSNP del NCBI. El polimorfismo rs908832 está descrito entre los diferentes polimorfismos inscritos en esta base.

Este polimorfismo se caracteriza por un alelo mayoritario en la población caucasiana, que es una guanina localizada en posición 348 en la secuencia SEQ ID N°2 y un alelo minoritario en la población caucasiana que es una adenina localizada en posición 348 en la secuencia SEQ ID N°1.

Alternativamente, este polimorfismo mononucleotídico está representado por las secuencias SEQ ID N°3 y SEQ ID N°4 en parte complementarias respectivamente de las secuencias SEQ ID N°1 y SEQ ID N°2. Este polimorfismo se caracteriza ahora por un alelo mayoritario en la población caucasiana, que es una citosina localizada en posición 201 en la secuencia SEQ ID N°4 y un alelo minoritario en la población caucasiana que es una timidina localizada en posición 201 en la secuencia SEQ ID N°3.

Este polimorfismo es sinónimo, es decir que no modifica la secuencia de la proteína traducida. Los dos alelos del polimorfismo forman parte de los codones que codifican para un ácido aspártico. Este polimorfismo codificante está localizado en el exón 14 del transcrito que presenta la secuencia EQ ID N°5 en posición 2185.

De manera sorprendente, la solicitante ha puesto de manifiesto que los individuos que presentan el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 tienen un riesgo acrecentado de desarrollar precozmente la enfermedad de Alzheimer.

Este descubrimiento es particularmente importante puesto que aporta por primera vez, con conocimiento de la solicitante, la prueba de una conexión entre la proteína ABCA2 y, en particular, un polimorfismo del gen codificante para esta proteína, y un estado patológico tal como la enfermedad de Alzheimer.

Permite confirmar y/o pronosticar la gravedad de la afección en los pacientes para los cuales ya fue diagnosticada la enfermedad de Alzheimer, así como la eficacia probable de los tratamientos previstos, o también pronosticar los riesgos de aparición de la enfermedad en caso de individuos que no presentan síntomas de la enfermedad de Alzheimer incluyendo los individuos emparentados con los pacientes cuyo diagnóstico ha sido confirmado.

Permite, además, confirmar un mayor papel funcional de ABCA2 en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, justificando la realización de ensayos de selección de moléculas susceptibles de ejercer una acción estimulante o inhibidora sobre la actividad de ABCA2 con vistas a la aplicación terapéutica contra la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención tiene así como primer objeto un método de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo. Este método comprende al menos una etapa de detección de la presencia del polimorfismo rs908832.

Individuos apropiados pueden ser, por ejemplo:

- las personas que no presentan síntomas de la enfermedad de Alzheimer,
- las personas en las cuales el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer ya ha sido detectado, pero que no presentan todavía los síntomas de la enfermedad, y
- las personas que previamente han sido diagnosticadas como estar afectadas por la enfermedad de Alzheimer, para las cuales es deseable una confirmación del diagnóstico.

La o las etapas de detección, simultáneas o no, de la presencia o de la ausencia del alelo minoritario del polimorfismo rs908832 se efectúan directa o indirectamente por cualquier medio adecuado a partir de muestras biológicas.

Por tanto, la presente invención se refiere igualmente a un método de selección de muestras biológicas tomadas de los individuos que especialmente no presentan síntomas de la enfermedad de Alzheimer, para detectar a los individuos muy susceptibles de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Una selección de este tipo comprende la búsqueda, de manera simultánea o no, en dichas muestras biológicas, de la presencia del alelo minoritario del polimorfismo rs908832.

Estas muestras que contienen los ADN o las proteínas a identificar pueden ser de diversos orígenes. Se puede tratar, por ejemplo, de muestras de sangre, de esperma, de cabellos (con sus raíces) o de cualquier otra muestra que contenga células nucleadas. De preferencia, las muestras biológicas analizadas son muestras de sangre. En este caso, el ADN a identificar se toma en los leucocitos.

En el sentido de la presente invención, se entiende por «muestra biológica» las muestras directamente procedentes del individuo que desea un diagnóstico o un pronóstico sin otra transformación, o muestras que hayan sufrido una o varias etapas de preparación de manera a no conservar de ellas más que una fracción útil para las etapas de detección, por ejemplo un extracto celular bruto.

Las técnicas que permiten detectar o identificar la presencia o ausencia de los ADN que portan el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 pueden ser combinaciones de las técnicas de Reacción de Polimerización en Cadena («PCR»), de hibridación, de transferencia de Southern, de digestión por nucleasas, de Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción («RFLP»), y/o de secuenciación directa de los productos de la PCR. Todas estas técnicas son conocidas por el experto en la materia.

De manera general, todas las técnicas de identificación de los ADN que portan el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 que pueden ser empleadas en el marco de la presente invención comprenden una etapa previa de recogida de la o las muestras biológicas que contienen los ADN a identificar y una etapa de extracción del ADN genómico según las técnicas estándar bien conocidas por el experto en la materia, por ejemplo según el método de Smith et al. (The Lancet, 1992, 339, pp. 1375-7).

Un método de identificación de este tipo puede comprender:

a) la extracción del ADN de dicho individuo,

b) la amplificación de dicho ADN aislado con ayuda de cebadores capaces de amplificar las secuencias correspondientes a cada uno de los alelos del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2, y

c) la determinación de al menos uno de los alelos del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 en el ADN amplificado.

Según un modo de ejecución ventajoso, se utiliza la técnica del PCR. Así, la etapa b) comprende ventajosamente una etapa de reacción de polimerización en cadena. Esta técnica consiste primeramente en sintetizar los oligonucleótidos complementarios de la secuencia de las regiones que delimitan el segmento de ADN a amplificar (cebadores). Estos oligonucleótidos sirven de cebadores a la DNA polimerasa. Después se emprenden las etapas de desnaturalización por calor (92-95°C) para separar las dos hebras de ADN, de hibridación con los dos cebadores específicos gracias a una disminución de la temperatura (50-55°C) y de extensión de los cebadores con una DNA polimerasa a 70-72°C.

Estos cebadores, que permiten la amplificación de cada uno de los alelos del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 y, en particular, del alelo minoritario, así como sus secuencias complementarias, constituyen otros objetos de la presente solicitud. Ventajosamente, éstos presentan secuencias respectivas tales como el número de bases entre sus respectivos puntos de hibridación sobre la molécula de ADN, el cual está comprendido entre 25 y 2500 pares de bases y, preferentemente, entre 100 y 500 pares de bases.

Ventajosamente, estos cebadores presentan entre aproximadamente 15 y 30 nucleótidos contiguos de la secuencia SEQ ID N°3 o de la secuencia SEQ ID N°4. De manera preferente, se trata de un par de cebadores que presentan las secuencias SEQ ID N°6 y SEQ ID N°7.

Según un modo de ejecución ventajoso, la presente solicitud tiene por objeto un método caracterizado porque el ADN amplificado que porta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 se distingue del ADN amplificado que no porta este alelo por hibridación específica de dos sondas, cada una de las cuales es específica de una de las dos formas del polimorfismo. Estas sondas, así como sus secuencias complementarias constituyen otros objetos de la presente solicitud.

Ventajosamente, estas sondas están constituidas respectivamente por aproximadamente 12 a 17 nucleótidos contiguos de la secuencia SEQ ID N°3 ó SEQ ID N°4. De manera preferente, éstas presentan respectivamente las secuencias SEQ ID N°8 y SEQ ID N°9.

El ADN amplificado que porta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 se puede distinguir también del ADN amplificado que no porta este alelo por la técnica que utiliza la actividad 5-nucleasa de la ADN polimerasa I (TaqMan).

Según un modo de ejecución ventajoso, la presente solicitud tiene por objeto un método caracterizado porque el ADN amplificado que porta el polimorfismo rs908832 se distingue del ADN amplificado que no porta este polimorfismo por análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). Ventajosamente, los fragmentos de restricción fueron obtenidos por digestión del ADN amplificado con ayuda de una enzima de restricción antes de la migración en gel de agarosa, transferido sobre membrana por la técnica de Southern e hibridación.

Para obtener a la vez una mayor sensibilidad y una mejor especificidad, es igualmente posible efectuar dos PCR sucesivos utilizando dos pares de cebadores diferentes (« nested PCR »): un primer par de cebadores externos que permite obtener un fragmento de ADN amplificado como en PCR clásico y un segundo par de cebadores internos para amplificar el fragmento de ADN obtenido del primer PCR.

Con el fin de determinar la huella genética de la región deseada, los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se pueden separar igualmente por electroforesis según su tamaño y visualizar gracias al BET (bromuro de etidio) y a los rayos ultravioleta.

Una posibilidad particularmente interesante en el presente caso consiste en efectuar una PCR con un primer cebador que tenga en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos mutada, y un segundo cebador que tenga en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos salvaje. La diferencia de temperatura de desnaturalización en estos dos casos y, por consiguiente, de eficacia de la amplificación, permite distinguir el ADN mutante del ADN salvaje.

Según otra alternativa, los fragmentos de ADN amplificados se identifican directamente por transferencia en punto (técnica de Dot Blot) que consiste en depositar una muestra de los fragmentos de ADN producidos por la PCR sobre un filtro de nilón, en efectuar la desnaturalización de los fragmentos de ADN, su hibridación con una sonda específica radiactiva y un lavado para eliminar el exceso de producto radiactivo no fijado, seguido de un autoradiograma. El relevado se puede hacer igualmente por otros medios gracias al empleo de sondas específicas que portan un marcador distinto al radiactivo, por ejemplo un colorante o también un marcador fluorescente.

Según otra alternativa, es igualmente posible detectar la presencia o ausencia de mutaciones de los ADN que comprenden el polimorfismo rs908832 por secuenciación directa de todo o parte de los fragmentos de ADN amplificados. Un procedimiento de este tipo consiste en determinar la secuencia nucleotídica a nivel del polimorfismo rs908832. La secuenciación se puede efectuar por cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo por el método de Sanger o bien por el método de Maxam y Gilbert.

Según otra alternativa, la detección de la presencia o ausencia de los ADN que portan el polimorfismo rs908832 se puede efectuar utilizando la técnica de transferencia de Southern (Southern Blotting) que consiste en efectuar una electroforesis de los fragmentos de ADN obtenidos después de un ataque por una o varias enzimas de restricción. El gel se desnaturaliza a continuación y se realiza una transferencia sobre una membrana de nilón. Esta membrana está destinada a ser hibridada con una sonda específica. Después del lavado para eliminar el exceso de producto radiactivo no fijado, la película se aplica sobre la membrana. Así, es posible descubrir una o varias bandas que correspondan a los fragmentos de ADN reconocidos por la sonda.

Es igualmente posible utilizar la técnica de la RFLP asociada a la técnica de Southern Blotting y/o de PCR para detectar la presencia o ausencia del polimorfismo rs908832. La RFLP permite comparar los ADN de diferentes individuos e investigar si se han producido mutaciones puntuales que hacen aparecer o desaparecer los sitios de restricción. Dos ADN de secuencia idéntica tratados con enzimas de restricción darán fragmentos idénticos, y los Southern Blot obtenidos con estos fragmentos serán por tanto idénticos. Por el contrario, si un sitio de restricción ha desaparecido o bien ha aparecido a continuación de una mutación, los fragmentos no tendrán ya tamaños idénticos, lo que será visible en los autoradiogramas. Ocurre lo mismo si un nuevo sitio de restricción aparece a continuación de una mutación.

También es posible detectar el polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 determinando el nucleótido en posición 2185 del transcrito que codifica para la proteína ABCA2.

Todas las técnicas descritas anteriormente son bien conocidas por el experto en la materia. Se puede emplear cualquier otra técnica conocida e igualmente apropiada para la detección de la presencia o ausencia del polimorfismo rs908832. A este efecto, se pueden citar por ejemplo las técnicas de «Ligase Chain Reaction», «Strand Displacement Amplification», « Transcription-based Amplification » etc... De manera ventajosa, dichas etapas de detección se efectúan por PCR, RFLP, Southern Blotting y/o una combinación de estas técnicas, conforme a los métodos descritos en la bibliografía (véanse por ejemplo : Gough et al., Nature, 1990, 347, p.773 ; Kagimoto et al., J. Biol. Chem., 1990, 265, p. 17209; Wolf et al., The Lancet, 1990, 336, p. 1452; Hayashi et al., Nucleic Acids Res., 1991, 19, p.4797; Daly et al., Pharmacogenetics, 1991, 1, p. 33; Spurr et al., Methods Enzymol., 1991, 206, p. 149; Armstrong et al., The Lancet, 1992, 339, p. 1017; Kurth et al., Am. J. of Med. Genet., 1993, 48, p. 166; McCann et al., J. Neurol. Sci., 1997, 153, p. 50; Stroomborgen et al., Hum. & Exper. 1999, 18, p. 141).

Todos estos métodos de detección son particularmente útiles puesto que constituyen la base que permite determinar si un individuo puede ser afectado por la enfermedad de Alzheimer o bien presenta un riesgo acrecentado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer.

Así, otro objeto de la invención se refiere a un método de análisis de muestras biológicas tomadas de un individuo, el cual consiste en:

a) determinar el genotipo para el gen ABCA2 de dicho individuo, y

b) convertir los datos obtenidos en a) con el fin de pronosticar el riesgo de dicho individuo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer y la eficacia de los tratamientos terapéuticos previstos para esta enfermedad.

También se describen equipos o estuches de diagnóstico o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer para un individuo.

Tales estuches se pueden presentar en formas de un embalaje con compartimentos, de manera a recibir diferentes recipientes tales como, por ejemplo, ampollas o tubos. Cada uno de estos recipientes comprende los diferentes elementos necesarios para efectuar la detección de la presencia o ausencia del ADN que porta el polimorfismo rs908832.

Dichos elementos que permiten realizar la o las detecciones se eligen entre los descritos anteriormente. Se puede tratar, por ejemplo :

- de un par de cebadores que hibridan una región definida del gen ABCA2 y eventualmente los medios necesarios para la realización de una reacción de amplificación, o
- de sondas oligonucleotídicas, eventualmente inmovilizadas sobre un soporte y que comprenden un marcador detectable y, eventualmente, los reactivos necesarios para la realización de una reacción de hibridación.

La presente invención se refiere, además, a un animal transgénico no humano, en el genoma del cual se ha insertado al menos una secuencia de ADN exógeno que porta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832, de tal manera que la función del gen ABCA2 se ha modificado.

Por animal transgénico se entiende cualquier animal no humano que presenta una modificación artificial de su genoma. La modificación del genoma puede resultar de una alteración o de una modificación de uno o varios genes por « knock-in » o por « knock-out » (inactivación/modificación de genes por recombinación homóloga) o la superexpresión del gen humano bajo el control de promotores específicos de los tipos celulares neuronales (tal como Thyl, PDGF o prión) o glial (tal como GFAP) en el ratón. Esta modificación puede ser debida a la acción de agentes alterantes o de mutagénesis clásicas o bien efectuada por inserción estable de un casete de expresión que permita la expresión de un gen híbrido. En particular, se puede operar por ejemplo según métodos idénticos o análogos a los descritos en las solicitudes WO 01/02552 o también WO 01/13176.

La modificación del genoma puede resultar igualmente de una inserción de un gen o de genes o del reemplazamiento de un gen o de genes en su forma salvaje o mutada.

Las modificaciones se efectúan ventajosamente en células madre reproductoras.

Actualmente, la modificación del genoma utilizando la tecnología « knock-in » y « knock-out » está limitada al ratón como modelo por el hecho de que sólo son disponibles las células madre (denominadas células « ES »), las cuales tienen la capacidad de colonizar la línea germinal procedente del embrión de ratón. Cuando las líneas celulares ES estén establecidas para otras especies, estas tecnologías podrán ser aplicadas fácilmente por el experto en la materia a esas otras especies para generar modelos KO y/o KI. Además, los enfoques basados en la utilización de oligonucleótidos (ADN, ARN o híbridos) solos o ligados a enzimas que modifican el ADN/ARN se pueden utilizar para introducir una modificación/mutación definida en un lugar predeterminado en el genoma. Se pueden utilizar incluso irradiaciones o mutagénesis químicas, que inducen modificaciones aleatorias en el genoma, si se combinan con un juego eficaz de marcadores biológicos (fenotipo) y con un procedimiento de clonación posicional de elevado rendimiento.

El enfoque más directo para la modificación del genoma de animales de laboratorio (ratones, ratas, vacas, cerdos, ovejas...) es sin embargo la integración aleatoria de transgenes por microinyección de ADN linealizado en uno o dos pronúcleos de ovocitos fertilizados en la etapa de célula única (preferentemente para evitar la generación de animales quiméricos, aunque también se puede emplear la inyección en el estadio de dos o más células). Por regla general, un transgen está compuesto por dos partes: los elementos de regulación que imponen el control espacio-temporal de la expresión del ARN codificado por el ADN, y dicho ADN yuxtapuesto (ADNc o fragmento genómico). Estos dos elementos (el elemento de regulación y el ADN que codifica para la proteína deseada) pueden ser homólogos o bien heterólogos del genoma diana. Los animales transgénicos referidos se eligen, de manera general, entre los mamíferos no humanos. Se puede tratar, por ejemplo, de murinos, a saber ratones, ratas y cobayas, conejos, gatos, perros, ovinos o también bovinos. Preferentemente, se trata de murinos, de ratas o de conejos obtenidos según las técnicas clásicas de transgénesis. Otros objetos de la presente invención son las líneas de células madre y las líneas de células diferenciadas a partir de estas líneas de células madre, en el genoma de las cuales se ha insertado al menos una secuencia de ADN exógeno genómico que porta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832.

Sucintamente, la obtención de los animales transgénicos, de líneas celulares madre y líneas de células diferenciadas según la invención consiste en un procedimiento que emplea la generación de animales transgénicos por inserción por recombinación homóloga de un ADN exógeno genómico que codifica para la proteína ABCA2 en el gen correspondiente del animal (la inserción del transgen es dirigida inmediatamente después del promotor del gen del animal, de manera a imponer el perfil de expresión correcto al transgen e impedir la expresión del gen endógeno del animal: knocked out) o bien por inserción de la mutación específica descrita en la presente invención correspondiente a una isoforma del gen ABCA2 humano en el gen endógeno del animal (la modificación se hace por recombinación homóloga en las células madre: knocked in), o bien por superexpresión del gen ABCA2 que porta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832.

En el caso de los ratones, estos animales se podrán cruzar ventajosamente con ratones transgénicos portadores del gen APP humano enarbolando mutaciones de tipo Alzheimer y que desarrollan las placas amiloides. Los animales transgénicos dobles, así obtenidos, reproducen el genotipo observado en los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer o de riesgo. El control del genotipo del polimorfismo rs908832 del animal recién nacido, así obtenido, se puede efectuar utilizando las técnicas ya descritas anteriormente, utilizando especialmente una reacción de amplificación (PCR) y/o de Southern.

Tales animales transgénicos son particularmente interesantes puesto que proporcionan un modelo ventajoso para la comprensión de la enfermedad de Alzheimer, el cual reproduce muy fielmente las características de la enfermedad de Alzheimer. En comparación con los modelos conocidos, este modelo permite especialmente la identificación de compuestos particularmente adaptados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, especialmente tal como se describe en el ser humano. Estos compuestos pueden ser moléculas químicas, moléculas peptídicas o proteicas, anticuerpos, moléculas quiméricas, así como los ADN antisentido o las ribozimas.

Los compuestos así identificados se pueden utilizar como medicamentos, como tales o en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable con el fin de obtener una composición farmacéutica. Se puede tratar en particular de soluciones salinas (fosfato monosódico, disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, etc., o mezclas de dichas sales), estériles, isotónicas o de composiciones secas, principalmente liofilizadas que, por adición, según el caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de solutos inyectables. Las inyecciones se pueden realizar por vía estereotóxica, tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc.

La identificación de los compuestos descritos anteriormente responde a la puesta en contacto, especialmente por administración de por ejemplo una inyección, del modelo animal de la invención con un compuesto o una mezcla de compuestos que supuestamente ejercen una acción, y medir a continuación el o los efectos de los compuestos especialmente a nivel cerebral del modelo sobre diferentes cambios bioquímicos y/o histológicos.

Además del hecho de poder ensayar *in vivo* los compuestos terapéuticos que permiten prevenir, atenuar o curar la enfermedad de Alzheimer, estos animales transgénicos permiten igualmente disponer de un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer útil para seleccionar los factores medioambientales que inducen o aceleran la patogénesis, o también para estudiar el comportamiento durante el desarrollo de la enfermedad y estudiar los diversos mecanismos biológicos que están implicados, por ejemplo con el fin del estudio de nuevos medicamentos o la determinación de las cantidades eficaces de los medicamentos y de la toxicidad. Así, otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización de un animal transgénico, de líneas de células madre o de líneas de células diferenciadas tales como las definidas anteriormente para ensayar la actividad de compuestos o de métodos destinados a prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer. Otro objeto de la invención se refiere a una célula extraída de animales transgénicos tales como los descritos anteriormente, así como a su utilización para identificar compuestos destinados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La identificación de los compuestos descritos anteriormente responde a la puesta en contacto de células extraídas del modelo animal de la invención con un compuesto o una mezcla de compuestos que supuestamente ejercen una acción, y medir a continuación el o los efectos de los compuestos a nivel de las células enteras, en homogeneizados de células o sobre una fracción subcelular, en cuanto a diferentes parámetros tales como, por ejemplo, la muerte celular.

Además de las disposiciones precedentes, la presente invención comprende igualmente otras características y ventajas que surgirán de los ejemplos y figuras siguientes, y que se deben considerar como ilustrativas de la invención sin limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio del genotipo del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 en una muestra de pacientes

Después de su consentimiento expreso, se utilizó una colección de ADNs procedentes de pacientes de origen caucásico afectados por la enfermedad de Alzheimer y de individuos testigo.

La frecuencia de los polimorfismos fue determinada por genotipado de una muestra de 47 individuos de un panel comercializado por el Institut Coriell (EE.UU).

Diez polimorfismos (entre los cuales el polimorfismo rs908832) fueron seleccionados sobre la base de su localización en el gen y de su frecuencia con el fin de ser genotipados en los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer y en los testigos.

Los genotipos se realizaron por el método del ensayo de la 5' nucleasa (técnica de discriminación alélica de Applied Biosystems, Foster City, EE.UU), después se realizó un ensayo estadístico de tipo Chi² ensayando la asociación de cada uno de estos marcadores con la enfermedad de Alzheimer (ensayo de heterogeneidad). Para el análisis, se distinguieron grupos según la edad de aparición de la enfermedad ((precoz (antes de o a los 65 años) o tardía (después de los 65 años)) y su origen (esporádico (primer caso conocido) o familiar (otros casos ya conocidos en la misma familia)).

Los resultados obtenidos para el polimorfismo rs908832 son los siguientes :

- frecuencia del alelo minoritario (T) en los pacientes (440 genotipos): 7,4

- frecuencia del alelo minoritario (T) en los testigos (519 genotipos): 3,4

Las proporciones de Hardy Weinberg fueron verificadas en los pacientes y en los testigos: no se observa diferencia significativa, lo que confirma que no hay error de genotipado.

5 Resultados de los ensayos efectuados en los pacientes que presentan una forma precoz de la enfermedad (antes de o a los 65 años):

- 136 casos esporádicos frente a 272 testigos:
- ensayo de heterogeneidad: χ^2 (1ddl) = 22,69 $p = 2 \cdot 10^{-6}$
- ensayo alélico (freq(T) frente a freq(C)): χ^2 (1ddl) = 21,27 $p = 4,10^{-6}$
- 104 casos familiares frente a 272 testigos:
- ensayo de heterogeneidad: χ^2 (2ddl) = 7,80 $p = 0,02$
- ensayo alélico (freq(T) frente a freq (C)): χ^2 (1ddl) = 7,27 $p = 7 \cdot 10^{-3}$

10

El odd ratio fue estimado por regresión logística en los 240 pacientes que presentan la forma precoz (ajuste sobre el sexo y el estatuto APOE-ε4). El resultado es igualmente significativo: OR = 3,97 IC = [2,23 - 7,09]

15

Los valores obtenidos siguen siendo significativos (umbral fijado en 0,05) incluso después de la corrección para ensayos múltiples por el método de Bonferroni.

Estos resultados indican que el gen ABCA2 es un gen importante en la etiología de la enfermedad de Alzheimer.

En término de riesgo, este resultado es del mismo orden de magnitud que el riesgo que confiere la poliproteína E4, el factor de riesgo más fuerte conocido hasta hoy día para la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 2: Obtención de ratones transgénicos

20

1. Generación de un ratón transgénico que expresa la proteína humana ABC A2

La mutagénesis del ABCA2 humano se hace por vía de la utilización de un sistema de mutagénesis in vitro tal como el Sculptor™ (Amersham, France). La región codificante del ABCA2 se subclona en un vector de clonación de tipo Bluescript (Stratagène) y las mutaciones se introducen según el protocolo suministrado por el fabricante por vía de la utilización de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. Las secuencias mutadas se han de verificar por análisis de secuencia.

25

2. Generación e identificación de los ratones transgénicos ABCA2

Para la construcción del transgen, el ADN genómico que codifica para el ABCA2 y que presenta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 humano es subclonado en el polienlazador de un vector de expresión transgénico específico de ciertos tejidos/tipos celulares como el THY1 (Lüthi et al., J. Neuroscience, 17, pp. 4688-99), PDGF o prión para los tipos neuronales, o GFAP para los tipos astrocitarios. Para preparar ADN superenrollado se utiliza un estuche de preparación de plásmido (Qiagen). Para la microinyección, las secuencias del vector se han de eliminar por digestión con una enzima de restricción definida, dejando intacta la totalidad del transgen y separándolo de las secuencias inútiles del vector de clonación. A continuación, el fragmento que contiene el casete de expresión se purifica por electroforesis sobre un gel de agarosa.

30

Las partes alícuotas destinadas a la microinyección se dializan contra un tampón TE (10 mM Tris pH 7,4 ; 0,1 mM EDTA) sobre un filtro flotante (Millipore ; tipo de membrana : VS ; 0,025 µm), después se filtran (Spin-X ; Costar ; membrana de poliacetato ; 0,22 µm). El ADN se diluye a la concentración final de 1-2 ng/µl para la microinyección. El fragmento purificado se inyecta en uno de los dos pronúcleos de los ovocitos fertilizados de ratón. Los embriones supervivientes se trasplantan inmediatamente en el oviducto de madres adoptivas (« pseudopreñado »). La presencia del transgen en los recién nacidos se determina o bien por PCR o bien por un análisis en Southem, utilizando sondas / secuencias específicas. Para el conjunto de estos análisis, cualquier reagrupación mayor o deleciones del transgen en los fundadores y su descendencia pueden ser excluidos.

35

40

3. Generación de animales transgénicos que portan la proteína humana ABCA2 en su genoma

Se utiliza la tecnología de recombinación homóloga en las células madre para introducir el gen ABCA2 que presenta el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 humano en la posición predefinida deseada en el gen del ratón. Los cebadores y las muestras descritas en la presente invención se pueden utilizar fácilmente para seleccionar las

45

librerías genómicas isogénicas de ratón (librerías lambda, BAC, YAC ...) con el fin de aislar y clonar el gen correspondiente del ratón. Dicho gen del ratón se caracteriza por su organización genómica y su secuencia utilizando las técnicas estándar conocidos por el experto en la materia (cartografía de los lugares de restricción, secuenciación, herramientas bioanalíticas) con el fin de definir el lugar exacto en donde se debe insertar el ADN humano para obtener el perfil de expresión del ADN humano deseado interrumpiendo definitivamente la expresión del gen murino. Una vez identificada la posición exacta, se construye un vector de orientación estándar para las células madre (es decir un vector que tenga marcadores para la selección de los eventos deseados, siendo todos estos marcadores bien conocidos por el experto en la materia, especialista del dominio). Rápidamente, una casete de selección (gen de resistencia a un antibiótico) se dispone en el límite de los extremos 3' y 5' de los fragmentos del ADN genómico del ratón (2-6 kb) idénticos a las extensiones 3' y 5' de la secuencia del gen murino ABCA2 situado inmediatamente después del sitio de inserción seleccionado.

En base del conocimiento del gen del ratón, se genera un vector de control positivo para la selección de las células madre recombinantes (el vector reproduce el lugar del gen murino una vez lograda la integración) con el fin de optimizar y validar el proceso de selección de alto rendimiento.

Conforme a los procedimientos estándar, el ADN es purificado para los ensayos de orientación. El vector de orientación se introduce en la células madre utilizando técnicas de electroporación estandarizadas, después de lo cual los clones de las células madre se someten a un procedimiento de selección secuencial (antibióticos), de manera a favorecer los clones de las células madre que portan la recombinación deseada. En general, la selección dura aproximadamente 2 semanas. Los clones resistentes de las células madre se seleccionan por PCR y/o Southern.

Los clones de las células madre que tengan la recombinación deseada sin otra modificación detectable en su genoma se desarrollan de manera a obtener suficientes células. Después, dichas células se inyectan en embriones de 3 días y medio, obtenidos de una hembra que haya ovulado normalmente. Los blastocitos supervivientes (que portan las células madre) se implantan en una hembra receptiva que permitirá el desarrollo a término de los blastocitos y dará lugar al nacimiento de ratoncitos recién nacidos compuestos de células procedentes de los blastocitos huésped y de clones de células madre. Este tipo de animal se denomina « animal quimérico ».

Estos quimeros (de preferencia machos puesto que la mayor parte de las líneas de células madre se obtienen de ratones macho) son «desposados » con ratones de tipo salvaje de manera a obtener animales heterocigóticos por modificación. La cría entre sí de animales heterocigóticos permite generar animales homocigóticos.

4. Generación de animales transgénicos que portan el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 humano en su gen correspondiente

De la misma manera que se ha descrito anteriormente, el gen murino se aísla y se caracteriza. Para este tipo de modificación, es esencial comparar el gen humano y el gen murino de manera a identificar la posición exacta en el cual el punto de mutación encontrado en el hombre debe ser introducido en el gen murino. En esta etapa es esencial un bioanálisis. Por último, el vector de orientación se elabora y se ajusta de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Después de conseguir la recombinación homóloga, en la secuencia codificante del gen murino no ha cambiado nada más que el punto de mutación deseado. Ciertos marcadores de selección pueden permanecer en un intrón, pero en general no tienen influencia alguna sobre la expresión del gen. Si fuera necesario, se pueden eliminar utilizando una segunda generación de vectores de orientación incluyendo los elementos de reconocimiento de una recombinasa. Una vez ajustada la construcción, las etapas son idénticas a las del procedimiento descrito anteriormente.

De manera general, estos ratones transgénicos ABCA2 serán cruzados favorablemente con ratones transgénicos que expresan el gen APP que porta las mutaciones de las formas familiares de la enfermedad de Alzheimer con el fin de favorecer la deposición de las placas amiloides.

5. Neurohistopatología

Preparación del tejido cerebral

Los ratones deben ser anestesiados profundamente (Pentobarbital: 60 mg/ml/kg i.p., Ketamine: 40 mg/ml/kg i.p.) después deben ser perfundidos por vía transcardiaca con suero fisiológico, después formaldehído (4% en PBS). Los cerebros se extraen a continuación, después se fijan posteriormente en la misma solución de fijación durante 24 horas a 4°C. Después de la fijación, los cerebros se separan en hemisferios derecho e izquierdo, después se someten al protocolo clásico de recubrimiento con parafina.

Los hemisferios izquierdos recubiertos con parafina de los ratones transgénicos y no transgénicos, e igualmente los bloques de tejido cerebral humano postmortem (cortex frontal) de individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer y de un individuo de control se cortan a 6 µm de espesor (cortes en serie), mediante la utilización de un

microtomo (LEICA RM 2155, France). Los bloques de tejido correspondientes a los hemiserebros derechos de los ratones transgénicos y no transgénicos se cortan a un espesor de 25 µm.

La inmunoreactividad contra el péptido amiloide Aβ se detectará como se describe normalmente por el experto en la materia.

5	<110> AVENTIS PHARMA S.A.	
	<120> MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE 'ALZHEIMER	
	<130> PRJ03027	
	<160> 9	
	<170> Patente en versión 3.1	
10	<210> 1	
	<211> 562	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	ttcatcacct gcgggtgggc caggggcttg gggcaggccc cggggaggac gccgccctc	60
	cctgccagcc cgcgcctcca gggagagtcc cggcccgcgc acctcctga gccggtgctc	120
	cttctccgcc acgatgtgct ggatgggtcat ggccacggag tagaccagc agatcacat	180
	gcacagcggc atcatgtgct caatgacaaa caggaagctg cggggaggcc gcgctcaggc	240
	gccactcagc cccagcccca gcccagccc cgggcgcca gactcactc atcgctgtg	300
	tagcaggggt aggggaacat ctgcacgtag ctgcctggct ccaccacatc gtgccccaca	360
	aaagtgtcga tgatggcgcg ctccatcatg tctgtgggtg ggggcagcca tcaggtgccg	420
	ggcaggccct ctgctcctca cacctgtcct ccccatgaa tcctccagcc ggtcttccgg	480
	gcctgtcct caccctggat ccagacgaag ccgtagagga agtagaagcg gccgccagta	540
15	ttggggcccag gccgccagta gg	562
	<210> 2	
	<211> 562	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 2	

ES 2 370 491 T3

t t c a t c a c c t g c g g g t g g g c c a g g g g c t t g g g g c a g g c c c c g g g g a g g a c g c c g c c c t c	60
c c t g c c a g c c c g c g c c t c c a g g g a g a g t c c c g g c c c g c g c a c c t c c t t g a g c c g g t g c t c	120
c t t c t c c g c c a c g a t g t g c t g g a t g g t c a t g g c c a c g g a g t a g a c c c a g g a g a t c a c c a t	180
g c a c a g c g g c a t c a t g t g c t c a a t g a c a a a c a g g a a g c t g c g g g g a g g c c g c g c t c a g g c	240
g c c a c t c a g c c c c a g c c c c a g c c c c a g c c c c g g g c g c c c a g c a c t c a c t c a t c g c g t g t g	300
t a g c a g g g g t a g g g g a a c a t c t g c a c g t a g c t g c c t g g c t c c a c c a c g t c g t g c c c c a c a	360
a a a g t g t c g a t g a t g g c g c g c t c c a t c a t g t c t g t g g g t g g g g g c a g c c a t c a g g t g c c g	420
g g c a g g c c c t c t c g t c c t c a c a c c t g t c c t c c c c c a t g a a t c c t c c a g c c g g t c t t c c g g	480
g c c t g c t c c t c a c c c t g g a t c c a g a c g a a g c c g t a g a g g a a g t a g a a g c g g c c g c c a g t a	540
t t g g g c c c a g g c c g c c a g t a g g	562

<210> 3

<211> 400

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

g g g c c c a a t a c t g g c g g c c g c t t c t a c t t c c t c t a c g g c t t c g t c t g g a t c c a g g g t g a g	60
g a g c a g g c c c g g a a g a c c g g c t g g a g g a t t c a t g g g g g a g g a c a g g t g t g a g g a c g a g a g	120
g g c c t g c c c g g c a c c t g a t g g c t g c c c c c a c c c a c a g a c a t g a t g g a g c g c g c c a t c a t c	180
g a c a c t t t t g t g g g g c a c g a t g t g g t g g a g c c a g g c a g c t a c g t g c a g a t g t t c c c c t a c	240
c c c t g c t a c a c a c g c g a t g a g t g a g t g c t g g g c g c c c g g g g c t g g g g c t g g g g c t g g g g c	300
t g a g t g g c g c c t g a g c g c g g c c t c c c c g c a g c t t c c t g t t t g t c a t t g a g c a c a t g a t g c	360
c g c t g t g c a t g g t g a t c t c c t g g g t c t a c t c c g t g g c c a t	400

<210> 4

10

<211> 400

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

g g g c c c a a t a c t g g c g g c c g c t t c t a c t t c c t c t a c g g c t t c g t c t g g a t c c a g g g t g a g	60
g a g c a g g c c c g g a a g a c c g g c t g g a g g a t t c a t g g g g g a g g a c a g g t g t g a g g a c g a g a g	120
g g c c t g c c c g g c a c c t g a t g g c t g c c c c c a c c c a c a g a c a t g a t g g a g c g c g c c a t c a t c	180
g a c a c t t t t g t g g g g c a c g a c g t g g t g g a g c c a g g c a g c t a c g t g c a g a t g t t c c c c t a c	240
c c c t g c t a c a c a c g c g a t g a g t g a g t g c t g g g c g c c c g g g g c t g g g g c t g g g g c t g g g g c	300
t g a g t g g c g c c t g a g c g c g g c c t c c c c g c a g c t t c c t g t t t g t c a t t g a g c a c a t g a t g c	360
c g c t g t g c a t g g t g a t c t c c t g g g t c t a c t c c g t g g c c a t	400

ES 2 370 491 T3

<210> 5

<211> 8154

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 5

ggggcggagc cagcgcggat cgggtcccgg acgcccgagc gcccgcgcc cgcgcgggcg	60
atgcccagcg gcgcggcggg ctgcggggcc cggcggggcg cgcagaggag cgggccgcgg	120
cgctgaggcg gcggagcgtg gcccgcgccat gggcttcctg caccagctgc agctgctget	180
ctggaagaac gtgacgctca aacgccggag cccgtgggtc ctggccttcg agatcttcat	240

ES 2 370 491 T3

```

ccccctggtg ctgttcttta tcctgctggg gctgcgacag aagaagccca ccattctcgt 300
gaaggaagtc cccttctaca cagcggcgcc cctgacgtct gccggcatcc tgctgtcat 360
gcaatcgctg tgcccggaag gccagcgaga cgagttcggc tcctgcagt acgccaactc 420
cacggtcacg cagctgcttg agcgcttga cgcgtggtg gaggaaggca acctgttga 480
cccagcgcg ccagcctgg gctcagagct cgaggcccta cgccagcatc tggaggccct 540
cagtgcgggc cggggcacct cggggagcca cctggacaga tccacagtgt cttccttctc 600
tctggactcg gtggccagaa acccgagga gctctggcgt tcctgcagc aaaacttgtc 660
gctgccaat agcagggccc aagcactctt ggccggcgt gtggaccgc ccgaggtcta 720
ccacctgctc tttggctcct catctgcctt ggattcacag tctggcctcc acaagggtca 780
ggagccctgg agccgcctag ggggcaatcc cctgttccg atggaggagc tgctgtggc 840
tcctgcctc ctggagcagc tcacctgcac gccgggctcg ggggagctgg gccggatcct 900
cactgtgcct gagagtcaga agggagcct gcagggtac cgggatgctg tctgcagtgg 960
gcaggctgct gcgcgtgcca ggcgttctc tgggctgtct gctgagctcc ggaaccagct 1020
ggacgtggcc aaggtctccc agcagctggg cctggatgcc cccaacggct cggactctc 1080
gccacaggcg ccaacccac ggaggtgca ggcgttctg ggggacctgc tggatgcca 1140
gaaggttctg caggatgtgg atgtcctg gcgcctggc ctgctactgc cccaggggtc 1200
ctgcactggc cggaccccg gacccacgc cagtgggtcg ggtggggcg ccaatggcac 1260
tggggcaggg gcagtcagtg gcccacgc caccgtgag gagggcgac cctctgctgc 1320
agcactggc acccggaca cgctgcagg ccagtgtca gccttcgtac agctctggg 1380
cggcctgcag ccatcttgt gtggcaaca ccgcaccatt gaaccgagg cgctggggc 1440
gggcaacatg agctcctgg gcttcacgag caaggagcag cggaacctgg gcctcctcgt 1500
gcacctcatg accagcaacc ccaaaatcct gtacgcgcct gcgggctctg aggtcgaccg 1560
cgtcatctc aaggccaac agacttttgc ttttggggc aacgtgactc actatgcca 1620
ggtctggctc aacatctcgg cggagatccg cagcttctg gagcaggga ggctgcagca 1680
acacctgcgc tggtgcagc agtatgtag agagctgcg ctgcaccccg aggcactgaa 1740
cctgtcactg gatgagctgc cgcggccct gagacaggac aacttctgc tgcccagtgg 1800
catggccctc ctgcagcagc tggataccat tgacaacgc gcctgcggct ggatccagtt 1860
catgtccaag gtgagcgtgg acatcttcaa gggcttccc gacgaggaga gcattgtcaa 1920
ctacaccctc aaccaggcct accaggacaa cgtcactgtt tttgccagt tgatcttcca 1980
gacccggaag gacggctcgc tcccgctca cgtgcactac aagatccgc agaactccag 2040
cttcaccgag aaaaccaac agatccgccc gcctactgg cggcctgggc ccaatactgg 2100

```

ES 2 370 491 T3

cggcgccttc tacttcctct acggtctcgt ctggatccag gacatgatgg agcgcgccat 2160
 catcgacact tttgtggggc acgacgtggt ggagccaggc agctacgtgc agatgttccc 2220
 ctaccctcgc tacacacgcg atgacttcct gtttgcatt gagcacatga tgccgtgtg 2280
 catggtgac tectgggtct actccgtggc catgaccatc cagcacatcg tggcggagaa 2340
 ggagcaccgg ctcaaggagg tgatgaagac catgggcctg aacaacgcgg tgcaactgggt 2400
 ggctcgttc atcacgggt ttgtgcagct gtccatctcc gtgacagcac tcaccgccat 2460
 cctgaagtac ggccaggtgc ttatgcacag ccacgtggtc atcatctggc tcttctggc 2520
 agtctacgcg gtggccacca tcatgttctg cttcctgggtg tctgtgctgt actccaaggc 2580
 caagctggcc tggcctgcg gtggcatcat ctacttcctg agctacgtgc cctacatgta 2640
 cgtggcgatc cgagaggagg tggcgcatga taagatcacg gccttcgaga agtgcatcgc 2700
 gtccctcatg tccacgacgg cctttggtct gggctcctaag tacttcgcgc tgtatgaggt 2760
 ggccggcgtg ggcatccagt ggcacacctt cagccagtcc ccggtggagg gggacgactt 2820
 caacttgctc ctggctgtca ccatgctgat ggtggacgcc gtggtctatg gcatcctcac 2880
 gtggtacatt gaggtgtgc acccaggcat gtacgggtg ccccgccctt ggtacttccc 2940
 actgcagaag tctactggc tgggcagtgg gcggacagaa gcctgggagt ggagctggcc 3000
 gtgggcacgc acccccgc tcaagtgtcat ggaggaggac caggcctgtg ccattggagag 3060
 ccggcgcttt gaggagaccg gtggcatgga ggaggagccc acccacctgc ctctggttgt 3120
 ctgcgtggac aaactcacca aggtctacaa ggacgacaag aagctggccc tgaacaagct 3180
 gagcctgaac ctctacgaga accagggtgt ctccttcttg ggccacaacg gggcgggcaa 3240
 gaccaccacc atgtccatcc tgaccggcct gttccctcca acgtcgggtt ccgccaccat 3300
 ctacgggcac gacatccgca cggagatgga tgagatccgc aagaacctgg gcatgtgccc 3360
 gcagcacaat gtgctctttg accggctcac ggtggaggaa cacctctggt tctactcacg 3420
 gctcaagagc atggctcagg aggagatccg cagagagatg gacaagatga tcgaggacct 3480
 ggagctctcc aacaaacgc actcactggt gcagacattg tcgggtggca tgaagcgcaa 3540
 gctgtccgtg gccatcgct tcgtgggcgg ctctcgcgcc atcatcctgg acgagccac 3600
 ggccggcgtg gaccctacg cgcgcgcgc catctgggac ctcatcctga agtacaagcc 3660
 aggcgcacc atccttctgt ccaccacca catggatgag gctgacctgc ttggggaccg 3720
 cattgccatc atctccatg ggaagctcaa gtgctgcggc tccccgctct tctcaaggg 3780
 cacctatggc gacgggtacc gcctcacgct ggtcaagcgg ccgcccagc cggggggccc 3840
 ccaagagcca gggctggcat ccagccccc aggtcgggcc ccgctgagca gctgctccga 3900

ES 2 370 491 T3

gctccaggtg tcccagttca tccgcaagca tgtggcctcc tgctgctgg tctcagacac 3960
aagcacggag ctctcctaca tctgcccag cgaggccgcc aagaaggggg ctttcgagcg 4020
cctcttcag cacctggagc gcagcctgga tgcactgcac ctcagcagct tcgggctgat 4080
ggacacgacc ctggaggaag tgttctcaa ggtgtcggag gaggatcagt cgctggagaa 4140
cagtgaggcc gatgtgaagg agtccaggaa ggatgtgctc cctggggcgg agggcccggc 4200
gtctggggag ggtcacgctg gcaatctggc ccggtgctcg gagctgaccc agtcgcaggc 4260
atcgctgcag tcggcgctcat ctgtgggctc tgcccgtggc gacgaggag ctggctacac 4320
cgacgtctat ggcgactacc gcccctctt tgataaccca caggaccag acaatgtcag 4380
cctgcaagag gtggaggcag aggcctgtc gagggtcggc cagggcagcc gcaagctgga 4440
cggcggttg ctgaagggtg gccagttcca cgggctgctg gtcaaactgt tccactgcgc 4500
ccgcgcgaac tccaaggcac tcttctccca gatcttctg ccagcctct tcgtctgcgt 4560
ggccatgacc gtggccctgt ccgtcccga gattggtgat ctgccccgc tggctctgtc 4620
accttcccag taccacaact acaccagcc ccgtggcaat ttcattccct acgccaacga 4680
ggagcgccgc gaggaccggtc tgccgtctc gcccgacgc agccccagc agctcgtgag 4740
cacgttcgg ctgccgtcgg ggggtgggtg cacctgcgtg ctcaagtct ccgccaacgg 4800
ctcgtgggg cccacgttga acctgagcag cggggagtc cgctgctgg cggtcgggt 4860
cttcgacagc atgtgtctgg agtccttcac acaggggctg ccactgtcca atttcgtgcc 4920
acccccccc tcgcccgcct catctgact gccagcgtc ccggatgagg acctgcaggc 4980
ctggaacgtc tccttgccgc ccaccgtgg gccagaaatg tggacgtcgg caccctccct 5040
gccgcgctg gtacgggagc ccgtccgtg cacctgctct gcgcagggca cgggtctctc 5100
ctgccccagc agtgtggggc ggcaccgcc ccagatgcgg gtggtcacag gcgacatcct 5160
gaccgacatc accggccaca atgtctctga gtacctgctc ttcacctcg accgttccg 5220
actgcaccgg tatggggcca tcaccttg aaacgtcctg aagtcctcc cagcctcatt 5280
tggcaccagg gccccaccca tgggtcggaa gatcgcggtg cgcagggctg ccaggtttt 5340
ctacaacaac aagggtatc acagcatgcc cacctacctc aacagcctca acaacgccat 5400
cctgcgtgcc aacctgccc agagcaagg caaccggcg gcttacggca tcaccgtcac 5460
caaccacccc atgaataaga ccagcgccag cctctccctg gattacctgc tgcagggcac 5520
ggatgtctc atcgccatct tcatcatcgt ggccatgtcc ttcgtgcgg ccagcttcgt 5580
tgtcttctc gtggccgaga agtccaccaa ggccaagcat ctgcagtttgc tgcagggtg 5640
caaccccatc atctactggc tggcgaacta cgtgtgggac atgctcaact acctgggtccc 5700
cgctacctgc tgtgtcatca tcctgtttgt gttcgacctg ccggcctaca cgtcgccac 5760

caacttcctt ggcgtcctct cctcttctct gctctatggg tggccatca cgcctcat	5820
gtacccggcc tccttctgtt tcgaggtccc cagctccgcc tacgtgttcc tcattgtcat	5880
caatctcttc atcggcatca cgcctaccgt ggcaccttc ctgctacagc tcttcgagca	5940
cgacaaggac ctgaaggttg tcaacagtta cctgaaaagc tgcctcctca ttttcccaa	6000
ctacaacctg ggcacgggc tcattggagt ggcctacaac gactacatca acgagtacta	6060
cggcaagatt ggcagtttg acaagatgaa gtcccgttc gactgggaca ttgtcaccgc	6120
cggactggtg gccatggcgg ttgagggcgt cgtgggcttc ctctgacca tcattgtcca	6180
gtacaacttc ctgcccgggc cacagcgcat gcctgtgtct accaagcctg tggaggatga	6240
tgtggacgtg gccagtgcgc ggcagcgagt gctccgggga gacgcccaga atgacatggt	6300
caagattgag aacctgacca aggtctacaa gtcccggag attggccgta tcctggccgt	6360
tgaccgctg tgctgggtg tgcgtcctgg cagtgcttc gggctcctgg gcgtcaacgg	6420
tgcgggcaag accagcacct tcaagatgct gaccggcgac gagagcacga cggggggcga	6480
ggccttcgtc aatggacaca gcgtgctgaa ggagctgctc cagggtgcagc agagcctcgg	6540
ctactgcccg cagtgtgacg cgtgttctga cagctcacg gcccgggagc acctgcagct	6600
gtacacggcg ctgctgggga tctcctggaa ggacgaggcc cgggtggtga agtgggctct	6660
ggagaagctg gagctgacca agtacgcaga caagccggtt ggcacctaca gcggcggcaa	6720
caagcgggag ctctccacgg ccatcgccct cattgggtac ccagccttca tcttctgga	6780
cagcccccac acaggcatgg accccaaggc ccggcgcttc ctctggaacc tcctcctga	6840
cctcatcaag acagggcgtt cagtgggtgt gacatcacac agcatggagg agtgcgaggc	6900
gctgtgcacg cggctggcca tcattgtgaa cggctgcctg cgggtgcctgg gcagcatcca	6960
gcacctgaag aaccgggttg gagatggcta catgatcacg gtgcggacca agagcagcca	7020
gagtgtgaag gacgtggtgc ggttcttcaa ccgcaacttc ccggaagcca tgctcaagga	7080
gcggcaccac acaaagggtg agtaccagct caagtcggag cacatctcgc tggcccaggt	7140
gttcagcaag atggagcagg tgtctggcgt gctgggcacg gaggactact cggtcagcca	7200
gaccacactg gacaatgtgt tcgtgaactt tgccaagaag cagagtgaca acctggagca	7260
gcaggagacg gagccgcat ccgactgca gtcccctctc ggctgcttgc tcagcctgct	7320
ccggccccgg tctgccccca cggagctccg ggcacttgtg gcagacgagc ccgaggacct	7380
ggacacggag gacgagggcc tcattcagctt cgaggaggag cgggcccagc tgccttcaa	7440
cacggacacg ctctgctgac caccagagc tgggcccagg aggacacgct cactgacca	7500
cccagagctg ggccagggac tcaacaatgg ggacagaagt ccccagtgct ctgccagggc	7560

ES 2 370 491 T3

	ctggagtgga ggttcaggac caaggggctt ctggctctcc agccccctgta ctcggccatg	7620
	ccctgcggtc actgcggttg ccgcccctaa ttgtgccaaa ggctgacctg gcccggtg	7680
	cgtacacctt tgccctgctt tgccttaaag cctcggggtc tgcccgccc ctgcccctg	7740
	cctggcactg ctacccgcc aaggcgacgc cggtggacc aggcactgct ggcctttctc	7800
	ctgcccggcc tcggaaccag cttttctctc ttacgatgaa ggctgatgcc gagagcgggc	7860
	tgtgggcgga gctgggtcag tcccgatattt attttgcttt gagaagaggc tcctctggcc	7920
	ctgctctcct gcagggaggt ggctgtcccg cggaagcca tcagcttggg ccagctggca	7980
	ggcggcagga atggagaagc tgacctgct gccagggcaa ggggccagac ccccccaac	8040
	ccccagctgc catcgctctc ccaccagct tggccccctg ccgcccacc tccctgggag	8100
	ccgggcctgt acatagcgca cagatgtttg ttttaaataa ataaacaaaa tgtc	8154
	<210> 6	
	<211> 16	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	agcgcgcat catga	16
	<210> 7	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	cactcatcgc gtgtgtagca	20
	<210> 8	
15	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
	cacgatgtgg tggag	15
20	<210> 9	
	<211> 14	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 9	
25	cacgacgtgg tgga	14

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo, caracterizado porque comprende al menos una etapa de detección de la presencia del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas etapas de detección se efectúan a partir de muestras biológicas.
3. Método de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo según la reivindicación 2, caracterizado porque dichas muestras biológicas son muestras que contienen células nucleadas.
4. Método de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo según las reivindicaciones 2 o 3, caracterizado porque dichas muestras biológicas son muestras de sangre, de esperma o de cabello.
- 10 5. Método de diagnóstico o de pronóstico de la enfermedad de Alzheimer en un individuo según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas etapas de detección de la presencia o ausencia de los ADN que portan el polimorfismo se efectúan por técnicas de reacción del polimerización en cadena (PCR), de hibridación, de transferencia de membrana por la técnica de Southern, de digestión por nucleasas, de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), o de secuenciación directa, o su combinación.
- 15 6. Método según la reivindicación 5 caracterizado porque comprende:
 - a. la extracción del ADN de dicho individuo a partir de una muestra biológica,
 - b. la amplificación de dicho ADN aislado con ayuda de cebadores capaces de amplificar la secuencia correspondiente al polimorfismo rs908832 del gen ABCA2,
 - 20 c. la determinación de la presencia de al menos uno de los alelos del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 en el ADN amplificado.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque la etapa de amplificación b) comprende una reacción de polimerización en cadena (PCR).
8. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque el ADN amplificado que porta el alelo minoritario T del polimorfismo rs908832 se distingue del ADN amplificado que no porta este alelo por la técnica que utiliza la actividad 5 nucleasa del ADN polimerasa I (TaqMan)
9. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque el ADN amplificado que porta el alelo minoritario T del polimorfismo rs908832 se distingue del ADN amplificado que no porta este polimorfismo por análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).
- 30 10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque los fragmentos de restricción se obtuvieron por digestión del ADN amplificado con ayuda de una enzima de restricción antes de la migración en gel de agarosa, transferencia sobre membrana por la técnica de Southern e hibridación.
11. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la detección de la presencia del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 comprende la determinación del nucleótido en posición 2185 del transcrito codificante para la proteína ABCA2, presentando dicho transcrito la secuencia SEQ ID N° 5.
- 35 12. Animales transgénicos no humanos, de líneas de células madre no humanas y líneas de células diferenciadas a partir de estas líneas de células madre, en el genoma de los cuales se ha insertado al menos una secuencia de ADN exógeno genómico que porta el alelo minoritario "T del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2..
13. Animales transgénicos según la reivindicación 12, caracterizados porque se seleccionan entre los mamíferos no humanos.
- 40 14. Procedimiento de obtención de animales transgénicos, de líneas de células madre y líneas de células diferenciadas a partir de estas líneas de células madre, según una de las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque comprende la generación de animales transgénicos, a excepción de los procedimientos que consisten o comprenden el crecimiento sexuado del conjunto del genoma de los animales, de líneas de células madre y de líneas de células diferenciadas a partir de estas líneas de células madre que comprenden el alelo minoritario del polimorfismo rs908832 del gen ABCA2 humano.
- 45 15. Utilización de animales transgénicos, de líneas de células madre y líneas de células diferenciadas a partir de estas líneas de células madre, según una de las reivindicaciones 12 y 13 para ensayar la actividad de agentes o de métodos destinados a prevenir y/o tratar la enfermedad de Alzheimer.
16. Célula extraída de animales transgénicos tal como se describe en una de las reivindicaciones 12 y 13.
- 50 17. Utilización de una célula según la reivindicación 16, para la identificación de compuestos destinados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.