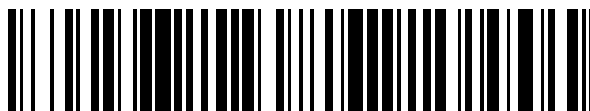


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 048**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06011829 .6**
96 Fecha de presentación: **08.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1865326**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **ANÁLISIS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER BASADO EN LA DETERMINACIÓN DE LA PROPORCIÓN DE PRODUCTOS DE ESCISIÓN AB DE SECRETASA.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.01.2012

73 Titular/es:
**FU BERLIN
KAISERSWERTHERSTRASSE 16-18
14195 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:
**Multhaupt, Gerd y
Münter, Lisa**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 048 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

Análisis para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la determinación de la proporción de productos de escisión A β de secretasa

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) o de una determinada etapa de la enfermedad, que se basa en la determinación de la proporción de al menos dos productos de escisión de la γ -secretasa, A β 48, A β 45, A β 42, A β 38 y A β 35, en el que se determina al menos la proporción de A β 38:A β 42. Una disminución de la proporción de A β 38:A β 42 en comparación con la proporción normal indica la EA.

10 Para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) y para distinguir la EA de otras demencias, se usan diversos procedimientos. Estos procedimientos de diagnóstico comprenden el "barrido" del cerebro mediante tomografía informatizada (CT), generación de imágenes por resonancia magnética (MRI) o tomografía de emisión de positrones (PET) para visualizar las anomalías del cerebro. Otro enfoque de diagnóstico es el minexamen del estado mental (MMSE), que se basa en la evaluación de determinados problemas cognitivos (memoria a corto plazo, memoria a largo plazo, pruebas de repetición) que, por tanto, permite una evaluación diferente de la capacidad del paciente en lo que respecta a la resolución de problemas, la competencia lingüística, etc. Según los neurólogos, geriatras y psiquiatras, quienes están familiarizados con una variedad de demencias, este examen permite obtener un diagnóstico preciso. Así pues, el MMSE constituye la base del diagnóstico actual.

15 Otro procedimiento de diagnóstico adicional se basa en la determinación de compuestos que son característicos de la enfermedad (marcadores bioquímicos, biomarcadores) en fluidos corporales como la sangre, líquidos, orina, etc., en el que se usan pruebas de laboratorio selectivas. Ese enfoque permite la determinación de los cambios en las concentraciones debidos a la enfermedad, incluso en una fase temprana de la enfermedad, cuando los síntomas clínicos pueden ser leves y poco claros. En cualquier caso, este análisis es problemático, pues es necesario determinar bajas concentraciones de marcadores bioquímicos selectivamente para el diagnóstico temprano y para distinguir con exactitud entre la EA y otras demencias. Para aumentar la exactitud del diagnóstico, se usan determinados marcadores bioquímicos como la proteína β -amiloide y la proteína tau. Se ha sugerido que el nivel de tau en el líquido cefalorraquídeo (LCR) refleja la degeneración neuronal y axonal o, posiblemente, la formación de ovillos neurofibrilares. Por consiguiente, tau es considerada como un biomarcador general de una disfunción neuronal (Creutzfeldt-Jacob, EA, etc.). Los niveles de tau aumentan moderadamente en la EA (hay un mayor aumento en la IDC) y en otras enfermedades neurodegenerativas, mientras que la tau con fósforo aumenta mucho en la EA.

20 Actualmente, el amiloide β (A β) se considera el parámetro de diagnóstico más importante, pues este péptido es responsable de las deposiciones extracelulares de tipo placa (amiloidosis) en el cerebro, que es un rasgo característico temprano del curso de la EA. La APP es una proteína de la transmembrana (TM) de tipo 1 que sufre el procesamiento proteolítico realizado por diversas secretasas. En primer lugar, es necesario retirar la carga del ectodominio mediante α - o β -secretasas unidas a la membrana que conducen a las formas secretadas de APP y a los fragmentos C-terminales unidos a la membrana α -CTF o β -CTF, respectivamente. La proteólisis intramembranosa regulada (PIR) de β -CTF realizada por la γ -secretasa sólo tiene lugar tras la retirada del ectodominio, y libera el péptido A β de la membrana. El complejo γ -secretasa activo consiste en cuatro subunidades, presenilina-1 (PS-1), APH-1, PEN-2 y nicastrina. La PS-1 contiene dos residuos aspartato activos catalíticos en los TMS-6 y TMS-7. PS-1 es escindida endoproteolíticamente y se observó la existencia de fragmentos N-terminales y C-terminales en forma de dímeros en el núcleo catalítico de γ -secretasa. Los terminales amino de los cabos de CTF son reconocidos por la nicastrina, que funciona como un receptor del sustrato de la γ -secretasa. La γ -secretasa escinde por sitios variables, generando así péptidos A β de varias longitudes. Los péptidos A β están estrechamente ligados a la EA, pues se acumulan formando placas amiloides.

35 A β 42 es la forma más relevante de las especies de A β desde el punto de vista patológico, pues tiene una mayor tendencia a agregarse y se encuentra a un nivel elevado en los cerebros de pacientes de EA.

40 Un mecanismo recientemente descrito de escisión de la γ -secretasa implica etapas secuenciales de escisión proteolítica para liberar A β . Por consiguiente, el primer corte tiene lugar en el borde citoplasmático del segmento transmembrana (TMS), en el sitio ϵ , i.e., el residuo 49 de β -CTF. El producto A β 49 permanece unido a la membrana y luego se procesa en un modo de acciones secuenciales en A β 46 (sitio ζ) y A β 40 o A β 42 (sitio γ) (Figura 4A). Recientemente, se ha publicado que la proteína Notch es procesada por la γ -secretasa mediante un mecanismo secuencial similar. Previamente, se observó que la APP forma homodímeros, como se ha observado para otros sustratos de γ -secretasa, p.ej., el receptor tirosina quinasa ErbB-4 y E-cadherina. Es probable que la homodimerización de la APP esté mediada por dos sitios diferentes del ectodominio, la región bucle que engloba los residuos 91-111 y un segundo sitio que se solapa con el sitio de unión al colágeno, que abarca los residuos 448-465.

55 En un estudio reciente, se compararon los niveles de A β 40 y A β 42 de pacientes con la EA y de individuos sanos.

Se pudo observar que no había diferencias en ambos grupos en lo que respecta a los niveles de A β 40. Sin embargo, los pacientes de la EA mostraron menores niveles de A β 42. Desafortunadamente, las concentraciones absolutas de A β 42 observadas en diversos pacientes de EA difieren de manera espectacular (individuos con “altas” frente a individuos con “bajas”). Estas variaciones de los valores de las concentraciones absolutas demuestran que los datos obtenidos han sido afectados por diversos factores (estado de la muestra, sistema analítico usado, etc.). Por consiguiente, es casi imposible establecer los valores límite que se requieren para el desarrollo de un análisis de diagnóstico fiable. Además, en el transcurso de la enfermedad de EA esporádica, se pudieron observar varios niveles de amiloide. Por consiguiente, no basta únicamente con la determinación de la concentración de A β 42 para obtener un diagnóstico preciso de la EA. En otras palabras, actualmente, no hay ningún marcador fiable disponible para el diagnóstico de la EA, de una determinada fase de la EA o para el diagnóstico de un riesgo elevado de desarrollar la EA.

(Inserción de página 3a).

Así pues, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar un marcador para el diagnóstico (temprano) fiable de la enfermedad de Alzheimer (EA) o de una determinada fase de dicha enfermedad.

Wiltfang *et al.*, *J. of Neurochemistry*, 81 (2002), p. 481–496 describen patrones muy conservados y específicos de la enfermedad de los péptidos A β truncados carboxiterminalmente 1–37/38/39, además de 1–40/42 en la enfermedad de Alzheimer y en pacientes con neuroinflamación crónica.

Blennow, K., *NeuroRx*, Vol. 1 (2004), pp. 213–225 describen biomarcadores proteicos del líquido cefalorraquídeo para la enfermedad de Alzheimer.

Andreasen *et al.*, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 107 (2005), pp. 165–173 describen biomarcadores del LCR para el deterioro cognitivo leve y la enfermedad de Alzheimer temprana.

Golde *et al.*, *Biochemica and Biophysica Acta* 1502 (2000), pp. 172–187 es un artículo de revisión sobre la detección bioquímica de isoformas A β .

La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Durante los experimentos que conducen a la presente invención, se pudo identificar un motivo GxxxG que media las interacciones entre hélices en el segmento transmembrana de la APP. Este motivo representa un sitio de interacción homofílico exclusivo del CTF del sustrato γ -secretasa y controla el procesamiento en A β mediante escisiones finales de la γ -secretasa. Las mutaciones de este motivo y el posterior análisis de las especies de A β revelaron la generación de cortes consecutivos por los dos conjuntos de escisiones identificados, (I) 49–46–43–40–37–34 y (II) 48–45–42–38–35 (numeración de A β). Cada vez hay más pruebas de que estas especies se generan mediante escisiones consecutivas entre giros de hélice realizadas por la γ -secretasa partiendo del terminal C y avanzando hacia el terminal N del sustrato de β -CTF. Estos descubrimientos tienen un impacto directo en los enfoques de diagnóstico que controlan el progreso de la enfermedad. Por consiguiente, la proporción de A β 38/A β 42 ha de ser un marcador ideal, no sólo para un diagnóstico específico de la EA, sino además para determinar la fase exacta de la enfermedad. Además, se descubrió que la proporción de A β 38/A β 37 de dos líneas de productos podría aumentar la fiabilidad de los sistemas analíticos existentes mediante la inclusión de un segundo punto de lectura de las dos líneas de productos de la actividad γ -secretasa.

En base al enfoque de la FRET, los resultados del presente estudio proporcionan además una prueba convincente de que la APP forma dímeros en células vivas. Teniendo en cuenta que los homodímeros de APP se forman tan temprano como en la ER, los dos sitios de contacto del ectodominio pueden iniciar la interacción. Entonces se alinean las dos cadenas polipeptídicas capturadas y se acoplan en la bicapa lipídica, en la que se hacen más estables mediante motivos GxxxG consecutivos del TMS de la APP. Este motivo proporciona un molde para la dimerización de dos hélices α en un medio hidrófobo. De manera similar a la APP, se describieron otros sustratos de γ -secretasa que tenían un solo motivo GxxxG en su TMS para formar homodímeros de longitud completa, tales como ErbB–4, E–cadherina, Nectina–1 y APLP–1.

El presente trabajo también muestra que esta interacción está mediada fundamentalmente por los residuos de glicina G29 y G33 de los motivos GxxxG, y que establece un papel funcional crucial de los motivos GxxxG en el procesamiento de la APP. Se podría demostrar que los sustratos diméricos (wt: de tipo natural), así como los sustratos principalmente monoméricos, i.e., el mutante de β -CTF G33I, son igualmente bien escindidos por la γ -secretasa. Para los mutantes de GxxxG, se observó un desplazamiento inverso en la generación de A β 42 y A β 38, mientras que el nivel de A β 40 disminuyó específicamente para el mutante de la interrupción de la dimerización G33I.

En base a un modelo recientemente presentado, el procesamiento de la γ -secretasa es un procedimiento continuo que se inicia en el extremo C-terminal del TMS en la posición 49/48, y sigue con las escisiones en la posición 46/45 y 42/40, retirando así la vuelta de hélice por vuelta de hélice. En condiciones normales, el procesamiento de β -CTF

se detiene en buena parte en la etapa 42/40, conduciendo a niveles elevados de A β 42 y A β 40. Según los datos actuales, el modelo de escisión secuencial se amplía mediante la proposición de que esta detención se debe al estado dimérico del sustrato β -CTF y que dos hélices α del sustrato dimérico forman un punto de cruce en los residuos G29 y G33, conduciendo a un impedimento estérico para la γ -secretasa (Figura 5B). La dimerización del TMS de la APP es única en la medida en que se trata del único sustrato de γ -secretasa conocido con un motivo GxxxG por triplicado en el inicio del TMS. Cualquier variación en la fuerza de dimerización del TMS de la APP puede afinar el sitio de escisión preferido real mediante la suspensión del impedimento estérico. Los factores candidatos son fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), de los que se ha publicado que afectan a la generación de diferentes especies de A β como el sulfuro de sulindaco y el flurbiprofeno. De manera similar a los mutantes de GxxxG, en función del AINE analizado, reducen los niveles de A β 42 y aumentan selectivamente la producción de A β 38 o viceversa. Para la mayoría de los AINE, los niveles de A β 40 también permanecen invariables. De este modo, algunos AINE podrían afectar directamente a la fuerza de dimerización del sustrato β -CTF. Sin embargo, también podría ser posible cualquier efecto de los AINE sobre los motivos GxxxG de TMS-7 de PS-1 o TMS-4 o TMS-6 de APH-1 mediante la alteración de la configuración de los sitios activos.

La disminución de la fuerza de dimerización de β -CTF permite que la γ -secretasa prosiga con escisiones hacia las posiciones N-terminales generando A β 38 y A β 37 (Figura 5B). Por lo tanto, los resultados actuales confirman y amplían el modelo presentado recientemente del modelo de escisión de la γ -secretasa, aclarando más detalladamente el principal mecanismo de escisión de esta enzima (Figura 5B). En el caso de la APP, la dimerización del TMS por los residuos G29 y G33 de los motivos GxxxG determina dónde se podría producir el último sitio de escisión de la γ -secretasa y si A β 42 puede dejar la membrana o se producen formas más cortas. Este modelo avanzado predeciría que la γ -secretasa no sólo está implicada en la producción de AICD, sino que además tiene una función en la aclaración de A β mediante la escisión vuelta por vuelta hasta que se liberan formas más hidrófilas de A β de la membrana, tales como A β 38.

En resumen, según las observaciones experimentales del presente estudio, existen dos líneas de productos diferentes de actividades de escisión γ -secretasa, i.e., (I) 49-46-43-40-37-34 y (II) 48-45-42-38-35. Estas especies se generan mediante escisiones independientes de la γ -secretasa, partiendo del terminal C y avanzando hacia el terminal N del sustrato β -CTF. En la EA, los niveles de productos de la primera línea (I) permanecen constantes. Así pues, cualquier proporción entre los productos de escisión de la γ -secretasa de la línea de productos II aportará información sobre la enfermedad y la fase de la enfermedad. Como los niveles de las especies 42 y 38 son los más destacados en comparación con otros de la misma línea, y la γ -secretasa es modulada por la dimerización del sustrato, de modo que A β 42 aumenta en los estados tempranos de la enfermedad, se ha decidido tomar la proporción de A β 38/A β 42 como un marcador.

Finalmente, se puede concluir que una fuerte dimerización del sustrato β -CTF es fundamental en la EA, pues cualquier suceso que establezca la dimerización aumentaría la producción de A β 4, que puede formar fácilmente oligómeros tóxicos. Los compuestos dirigidos a la dimerización del TMS de la APP y que interfieren en el motivo de interacción G₂₉xxxG₃₃ de dos moléculas de sustrato de γ -secretasa pueden ser útiles como agentes terapéuticos para prevenir la generación de A β 42.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: la dimerización de longitud completa de la APP es independiente de los motivos GxxxG

(A) secuencia del TMS de la APP. Los residuos de glicina de los tres motivos GxxxG consecutivos están numerados (recuadro gris). La secuencia introducida en la membrana está marcada por un recuadro amarillo. Los sitios de escisión de la γ -secretasa se indican sobre la secuencia con flechas.

(B) Las imágenes de microscopía confocal de los mutantes APPwt-YFP y APP-YFP muestran las mismas ubicaciones subcelulares; barras: 10 μ m.

(C) Enfoque FRET: Competición de dímeros APPwt fluorescentes con APPwt-Flag (medias \pm E.E.M., n = 4 con 3-6 células cada uno). Como control negativo, APP-YFP wt no interactúa con EGFR-CFP.

(D) Eficiencias de la FRET de la APP de tipo natural (wt) y mutante (medias \pm E.E.M., n = 5 evaluadas por cuadruplicado). Cabe destacar que la eficiencia de la FRET para APPwt en C es inferior a D debido a menores cantidades de plásmidos y, por tanto, a la competición con la APP endógena.

(E) Tiempo transcurrido en la recuperación de la fluorescencia del donante (ΔF_{CFP}) durante el fotoblanqueamiento selectivo del receptor (F_{XPP}). Los datos representan células simples (líneas grises) y la medias (líneas negras) de un grupo de células representativo.

(F) Análisis de regresión lineal de la recuperación del donante (ΔF_{CFP}) frente al fotoblanqueamiento del

receptor (YFP) fraccional. Se representa la media de las células simples de un experimento representativo mostrado en D.

Figura 2: El TMS de la APP forma dímeros a través del motivo G₂₉XXXG₃₃

5 **(A)** Representación de las proteínas quiméricas del sistema ToxR. El TMS objeto de estudio está fusionado entre la proteína de unión a la maltosa (MBP) y el activador de la transcripción de ToxR. Tras la dimerización, los dominios ToxR inician la transcripción del gen lacZ codificante de la β-galactosidasa.

10 **(B)** Análisis de ToxR. Se indican los residuos Aβ analizados 29 a 42 de tipo natural. La actividad β-galactosidasa medida de la secuencia de tipo natural fue fijada en el 100% (media ± E.E.M., n = 4–6). Las mutaciones de la alanina en la posición G29 y, especialmente, en G33, reducen la fuerza de dimerización. La mutación G29/33A potencia los efectos de los mutantes simples, y G33I es muy perjudicial. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto a Aβ_{29–42}wt (*p < 0,01, **p < 1 x 10⁻¹⁵, test t de Student).

15 **(C)** Todas las quimeras complementan la deficiencia de MBP de las células PD28 de *E. coli* y dejan que las células crezcan en medios mínimos, lo que indica una correcta integración de la membrana de las proteínas quiméricas.

Figura 3: Expresión y procesamiento de APP y SPA4CT en líneas celulares SHSY5Y transfectadas establemente

20 **(A)** células transfectadas en APP. Se usó anticuerpo 22C11 para detectar la APP de longitud completa (APP). Se usó anticuerpo WO-2 (residuos Aβ 2–10 del epítipo) para marcar sAPPα (sAPPα) e inmunoprecipitar los fragmentos C-terminales (β-CTF) y Aβ. Se sondó una transferencia Western de sAPPβ con anticuerpo 879 (sAPPβ). Las barras verticales indican los carriles intercambiados para un marcaje uniforme.

(B) Células transfectadas en SPA4CT. Control de la expresión de β-CTF inmunoprecipitado, transferencia Western sondada con anticuerpo WO-2 (β-CTF). Transferencia Western de Aβ inmunoprecipitado sondada con anticuerpo WO-2 (residuos Aβ 2–10 del epítipo).

25 **(C)** Representación esquemática del procesamiento de APP y el constructo SPA4CT. PS: péptido señal (escindido en el retículo endoplasmático); bucle: residuos 91111 de la región del bucle; CBP: residuos 448–465 del sitio de unión al colágeno; Aβ: dominio Aβ, parte del ectodominio de APP y la secuencia transmembrana (TM); las α- y β-secretasas se escinden en el dominio Aβ para generar APP soluble (sAPPct o sAPPβ, respectivamente) y fragmentos C-terminales (α-CTF o β-CTF, respectivamente). La γ-secretasa escinde β-CTF en la membrana y genera Aβ.

Figura 4: La fuerza de dimerización de TMS determina el sitio de escisión de γ-secretasa y la generación de Aβ₄₂

30 **(A, C)** ELISA específicos de Aβ₄₀ y Aβ₄₂ de medios de células SHSY5Y transfectadas establemente en APP y **(B, D)** ELISA específicos de Aβ₄₀ y Aβ₄₂ de medios de células SHSY5Y transfectadas establemente en SPA4C.

35 **(A–D)** Se fijó el tipo natural (wt) como el 100% (medias ± E.E.M., n = 3–6). Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto a wt (*p < 0,01, ** p < 0,00001, test t de Student). Los mutantes de atenuación de la dimerización no afectan a los niveles de Aβ₄₀, pero reducen el nivel de Aβ₄₂ significativamente. La mutación G33I reduce Aβ₄₀, así como los niveles de Aβ₄₂. Los mutantes G37A y G38A no se pudieron analizar mediante ELISA, pues las mutaciones afectaron al epítipo de los anticuerpos monoclonales usados para detectar Aβ₄₀ o Aβ₄₂.

40 **(E)** Espectros de EM-MALDI del Aβ secretado de células transfectadas en G33I de APPwt o APP. La mutación G33I conduce principalmente a Aβ₃₇ y Aβ₃₈ secretado a expensas de Aβ₄₀ o Aβ₄₂.

45 **(F)** ELISA específico de Aβ₃₈ de medios de células SH-SY5Y transfectadas establemente en SPA4CT, el mutante G29/33A se fijó en el 100% (medias ± E.E.M., n = 4). Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto al tipo natural (*p < 0,01, **p < 0,0001, test t de Student). Los niveles de Aβ₃₈ aumentan cuando disminuyen los niveles de Aβ₄₂ de mutantes que atenúan la estabilidad de la dimerización.

Figura 5: Modelo del mecanismo de escisión del TMS de la APP y la γ-secretasa

(A) Modelo molecular informatizado de una configuración de baja energía del TMS de APP con G29 y G33 en la interfase hélice-hélice.

50 **(B)** Mecanismo postulado de escisión de la γ-secretasa en el TMS de APP. La escisión secuencial de la γ-

secretasa avanza del extremo terminal carboxilo al terminal N (sitios indicados por tijeras). El sitio de escisión final se determina mediante la fuerza de interacción de las dos hélices de dos moléculas de APP mediada por los residuos transmembrana G29 y G33. Las escisiones ϵ y ζ tienen lugar independientemente de la forma dimérica o monomérica del sustrato (tijeras verdes). Los dímeros APP-TMS estables constituyen un impedimento estérico para mover la γ -secretasa, de modo que la escisión final se produce detrás del residuo 42/40 y produce A β 42 y A β 40 (tijeras amarillas). Sólo los dímeros y los sustratos monoméricos perturbados permiten que la γ -secretasa se mueva hacia sitios más N-terminales, produciendo A β 38 y A β 37 (tijeras rojas).

La presente invención proporciona, por tanto, un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) o de una fase de la EA, procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con sondas que se unen específicamente con al menos dos productos de escisión de γ -secretasa A β 48, A β 45, A β 42, A β 38 y A β 35; y

(b) determinar las cantidades de dichos productos de escisión en dicha muestra, en la que se determina al menos la proporción A β 38:A β 42, y una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con una proporción normal indica la EA.

La presente invención también proporciona un procedimiento para controlar el progreso de una terapia contra la EA, procedimiento que comprende las siguientes etapas:

(a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con sondas que se unen específicamente con al menos dos productos de escisión de γ -secretasa A β 48, A β 45, A β 42, A β 38 y A β 35; y

(b) determinar las cantidades de dichos productos de escisión en dicha muestra, en la que una proporción normalizada de dichos productos de escisión en comparación con la proporción al inicio de la terapia indica un efecto terapéutico.

La expresión "proporción normal", como se usa en la presente memoria, corresponde a una proporción que se puede encontrar en individuos sanos y que se determina usando los valores medios obtenidos, p.ej., de al menos 10, preferiblemente, de al menos 100 individuos.

Las muestras adecuadas para llevar a cabo el procedimiento de diagnóstico de la invención son líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, suero, plasma u orina, siendo preferidos el LCR y la sangre. La muestra se toma del paciente usando procedimientos rutinarios, p.ej., el LCR se toma mediante punción lumbar.

Según la presente invención, se determinan las cantidades de A β 38 y A β 42 en dicha muestra, en la que una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con la proporción normal indica la EA.

En realizaciones más preferidas de los procedimientos de la invención, se determinan las cantidades de A β 38 y A β 42 en dicha muestra, en la que (i) una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con la proporción normal y una mayor concentración de A β 42 en comparación con la concentración normal indica una etapa temprana de la EA y (ii) una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con la proporción normal y una concentración menor o normal de A β 42 en comparación con la concentración normal indica una etapa tardía de la EA.

En una realización incluso más preferida del procedimiento de diagnóstico de la presente invención, una menor proporción de A β 38:A β 42 significa A β 38:A β 42 \leq 1,5, preferiblemente, \leq 1,2, más preferiblemente, \leq 1,0.

En el procedimiento de la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento que permita la determinación de los niveles de A β 38, A β 42 etc., en una muestra p.ej., análisis inmunológicos, separación por tamaños, p.ej., mediante filtración en gel, análisis de aminoácidos, etc. Se prefieren los análisis inmunológicos y la EM-MALDI.

En una realización incluso más preferida del procedimiento de la presente invención, la determinación de las cantidades de A β 38, A β 42, etc., se lleva a cabo mediante un análisis inmunológico, usando anticuerpos específicos de A β 38, etc., i.e., el anticuerpo anti-A β 38 no reacciona sustancialmente de forma cruzada con A β 42 y viceversa; el anticuerpo anti-A β 42 no reacciona sustancialmente de forma cruzada con hA β 38. Hay anticuerpos adecuados comercialmente disponibles, p.ej., los anticuerpos G2-10 (anti-A β 40) y G2-13 (anti-A β 42) de TGC, Zürich.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se refiere, preferiblemente, a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales mezclados con diferentes especificidades epitópicas, así como a preparaciones de distintos anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fragmentos que contienen antígenos del péptido hA β 42 y hA β 38, respectivamente, mediante procedimientos ampliamente conocidos por los expertos en la técnica (véase, p.ej. Köhler *et al.*, *Nature* 256 (1975), 495). Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" (Ac) o la expresión "anticuerpo monoclonal" (Acm) pretenden incluir moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂)

que son capaces de unirse específicamente a una proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto.

5 En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, se dirige el anticuerpo anti-Aβ38 hacia el terminal C de Aβ38 y el anticuerpo anti-Aβ42 se dirige hacia el terminal C de Aβ42 (véase también la información del producto de G2-13, TGC, Zürich). Preferiblemente, los anticuerpos se unen a un epítipo que sólo está presente en las especies de Aβ que se deseen detectar.

10 El término "epítipo", como se usa en la presente memoria, pretende incluir cualquier determinante responsable de la interacción específica con una molécula de anticuerpo. Los determinantes epitópicos, habitualmente, consisten en grupos superficiales químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

15 Es posible marcar detectablemente las sondas, p.ej., un anticuerpo, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto bioluminescente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico o una enzima (p.ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, malato deshidrogenasa, glucosa oxidasa, ureasa, catalasa, etc.) que, a su vez, cuando posteriormente se expone a un sustrato reaccionará con el sustrato de manera que producirá un resto químico que se podrá detectar. También es posible inmovilizar las sondas sobre un vehículo insoluble, p.ej., vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamida, agarosa y perlas magnéticas.

20 Los ejemplos de inmunoanálisis adecuados para el procedimiento de la presente invención son análisis competitivos o de tipo sándwich, tales como, el análisis de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA), el radioinmunoanálisis (RIA) o transferencias Western. Los marcadores adecuados para los análisis de anticuerpos son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como glucosa oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (¹²⁵I, ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹²In) y tecnecio (^{99m}Tc), y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina.

25 En otra realización preferida más, el procedimiento de la presente invención se lleva a cabo en un formato de ELISA, prefiriéndose aún más un formato de ELISA de tipo sándwich. Los formatos de ELISA y de ELISA de tipo sándwich adecuados son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica.

30 El procedimiento de la presente invención se puede modificar, p.ej., mediante la determinación adicional de la concentración de uno o más biomarcadores adicionales (p.ej., (i) la proporción de Aβ42:Aβ40; (ii) la concentración de Aβ37 o de Aβ90; o (iii) la concentración de tau con fósforo (que presenta una mayor concentración en pacientes de EA), lo que, en ciertos casos, podría mejorar aún más el valor de diagnóstico del procedimiento de la invención.

El procedimiento de la presente invención para controlar el progreso de una terapia contra la EA se puede aplicar a cualquier terapia, p.ej., al tratamiento con un AINE (tal como MPC-7869, R-flurbiprofeno) o una estatina.

35 Para la investigación diagnóstica descrita anteriormente, son útiles los kits. Preferiblemente, tales kits comprenden un anticuerpo anti-Aβ38 y un anticuerpo anti-Aβ42. Los anticuerpos se pueden marcar detectablemente según lo descrito anteriormente y, preferiblemente, permiten el diagnóstico mediante ELISA. Los kits podrían contener anticuerpos que están unidos a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microvaloración de poliestireno o un papel de nitrocelulosa. Alternativamente, dichos kits se basan en un RIA y contienen dichos anticuerpos marcados con un isótopo radiactivo. En una realización preferida del kit de la invención, los anticuerpos están marcados con enzimas, compuestos fluorescentes, compuestos luminiscentes, sondas ferromagnéticas o compuestos radiactivos.

40 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Procedimientos generales

(A) Plasmados y transfecciones

45 Se ha descrito la generación de los plásmidos del sistema ToxR (Langosch *et al.*, *J Mol Biol* 263 (1996), 525-30). Se usaron APP695 con etiqueta Myc N-terminal y etiqueta Flag C-terminal o SPA4CT con etiqueta Flag C-terminal como molde para introducir las mutaciones G25A, G29A, G33A, G29/33A o G33I mediante mutagénesis de sitio dirigida. Los ADNc se insertaron en pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), que contiene un gen de resistencia a la higromicina. Para la expresión estable, se transfectaron los plásmidos (2 µg) en la línea celular SH-SY5Y (número ATCC: CRL-2266) usando transfectina (Bio-Rad, München, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para las mediciones de la FRET, se amplificaron ADNc de APP695 con cebadores que permitían la unión en marco con CFP/YFP en los vectores pcDNA3 (Invitrogen). Todas las secuencias se confirmaron mediante secuenciación didesoxi.

(B) Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

Para la expresión transitoria, se transfectaron los plásmidos (0,75 µg de pcDNA3-APP695-CFP y 1,5 µg de pcDNA3-APP695-YFP) en células BEK293 (número ATCC: CRL1573) usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En los experimentos de FRET de competición, se redujo la cantidad de plásmido a 0,35 µg de pcDNA3-APP695-CFP y 0,75 µg de pcDNA3-APP695-YFP para permitir la adición de hasta 1,5 µg de plásmido codificante del competidor pCEP4-APP o pcDNA3. Las mediciones de FRET se realizaron según lo descrito por Voigt *et al.*, *J Biol Chem* 280 (2005), 5121-7.

(C) Sistema ToxR

Se lisaron células FHK12 de *E. coli* que expresaban constructos quiméricos y se midió la actividad β-galactosidasa (Langosch *et al.*, 1996). Para controlar la correcta inserción de las proteínas de fusión en la membrana interna bacteriana, se expresaron quimeras en células PD28 de *E. coli* deficientes en MBP (Brosig y Langosch, *Protein Sci* 7 (1998), 1052-6). Las quimeras orientadas correctamente complementan la deficiencia en MBP cuando las células se cultivan en medios mínimos M9 con maltosa, como la única fuente de carbono medida mediante las densidades celulares transcurridas 48 h.

(D) ELISA de tipo sándwich, inmunoprecipitación y transferencias Western

Se colocaron sobre placas las células transfectadas de forma estable a una densidad de 2×10^6 células por cada placa de 60 mm. El día después de la división, se añadieron 4 ml de medios recién preparados y se incubaron durante 24 h. Para los ELISA específicos de Aβ40 y Aβ42, se analizaron 50 µl de medios según las instrucciones del fabricante (The Genetics company (TGC), Basel, Suiza). Se aplicó el mismo protocolo para determinar los niveles de Aβ38, a excepción de que se usó el anticuerpo BAP-29 (proporcionado por M. Brockhaus, Roche, Basel, Suiza). Se hizo precipitar Aβ a partir de volúmenes iguales de medios acondicionados con antisuero (generado contra los residuos 1-40). Se analizaron directamente alícuotas de los medios acondicionados para detectar la APP secretada (sAPP). Para la APP de longitud completa, se lisaron las células en un tampón que contenía Tris 50mM, pH 7,4, NaCl 150mM, EDTA 2mM, NP40 al 2% y Triton-X100 al 2%. Para la detección de los fragmentos C-terminales (β-CTF) de las células transfectadas en APP y SPA4C, se trataron las células con inhibidor de γ-secretasa *t*-butiléster de *N*-[*N*-(3,5-difluorofenacetil-L-alanil)]-*S*-fenilglicina (DAPT) durante 24 h, se lisaron y se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteína con un antisuero (contra el dominio citosólico de APP). Se separaron las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SD, se transfirieron a nitrocelulosa y se inmunomarcaron bien con anticuerpo WO-2 contra los residuos Aβ 2-10 o 879 (sAPPβ, proporcionado por P. Paganetti, Novartis, Basel, Suiza) o anticuerpo 22C11 (Roche, Mannheim, Alemania).

(E) EM-MALDI

Se inmunoprecipitó Aβ de los medios acondicionados con WO-2. Se lavó la proteína G-sefarosa en presencia de alta concentración de sal (NaCl 500mM), seguida por PBS y cloruro de amonio 100mM, pH 7,4. Se eluyó Aβ con ácido acético al 50% y se secó al vacío. El análisis de EM-MALDI se llevó a cabo sobre una matriz con ácido sinapínico con UltraflexII TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

(F) Modelización molecular

Para ambas hélices, se generaron cinco configuraciones iniciales no simétricas diferentes con idéntica estructura pero varias configuraciones aleatorias de cadena lateral. Para cada configuración inicial, se generaron 65.000 estructuras mediante rotación aleatoria de la hélice 0-360° alrededor del eje largo; la translación de -2 a +6 Å hacia o desde el centro geométrico, respectivamente, la translación de cada hélice ± 10 Å a lo largo de su eje largo y la inclinación de las hélices con respecto al eje diádico en $\pm 20^\circ$. Se usó una constante dieléctrica de 20 para la electrostática y se creó un mapa de energía. Se muestreó la rotación en depósitos de 36 grados, la inclinación en depósitos de 2,5 grados, el desplazamiento longitudinal en depósitos de 2 Å y el desplazamiento de la translación se muestreó en depósitos de 0,8 Å. Se evaluó la energía media de cada depósito independientemente usando la media de Boltzmann. Se evaluó el mapa de energía gráficamente y se supuso una estructura simétrica, de manera que se despreciaron los mínimos de energía correspondientes a las estructuras asimétricas. Se ha observado un procedimiento relacionado para modelizar de manera fiable los haces de hélices (Gottschalk, *J Mol Graph Model* 23 (2004), 99-110).

Ejemplo 2**Impacto de los motivos GxxxG sobre la homodimerización de APP de longitud completa**

Los estudios bioquímicos ya habían indicado previamente el ectodominio de APP en la homodimerización por dos sitios diferentes, uno ubicado en los aminoácidos 448-465, que se solapa con el sitio de unión al colágeno, y el otro

en la región bucle que engloba los residuos 91–111 (Behr *et al.*, *J Biol Chem* 271 (1996), 1613–20; Scheuermann *et al.*, *J Biol Chem* 276 (2001), 33923–9). Los motivos GxxxG, por tanto, proporcionarían un tercer sitio de contacto de los dímeros de APP. Se usó un enfoque de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para examinar si la dimerización de APP también depende del motivo GxxxG en células vivas. Se fusionaron proteínas fluorescentes de color azul verdoso y amarillo (CFP o YFP) con el terminal C de APP695 de longitud completa de tipo natural (wt) o constructos mutantes G33A, G33I o G29/33A, que están mutados en el motivo GxxxG central. Las proteínas de fusión mostraron patrones de distribución subcelular idénticos en las células HEK293 según lo analizado mediante microscopía confocal (Figura 1B). Para APPwt–YFP y APPwt–CFP, se determinó una eficiencia de la FRET del 11,2%, lo que demuestra por primera vez una proximidad cercana de dos moléculas de APP en células vivas (Figura 1D). Como las señales de la FRET fueron reducidas en función de la concentración tras la coexpresión de APPwt–Flag no fluorescente, se concluyó que las señales de la FRET observadas son específicas (Figura 1C). La especificidad se indica además mediante APP–YFP y la colocalización de EGFR–CFP no relacionado, un miembro de la familia del sustrato de γ -secretasa ErbB–4, que no muestra ninguna eficiencia de la FRET detectable, como se esperaba (Figura 1C). En las figuras 1E y 1F, se muestran las cinéticas de la FRET y el análisis de regresión del fotoblanqueamiento del receptor. Para analizar la influencia de los motivos GxxxG del TMS de la APP, se midieron una homodimerización de APP, las eficiencias de la FRET de G33A de APP, G29/33A de APP y G33I de APP. No se observaron diferencias muy importantes para los mutantes en comparación con wt (Figura 1D). Se concluyó que las mutaciones del motivo GxxxG no influyen en la dimerización de APP en general. Por consiguiente, las interacciones mediadas por GxxxG parecen ser secundarias al inicio de la dimerización a través de los sitios de contacto N–terminales (Behr *et al.*, (1996); Scheuermann *et al.*, (2001)) y podrían afectar a la configuración de TMS dentro de la membrana.

Ejemplo 3

La secuencia transmembrana de la APP se dimeriza a través de los motivos GxxxG

Para analizar selectivamente la capacidad de los motivos GxxxG de la APP como parte del TMS para promover la autointeracción de las hélices, se aplicó el sistema ToxR (Langosh *et al.*, (1996)), un análisis para medir la fuerza homodimerización de un TMS corto en la membrana interna bacteriana. Con este fin, se construyó una proteína de fusión compuesta por proteína de unión a la maltosa (MBP) periplasmática, el TMS objeto de estudio, que está integrado en la membrana interna bacteriana, y el dominio de activación de la transcripción citosólico ToxR (Figura 2A). La dimerización dirigida por el TMS en la membrana conduce a una proximidad cercana de los dominios ToxR, que son capaces de activar la transcripción del gen indicador que codifica la β -galactosidasa sólo en el estado dimerizado. Por tanto, la fuerza de dimerización del TMS objeto de estudio es indicada por la actividad β -galactosidasa. Los residuos del TMS A β 29 a 42 dieron una potente señal similar a la obtenida con los residuos 75 a 87 de la glicoforina A (GpA) (Figura 2B), una autointeracción ampliamente investigada. TMS (Langosch *et al.*, (1996)). La fuerza de dimerización se redujo gradualmente de los constructos mutantes del TMS de A β G29A y G33A a la mutación G29/33A, y fue suprimida por la mutación G33I (Figura 2B). Desafortunadamente, no se puede medir la influencia del residuo yuxtamembranoso G25 mediante este sistema, pues sólo se pueden analizar secuencias del TMS. Debido a que las mutaciones G37A y G38A distales al motivo GxxxG central no produjeron ningún efecto, se concluye que G29 y G33 son los residuos clave de los motivos GxxxG que determinan la asociación del TMS de A β . Las diferencias entre la mutación doble G29/33A y la mutación G33I podrían reflejar directamente las afinidades variables de las dos hélices. Aunque la mutación G29/33A todavía podría permitir que los dos TMS se aproximaran entre sí, podría producirse una unión de van der Waals estabilizadora. Por el contrario, el aminoácido isoleucina ramificado del mutante G33I podría evitar esta aproximación y, por tanto, suprimir la dimerización. Todas las quimeras de ToxT se insertaron correctamente en la membrana bacteriana (Figura 2C) y mostraron los mismos niveles de expresión (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Las mutaciones de GxxxG reducen los niveles de A β 42

A continuación, se examinó si las mutaciones de GxxxG alteran el procesamiento de APP y la generación de A β . Se generaron células SHSY5Y que expresaban establemente APP695wt o los mutantes G25A, G29A, G33A, G29/33A o G33I. Para todas las líneas celulares, se observaron niveles similares de APP de longitud completa, APP soluble (sAPP α y sAPP β), β -CTF y A β secretado total mediante transferencia Western (Figura 3, A y C). Así pues, las mutaciones de GxxxG no afectaron al desprendimiento realizado por α - o β -secretasas ni interfirieron en la maduración y la expresión superficial de APP. Sin embargo, cuando se cuantificaron las especies A β 42, A β 40 y A β 38 en un análisis de inmunoabsorción unida a una enzima de tipo sándwich (ELISA), se revelaron diferencias significativas con el tipo natural. Los mutantes G25A, G29A y G33A no mostraron alteraciones en los niveles de A β 40, pero la secreción de A β 42 se redujo significativamente en un 28%, 67% y 60%, respectivamente, en comparación con las líneas celulares que expresaban a APPwt (Figura 4, A y C). Por lo tanto, G29A y G33A redujeron los niveles de A β 42 hasta un grado similar, aunque G33A atenuó la dimerización del TMS más eficazmente que G29A (Figura 2B). Esto podría deberse a la inserción en la membrana bacteriana de los residuos

A β 29 a 42, estando G29 ubicado en el límite de los constructos quiméricos usados en el análisis de ToxR (Figura 2B). Además, el residuo G25 de la posición de la yuxtamembrana extracelular parece ser una parte ampliada del motivo de dimerización GxxxG, pues el mutante G25A redujo los niveles de A β 42 de manera similar a las mutaciones G29A y G33A. La mutación doble G29/33A redujo ligeramente la generación de A β 40 y disminuyó el nivel de A β 42 hasta la secreción de fondo de células transfectadas a un vector vacío (Figura 4, A y C). Como la mutación G33I suprimió la generación de A β 40 y A β 42, pero no se observó ninguna reducción del A β total mediante transferencia Western (Figura 3A), se supuso que este mutante podría conducir a la secreción de otras especies de A β (véase el Ejemplo 6).

Ejemplo 5

Los efectos de los mutantes de GxxxG son independientes del ectodominio de la APP

Para excluir las influencias de los sitios de contacto con el ectodominio de la APP o la actividad β -secretasa, se analizó una generación de A β de mutantes de GxxxG, A β secretado de células SH-SY5Y transfectadas establemente con el constructo SPA4CT (Dyrks *et al.*, *FEBS Lett* 309 (1992), 20–24), lo que libera β -CTF tras la escisión del péptido señal (PS) independientemente de la β -secretasa (Figura 3C). Las células transfectadas en SPA4CTwt o en mutantes mostraron niveles de expresión iguales de β -CTF y A β mediante análisis de transferencia Western (Fig. 3B). La generación de A β 40 y A β 42 de SPA4CTwt y de los mutantes produjo niveles de A β similares a los obtenidos a partir de los correspondientes constructos de APP de longitud completa descritos anteriormente (Figura 4, B y D). Esto indica que el efecto del motivo GxxxG sobre la producción de A β es independiente del ectodominio de la APP.

Ejemplo 6

A β 38 se produce a expensas de A β 42

Como los niveles de A β total de APPwt y los mutantes G33I y G29/33A parecieron ser similares a los observados mediante transferencia Western (Figura 3A), se analizaron las muestras en cuanto a la presencia de especies de A β truncadas C-terminalmente mediante EM-MALDI. En el sobrenadante del cultivo de las células que expresaban G33I de APP, A β 38 y A β 37 dieron las señales más destacadas, mientras que apenas se pudo detectar A β 40 (Figura 4E). El A β de células que expresaban G29/33A de APP también mostró una señal mucho más potente para A β 38 (datos no mostrados). Para investigar si las cantidades aparentemente crecientes de A β 38 (Figura 4E) se producen a expensas de A β 42, se determinó el nivel de A β 38 secretado desde las células que expresaban β -CTF usando un ELISA específico de A β 38 (Figura 4F). Las mutaciones G29/33A y G33I mostraron la cantidad más elevada de A β 38 producido (la mutación G29/33A fue fijada como el 100%) correspondiente a su generación de A β 42 suprimida y niveles de A β 40 reducidos. En comparación con la mutación doble G29/33A, las sustituciones simples G29A y G33A generaron menos A β 38 (36% y 52%, respectivamente), pues éstas redujeron específicamente la generación de A β 42, pero no la de A β 40. La mutación G25A mostró un cambio relevante en los niveles de A β 38 en comparación con el tipo natural. El mutante G33I condujo a ligeramente menos A β 38 producido en comparación con el mutante G29/33A, pero en cambio condujo a mayores cantidades de A β 37 (Figura 4E). Así pues, hay una gran correlación inversa entre la generación de A β 42 y A β 38 en función de las mutaciones GxxxG. Los niveles gradualmente decrecientes o crecientes de A β 42 y A β 38 dependen claramente de las sustituciones de glicina individuales y, por consiguiente, se atribuyen bien a mutaciones conservadoras o no conservadoras. Los datos indican que la producción de A β 42 y A β 38 está íntimamente ligada a la fuerza de dimerización de la interacción TMS-TMS a través de los residuos G29 y G33 de los motivos GxxxG según lo indicado por el análisis ToXR. Los resultados muestran que las mutaciones de los motivos GxxxG no afectan a la eficiencia de la escisión, pero desplazan la escisión realizada por la γ -secretasa a sitios más N-terminales.

Ejemplo 7

La interfase de hélice-hélice con G29 y G33 es favorecida configuracionalmente

Para analizar si la interacción entre hélices a través del motivo GxxxG se ve favorecida energéticamente y configuracionalmente, se realizó una búsqueda informatizada de las configuraciones de los residuos A β 25 a 46. Se observó una configuración de baja energía con un ángulo cruzado a mano derecha y las cuatro glicinas de los tres motivos GxxxG consecutivos en la interfase hélice-hélice (Figura 5A). Según este modelo, los residuos G29 y G33 constituyen el núcleo de la interfase con las distancias C α -C α de menos de 5 Å para cada par en comparación con las distancias de G25 (6,7 Å) y G37 (5,7 Å)

REIVINDICACIONES

- 1.– Un procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) o la fase de la EA, procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con sondas que se unen específicamente con al menos dos productos de escisión de γ -secretasa A β 48, A β 45, A β 42, A β 38 y A β 35; y
- (b) determinar las cantidades de dichos productos de escisión en dicha muestra, en la que se determina al menos la proporción A β 38:A β 42, y una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con una proporción normal indica la EA.
- 10 2.– Un procedimiento para controlar el progreso de una terapia contra la EA, procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- (a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con sondas que se unen específicamente con al menos dos productos de escisión de γ -secretasa A β 48, A β 45, A β 42, A β 38 y A β 35; y
- 15 (b) determinar las cantidades de dichos productos de escisión en dicha muestra, en la una proporción normalizada de dichos productos de escisión en comparación con la proporción al inicio de la terapia indica un efecto terapéutico.
- 3.– Un procedimiento de diagnóstico para distinguir entre la enfermedad de Alzheimer (EA) y otra enfermedad que no sea Alzheimer, procedimiento que comprende las siguientes etapas:
- (a) poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con sondas que se unen específicamente con los productos de escisión de γ -secretasa A β 42, A β 40 y A β 38; y
- 20 (b) determinar las cantidades de dichos productos de escisión en dicha muestra, en la una proporción de A β 38:A β 42 > 1 en combinación con una proporción normal de A β 42:A β 40 indica una enfermedad que no es la EA.
- 4.– El procedimiento de la reivindicación 2, en el que se determina la proporción de A β 38:A β 42.
- 5.– El procedimiento de la reivindicación 1, en el que (i) una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con la proporción normal y una mayor concentración de A β 42 en comparación con la concentración normal indica una etapa temprana de la EA y (ii) una menor proporción de A β 38:A β 42 en comparación con la proporción normal y una concentración menor o normal de A β 42 en comparación con la concentración normal indica una etapa tardía de la EA.
- 25 6.– El procedimiento de la reivindicación 4 ó 5, en el que la proporción de A β 38:A β 42 es $\leq 1,5$.
- 30 7.– El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra es LCR o sangre.
- 8.– El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las sondas son anticuerpos.
- 9.– El procedimiento de la reivindicación 8, en el que los anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
- 10.– El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el procedimiento se lleva a cabo como un ELISA.
- 11.– El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el ELISA es un ELISA de tipo sándwich.
- 35 12.– El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende la determinación de la concentración de al menos un biomarcador adicional que comprende (i) la proporción de A β 42:A β 40; (ii) la concentración de A β 37 o A β 40; o (iii) la concentración de tau con fósforo.
- 13.– El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la terapia comprende el tratamiento con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o estatina.
- 40 14.– El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) es MPC-7869 (R-flurbiprofeno).

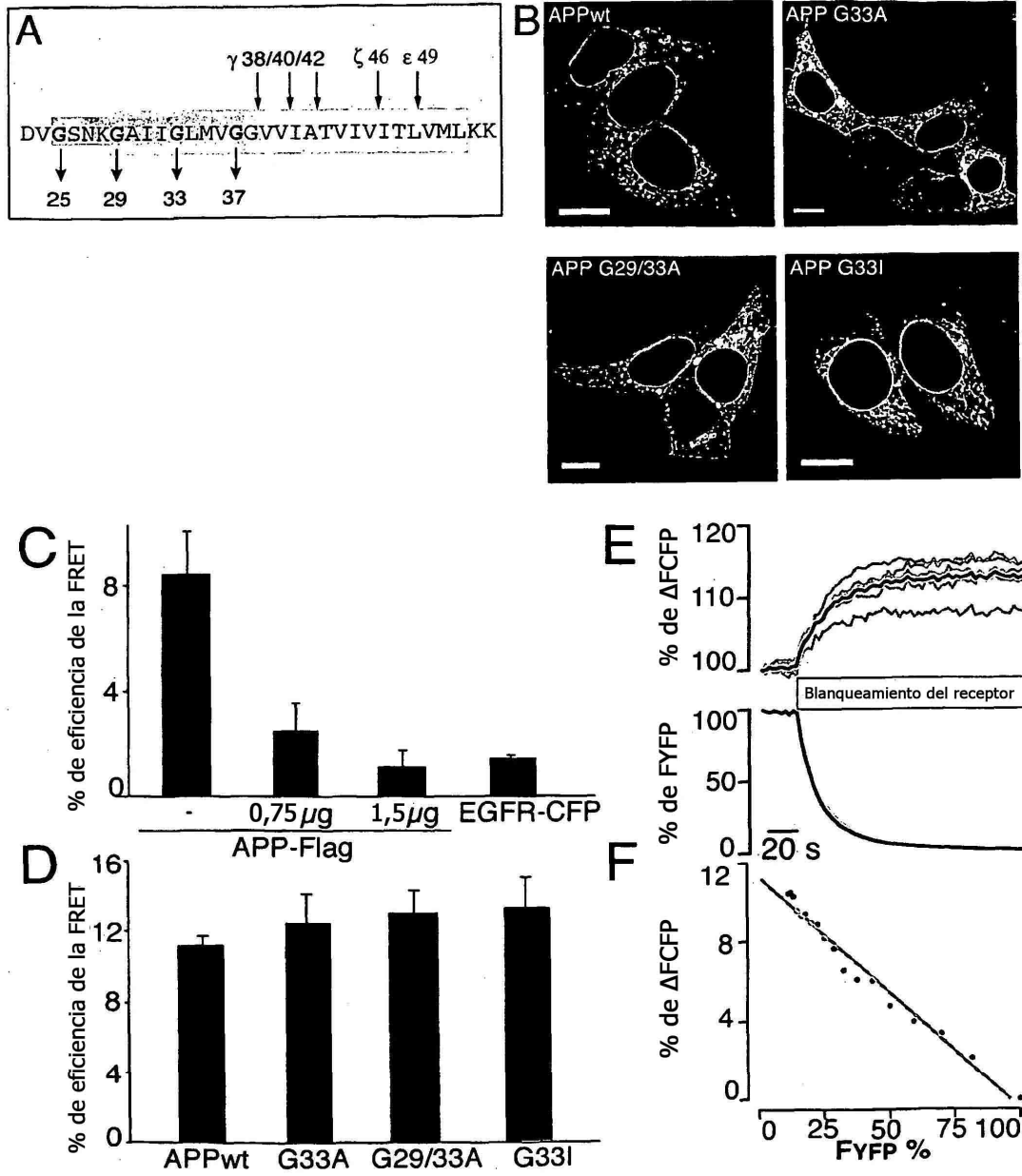


Figura 1

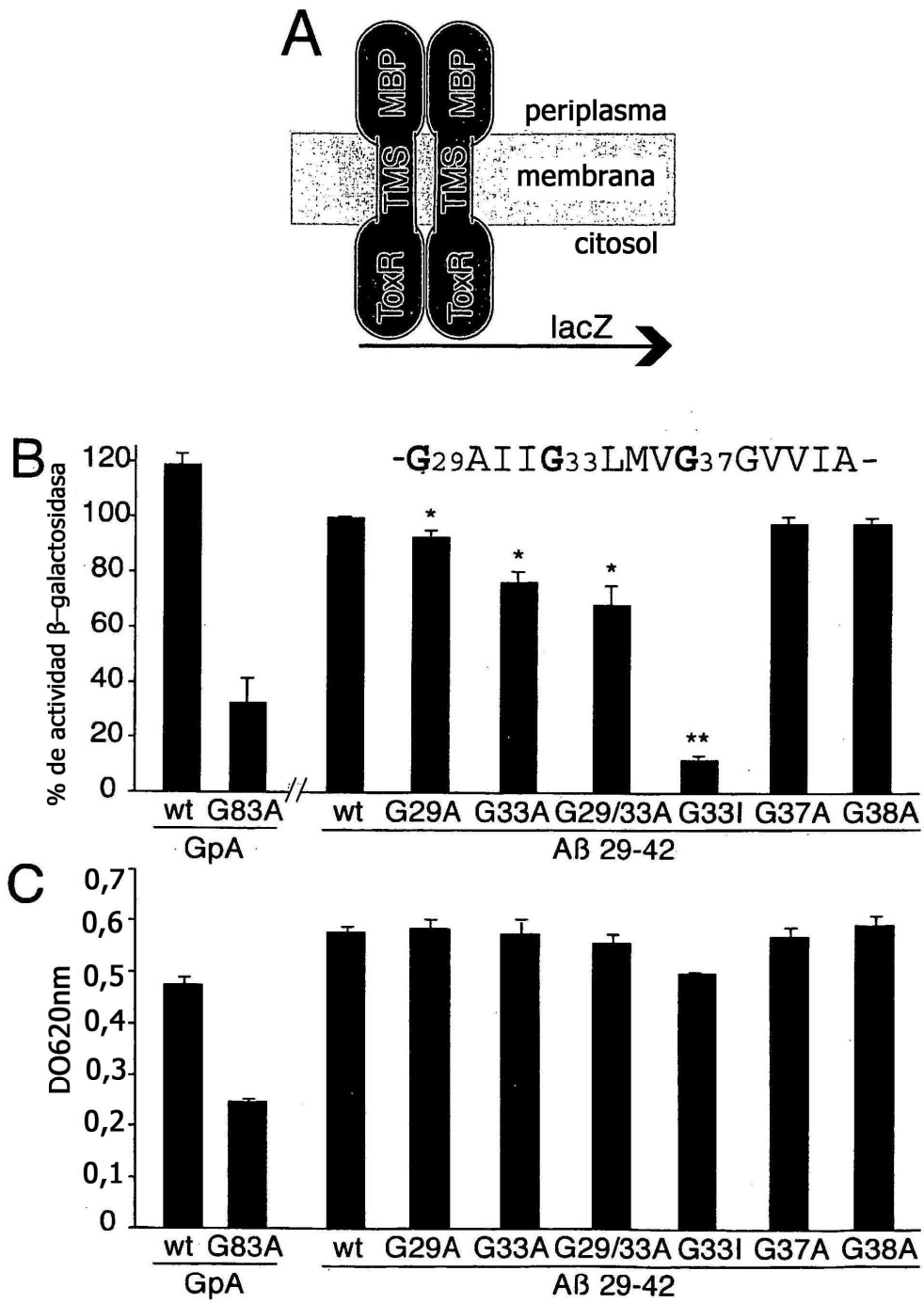


Figura 2

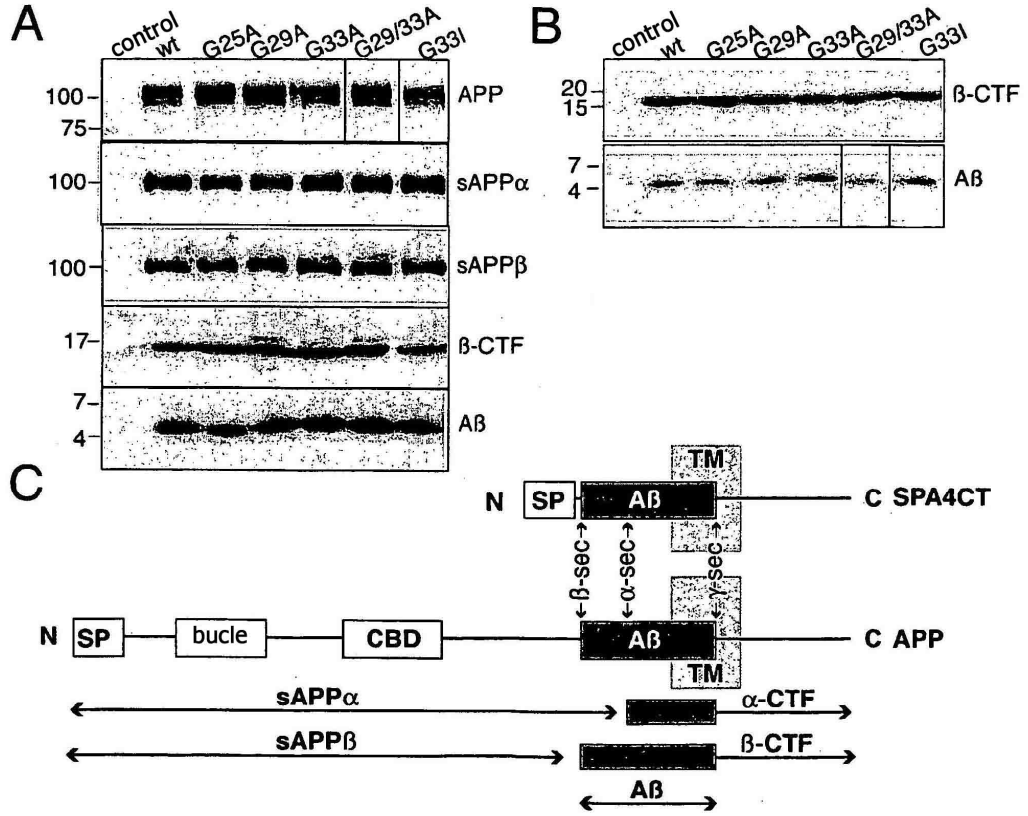


Figura 3

5

10

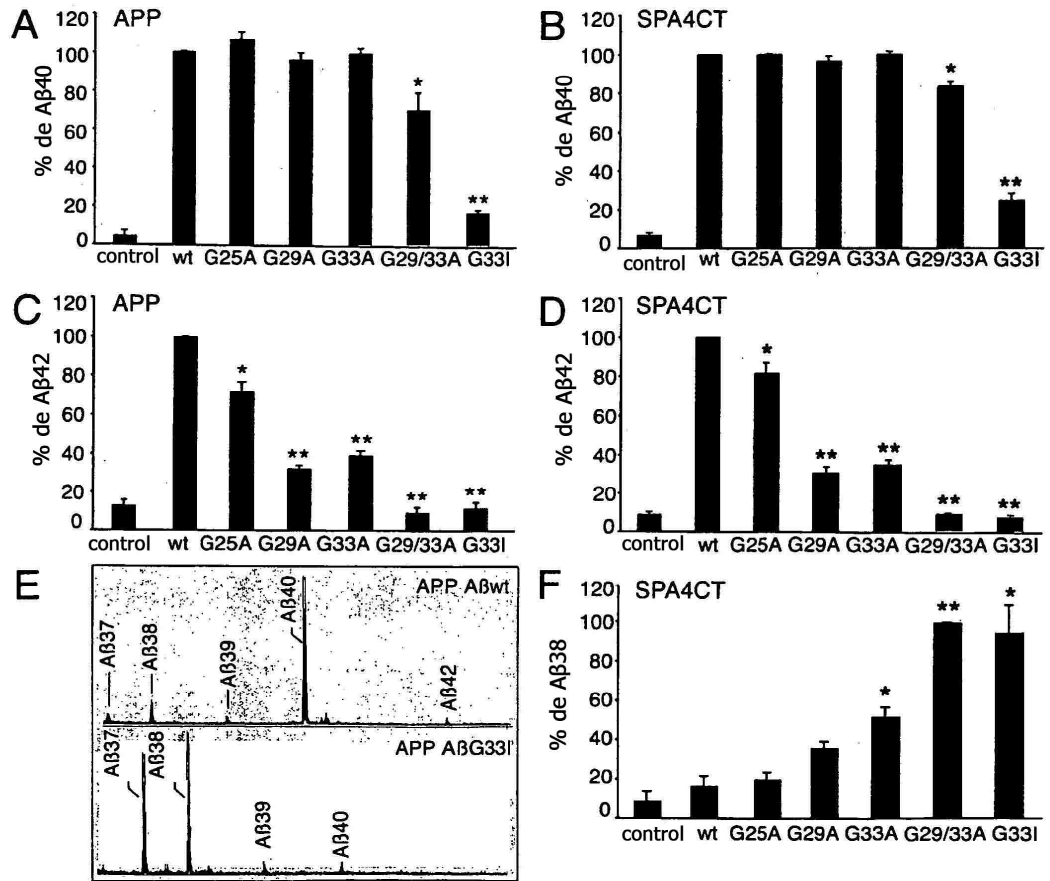


Figura 4

5

10

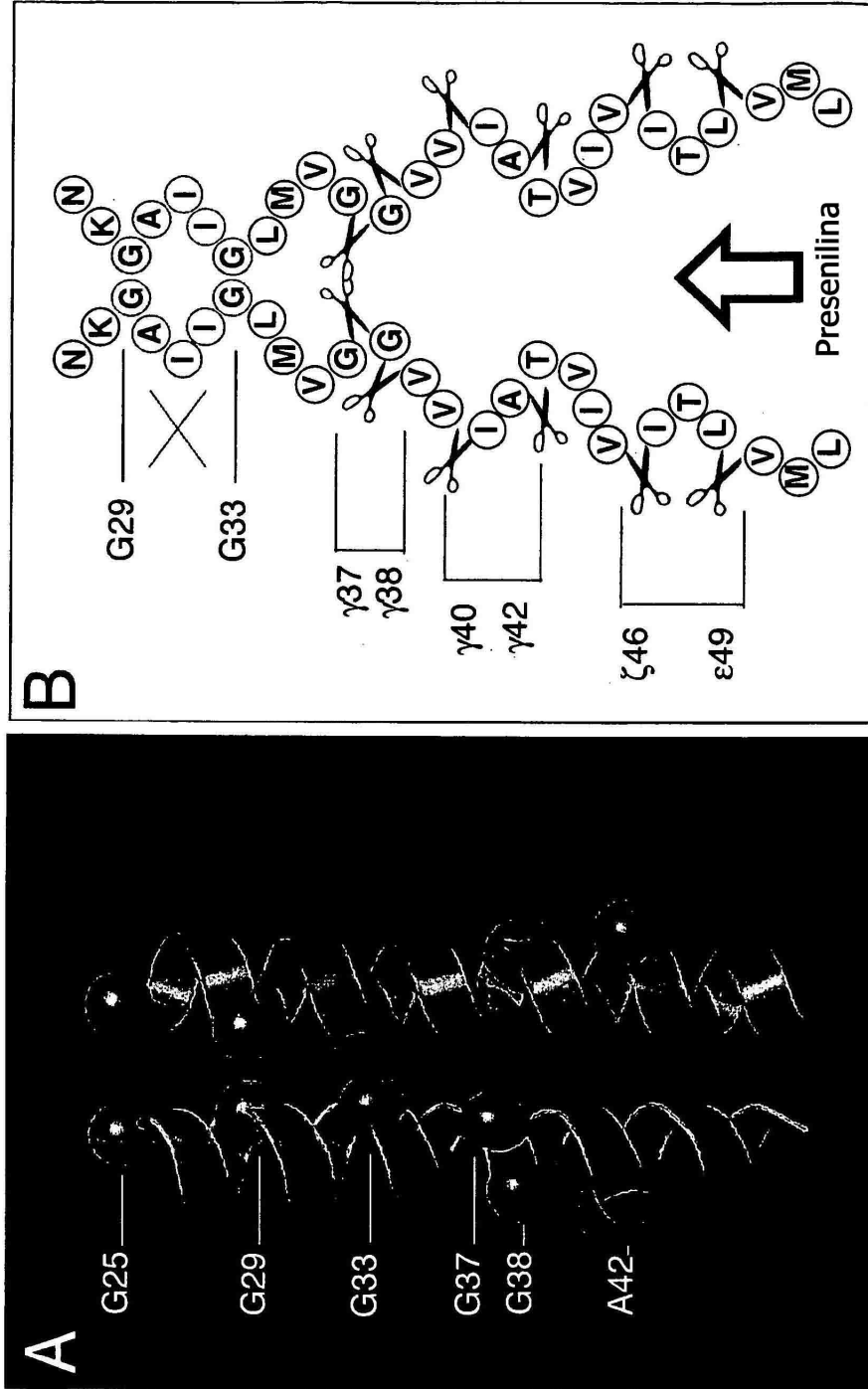


Figura 5