

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 284**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2006 E 10012836 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2317321**

54 Título: **Método de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer por medición de un biomarcador**

30 Prioridad:

**11.10.2005 US 246524**

**11.10.2005 WO PCT/US2005/036014**

**07.06.2006 WO PCT/US2006/022156**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.07.2014**

73 Titular/es:

**BLANCHETTE ROCKEFELLER NEUROSCIENCES  
INSTITUTE (100.0%)  
8 Medical Center Drive  
Morgantown, WV 26505-3409, US**

72 Inventor/es:

**KHAN, TAPAN KUMAR y  
ALKON, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 477 284 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

Método de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer por medición de un biomarcador

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende la medición de un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB).

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Se ha sugerido que la perturbación de la homeostasis del calcio intracelular, los niveles incrementados de estrés oxidativo, y los mecanismos inflamatorios que dan lugar a una toxicidad excitatoria y la muerte neuronal, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Ito y otros 1994, Putney, 2000; Yoo y otros, 2000; Sheehan y otros, 1997; De Luigi y otros, 2001; Anderson y otros, 2001; Remarque y otros, 2001). A partir de estudios que utilizaban bradiquinina como estímulo se han derivado una serie de anomalías asociadas con AD en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular y otros procesos celulares. Como potente mediador de la inflamación, la bradiquinina (BK) es producida por el cerebro y las células periféricas bajo condiciones patofisiológicas, tales como trauma, apoplejía, dolor isquémico y asma (Regoli y otros, 1993; Bockmann y Paegelow, 2000; Ellis y otros, 1989; Kamiya y otros, 1993). Al actuar sobre el receptor de bradiquinina B2 (BK2bR), un receptor acoplado a la proteína G, la BK desencadena la generación de fosfatidilinositol (PI) a través de la actividad de fosfolipasa C (PLC), el cual a su vez produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) que incrementa la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular de los almacenes sensibles a IP3 (Noda y otros, 1996; Venema y otros, 1998; Wassdal y otros, 1999; Cruzblanca y otros, 1998; Ricupero y otros, 1997; Pascale y otros, 1999). A través del mismo mecanismo, la BK también desencadena la producción de otras citoquinas proinflamatorias mediante la activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP) (Hayashi y otros, 2000; Schwaninger y otros, 1999; Phagoo y otros, 2001). Se ha observado un mayor aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en cerebros con AD, así como en células periféricas de AD en respuesta a la estimulación de bradiquinina y la inactivación de los canales de  $K^+$  (Etcheberrigaray y otros, 1993, 1998; Hirashima y otros, 1996; Gibson y otros, 1996(a)).

La estimulación de PLC posterior a la activación de BK2bR también conduce a la producción de diacilglicerol que, junto con un  $Ca^{2+}$  intracelular aumentado, activa isoformas de proteína quinasa C (PKC). La cascada PLC/fosfolípidos- $Ca^{2+}$ /PKC activada por BK interacciona con el mecanismo de señalización Ras/Raf, el cual activa quinasas 1/2 reguladas por señal extracelular (Erk 1 y Erk 2, que se denominan en conjunto como "Erk1/2"), un subtipo de la familia de MAP quinasas (Berridge, 1984; Bassa y otros, 1999; Hayashi y otros, 2000; Blaukat y otros, 2000; Zhao y otros, *Neurobiology of Disease* 11, 166-183, 2002). Erk1/2 recibe señales de mecanismos de transducción de señales múltiples y conduce a la proliferación y diferenciación celular mediante la regulación de la expresión génica a través de un conjunto de factores transcripcionales, incluyendo AP-1, NF- $\kappa$ B y proteína de unión a elementos sensibles a AMP cíclico (CREB). Al actuar como una de las principales quinasas, Erk2 fosforila tau en múltiples sitios de serina/treonina incluyendo Ser-262 y SER-356 (Reynolds y otros, 1993; Lu y otros, 1993). Además, se ha observado por diferentes laboratorios (Desdouts-Magnen y otros, 1998; Gasparini y otros, 2001; Nitsch y otros, 1994, 1995, 1996, 1998) que los mecanismos asociados a la MAP quinasa activada por PKC y al receptor de BK regulan la formación y secreción de la forma soluble de la proteína precursora de amiloides (APP). Estos descubrimientos han sugerido la posibilidad de que el procesamiento de APP asociada a BK pueda estar unido al mecanismo de PKC-MAP quinasa. Por otro lado, afecciones patológicas, tales como infecciones virales, estrés oxidativo incrementado, expresión aberrante de APP y la exposición a  $AP\beta$  provocan la activación de MAP quinasa (Rodems y Spector, 1998; McDonald y otros, 1998; Ekinci y otros, 1999; Grant y otros, 1999) y una mayor fosforilación de tau (Greenberg y otros, 1994; Ekinci y Shea, 1999; Knowles y otros, 1999). Estos efectos implican la alteración de un mecanismo o mecanismos de señalización de MAP quinasa en la patogénesis de AD.

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (tales como Erk1 y Erk2) regulan la fosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos y el procesamiento de la proteína  $\beta$  amiloide, ambos hechos críticos para la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer. La fosforilación incrementada y prolongada de Erk1/2 en respuesta a la bradiquinina se ha detectado en fibroblastos de la enfermedad de Alzheimer tanto familiar como esporádica, pero no en controles relacionados con la edad (Zhao y otros, *Neurobiology of Disease* 11, 166-183, 2002). La fosforilación prolongada de Erk1/2 inducida por bradiquinina se ha observado previamente en fibroblastos de la enfermedad de Alzheimer y es la materia del documento WO 02/067764.

El documento WO 03/102016 A2 se refiere al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El documento da a conocer que la utilización de insulicina para hidrolizar los péptidos  $A\beta$  representa una estrategia terapéutica alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Existe la necesidad de pruebas muy sensibles y específicas para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer y para cribar compuestos útiles en el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer. Los presentes inventores han identificado, por primera vez, biomarcadores moleculares únicos específicos de la enfermedad de Alzheimer

útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de una manera muy sensible y específica en comparación con las pruebas de diagnóstico conocidas previamente. De este modo, los biomarcadores moleculares únicos específicos de la enfermedad de Alzheimer dados a conocer en el presente documento sirven como base para métodos de diagnóstico que tienen un grado elevado de sensibilidad y especificidad para la monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a métodos *in vitro* de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende la medición de un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer ("ADSMB"), en el que el ADSMB es la proporción del nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células del paciente que han sido estimuladas por un activador de proteína quinasa C, restando la proporción del nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células de dicho paciente que han sido estimuladas con una solución de control que carece del activador de proteína quinasa C.

La presente invención está dirigida a métodos *in vitro* de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende las etapas de poner en contacto células obtenidas de un paciente con un agente que es un activador de proteína quinasa C y medir la proporción del nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en las células, restando la proporción del nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células de dicho paciente que han sido estimuladas con una solución de control que carece del activador de proteína quinasa C. Los métodos de diagnóstico de la presente invención son métodos *in vitro*. En realizaciones todavía más preferentes de los métodos de diagnóstico, las proteínas MAP quinasas fosforiladas específicas son variantes de secuencia entre sí y pertenecen a la misma familia de proteínas.

En la presente invención, la proporción de proteínas quinasa MAP fosforiladas específicas es la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada y se puede calcular mediante la división de la cantidad normalizada de Erk1 fosforilada por la cantidad normalizada de Erk2 fosforilada. En realizaciones preferentes de la presente invención, el activador de proteína quinasa C se selecciona del grupo que comprende bradiquinina, briostatina, bombesina, colecistoquina, trombina, prostaglandina F<sub>2α</sub> y vasopresina.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las células que se utilizan en los ensayos de diagnóstico son células periféricas. En realizaciones preferentes, las células pueden ser células de la piel, células de fibroblastos de la piel, células de la sangre o células de la mucosa bucal. En ciertas realizaciones, las células no se aíslan del fluido cerebroespinal. En otras realizaciones preferentes, las células no comprenden fluido cerebroespinal. En todavía otras realizaciones preferentes, las células no se obtienen por extracción espinal o mediante punción lumbar.

En ciertas realizaciones de los métodos de diagnóstico, se pone en contacto un activador de la proteína quinasa C con células en un medio que comprende suero. En otras realizaciones preferentes de la presente invención, se pone en contacto un activador de la proteína quinasa C con dichas células en un medio sin suero.

En ciertas realizaciones de los métodos de diagnóstico de la presente invención, se detectan las proteínas MAP quinasas fosforiladas específicas mediante inmunoensayo. En realizaciones preferentes de la presente invención, el inmunoensayo puede ser un radioinmunoensayo, un ensayo de transferencia Western, un ensayo de inmunofluorescencia, un inmunoensayo enzimático, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoelectroforesis, un ensayo de transferencia tipo "dot" o un ensayo de transferencia tipo "slot". En realizaciones preferentes adicionales de los métodos de diagnóstico de la presente invención, se pueden utilizar grupos de proteínas o grupos de péptidos o microgrupos de proteínas en los métodos de diagnóstico.

La presente invención está dirigida a métodos de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende la medición de un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer. El método comprende, de manera preferente, la medición del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer en más de un momento de tiempo. En realizaciones preferentes, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer se mide en momentos de tiempo separados, como mínimo, por seis meses, de manera más preferente, en momentos de tiempo separados, como mínimo, por 1-2 meses. En realizaciones preferentes de la presente invención, una disminución en el valor numérico (es decir, un valor menos positivo) del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer es indicativa de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra los resultados de determinaciones de los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB) en células de fibroblastos de piel depositadas, obtenidas del Depósito de células Coriell y en muestras de biopsia de piel por punción que se colocaron inmediatamente en cultivos de tejidos y que se obtuvieron de pacientes con autopsias confirmadas. AD se refiere a células de la enfermedad de Alzheimer; AD/PD/LBD mixtas se refiere a células extraídas de pacientes con patologías mixtas de enfermedad de Alzheimer,

enfermedad de Parkinson y/o enfermedad de cuerpos de Loewi; AC se refiere a células de control de la misma edad sin demencia; No ADD se refiere a células extraídas de pacientes diagnosticados con una demencia que no es la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia clínica). Los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer en las células de AD analizadas dieron un valor positivo que era superior a aproximadamente 0,02 e inferior a aproximadamente 0,4. El biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer en AD/PD/LBD mixtas se agrupaba en valores positivos muy bajos, es decir inferior a aproximadamente 0,02 o aproximadamente 0,03. Los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer en células de control de la misma edad sin demencia presentaron valores negativos o positivos muy bajos, es decir, inferior a aproximadamente 0,01. Los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer en células no ADD presentaron valores negativos. Los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer se midieron determinando la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que habían sido estimuladas con bradiquinina menos la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que fueron estimuladas con un medio que carecía de bradiquinina. Esto se expresa de la siguiente manera: biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer =  $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{bradiquinina}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{vehículo}}\}$ . Se representó el ADSMB (indicado como "Factor Diferenciador" (D.F) en la figura) para cuatro categorías diferentes de pacientes: líneas celulares de la enfermedad de Alzheimer (AD), AD/PD/DLV mixtas (diagnóstico mixto de enfermedad de Alzheimer, de Parkinson y cuerpos de Lew confirmado por autopsia), de control de la misma edad (AC) y de demencias que no son AD (enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington) para el depósito de células de Coriell y confirmadas por autopsia.

La figura 2 muestra un análisis de regresión lineal de biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer en función de los años de demencia. La regresión lineal muestra una pendiente negativa aproximadamente de -0,01, lo que indica una correlación inversa entre los años de demencia y la magnitud positiva del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer. A medida que aumentan los años de demencia (es decir, a medida que progresa la enfermedad de Alzheimer), el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer presenta un valor numérico positivo inferior. La medición del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer permite un diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer, ya que un valor positivo más elevado es indicativo de las fases iniciales de la enfermedad. Los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer se midieron determinando la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que habían sido estimuladas con bradiquinina menos la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que fueron estimuladas con un medio que carecía de bradiquinina. Esto se expresa de la siguiente manera: biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer =  $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{bradiquinina}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{vehículo}}\}$ . El análisis de regresión lineal del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB) en función de la duración de la enfermedad de casos confirmados por autopsia. El biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer es más eficaz en los primeros años de la enfermedad. Esto demuestra que el presente método es más eficaz en el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer.

La figura 3 muestra datos de una transferencia western de p-Erk1/2 (Erk1 y Erk2 fosforiladas) después del tratamiento con bradiquinina (BK+) y vehículo (DMSO, sin bradiquinina, BK-) para líneas celulares de AD y líneas celulares de control. Para el tratamiento con bradiquinina (BK+), las células sin suero (24 horas) se trataron con bradiquinina 10 nM durante 10 minutos a 37°C. En el correspondiente tratamiento con vehículo (BK-), se trataron las células sin suero (24 horas) con la misma cantidad de DMSO (sin BK) durante 10 minutos a 37°C. Después de 10 minutos, las bandas de P-Erk1/2 eran más oscuras para el tratamiento con BK+ que con BK- para la línea celular de AD, pero a la inversa para las líneas celulares de control. Esto demuestra que la activación de Erk inducida por BK era más elevada para las líneas celulares de AD.

Las figuras 4A y 4B muestran un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB) (indicado como "Factor Diferenciador" (D.F) en la figura) calculado tal como se describe en el presente documento. ADSMB se representó para líneas celulares de AD (enfermedad de Alzheimer), AC (control relacionado con la edad) y no ADD (demencias que no son la AD, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de cuerpos de Lewy) del depósito de Coriell (A) (Instituto Coriell de Investigación Médica ("Coriell Institute of Medical Research"), Camden, Nueva Jersey) y líneas celulares obtenidas de Neurologic Inc. (confirmadas por autopsia) (B). Los resultados demuestran que ADSMB para los casos de AD era uniformemente más elevado que para los casos de AC y no ADD.

Las figuras 5A y 5B muestran un análisis de matriz de decisión del ADSMB. Se representan la sensibilidad y especificidad del biomarcador para mostrar la eficacia para detectar la enfermedad para células del depósito de células de Coriell (A) y células confirmadas por autopsia (B).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

El diagnóstico se basa en el descubrimiento de biomarcadores moleculares específicos únicos de la enfermedad de Alzheimer. La presente invención está dirigida a métodos de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Debido a que es imposible el acceso directo a las neuronas en los cerebros de seres humanos vivos, el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer es extremadamente difícil. Mediante la medición de los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer dados a conocer en el presente documento, la presente invención da a conocer pruebas muy prácticas, muy específicas y muy selectivas para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Además, los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer descritos en el presente documento proporcionan una base para hacer el seguimiento de la progresión de la enfermedad y para identificar agentes terapéuticos para el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento y la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Los presentes inventores han descubierto un biomarcador molecular único para la enfermedad de Alzheimer que utiliza tejido terapéutico (no del SNC) que es útil en ensayos de diagnóstico que son muy sensibles y muy específicos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Una gran ventaja de la presente invención es que el tejido utilizado en los ensayos y métodos dados a conocer en el presente documento se pueden obtener de pacientes utilizando procedimientos mínimamente invasivos, es decir, sin la utilización de una punción lumbar. De este modo, un aspecto de la presente invención está dirigido a un ensayo o prueba para la detección precoz de la enfermedad de Alzheimer en un paciente en el que se mide una proporción internamente controlada de fosforilación de Erk1 con respecto a la fosforilación de Erk2, que está inducida por un activador de la proteína quinasa C (tal como bradiquinina), con anticuerpos específicos utilizando una respuesta de normalización de la línea base con respecto al medio de crecimiento en células humanas, tales como fibroblastos de la piel, u otras células periféricas, tales como células sanguíneas.

En los métodos de la presente invención, las células que se extraen del individuo o paciente pueden ser cualquier célula viable. De manera preferente, son fibroblastos de la piel, pero se puede utilizar cualquier otra célula de tejido periférico (es decir, células de tejido fuera del sistema nervioso central) en las pruebas de la presente invención si dichas células son más convenientes para la obtención o el proceso. Entre otras células adecuadas se incluyen, pero sin limitarse a las mismas, células sanguíneas, tales como eritrocitos y linfocitos, células de la mucosa bucal, células nerviosas, tales como neuronas olfativas, fluido cerebroespinal, orina y cualquier otro tipo de célula periférica. Además, las células utilizadas con fines de comparación no necesariamente deben ser de donantes sanos.

Las células pueden ser frescas o se pueden cultivar (véase la patente de Estados Unidos No. 6.107.050, que se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia). En una realización específica, se puede utilizar una biopsia en la piel por punción para obtener fibroblastos de la piel de un paciente. Estos fibroblastos se analizan directamente utilizando las técnicas descritas en el presente documento o se introducen en condiciones de cultivo celular. A continuación, los fibroblastos cultivados resultantes se analizan tal como se describe en los ejemplos y a lo largo de la memoria. Se pueden requerir otras etapas para preparar otros tipos de células que se podrían utilizar para el análisis, tales como células de la mucosa bucal, células nerviosas, tales como células olfativas, células sanguíneas, tales como eritrocitos y linfocitos, etc. Por ejemplo, las células sanguíneas se pueden obtener fácilmente mediante la extracción de sangre de venas periféricas. A continuación, las células se pueden separar mediante procedimientos estándar (por ejemplo, utilizando un clasificador celular, centrifugación, etc.) y se pueden analizar posteriormente.

**I. Definiciones**

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sensibilidad", en el contexto del cribado y diagnóstico médico, significa la proporción de individuos afectados que proporcionan un resultado positivo en la prueba para la enfermedad que la prueba pretende revelar, es decir, resultados positivos verdaderos divididos por los resultados positivos verdaderos y negativos falsos totales, normalmente expresado como un porcentaje.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "especificidad", en el contexto del cribado y diagnóstico médico, significa la proporción de individuos con resultados negativos en la prueba para la enfermedad que la prueba pretende revelar, es decir, resultados negativos verdaderos como una proporción del total de resultados negativos verdaderos y positivos falsos, normalmente expresado como un porcentaje.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muy sensible" significa un método de diagnóstico que es sensible en más o igual a aproximadamente el 50%, o es sensible en aproximadamente el 55%, o es sensible en aproximadamente el 60%, o es sensible en aproximadamente el 65%, o es sensible en aproximadamente el 70%, o es sensible en aproximadamente el 75%, o sensible en aproximadamente el 80%, o es sensible en aproximadamente el 85%, o es sensible en aproximadamente el 90%, o es sensible en aproximadamente el 95%, o

es sensible en aproximadamente el 96%, o es sensible en aproximadamente el 97%, o es sensible en aproximadamente el 98%, o es sensible en aproximadamente el 99% o es sensible en aproximadamente el 100%.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “muy específico” significa un método de diagnóstico que es específico en más o igual a aproximadamente el 50%, o es específico en aproximadamente el 55%, o es específico en aproximadamente el 60%, o es específico en aproximadamente el 65%, o es específico en aproximadamente el 70%, o es específico en aproximadamente el 75%, o es específico en aproximadamente el 80%, o es específico en aproximadamente el 85%, o es específico en aproximadamente el 90%, o es específico en aproximadamente el 95%, o es específico en aproximadamente el 96%, o es específico en aproximadamente el 97%, o es específico en aproximadamente el 98%, o es específico en aproximadamente el 99% o es específico en aproximadamente el 100%.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, “compuestos directrices” son compuestos identificados utilizando los métodos de cribado de compuestos dados a conocer en el presente documento. Los compuestos directrices pueden presentar actividad en el desplazamiento de los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer dados a conocer en el presente documento a valores que corresponden a aquellos valores calculados para los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer determinados utilizando células sanas normales en los ensayos descritos en el presente documento. Los compuestos directrices posteriormente se pueden modificar químicamente para optimizar o aumentar su actividad para utilizar en composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, “variantes de secuencia” son proteínas que están relacionadas entre sí tanto estructural como funcionalmente. En ciertas realizaciones, las variantes de secuencia son proteínas que comparten similitud estructural a nivel de la secuencia de aminoácidos y comparten características funcionales a nivel de actividad enzimática. En ciertas realizaciones, las variantes de secuencia son proteínas MAP quinasas que catalizan la fosforilación de otras proteínas.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, “ausencia de enfermedad de Alzheimer” significa que un paciente o células extraídas de un paciente no muestran un fenotipo medible o detectable de la enfermedad de Alzheimer.

Tal como se utiliza en el presente documento, un “fenotipo de la enfermedad de Alzheimer” en un paciente o una muestra celular incluye, pero sin limitación al mismo, un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer que tiene un valor positivo superior a cero.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, un “péptido beta amiloide” es cualquier fragmento del péptido beta amiloide o un péptido beta amiloide de longitud completa.

40 Los ensayos de diagnóstico dados a conocer en el presente documento se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo*. En una realización específica, el activador de la proteína quinasa C es bradiquinina. En la presente invención, la proporción de proteínas MAP quinasas específicas fosforiladas es la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada, que se puede calcular dividiendo la cantidad relativa o normalizada de Erk1 fosforilada por la cantidad relativa o normalizada de Erk2 fosforilada.

#### 45 Biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer

Los métodos de diagnóstico que se dan a conocer en el presente documento se basan en el descubrimiento realizado por los inventores de un biomarcador molecular único para la enfermedad de Alzheimer. El valor numérico del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer dependerá de ciertas variables, tales como, por ejemplo, las células utilizadas en el ensayo, el activador de la proteína quinasa C utilizado en el ensayo y las proteínas MAP quinasa específicas que son reconocidas para la medición de las proporciones de fosforilación.

50 En la presente invención, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer se mide determinando la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas por un activador de proteína quinasa C y restando de ésta la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con una solución de control (vehículo) que carece del activador de proteína quinasa C. En ciertas realizaciones, si la diferencia es superior a cero, es decir, un valor positivo, esto es diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En otras realizaciones preferentes, si la diferencia es inferior o igual a cero, esto es indicativo de la ausencia de la Enfermedad de Alzheimer.

60 En ciertas realizaciones, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer es un valor numérico positivo en muestras de células extraídas de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (células de AD). En ciertas realizaciones preferentes, cuando se mide el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer determinando las proporciones de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células de AD que han sido estimuladas con bradiquinina, los valores numéricos positivos para el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer en células de AD pueden variar de aproximadamente cero a aproximadamente 0,5.

En ciertas realizaciones, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer es un valor numérico negativo cuando se mide en células extraídas de pacientes diagnosticados con una demencia que no es la enfermedad de Alzheimer (células de no ADD), tales como, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington o esquizofrenia clínica. En ciertas realizaciones preferentes, cuando se mide el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer determinando las proporciones de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células de no ADD que han sido estimuladas con bradiquinina, los valores numéricos negativos pueden variar de aproximadamente cero a aproximadamente -0,2 o aproximadamente -0,3.

En ciertas realizaciones, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer puede ser un valor numérico negativo, cero o un valor numérico positivo muy bajo en muestras de células de células de control de la misma edad (células AC) extraídas de pacientes que no padecen la enfermedad de Alzheimer. Cuando se mide el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer determinando las proporciones de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células AC que han sido estimuladas con bradiquinina, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer en células AC puede variar de menos de aproximadamente 0,05 a aproximadamente -0,2.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer se pueden medir calculando la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con bradiquinina menos la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con una solución que carece de bradiquinina. Esto se expresa de la siguiente manera: biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer =  $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{bradiquinina}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{vehículo}}\}$ .

#### Activadores de la proteína quinasa C

Los activadores de la proteína quinasa C que se contemplan de manera específica para su utilización en los métodos de diagnóstico, kits y métodos de cribado para identificar compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a los mismos: bradiquinina; modulador  $\alpha$ -APP; briostatina 1; briostatina 2; DHI; 1,2-dioctanoil-sn-glicerol; FTT; gnidimacrina; *Stella chamaejasme* L.; (-)-indolactama V; lipoxina A<sub>4</sub>; lingbiatoxina A; *Micromonospora* sp.; ácido oleico; 1-oleil-2-acetil-sn-glicerol; 4 $\alpha$ -forbol; forbol-12,13-dibutirato; forbol-12,13-didecanoato; 4 $\alpha$ -forbol-12,13-didecanoato, forbol-12-miristato-13-acetato; sal pentaamónica de L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-3,4-bifosfato de dipalmitoilo; sal pentaamónica de L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-4,5-trifosfato de dipalmitoilo; sal heptaamónica de L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato de dipalmitoilo; 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol; timeleatoxina, *Thymelea hirsuta* L.; insulina; ésteres de forbol, lisofosfatidilcolina, lipopolisacárido, antraciclina, dannorrubicina y sulfato de vanadilo. También se incluyen compuestos conocidos como "briólogos". Los briólogos se describen, por ejemplo, en Wender y otros, Organic Letters (Estados Unidos) 12 de mayo de 2005, 7 (10) pág. 1995-8; Wender y otros, Organic Letters (Estados Unidos) 17 de marzo de 2005, 7 (6) pág. 1177-80; Wender y otros, Journal of Medicinal Chemistry (Estados Unidos) 16 de diciembre de 2004, 47 (26) pág. 6638-44. Un activador de proteína quinasa C se puede utilizar solo o en combinación con cualquier otro activador de proteína quinasa C en los métodos de diagnóstico dados a conocer en el presente documento.

La bradiquinina es un nanopéptido vasoactivo potente que se genera en el transcurso de varias afecciones inflamatorias. La bradiquinina se une y activa un receptor o receptores específicos de bradiquinina de la membrana celular, desencadenando de este modo una cascada de sucesos intracelulares que conducen a la fosforilación de proteínas conocidas como "proteína quinasa activada por mitógeno" (MAPK). La fosforilación de proteína, la adición de un grupo fosfato a un residuo de Ser, Thr o Tyr, está mediada por un gran número de enzimas conocidas colectivamente como proteínas quinasas. La fosforilación normalmente modifica la función de una proteína y normalmente la activa. La homeostasis requiere que la fosforilación sea un proceso transitorio, que se invierte mediante enzimas fosfatasa que desfosforilan el sustrato. Cualquier aberración en la fosforilación o desfosforilación puede alterar los mecanismos bioquímicos y las funciones celulares. Dichas alteraciones pueden ser la base para ciertas enfermedades cerebrales.

#### Medición o detección de niveles de proteínas fosforiladas

Los métodos dados a conocer en el presente documento dependen de la medición de los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer utilizados en la presente invención.

En una realización preferente, el nivel de proteína fosforilada presente en las células se detecta mediante transferencia Western. Los niveles de proteína de Erk1 fosforilada o Erk2 fosforilada se pueden medir en fibroblastos utilizando anticuerpos anti-Erk1, anti-Erk2, anti-fosfo-Erk1 y anti-fosfo-Erk2 (Cell Signaling Technology). Los niveles de una proteína diferente también se pueden medir en la misma muestra como proteína de referencia para la normalización. Entre los ejemplos de posibles proteínas de referencia se incluyen, pero sin limitarse a las mismas, annexina-II o actina.

En una realización, se realiza un ensayo ELISA según los siguientes procedimientos: a) Añadir lisados de células de fibroblastos después del tratamiento en duplicados o triplicados a una microplaca de 96 pocillos que se recubre previamente con un anticuerpo anti-Erk. 2) Incubar muestras en pocillos de microplacas a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. 3) Aspirar las muestras y lavar los pocillos con un tampón de lavado de base tampón fosfato salino (PBS). 4) Añadir la dilución de trabajo de un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 o un anticuerpo Erk1/2 anti-regular a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. 5) Aspirar y lavar bien con tampón de lavado. 6) Añadir una dilución de trabajo de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo e incubar bien a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. 7) Aspirar y lavar bien con tampón de lavado. 8) Añadir Cromógeno estabilizado, tal como diaminobencidina (DAB), e incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. 9) Añadir una solución de desactivación de la reacción y medir la absorbancia a 450 nm. La fosforilación de Erk1/2 se calcula después de la normalización:  $NR = A_p/A_R$ , en la que NR = la proporción normalizada;  $A_p$  es el valor de la absorbancia para fosfo-Erk1/2; y  $A_R$  es la absorbancia para el Erk1/2 total (regular).

En una realización preferente, la fosforilación de Erk1/2 se analiza en transferencias Western utilizando un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2. Los niveles de señales inmunorreactivas para Erk1/2 fosforilada se cuantifican mediante rastreo densitométrico. La densidad promedio de las señales de fosfo-Erk1/2 se normaliza con la densidad promedio de las señales de Erk1/2 totales que se detectan de las mismas muestras de lisados celulares con un anticuerpo Erk1/2 anti-regular en una transferencia Western separada. La fórmula para la normalización es:  $NR = D_p/D_R$ , en la que NR (proporción normalizada) representa la extensión de la fosforilación de Erk1/2;  $D_p$  es la densidad promedio para fosfo-Erk1/2, y  $D_R$  es la densidad promedio para la cantidad total de Erk1/2 detectada en una transferencia Western de la misma muestra.

Los inmunoensayos de la presente invención para la detección de proteínas pueden ser ensayos inmunofluorescentes, radioinmunoensayos, ensayos de transferencia Western, inmunoensayo enzimático, inmunoprecipitación, ensayo quimioluminiscente, ensayo inmunohistoquímico, ensayo de transferencia de tipo "dot" o "slot" y similares. (En "Principles and Practice of Immunoassay" (Principios y prácticas de inmunoensayos) (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds), Stockton Press, Nueva York, Nueva York, Ausubel y otros (eds) (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology" (Protocolos actuales en biología molecular) John Wiley and Sons, Nueva York, Nueva York). La detección puede ser mediante métodos colorimétricos o radioactivos o cualquier otro método convencional conocido por los expertos en la materia. Las técnicas estándar conocidas en el sector para ELISA se describen en *Methods in Immunodiagnosis*, (Métodos en inmunodiagnóstico) 2ª Edición, Rose y Bigazzi, eds., John Wiley and Sons, Nueva York 1980 y Campbell y otros, *Methods of Immunology*, (Métodos de inmunoensayo) W.A. Benjamin, Inc., 1964, ambas incorporadas en la presente invención como referencias. Dichos ensayos pueden ser inmunoensayos directos, indirectos, competitivos o no competitivos tal como se describen en la técnica (En "Principles and Practice of Immunoassay" (Principios y prácticas de inmunoensayos) (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds), Stockton Press, NY, NY; Oellirich, M. 1984. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 895-904 Ausubel y otros (eds) 1987 en *Current Protocols in Molecular Biology*, (Protocolos actuales en biología molecular) John Wiley and Sons, Nueva York, Nueva York).

#### Tipos de células, aislamiento de proteínas y anticuerpos

Tal como se ha indicado previamente, las células extraídas del paciente al que se le hace el diagnóstico pueden ser cualquier célula. Entre los ejemplos de células que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación a las mismas, células de piel, fibroblastos de piel, células de mucosa bucal, célula sanguíneas, tales como eritrocitos, linfocitos y células linfoblastoides, y células nerviosas y cualquier otra célula que exprese la proteína Erk1/2. También se pueden utilizar muestras de necropsia y muestras de patología. También se pueden utilizar tejidos que comprenden estas células, incluyendo células del tejido cerebral o del cerebro. Las células pueden ser frescas, cultivadas o congeladas. Las muestras de proteínas aisladas de las células o tejidos se pueden utilizar de manera inmediata en el ensayo o métodos de diagnóstico para cribar compuestos o se pueden congelar para una utilización posterior. En una realización preferente, se utilizan células de fibroblastos. Las células de fibroblastos se pueden obtener mediante biopsia con punción de la piel.

Las proteínas se pueden aislar de las células mediante métodos convencionales conocidos por un experto en la materia. En un método preferente, las células aisladas de un paciente se lavan y se agrupan formando pélets en solución salina con tampón fosfato (PBS). A continuación, los pélets se lavan con "tampón de homogenización" que comprende 50 nM de NaF, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 20 µg/ml de leupeptina, 50 µg/ml de pepstatina, 10 mM de TRIS-HCl, pH 7,4, y se agrupa en pélets mediante centrifugación. El sobrenadante se descarta y se añade "tampón de homogenización" al pélet seguido de sonicación del pélet. El extracto de proteínas se puede utilizar fresco o almacenado a -80°C para el análisis posterior.

En los métodos de la presente invención, los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos descritos pueden ser monoclonales o policlonales en origen. La proteína Erk1/2 fosforilada y no fosforilada o partes de la misma utilizada para generar los anticuerpos puede ser de origen natural o recombinante o se puede generar mediante síntesis química. Las proteínas Erk1/2 naturales se pueden aislar de muestras biológicas mediante métodos convencionales. Entre los ejemplos de muestras biológicas que se pueden utilizar para aislar la proteína Erk1/2 se incluyen, pero sin

limitación a las mismas, células de la piel, tales como fibroblastos, líneas de células de fibroblastos, tales como líneas de células de fibroblastos de la enfermedad de Alzheimer y líneas de células de fibroblastos de control que están disponibles comercialmente en los Depósitos de Células de Coriell (Camden, N.J.) y se indican en el Catálogo de Líneas Celulares del Instituto Nacional del Envejecimiento 1991, Catálogo de Líneas Celulares del Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales 1992/1993 [(Publicación de NIH 92-2011 (1992)].

También se contempla que la presente invención se puede utilizar para kits que se pueden utilizar en la realización de cualquiera de las pruebas de diagnóstico descritas anteriormente. Los kits pueden contener una única prueba de diagnóstico o cualquier combinación de las pruebas descritas en el presente documento. Los kits pueden comprender anticuerpos que reconocen Erk1/2 regular (Erk1 fosforilada o Erk2 no fosforilada) o Erk1/2 fosforilada (Erk1 fosforilada o Erk2 fosforilada). Los kits pueden contener anticuerpos que reconocen proteínas MAP quinasas regulares, así como proteínas MAP quinasas fosforiladas. Los kits pueden contener también cualquiera o más de los activadores de proteína quinasa C dados a conocer en el presente documento (tales como, por ejemplo, bradiquinina o briostatina). Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los kits pueden contener instrumentos, tampones y recipientes de almacenamiento necesarios para realizar una o más biopsias, tales como biopsias por punción en la piel. Los kits pueden contener también instrucciones relativas a la determinación de las proporciones utilizadas para identificar los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer de la presente invención, así como la utilización de los anticuerpos u otros constituyentes en los métodos de diagnóstico. Las instrucciones pueden describir también los procedimientos para realizar una biopsia, tal como una biopsia por punción en la piel. Los kits pueden contener también otros reactivos para llevar a cabo las pruebas de diagnóstico, tales como anticuerpos para la detección de proteínas de referencia utilizadas para la normalización. Entre los ejemplos de anticuerpos que reconocen posibles proteínas de referencia se incluyen, pero sin limitación a los mismos, anticuerpos que reconocen la annexina-II o la actina. Los kits pueden incluir también tampones, anticuerpos secundarios, células de control.

#### V. Métodos de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer

La presente invención también está dirigida a métodos de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un paciente. La figura 2 proporciona un análisis de regresión lineal de biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer en función de los años de duración de la demencia. La regresión lineal muestra una pendiente negativa aproximadamente de -0,01, lo que indica una correlación inversa entre los años de demencia y la magnitud positiva del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer. A medida que aumentan los años de demencia (es decir, a medida que progresa la enfermedad de Alzheimer), el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer presenta un valor numérico menos positivo. La medición del biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer permite un diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer, ya que, en ciertas realizaciones, un valor positivo más elevado es indicativo de las fases iniciales de la enfermedad. En ciertas realizaciones, a medida que progresa la enfermedad de Alzheimer en un paciente, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer presenta un valor menos positivo.

En ciertas realizaciones, los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer se miden determinando la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con bradiquinina menos la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con un medio que carecía de bradiquinina. Esto se expresa de la siguiente manera: biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer =  $\{(pErk1/pErk2)_{bradiquinina}\} - \{(pErk1/pErk2)_{vehículo}\}$ .

Los términos "péptido amiloide beta", "proteína beta amiloide", "péptido beta amiloide", "beta amiloide", "beta A." y "péptido A. beta" se utilizan indistintamente en el presente documento. En algunas formas, un péptido beta amiloide (por ejemplo, beta A. 39, beta A. 40, beta A. 41, beta A. 42 y beta A. 43) es un fragmento interno aproximadamente de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de la glicoproteína transmembrana más grande denominada Proteína Precursora Amiloide (APP). Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo, APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup> y APP<sup>770</sup>. Los ejemplos de isotipos específicos de APP que se sabe actualmente que existen en humanos son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang y otros (1987) Nature 325: 733-736, que se denomina como APP "normal"; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte y otros (1988) Nature 331: 525-527 (1988) y Tanzi y otros (1988) Nature 331: 528-530; y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y otros (1988) Nature 331: 530-532. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasas *in vivo* o *in situ*, la beta A. se encuentra tanto en una "forma corta" de 40 aminoácidos de longitud, como en una "forma larga" que tiene una longitud que varía de 42 a 43 aminoácidos. Parte del dominio hidrofóbico de APP se encuentra en el extremo carboxilo de beta A., y puede explicar la capacidad de beta A. para agregarse, en particular en el caso de la forma larga. El péptido beta A. se puede disponer en los fluidos corporales de humanos y otros mamíferos, por ejemplo, fluido cerebrospinal, incluyendo tanto individuos normales como individuos que padecen de trastornos amiloidogénicos, o se puede purificar a partir de los mismos.

Los términos "péptido amiloide beta", "proteína beta amiloide", "péptido beta amiloide", "beta amiloide", "beta A." y "péptido A. beta" incluyen péptidos resultantes de la escisión por secretasa de APP y péptidos sintéticos que tienen la misma o esencialmente la misma secuencia que los productos de la escisión. Los péptidos beta A. de la presente invención pueden derivar de una serie de fuentes, por ejemplo, tejidos, líneas celulares o fluidos corporales (por

ejemplo, suero o fluido cerebroespinal). Por ejemplo, una beta A. puede derivar de células que expresan APP, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), tal como se describe, por ejemplo, en Walsh y otros (2002), Nature, 416, pág. 535-539. Un preparado de beta A. puede derivar de una fuente de tejido utilizando métodos previamente descritos (véase, por ejemplo, Johnson-Wood y otros (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1550). De manera alternativa, los péptidos beta A. se pueden sintetizar utilizando métodos que son bien conocidos por un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Fields y otros, Synthetic Peptides: a User's Guide, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., Nueva York, N.Y., 1992, pág. 77). Por lo tanto, los péptidos se pueden sintetizar utilizando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el grupo a-amino protegido mediante química t-Boc o F-moc utilizando aminoácidos protegidos en la cadena lateral en, por ejemplo, el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems Modelo 430A ó 431. Los antígenos de péptidos más largos se pueden sintetizar utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido o péptido de fusión se pueden sintetizar o clonar molecularmente e insertar en un vector de expresión adecuado para la transfección y la expresión heteróloga por una célula huésped adecuada. El péptido beta A. también se refiere a las secuencias de beta A. relacionadas que resultan de las mutaciones en la región beta A. del gen normal.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración para describir adicionalmente ciertas realizaciones preferentes de la presente invención.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB)

Se observó que la bradiquinina (10 nM, 10 min a 37°C) provocaba una mayor fosforilación de Erk1/2 en fibroblastos de Alzheimer (AD) frente a fibroblastos de una demencia que no es AD y fibroblastos de control sin demencia. Aunque esta mayor fosforilación de Erk1/2 para fibroblastos de AD se podía observar en el presente ejemplo con líneas celulares de Coriell adicionales, la variabilidad inherente hallada en estas mediciones indicaba la necesidad de una cuantificación, fiabilidad y reproducibilidad mejoradas. Por lo tanto, en el presente ejemplo, para controlar las diferencias intrínsecas en las velocidades de crecimiento de las líneas celulares de fibroblastos, así como las diferencias en las cantidades exactas de extractos de proteína aplicados a los geles, se introduce una nueva medición de la fosforilación, una que compara la fosforilación de Erk1 con la fosforilación de Erk2 en cada muestra de paciente utilizando una proporción de Erk1/2 antes y después de la estimulación con BK+. Esta medición de la proporción de fosforilación Erk1/Erk2, el biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB), diferenció completamente todos los fibroblastos de control sin demencia de todos fibroblastos de AD (figuras 1 y 4A). El aparente nivel más elevado de p-Erk1 para los casos de control (BK-) (figura 3) no fue consistente para todos los pacientes. No se diferenciaron algunos casos de demencia que no era AD, aunque esto puede ser debido a la falta de confirmación por la autopsia de los diagnósticos clínicos. Esta interpretación se basó en los resultados de la medición de ADSMB obtenida con fibroblastos de pacientes con diagnósticos confirmados por autopsia (figuras 1 y 4B), en los que el ADSMB diferenció con precisión todos los casos de AD de todos los casos de demencias que no son AD e incluso los casos de demencias "mixtas" debido a etiologías de AD y otras etiologías que no son AD, tales como la enfermedad de Parkinson. Esta precisión elevada en la diferenciación de pacientes con AD de pacientes con una demencia que no es AD y de pacientes de control sin demencia se refleja en la destacada sensibilidad y especificidad del ADSMB (figura 6) considerando las muestras celulares de Coriell y las muestras confirmadas por autopsia. Cuando sólo se consideran los diagnósticos confirmados por autopsia, la sensibilidad y especificidad están a niveles del 100%.

#### El biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB) varía con la duración de la enfermedad

Para una muestra de aquellos pacientes para los que estaba disponible la duración de la enfermedad (es decir, el tiempo de medición de ADSMB desde el momento del inicio del síntoma o síntomas), se examinó la relación de las amplitudes de ADSMB con respecto a la duración de la enfermedad. Tal como se ilustra (figura 2), hubo una correlación inversa significativa (con análisis de regresión lineal) de la magnitud de ADSMB con la duración de la enfermedad. Estos resultados sugieren que el ADSMB de la fosforilación de la MAP quinasa es más destacado cuanto antes se haya medido en la transcurso de la enfermedad.

#### Inducción del fenotipo de Alzheimer por A $\beta$ (1-42)

Dado que los niveles de A $\beta$  (1-42) están probablemente implicados de manera crítica en la AD temprana y dado que se demostró que el ADSMB observado por los datos tenía poder de diagnóstico en la AD temprana, se examinó en el presente ejemplo la posibilidad de que la A $\beta$  (1-42) elevada podría inducir anomalías de MAP quinasa D.F. Por lo tanto, se expusieron líneas celulares de fibroblastos de pacientes de control normales durante 24 horas a A $\beta$  (1-42) 1,0  $\mu$ M. Tal como se ilustra en la figura 5A, la preincubación con A $\beta$  (1-42) efectivamente convirtió, tal como se predijo, el fenotipo de ADSMB normal (negativo) en el fenotipo de ADSMB anormal con valor positivo que se había observado para todos los fenotipos de AD. Estos resultados sugieren que este fenotipo de ADSMB en pacientes con AD en realidad aumentó a partir de los niveles elevados de A $\beta$  (1-42).

Inversión del fenotipo del Alzheimer por el activador de PKC, briostatina

Tal como se ha descrito anteriormente, la fosforilación de MAP quinasa (medida mediante el ADSMB) está regulada por la activación de PKC que, a su vez, mostró vulnerabilidad para los niveles elevados de Aβ. Además, se observó que el potente activador de PKC, la macrolactona, briostatina, aumentaba la activación de PKC en fibroblastos humanos, al igual que reducía los niveles de Aβ (1-42) en los cerebros de ratones transgénicos con genes de AD humanos. Por lo tanto, en base a estos descubrimientos, se ensayaron los efectos de la briostatina (0,1 nM) sobre fibroblastos humanos tratados con Aβ(1-42). Tal como se ilustra (figura 5B y Tabla 1), la briostatina invierte completamente el cambio de fosforilación de MAP quinasa inducido en fibroblastos normales por Aβ(1-42). La briostatina cambió los valores anormales positivos de fibroblastos tratados con Aβ en valores negativamente normales de ADSMB observados previamente para fibroblastos que no son de AD. La eficacia "terapéutica" de la briostatina concuerda con la supervivencia ampliamente incrementada de ratones transgénicos con AD que se expusieron a tratamiento crónico con briostatina.

Tabla 1

El biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer (ADSMB) se midió para AC (líneas celulares de control) (control), células inducidas por beta amiloide (Aβ) y células inducidas por beta amiloide (Aβ) más tratamiento con briostatina (Aβ + BY).

Líneas celulares	ADSMB <sup>a</sup>		
	Control*	Aβ <sup>*#</sup>	Aβ + BY <sup>#</sup>
AG06959	-	0,13	0,0
AG07732	-0,11	0,12	-0,13
AG11363	0,0	0,16	0,09
AG09977	-0,15	0,13	0,01
Promedio ± SE	-0,09 ± 0,05	0,13 ± 0,01	-0,01 ± 0,05

\* P < 0,001, # P < 0,01

<sup>a</sup> Se calculó ADSMB según el método utilizado por este estudio.

\* Se realizó el Test-t entre las células de control y las células tratadas con Aβ.

# Se realizó el Test-t entre las células tratadas con Aβ y las células tratadas con Aβ más tratamiento con briostatina.

La elevada sensibilidad y especificidad de la medición de ADSMB de la fosforilación de MAP quinasa para diagnosticar AD sugieren un potencial importante como prueba de laboratorio para AD con el fin de ayudar en la valoración clínica de la demencia. Hasta la fecha, la confirmación por autopsia de la demencia diagnosticada clínicamente está disponible normalmente sólo para pacientes con enfermedad de larga duración. Considerando que la AD puede durar de 8 a 15 años, se ha observado que el diagnóstico clínico para AD de duración breve muestra una elevada imprecisión cuando se compara con el diagnóstico clínico posterior en la progresión de la enfermedad y, a continuación, se somete a la validación mediante autopsia. Por lo tanto, un biomarcador periférico, en el presente ejemplo la proporción de la fosforilación de MAP quinasa para fibroblastos humanos, tiene una utilidad real para conseguir estrategias terapéuticas para la demencia.

Aunque no se desea estar ligado a ninguna teoría, también es de interés considerar por qué la proporción de la fosforilación de Erk1 con respecto a la fosforilación de Erk2 podría ser sensible a anomalías debidas a diferencias específicas en AD del metabolismo de Aβ. Una implicación de este y anteriores estudios de biomarcadores periféricos para AD es que la patofisiología de AD no sólo implica al cerebro, sino también a una variedad de sistemas de órganos. Esta visión patofisiológica sistémica de AD concuerda con las observaciones de que los mecanismos metabólicos de amiloide y tau están omnipresentes en el cuerpo humano y se manifiestan en sangre, saliva, piel y tejidos extracerebrales.

La estrecha correlación mostrada en el presente ejemplo de la proporción Erk1/Erk2 con AD también centra la atención en estos sustratos como una "lectura" de la señalización de AD. Por ejemplo, las isozimas de PKC regulan diversas dianas moleculares que convergen en MAP quinasa. El PKC activa: (1) el aumento de la α-secretasa de s-APP y, por tanto, indirectamente la reducción de β-amiloide; (2) la β-amiloide activa la glicógeno sintasa Quinasa-3β (GSK-3β) que aumenta la fosforilación de MAP quinasa; (3) el PKC inhibe GSK-3β; (4) el propio PKC fosforila GSK-3β; y (5) el PKC activa señales inflamatorias de citoquinas que pueden responder a BK y otros sucesos iniciados por AD; (6) los metabolitos tóxicos del colesterol (por ejemplo, 17-OH colesterol) inhiben el PKC α que, en equilibrio, reduce Aβ y reduce la tau fosforilada.

La evidencia de que la disfunción de las propias isozimas de PKC puede contribuir a la iniciación más temprana del proceso de AD, se reflejó, por tanto, a través de todos los sucesos de señalización anteriores, en la anomalía de la proporción de fosforilación de Erk1/2.

Finalmente, también es un misterio cómo la especificidad de la anomalía de fosforilación de AD se puede mantener a través de pases sucesivos de líneas celulares de fibroblastos humanos. Este fenómeno se podría explicar a través de una interacción de los niveles de PKC/MAP quinasa con el genoma de los fibroblastos. Se sabe que PKC y MAP quinasa regulan la expresión génica. Por lo tanto, puede ser posible que un ciclo continuo de estimulación por PKC/MAP quinasa de su propia síntesis pueda perpetuar las anomalías de los niveles de PKC y la fosforilación de MAP quinasa de una generación de fibroblastos humanos a la siguiente.

EJEMPLO 2: Ensayo *in vitro* de fibroblastos de piel para determinar la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada

Se cultivaron hasta una fase de confluencia del 90-100% células de fibroblastos de piel depositadas (enfermedad de Alzheimer (AD), demencia que no es AD (no ADD) (por ejemplo, enfermedad de Huntington y Parkinson y esquizofrenia clínica) y células de control de la misma edad (AC), del Instituto Coriell de Investigación Médica. Las células se "privaron" de medio sin suero (DMEM) durante 16 horas. Se añadió 10 nM de bradiquinina (BK) en DMSO en medio regular a 37°C durante 0 y 10 minutos. Para los controles, se añadió la misma cantidad de DMSO.

Después de lavar cuatro veces con 1 X PBS frío (4°C), los matraces se mantuvieron en una mezcla de hielo seco/etanol durante 15 minutos. Se extrajeron los matraces de la mezcla de hielo seco/etanol y, a continuación, se añadieron a cada matraz 80 µL de tampón de lisis (10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, NP-40 al 0,5%, Triton X-100 al 1%, cóctel de inhibidores de proteasas al 1%, cócteles de inhibidores de ser/thr/tirosina fosfatasas al 1%).

Se mantuvieron los matraces en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría (4°C) durante 30 minutos y se recogieron las células de cada matraz con un rascador de células. Las células se sonicaron y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos, y se utilizó el sobrenadante para transferencia Western después del ensayo de proteínas totales.

Se determinaron Erk1, Erk2 totales y las formas fosforiladas de Erk1 y Erk2 (p-Erk1, p-Erk2) utilizando anticuerpos específicos: Erk1/2 anti-regular y anti-Erk1/2 fosfo.

EJEMPLO 3: Fibroblastos de la piel

Se adquirieron fibroblastos de piel depositados de pacientes con AD y controles de la misma edad del Instituto Coriell para Investigación Médica. La autopsia confirmó que los fibroblastos de piel se obtienen por separado. Los pacientes pueden estar clínicamente afectados con demencia severa, pérdida de memoria progresiva y otras funciones cognitivas deterioradas. Los cerebros de estos pacientes muestran EEG anormales y diferentes grados de atrofia cerebral mediante un rastreo CAT o CT. Las células de individuos normales con un parecido próximo en la edad se utilizan como controles.

Fibroblastos de piel recién extraídos. La recogida y cultivo de fibroblastos de tejido de piel recién obtenidos se realiza de la siguiente manera: El personal cualificado obtiene tejidos de piel mediante biopsias por punción de pacientes que no son FAD (nFAD) y controles de la misma edad. Todos los pacientes (o representantes) firman formularios de consentimiento informado.

Fibroblastos depositados con la enfermedad de Huntington. Estos fibroblastos son de pacientes con la enfermedad de Huntington (HD), con demencia que acompaña a síntomas habituales de la enfermedad de Huntington. Se utilizan como controles fibroblastos de individuos normales de la misma edad y género.

EJEMPLO 4: Materiales

El DMEM se adquiere de Gibco BRL. El suero bovino fetal se adquiere de Bio Fluids. La bradiquinina, el éster 2-aminoetilico del ácido difenilbórico (2ABP), proteasa y cócteles de inhibidores de fosfatasa se adquieren de Sigma; la bisindolilmaleimida-1 y LY294002 se adquieren de Alexis; PD98059 se adquiere de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos anti-fosfo-Erk1/2 se adquieren de Cell Signaling Technology. Erk1/2 anti-regular se adquiere de Upstate Biotechnology. Los minigeles de SDS (4-20%) se adquieren de InvertoGene-Novex. Las membranas de nitrocelulosa se adquieren de Schleicher & Schuell (Keene, NH). Todos los reactivos de la electroforesis de SDS se adquieren de Bio-Rad. El kit con sustratos de quimioluminiscencia SuperSignal se adquiere de Pierce.

De manera alternativa, la bradiquinina (P.M. 1060,2) se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA). La MAPK anti fosfo-p44/p42 de conejo se obtuvo de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Erk1/2 anti-regular se adquirió de Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA), el anticuerpo secundario anti-conejo se adquirió de Jackson Lab (Bar Harbor, ME). La beta amiloide (1-42) (P.M. 4514,1) se obtuvo de American Peptide (Sunnyvale, CA). La briostatina se adquirió de Biomol (Plymouth Meeting, PA).

## EJEMPLO 5: Cultivo de células de fibroblastos con AC y AD

5 Los fibroblastos depositados de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, que incluyen los tipos FAD y nFAD, y de los controles de la misma edad (AC), se mantienen y cultivan en matraces T25/T75 con DMEM que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%. Las células se utilizan en los pases 6 a 17.

## EJEMPLO 6: Procesado y cultivo de fibroblastos de muestras de tejido de biopsia reciente o muestras depositadas

10 Las muestras se colocan en 1 x PBS y se transportan en un medio de transferencia al laboratorio para la propagación. Después de extraer el medio de transferencia, los tejidos de piel se lavan con PBS y se trocean finamente en explantes de 1 mm de tamaño. Los explantes se transfieren uno por uno sobre la superficie de crecimiento de matraces T25 aireados con 3 ml de medio de biopsia que contiene FBS al 45% y 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (Pen/Strep). Los tejidos se cultivan a 37°C durante 24 horas antes de la adición de 2 ml de medio de biopsia que contiene FBS al 10%. El medio se sustituye después de 48 horas con 5 ml  
15 de medio de cultivo regular que contiene FBS al 10% y 100 U/ml de Pen/Strep. A continuación, las células se subcultivan y se mantienen según el procedimiento habitual indicado anteriormente.

20 Para estos estudios también se han utilizado sistemas de cultivos de células de fibroblastos de piel humana. Se cultivaron células de fibroblastos de piel depositadas con la enfermedad de Alzheimer (AD), demencia que no es AD (por ejemplo, enfermedad de Huntington y Parkinson y esquizofrenia clínica y células de control de la misma edad, AC), del Instituto Coriell de Investigación Médica (Camden, Nueva Jersey) (complementadas con suero al 10% y penicilina/estreptomina, 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%) hasta una etapa de confluencia del 90-100% en un matraz de cultivo con células de 25 ml. Las células se "privaron" de medio sin suero (DMEM) durante 16 horas. Se preparó una solución 10 nM de bradiquinina (en DMSO) en medio DMEM con suero al 10%. Se añadieron 7 ml de una solución  
25 de BK 10 nM al matraz de cultivo de 25 ml y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Para los controles se añadió la misma cantidad de DMSO en medio DMEM con suero al 10%. Se añadieron 7 ml de este medio con DMSO (< 0,01%) al matraz de cultivo de 25 ml y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Después de lavar cuatro veces con 1 X PBS frío (4°C), los matraces se mantuvieron en una mezcla de hielo seco/etanol durante 15 minutos. Se extrajeron los matraces de la mezcla de hielo seco/etanol y, a continuación, se añadieron a cada matraz 100 µL de tampón de lisis (10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, NP-40 al 0,5%, Triton X-100 al 1%, cóctel de inhibidores de proteasas al 1%, cócteles de inhibidores de ser/thr/tirosina fosfatasa al 1%). Se mantuvieron los matraces en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría (4°C) durante 30 minutos y se recogieron las células de cada matraz con un rascador de células. Las células se sonicaron y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos, y se utilizó el sobrenadante para transferencia Western después del  
35 ensayo de proteínas totales.

## EJEMPLO 7: Tratamiento de células de fibroblastos con diferentes activadores de proteína quinasa C.

40 Se utilizan bradiquinina o diferentes activadores de proteína quinasa C específicos para el tratamiento de fibroblastos. Se cultivan fibroblastos de piel de AC y AD depositados hasta una confluencia del 80-100% antes de "privarse" en DMEM sin suero durante toda la noche. Las células se tratan con 10 nM de activador de proteína quinasa C a 37°C para diferentes periodos de tiempos con el fin de establecer una evolución con el tiempo para los efectos inducidos por el activador de la proteína quinasa C. El momento de tiempo en el que las reacciones se terminan inmediatamente después de la aplicación de activador de proteína quinasa C se define como el "minuto 0" después del tratamiento con activador de proteína quinasa C. Se añade un matraz de control de células para cada línea celular en cada momento de tiempo del tratamiento con el volumen idéntico de PBS. La reacción se termina mediante la extracción del medio de cultivo, enjuagando las células rápidamente con PBS enfriado previamente, pH 7,4, y transfiriendo el matraz sobre hielo seco/etanol. Para las células obtenidas y cultivadas a partir de tejidos de biopsias recientes, se puede utilizar una concentración de activador de proteína quinasa C de 0,1 nM. El tiempo de  
50 tratamiento es aproximadamente de 10 minutos a 37°C.

Para preparar lisados celulares a partir de células tratadas, se mueven los matraces de hielo seco/etanol a agua helada. A cada matraz se añade 1 ml de tampón de lisis que contiene 10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, pH 8, NP-40 al 0,5%, Triton X-100 al 1%, cóctel de inhibidores de proteasas al 1% (Sigma), cócteles de inhibidores de Ser/Thr, tirosina fosfatasa al 1% (Sigma). Después de agitar en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría durante 30 minutos, se recogen las células de cada matraz con un rascador de células. Las células se sonicaron y centrifugan a 5.000 rpm durante 5 minutos y se utiliza el sobrenadante para transferencia Western.

## 60 EJEMPLO 8: Transferencia Western

Protocolo 1: Los lisados celulares se tratan con un volumen igual de 2 X de SDS-tampón de muestra y se hierven durante 10 minutos. Se separan las proteínas de cada muestra en un minigel de gradiente del 4-20% y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Se detecta la Erk1/2 fosforilada con un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 utilizando el  
65 kit de detección Super Signal ECL. A efectos de normalizar la cantidad de Erk1/2 fosforilada contra la cantidad total de Erk1/2, después de transferirse con un anticuerpo anti-fosfo Erk1/2, se extrae la misma membrana con un

5 tampón de extracción que contiene 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,7, SDS al 2% y 100 mM de 2-mercaptoetanol a 60°C durante 45 minutos y, a continuación, se realizó la transferencia con un anticuerpo Erk1/2 anti-regular. De manera alternativa, se transfieren las muestras duplicadas separadas en SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos anti-fosfo-Erk y Erk anti-regular, respectivamente. Después de lavarse con 10 mM de PBS, pH 7,4, que contiene Tween 20 al 0,01% (tres veces durante 10 minutos), la membrana se transfiere con un anticuerpo Erk1/2 anti-regular, a partir del cual se mide la cantidad total de Erk1/2 cargada en el gel de SDS.

10 Protocolo 2: Se añadieron volúmenes iguales de 2 X de SDS-tampón de muestra a cada lisado celular, y se llevó a ebullición durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo. Se realizó una electroforesis en un minigel de gradiente de 8-16% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se determinaron Erk1, Erk2 totales y las formas fosforiladas de Erk1 y Erk2 (p-Erk1, p-Erk2) utilizando anticuerpos específicos.

EJEMPLO 9: Análisis de datos

15 Se rastrean las señales para las formas fosforiladas y regulares de Erk1/2 con un escáner Fujifilm LAS-1000 PLUS. Se mide la densidad óptica promedio de cada banda de proteína utilizando software de imagen NIH. Los valores de las señales de fosfo-Erk1/2 se normalizan respectivamente contra los de las señales de Erk1/2 total. Después de la normalización, los datos de cada línea celular tratada se convierten en un porcentaje del control basal y se someten a análisis estadístico.

20 EJEMPLO 10: Inmunocitoquímica

25 Las células de fibroblastos se cultivan sobre la superficie de portaobjetos de vidrio de 2,5 cm de diámetro con 0,02 mg de polilisina. Después del tratamiento con bradiquinina u otro activador de proteína quinasa C descrito anteriormente, las células se enjuagan rápidamente con PBS frío, pH 7,4, y se fijan con formaldehído al 4% en PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de lavarse tres veces con PBS, pH 7,4, cada vez con una duración de 5 minutos, las células son penetradas con Triton x-100 al 0,1% en PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación con suero de caballo normal al 10% en PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 30 minutos, las células se incuban con anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 (1:200) a 4°C durante toda la noche. Las células sobre los portaobjetos se lavan tres veces con PBS, pH 7,4, y a continuación, se añade (1:200) una IgG anti-ratón marcada con fluoresceína (Vector Laboratories) y se incuban con las células a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después de tres lavados con PBS, y el sellado con Vectashield (Vector Laboratories), se observan señales de inmunotinción en las células con un microscopio de fluorescencia Nikon. La intensidad de las señales de inmunocitoquímica en las imágenes celulares se mide con el software Bio-Rad Quantity One (BioRad) y Tnimage. Para la localización de los receptores de BK o del activador de proteína quinasa C en los fibroblastos de la piel, se aplica un anticuerpo monoclonal anti-BK B2 o un anticuerpo anti-activador de proteína quinasa C a los fibroblastos normales, seguido de la incubación con IgG anti-ratón conjugado con Cy5. Las señales inmunorreactivas resultantes se transforman en imágenes con un microscopio de fluorescencia.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método *in vitro* de monitorización de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende la medición de un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer ("ADSMB"), en el que la proporción del nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células del paciente que han sido estimuladas por un activador de proteína quinasa C, restando la proporción del nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células de dicho paciente que han sido estimuladas con una solución de control que carece del activador de proteína quinasa C.
- 10 2. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, que comprende además la medición de la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada en más de un momento de tiempo.
- 15 3. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, en el que una disminución en la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada es indicativa de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.
4. Método *in vitro*, según la reivindicación 1, en el que dicho activador de proteína quinasa C es bradiquinina.
- 20 5. Método *in vitro*, según la reivindicación 4, en el que el nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células del paciente que han sido estimuladas por dicho activador de proteína quinasa C y el nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células de dicho paciente que han sido estimuladas con dicha solución de control que carece del activador de proteína quinasa C, es cada una de ellas una proporción normalizada, en el que la proporción normalizada representa el grado de fosforilación de Erk1 o Erk2.
- 25 6. Método *in vitro*, según la reivindicación 4, en el que el nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células del paciente que han sido estimuladas por dicho activador de proteína quinasa C y el nivel de Erk1 fosforilada con respecto al nivel de Erk2 fosforilada en células de dicho paciente que han sido estimuladas con dicha solución de control que carece del activador de proteína quinasa C, es cada una de ellas una cantidad normalizada.
- 30 7. Método *in vitro*, según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada se mide en células extraídas del paciente en más de un momento de tiempo.
- 35 8. Método *in vitro*, según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que una disminución en el valor numérico de la proporción de Erk1 fosforilada con respecto a Erk2 fosforilada es indicativa de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en dicho paciente.

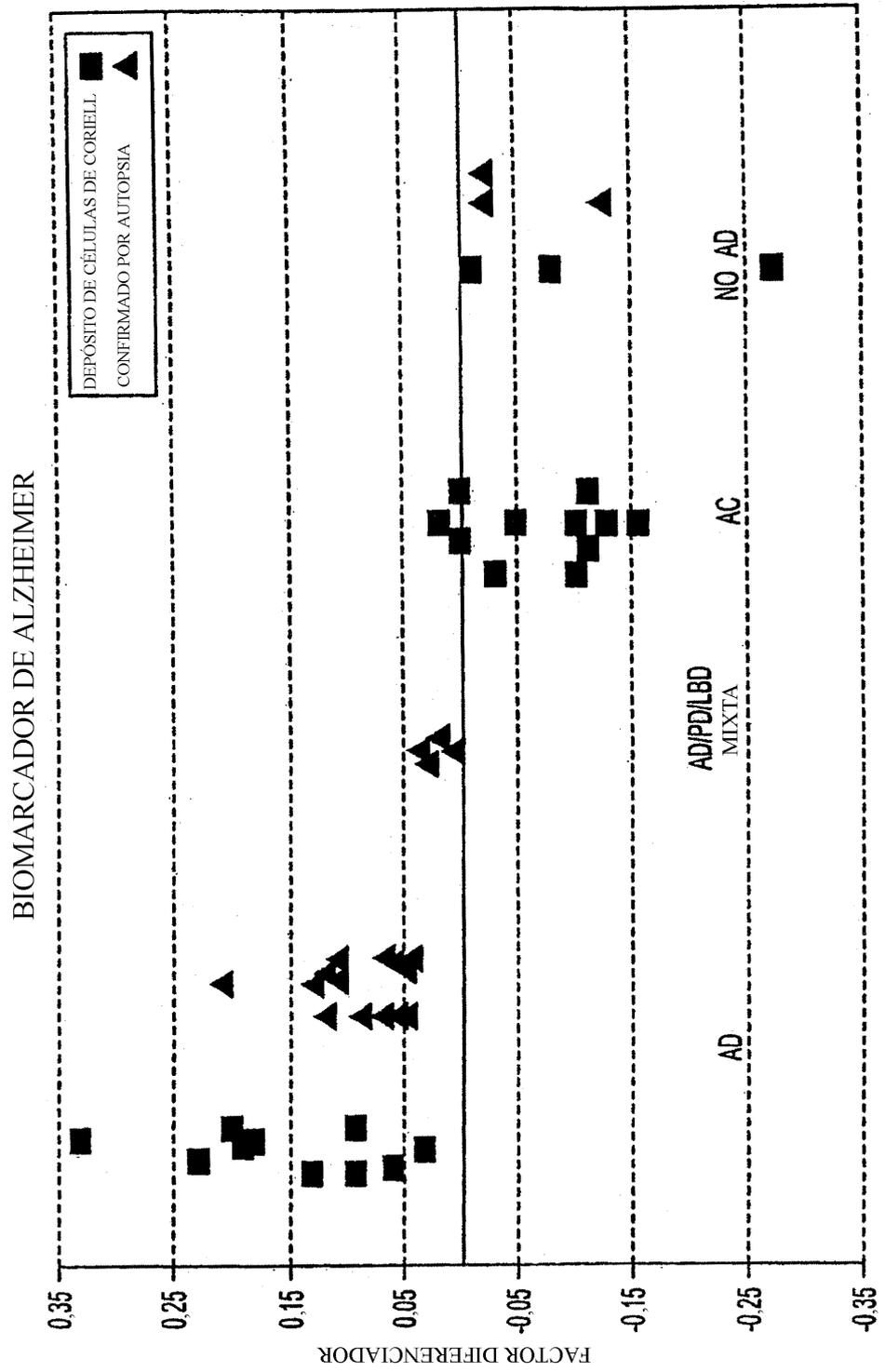


FIG. 1



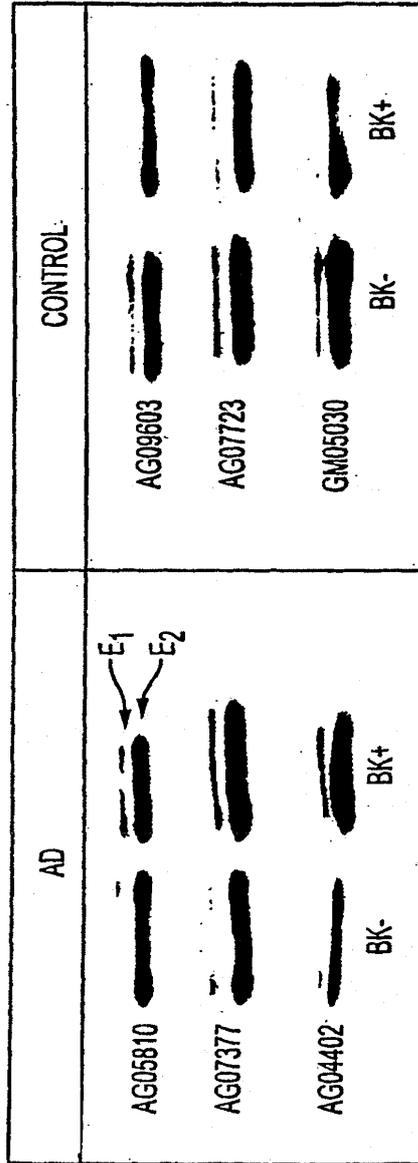


FIG. 3

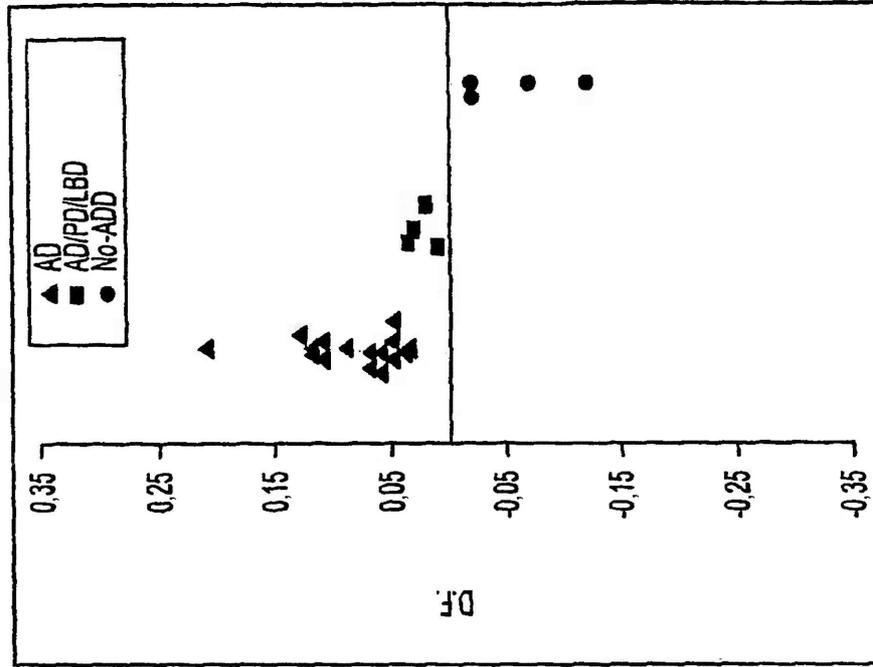


FIG. 4B

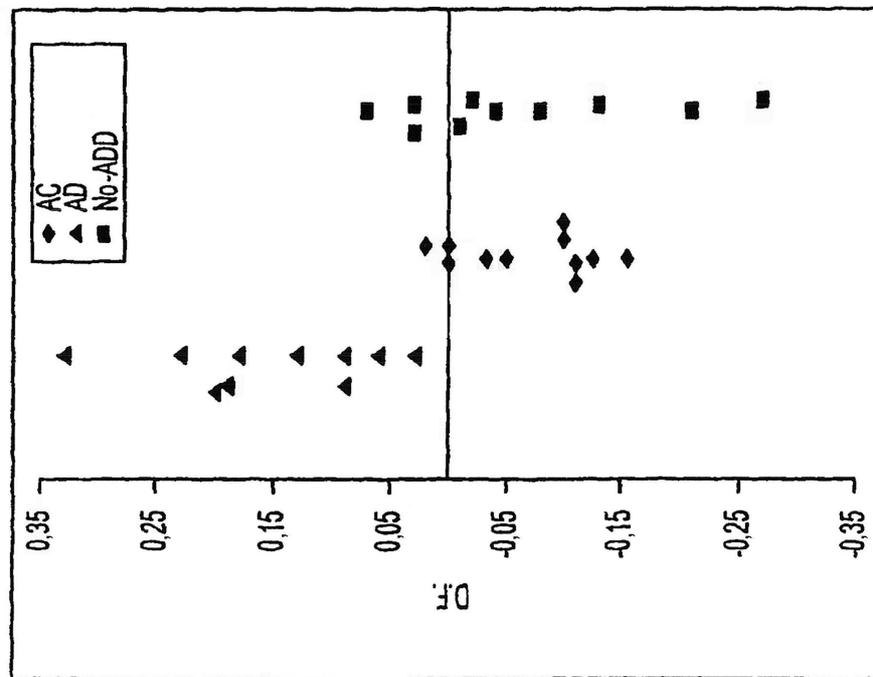


FIG. 4A

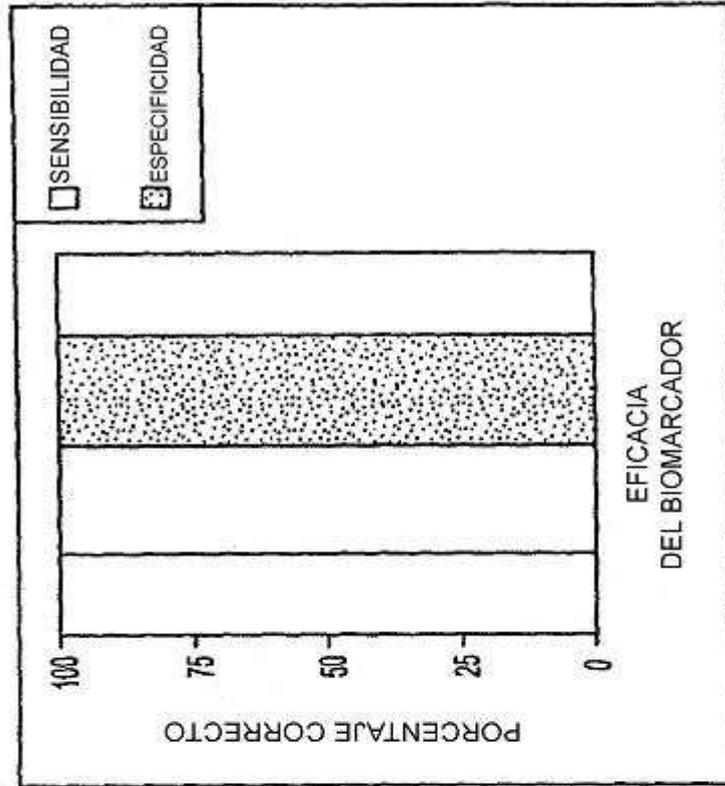


FIG. 5B

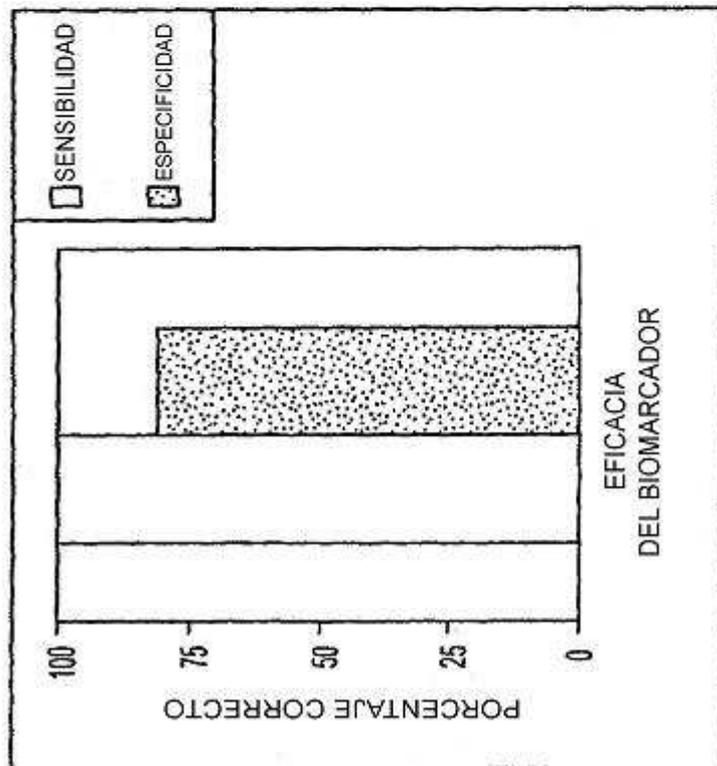


FIG. 5A