

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 495 266**

21 Número de solicitud: 201330187

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**13.02.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**16.09.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070103**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**C/ Serrano, 117**

**28006 Madrid ES y**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TRUEBA SAIZ, Angel;**

**TORRES ALEMAN, Ignacio;**

**CAVADA MARTINEZ, Carmen y**

**NUÑEZ MOLINA, Angel**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **USO DE IGF-1 COMO REACTIVO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO PRECOZ DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

57 Resumen:

Uso de IGF-1 como reactivo de diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. La presente invención se refiere al uso del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) como reactivo de diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer, así como a un kit que comprende IGF-1 y un sedante y su uso en el diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer.

**USO DE IGF-1 COMO REACTIVO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO PRECOZ DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**DESCRIPCION**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere al uso del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) como reactivo de diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer, y a un kit que comprende IGF-1 y un sedante y su uso en el diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, la invención se enmarca en el campo de la biomedicina y más concretamente en el campo de diagnóstico o pronóstico precoz de la Enfermedad de Alzheimer (EA).

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 Actualmente la EA es uno de los principales problemas sanitarios de las sociedades modernas debido a su enorme incidencia. Tras años infructuosos de búsqueda de terapias eficaces se ha propuesto de forma reciente que el fracaso de los numerosos ensayos terapéuticos realizados podría deberse a que los tratamientos se inician siempre en fases demasiado avanzadas de la enfermedad ya que los métodos diagnósticos actuales (basados fundamentalmente en escalas clínicas) no permiten seleccionar a los pacientes en fases tempranas de la patología.

20

Existen dos líneas fundamentales de búsqueda de métodos diagnósticos, uno basado en técnicas avanzadas de imagen médica y el otro en técnicas de genómica y proteómica. Ambos están produciendo muchas innovaciones pero ninguno ha llegado a instalarse aún en la práctica clínica. Además, ninguno reclama todavía ser un sistema de diagnóstico temprano. En general estos métodos se basan en la hipótesis más aceptada como origen de la enfermedad, la llamada "cascada amiloide" (Selkoe, D.J., 2001, Neuron 32, 177-180). Por lo tanto los métodos de diagnóstico están centrados sobretodo, que no exclusivamente, en detectar biomarcadores relacionados con este hipotético mecanismo patogénico.

25

30

Así, en el diagnóstico de la EA se ha descrito el empleo un anticuerpo monoclonal dirigido al péptido beta amiloide (ES2259270B1), el análisis de los polimorfismos en el gen il-10 (EP1509621B1), la medida de la concentración del péptido b-amiloide y de la proteína Tau

(EP0792458B1) o el análisis de la fosforilación de una proteína quinasa activada por mitógeno (EP1385531B1). En 2012, la FDA ha aprobado el empleo del compuesto Florbetapir, capaz de unirse a las proteínas b-amiloide y ser detectado mediante tomografía por emisión de positrones (PET), como reactivo para el diagnóstico de la EA.

5

Alternativamente, han ido surgiendo o rescatándose distintas hipótesis sobre el origen de la enfermedad. Una de ellas sostiene que la EA obedece a un desajuste metabólico en el que estaría implicada la insulina (Blum-Degen, D. *et al.* 1995, *J. Neural Transm. Suppl* 46, 139-147) y posiblemente uno de sus factores relacionados, el factor de crecimiento insulínico tipo 1, también conocido como somatomedina C, o IGF-1 (del inglés: insulin-like growth factor-1) (Carro, E. & Torres-Alemán, I. 2004, *J Pharmacol.* 490, 127-133).

10

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico temprano de la EA alternativos a los ya existentes.

15

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el uso de IGF-1 para detectar la patología subyacente en pacientes con EA en etapas aún preclínicas. Los resultados obtenidos en ratones y en monos, en los que se les administró una inyección sistémica de IGF-1 para determinar su efecto sobre el electroencefalograma (EEG), permiten concluir que en fases pre-clínicas de la EA, la señal EEG en respuesta a la administración de IGF-1 se encuentra alterada, por lo que este procedimiento es útil para el diagnóstico y/o el pronóstico temprano o precoz de la EA en pacientes humanos.

20

La presente invención se basa en que los inventores han observado que mientras el IGF-1 administrado a animales sanos (en condiciones de sedación) modifica las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  registradas, en animales con EA estos cambios no se aprecian. Más concretamente, y como se muestra en la Figura 1, mientras que la inyección de suero salino no altera las frecuencias EEG registradas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$ ), en ratones control sanos, el IGF-1 provoca un aumento sostenido y significativo de 3 de ellas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\theta$ ) y una pequeña caída de las ondas  $\delta$ . Lo mismo ocurre en monos control sanos (Figura 2), indicando que el efecto del IGF-1 está también presente en primates.

30

Por el contrario, al administrarse IGF-1 a ratones APP/PS1 de la misma edad (3-4 meses) que modelan la amiloidosis tipo Alzheimer y que están en las fases iniciales de la patología este aumento de las bandas de frecuencia del EEG ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\theta$ ) no se aprecia, indicando que el IGF-1 deja de actuar en el cerebro con patología tipo Alzheimer (Figura 3).

5

A continuación, se utilizaron ratones APP jóvenes (3-5 meses) que corresponden con otro modelo de ratón transgénico que desarrolla la patología tipo Alzheimer mucho más despacio, con lo que hasta los 9-10 meses están cognitivamente intactos y no tienen placas amiloide en el cerebro. Sin embargo, estos ratones APP sin patología presentan también  
10 una respuesta atenuada al IGF-1, en este caso en las frecuencias  $\alpha$  y  $\beta$ . Esto indica que la pérdida de sensibilidad a IGF-1 aparece antes de los síntomas clínicos de la enfermedad (Figura 3).

Por lo tanto, el tipo de respuesta al IGF-1 permite discriminar de forma sencilla y rápida  
15 individuos sanos de enfermos y, lo más significativo, de aquellos que padecerán la enfermedad en el futuro pero que en el momento del test son asintomáticos, distinguiéndose animales sanos de los que van a desarrollar patología EA por la atenuación de las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  del EEG. Además, si la banda  $\theta$  está también atenuada, eso quiere decir que la patología ya está presente.

20

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) como reactivo de diagnóstico y/o pronóstico precoz de la EA.

25 En la presente invención se entiende por "factor de crecimiento insulínico tipo 1" (IGF-1) o somatomedina C, o IGF-1 (del inglés: *insulin-like growth factor-1*) a la proteína que en humanos es codificada por el gen *IGF-1*. La proteína IGF-1 es una hormona similar en estructura molecular a la insulina, cuyo peso molecular es de 7.649 Da, que consiste de 70 aminoácidos en una sola cadena con tres puentes disulfuro intramoleculares. Su acción  
30 principal es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1R). El IGF-1 es uno de los activadores naturales más potentes de la transducción de señal PKB (Proteína Kinasa B), un estimulador del crecimiento y proliferación celular, y un potente inhibidor de la muerte celular programada.

En la presente invención se entiende por “reactivo de diagnóstico” a aquel compuesto que sirve para diagnosticar una enfermedad, en particular, la EA, y por “reactivo de pronóstico” a aquel compuesto que sirve para pronosticar una enfermedad, en particular, la EA. En la presente invención, dicho reactivo es IGF-1 que, cuando es administrado a un individuo, es capaz de modificar las bandas de EEG de forma diferencial dependiendo de si dicho individuo padece o no la EA. Este reactivo es, por tanto, un reactivo de diagnóstico y/o pronóstico que permite determinar si un individuo padece o no EA, o determinar si un individuo va a desarrollar o no la EA.

El término “diagnóstico precoz de la EA” se refiere al proceso que comprende determinar si un individuo padece o no la EA antes de que aparezcan los síntomas tempranos de la enfermedad, entre los que se incluyen, sin limitar a, confusión, alteraciones en la memoria de corto plazo, problemas con la atención y la orientación espacial, cambios de personalidad, dificultades de lenguaje y cambios de humor inexplicables.

El término “pronóstico precoz de la EA ” se refiere al procedimiento mediante el cual se establece una predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo o curso de la EA, incluyendo aumento de la gravedad de la enfermedad en un sujeto en las primeras etapas de la misma, es decir, antes de la aparición de síntomas clínicos de la EA.

La proteína IGF-1 puede administrarse al individuo por cualquiera vía de administración conocida por el experto en la materia. Ejemplos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, peritoneal, cutánea y parenteral. No obstante, una vía de administración preferida es la parenteral, es decir, la inyección subcutánea de IGF-1.

Asimismo, el experto en la materia entiende que IGF-1 puede administrarse formando parte de una composición farmacéutica que comprenderá IGF-1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede presentarse en cualquier forma farmacéutica de administración que se considere adecuada para la vía de administración elegida, por ejemplo, por vía sistémica, oral, parenteral o tópica, para lo cual incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., las cuales pueden contener los vehículos apropiados convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. La composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dicha composición farmacéutica incluirá los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En cualquier caso, los vehículos farmacéuticamente aceptables se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de los vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para su obtención así como de sus métodos de producción puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A Ediciones, Madrid; y en Remington's Pharmaceutical Sciences (AR. Gennaro, Ed.), 20a edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como aquí se utiliza, se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar el principio activo (i.e. IGF-1); obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dichos productos.

Como entiende el experto en la materia, la concentración de IGF-1 en la composición farmacéutica estará en una concentración efectiva, es decir, en una concentración tal que pueda ejercer su actividad, como es alterar el patrón de bandas de EEG cuando es administrado a un sujeto. La cantidad efectiva de IGF-1 puede variar dentro de un amplio intervalo y, en general, variará en función de circunstancias particulares de aplicación, del sujeto que vaya a ser tratado, de su edad, de su estado, de la forma de administración elegida, de la vía y frecuencia de administración y consideraciones de este tipo. Así, en una realización particular, la concentración de IGF-1 es de entre 50 y 300 µg/kg, en particular, de

entre 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En una realización aun más particular la concentración de IGF-1 es 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

5 El término "sujeto", tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferiblemente dicho sujeto es un ser humano masculino o femenino de cualquier edad o raza.

10 La "enfermedad de Alzheimer" o "EA" es una afección neurodegenerativa que se caracteriza por el deterioro progresivo de los procesos mentales y la función de la memoria, problemas de comunicación, cambios de personalidad, conducta errática, la dependencia y la pérdida de control sobre las funciones corporales.

15 Por otro lado, tal como se ha explicado al principio de la presente descripción, la invención se basa en que la administración de IGF-1 a animales sanos modifica las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  registradas, mientras que en animales con EA estos cambios no se aprecian. Para poder observar dichos cambios en las bandas de frecuencia es necesario que el sujeto esté tranquilo o en un estado basal estable. Para el experto en la materia es práctica de rutina juzgar cuándo se ha alcanzado este punto del procedimiento.

20 El "estado basal estable" se refiere al momento en que el paciente, hallándose en reposo sensorial y psíquico (con o sin sedación), tenga una actividad electroencefalográfica tal que empíricamente presente la mínima variación en función del tiempo; es decir, que espontáneamente su composición de bandas de frecuencia no varíe o lo haga 25 mínimamente. Si esto no fuera posible, entonces cabe la posibilidad de administrar un sedante con la finalidad de conseguir dicho estado basal estable. Así, en una realización particular, el IGF-1 es empleado secuencialmente con un sedante.

30 En la presente invención se entiende por "uso secuencial" a la administración de un primer reactivo y, a continuación, la administración de un segundo reactivo, pudiendo ejercer sus efectos simultáneamente a lo largo del tiempo. En el contexto de la presente invención, el primer reactivo es un sedante y el segundo reactivo es IGF-1. El tiempo de administración entre ambos reactivos puede variar, pero el segundo reactivo (IGF-1) no será administrado hasta que el primer reactivo (sedante) ejerza su efecto sobre el individuo y se obtenga un

estado basal estable. Ambos reactivos serán administrados al paciente vía sistémica preferentemente a través de la vía intravenosa (aunque subcutánea es igualmente válida) siendo aceptable cualquier formulación de los reactivos orientada a dicha vía de administración, por lo que se podrán utilizar los usados habitualmente por el experto en la  
5 materia.

Por “sedante” se refiere a un principio activo que cuando es administrado provoque en el sujeto, entre otros efectos, calma, relajación, reducción de la ansiedad, o adormecimiento para facilitar así que el sujeto tenga un “estado basal estable” y así (i) minimizar las  
10 diferencias con el paradigma experimental y (ii) obtener mayor homogeneidad en los resultados de la prueba diagnóstica. Se puede utilizar cualquier sedante conocido por cualquier experto en la materia para tal fin y que preferiblemente sea un compuesto de la familia de las benzodiazepinas, por ejemplo, pero sin limitarse a, triazolam, oxazolam, estazolam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, bentazepam, flurazepam, flunitrazepam,  
15 clonazepam, clorazepato dipotásico y clordiazepóxido.

Así, en una realización particular, el sedante pertenece al grupo de las benzodiazepinas. Preferiblemente, el sedante se selecciona del grupo que consiste en triazolam, oxazolam, estazolam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, bentazepam, flurazepam, flunitrazepam,  
20 clonazepam, clorazepato dipotásico y el clordiazepóxido.

En la presente invención, la aplicación del sedante tiene que ser tal que origine una sedación ligera o mínima, también denominada ansiolisis, sin necesidad de la presencia de un anestesista. La ansiolisis es un estado inducido por fármacos en el cual el paciente  
25 responde normalmente a comandos verbales, la ventilación y la función cardiovascular permanecen inalteradas, sin embargo, la función cognitiva y la coordinación motora pueden estar atenuadas. Asimismo, también es posible que con la sedación el paciente pase a un nivel de sedación moderado conocido en clínica como “sedación consciente”. La sedación consciente es un estado médicamente controlado de disminución de la conciencia, pero  
30 conservando los reflejos protectores. Así se preserva la capacidad del paciente para mantener su respiración de forma independiente y continua, además de permitir la respuesta ante estímulos físicos u órdenes.

La dosis de sedación ligera o de sedación consciente del paciente en la presente invención, se rige según las guías de procedimiento de sedación durante pruebas diagnósticas, existentes en todos los hospitales. Por lo tanto, la administración de la dosis de sedación ligera o de sedación consciente durante pruebas diagnósticas es para el experto en la  
5 materia práctica de rutina.

Por otro lado, el experto en la materia entiende que la administración de IGF-1 a concentraciones elevadas puede provocar hipoglucemia en el individuo, la cual a su vez puede alterar el patrón de bandas de frecuencia del EEG. Por este motivo, opcionalmente,  
10 antes de la medir dicho patrón de bandas, se pueden medir los niveles de azúcar en sangre antes y después de la administración de IGF-1 y así controlar la glucemia en el individuo. El experto en la materia sabe evaluar cuando la concentración de IGF-1 es lo suficientemente elevada como para provocar hipoglucemia en el individuo, y en qué condiciones el IGF-1 puede tener este efecto (por ejemplo, si el individuo no ha comido). Por lo tanto, el experto  
15 en la materia sabe cuándo es recomendable controlar la glucemia. Cualquier técnica convencional para medir los niveles de azúcar en sangre puede emplearse en la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit, de aquí en adelante “kit de la  
20 invención”, que comprende el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y un sedante.

Los términos “factor de crecimiento insulínico tipo 1” (IGF-1) y “sedante” han sido definidos o explicados previamente en la presente descripción.

25 En la presente invención, un kit se entiende como un producto que contiene los diferentes principios o compuestos activos de la invención (es decir, IGF-1 y un sedante) formando una unidad que permite su transporte, almacenamiento y su administración secuencial. El kit de la invención puede contener de este modo una o más suspensiones, comprimidos, cápsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares, que contienen los principios activos de la  
30 invención y que se pueden preparar en una dosis individual o como dosis múltiples. El kit puede contener adicionalmente un soporte adecuado para resuspender los compuestos activos tal como un medio acuoso, solución salina, etc. Otros componentes que pueden estar presentes en el kit es un envase que permite mantener las los principios activos dentro de determinados límites. Los materiales adecuados para preparar tales envases incluyen

vidrio, plástico, polietileno, polipropileno, policarbonato y similares, botellas, viales, papel, bolsitas y similares.

5 El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para la administración secuencial o separada de los diferentes principios activos presentes en el kit. Por lo tanto, en una forma de realización particular, el kit de la invención comprende además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de los diferentes componentes y/o para llevar a cabo el diagnóstico y/o pronóstico precoz de la EA. Dichas instrucciones se pueden encontrar en forma de material impreso o en forma de soporte  
10 electrónico que puede almacenar las instrucciones tal que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden adicional o alternativamente contener sitios Web en Internet proporcionando dichas instrucciones.

15 La concentración de IGF-1 en el kit de la invención puede variar en un amplio rango de concentraciones. No obstante, en una realización particular, la concentración de IGF-1 es de entre 50 y 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en particular, de entre 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Preferiblemente, la concentración de IGF-1 del kit de la invención es de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

20 El kit de la invención puede comprender cualquier sedante conocido por el experto en la materia para conseguir un estado basal estable en un individuo. En una realización particular del kit de la invención, el sedante pertenece al grupo de las benzodiazepinas. Preferiblemente, el sedante se selecciona del grupo que consiste en triazolam, oxazolam, estazolam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, bentazepam, flurazepam, flunitrazepam,  
25 clonazepam, clorazepato dipotásico y el clordiazepóxido.

Estas realizaciones particulares han sido citadas, descritas y explicadas en aspectos inventivos anteriores y, en consecuencia, no es necesario más comentarios a este respecto.

30 Tal como se ha explicado anteriormente, la administración de IGF-1 a concentraciones elevadas puede provocar hipoglucemia en el individuo la cual podría alterar el patrón de bandas de frecuencia. Así, en otra realización particular, el kit de la invención comprende compuestos para la determinación de la glucosa en sangre. En una realización aun más preferida, los compuestos para la determinación de la glucosa en sangre son tiras reactivas.

Se entiende por "tiras reactivas" en la presente invención, tiras que se utilizan para determinar la concentración de glucosa en sangre basadas en el funcionamiento de la enzima glucosa oxidasa. . Las tiras impregnadas de la enzima glucosa oxidasa y de ferroceno llevan un chip y se acoplan a un lector. La enzima oxida la glucosa contenida en la muestra de sangre y transfiere electrones al ferroceno, el cual a su vez transfiere estos electrones al chip, lo que genera una intensidad de corriente. El lector, llamado glucómetro, traduce el valor de esta intensidad de corriente en concentración de glucosa en sangre.

Finalmente, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico y/o pronóstico precoz de la EA. El significado de los términos empleados en el presente aspecto inventivo así como sus realizaciones particulares han sido explicados en anteriores aspectos inventivos.

Por otro lado, en el contexto de la presente invención también se incluye un método para el diagnóstico precoz de la EA de un sujeto que comprende:

- (a) Medir las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  de dicho sujeto en un estado basal,
  - (b) Administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de IGF-1, y
  - (c) Medir de nuevo las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  de dicho individuo,
- en el que si el patrón de frecuencia de bandas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\theta$  obtenido antes de la administración de IGF-1 no varía de forma significativa con respecto al patrón de bandas obtenido después de la administración de IGF-1, entonces el sujeto padece la EA.

Asimismo, la presente invención también incluye un método para el pronóstico precoz de la EA de un sujeto que comprende:

- (a) Medir las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  de dicho sujeto en un estado basal,
  - (b) Administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de IGF-1, y
  - (c) Medir de nuevo las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  de dicho individuo,
- en el que si el patrón de bandas  $\alpha$  y  $\beta$  obtenido antes de la administración de IGF-1 no varía de forma significativa con respecto al patrón de bandas obtenido después de la administración de IGF-1, entonces el sujeto va a desarrollar la EA.

De forma opcional, previamente a medir las bandas de frecuencia del EEG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\theta$  en dicho sujeto, los métodos de la invención pueden comprender otra etapa dirigida a medir los niveles de azúcar en sangre en el individuo, tanto antes como después de la administración de IGF-1 con el objetivo de controlar la glucemia, pues tal como se ha explicado  
 5 previamente, alteraciones en ésta pueden modificar el patrón EEG y además, el IGF-I tiene potencial hipoglucemiante a dosis elevadas.

El significado de los términos empleados en el método de diagnóstico aquí mencionado ha sido ya explicado a lo largo de la presente descripción. Asimismo, realizaciones particulares  
 10 de dicho método de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, las realizaciones particulares descritas para los aspectos inventivos de la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los  
 15 expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.- Efecto del IGF-1 sobre el perfil EEG de ratones sanos.** A, Respuesta a administración sistémica de suero salino (n= 9). B, Respuesta a IGF-1 (1 mg/kg). Las 4 bandas de frecuencia analizadas ( $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) se vieron modificadas por el IGF-1 (n=14) de manera significativa como revela el test de ANOVA de un factor ( $\delta$ : F=14,20; p<0,001 /  $\theta$ :  
 25 F=37,53; p<0,001 /  $\alpha$ : F=18,50; p<0,001 /  $\beta$ : F=22,41; p<0,001). Se muestra la respuesta media de ratones control.

**Figura 2.- Efecto del IGF-1 sobre el perfil EEG de monos adultos sanos.** A, Respuesta a administración sistémica de suero salino (n=7). B, Respuesta a IGF-1 (100  $\mu$ g/kg). Las 4  
 30 bandas de frecuencia analizadas ( $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) se vieron modificadas por el IGF-1 (n= 5) de manera significativa como revela el test de ANOVA de medidas repetidas de dos factores ( $\delta$ : F=10,18; p<0,01 /  $\theta$ : F=13,91; p<0,01 /  $\alpha$ : F=6,235; p<0.05 /  $\beta$ : F=8,48; p<0,05). Se muestra la respuesta media.

**Figura 3.- La estimulación por IGF-1 de las ondas del EEG está alterada en ratones con amiloidosis tipo Alzheimer antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad.** La respuesta a IGF-1 tras 1 hora de su administración sistémica generó aumentos significativos en las bandas de frecuencia:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\theta$ , y un pequeño decremento, también significativo, en la banda  $\delta$  en ratones control sanos (wt). A, Éste patrón de respuesta está ausente en ratones APP/PS1 ( $\delta$ : F=14,20; p<0,001 /  $\theta$ : F=37,53; p<0,001 /  $\alpha$ : F=18,50; p<0,001 /  $\beta$ : F=22,41; p<0,001) que ya padecen los síntomas de la enfermedad mientras que en B, ratones APP que no tienen aún ningún síntoma también se presenta significativamente atenuado en las bandas de frecuencia  $\theta$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\theta$ : F=37,53; p<0,01 /  $\alpha$ : F=18,50; p<0,001 /  $\beta$ : F=22,41; p<0,001). C, Tras 60 minutos de tratamiento (salino o IGF-1); T de Student vs WT + Salino (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001) o vs WT + IGF-1 (#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001)

## EJEMPLOS

15

### **Materiales y Métodos:**

#### *Análisis off-line y Estadística*

Se utilizó el programa Spike 2 para calcular el espectro de potencia del EEG usando una resolución de 0,2 Hz en intervalos de registro de 5 minutos y se analizaron las siguientes bandas de frecuencia: banda Delta (0,3-4 Hz), banda Theta (4-8 Hz), banda Alpha (8-12 Hz) y banda Beta (12-30 Hz). Se calculó el porcentaje de contribución de cada banda de frecuencia al EEG global y se normalizó dicho valor frente a la línea basal (calculada como el EEG promedio durante el periodo control). Así se obtienen los valores representados gráficamente en las figuras en función del tiempo, considerando la inyección de IGF-1 o suero salino como t = 0 minutos.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPrism y se realizaron los siguientes análisis estadísticos: T de Student y ANOVA de dos factores. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquéllas con p<0,05.

Todos los datos se representan como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media).

**Ejemplo 1.- Experimentos iniciales con ratones.**

Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo al R.D. 1201/2005 sobre protección de animales usados para experimentación y otros fines científicos.

5

Así mismo se contaba con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Los animales se estabularon hasta el momento del experimento en grupos de un mínimo de 2 ratones, en condiciones constantes de humedad ( $55 \pm 10\%$ ) y temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y bajo un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad con comida y bebida *ad libitum*.

10

Para los procedimientos experimentales se utilizaron ratones de 3-4 meses de edad entre 25-30 g de peso y de ambos sexos. Los animales de la cepa C57BL6/J silvestres o *wild type* (WT) fueron suministrados por el Gabinete Veterinario de la Facultad de Medicina de la UAM (Madrid, España). El modelo de animal transgénico APP/PS1 fue proporcionado por el NIH (U.S.A.): son ratones de la cepa C57BL6/J que expresan dos transgenes humanos mutados (APP<sup>swe</sup> y PSEN1<sup>dE9</sup>) causantes de enfermedad de Alzheimer familiar bajo control del promotor murino de la proteína priónica (PrP). Mediante retrocruzamiento con animales WT obtuvimos otro modelo de animal transgénico de la enfermedad que solamente portaba el transgen APP<sup>swe</sup> (APP) y que presenta una enfermedad de aparición más tardía y de progresión más lenta.

15

20

Al final del experimento cada animal fue sacrificado por sobredosis anestésica o perfusión intracardíaca.

25

Durante los procedimientos se utilizó isoflurano tanto en la fase de inducción como en la de mantenimiento. Para la primera se usó una mezcla de 2-3% del anestésico en O<sub>2</sub> (0,5-1 L/minuto), se colocó al ratón en un aparato estereotáxico, se realizó una incisión a lo largo de la línea media y a la altura de la corteza somatosensorial primaria (SI) se hizo una craneotomía con ayuda de un trépano de 0,5 mm de diámetro. Allí se colocó sobre la duramadre un macroelectrodo de tungsteno de 0,5 MOhm de resistencia (World Precision Instruments, WPI, Sarasota, FL, USA) con el objetivo de registrar la actividad eléctrica del EEG. Durante la fase de mantenimiento, la anestesia se redujo a 0,5-1,5%, en función de

30

cada animal de forma que se mantuviese tanto la ausencia de los reflejos podal y parpebral, como un registro de EEG estable con ondas lentas de gran amplitud.

El protocolo seguido fue el siguiente: se registró la actividad basal del EEG durante 20 minutos (periodo control), se inyectaron en el peritoneo 25  $\mu\text{g}$  de IGF-1 en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  de suero fisiológico o solamente el vehículo en los registros control. A continuación se registró el EEG durante 1 hora adicional. La actividad eléctrica registrada se filtró entre 0,3 y 100 Hz, se amplificó (P15, Grass & Ampli 4G, Cibertec) y se almacenó en un PC mediante una tarjeta de conversión analógico – digital (1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK), a una frecuencia de muestreo de 512 Hz, para su análisis off-line con el programa Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

Los resultados se muestran en la Figura 1. Los ratones control respondieron al IGF-I con incrementos en las frecuencias  $\theta$ ,  $\alpha$ , y  $\beta$  y decrementos en la banda  $\delta$ . Al cabo de una hora se analizaron diferencias estadísticas, siendo todas ellas significativas (Figura 3). Al realizar los mismos experimentos con ratones APP/PS1, se observa que no hay ningún tipo de respuesta a la inyección de IGF-1, siendo el perfil de la evolución del EEG en el tiempo muy similar al del grupo control inyectado con suero salino. En el caso de los ratones APP, lo que se observa es que sí existe una respuesta a IGF-1 pero que se encuentra atenuada; es decir, la activación del EEG es de menor intensidad que en el caso de los *wild type* inyectados con IGF-1.

#### Algoritmo diagnóstico

Para el análisis de los datos creamos una subrutina en lenguaje de Programación Matlab. Asignamos cada columna de valores a un vector independiente, uno de voltaje y otro de tiempo. Analizamos los datos en intervalos de 5 minutos y realizamos el espectro de potencia para cada intervalo con una función que utiliza el método multitaper descrito por Percival et al., 1993, Cambridge University Press el cual utiliza combinaciones lineales y no lineales de periodogramas modificados para obtener la densidad de potencia espectral (PSD).

Para el uso de la función introduciremos los valores: vector de voltaje de la señal, tiempo de ancho de banda predeterminado por la función, tamaño de muestreo para la realización de

la transformada de Fourier (nfft=512) y la frecuencia de muestreo. La función nos devuelve dos vectores: potencia ( $V^2$ ) y frecuencia (Hz).

Una vez obtenido el PSD separamos los datos en las distintas bandas de frecuencia con el siguiente criterio: banda de frecuencia delta de 0,3 a 4 Hz, banda de frecuencia theta de 4 a 8Hz, banda de frecuencia alfa de 8 a 12 Hz y banda de frecuencia beta de 12 a 30 Hz. Sumamos todos los puntos de la señal que comprende cada intervalo de frecuencia, obteniendo con esto dos valores distintos el porcentaje de potencia de cada frecuencia y la media de potencia para cada frecuencia a lo largo de la señal. Con estos dos valores podemos obtener el aumento sobre la basal ("fold increase") de la potencia para cada banda de frecuencias a lo largo del tiempo de registro cada 5 minutos.

De este modo en un caso control (wild type): la frecuencia delta no varía más de un 20% para el 80% de los casos; la frecuencia theta varía en más de un 25% para el 80% de los casos; la frecuencia alfa varía más de un 38% para el 80% de los casos; y la frecuencia beta varía más de un 45% en el 100% de los casos (Figura 3).

### **Ejemplo 2.- Experimentos con primates no humanos (PNH).**

Para la realización de los registros de EEG en primates no humanos se utilizaron nueve monos macacos sanos adultos (dos *Macaca fascicularis* y siete *Macaca mulata* de 12 a 18 años de edad y peso de 3,6 a 11,7 kg. Todos los individuos eran machos con la excepción de una hembra de *Macaca fascicularis*. Los monos fueron suministrados por R.C. Hartelust BV (Tilburg, Holanda) y permanecieron estabulados en el Gabinete Veterinario de la Facultad de Medicina de la UAM (nº de Registro EX 021-U) con condiciones controladas de ventilación (16 L/minuto), temperatura ( $22 \pm 4^\circ\text{C}$ ), humedad (55-65%) y ciclo de luz/oscuridad (12 horas). Fueron alimentados con pienso comercial y fruta fresca y tenían libre acceso al agua.

Los animales estuvieron supervisados por la Directora del Gabinete Veterinario de la UAM cumpliéndose las directivas españolas y europeas (R.D. 1201/2005, Ley 32/2007 y Directivas Europeas 86/609/EEC y 2003/65/EC). Así mismo, se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación de la UAM.

Ocho monos se utilizaron como control inyectados con suero salino y cinco fueron inyectados con IGF-1.

Los animales fueron tranquilizados con ketamina (5-10 mg/kg intramuscular) y anestesiados con isofluorano (2-4% durante la inducción; 1-1,5% durante el mantenimiento) mezclado con O<sub>2</sub> (2 L/minuto durante la inducción; 1.5 L/minuto durante el mantenimiento). Se esperó durante un tiempo suficiente (15-30 minutos) para asegurar el aclaramiento de la ketamina y la estabilidad del registro de EEG antes de comenzar con el registro definitivo. Para evitar artefactos derivados de la hipoglucemia inducida por IGF-1, los niveles sanguíneos de glucosa se controlaron y mantuvieron en rangos de normoglucemia (*M. fascicularis*: 50-70 mg/dl; *M. mulata*: 40-60 mg/dl) mediante infusión sistémica de solución glucosalina al 3,3% (Grifols, España) a través de una vía colocada en la vena safena menor.

Para el registro del EEG se utilizaron tres electrodos de superficie (World Precision Instruments) colocados en F<sub>pz</sub>, C<sub>z</sub> y O<sub>z</sub> según el Sistema 10-20 de Registro de EEG. Este es un sistema internacional estandarizado que utiliza el *nasion* y el *inion* como puntos de referencia para colocar los electrodos en distancias porcentuales a ellos (F<sub>pz</sub> a 10% de *nasion*, C<sub>z</sub> equidistante a ambos y O<sub>z</sub> a 10% de *inion*) cada uno con sus correspondientes electrodos de referencia y tomas de tierras. Para mejorar la conductividad de la señal se utilizó un gel electroconductor entre la superficie del cuero cabelludo y el electrodo. A partir de este momento el protocolo experimental fue idéntico al de ratón con la única salvedad de que tanto el suero salino como el IGF-1 (100 µg/kg diluidos a 1 mg/mL en suero salino) fueron inyectados como un bolo intravenoso a través de la vía venosa.

El tratamiento de la señal fue similar con la excepción de que ésta se recogió en tres amplificadores P15, Grass y luego se filtró en un filtro/amplificador Ampli 4G, Cibertec de 4 canales. Se digitalizó igualmente a 512 Hz mediante la tarjeta CED 1401 y se analizó off-line de la forma anteriormente descrita.

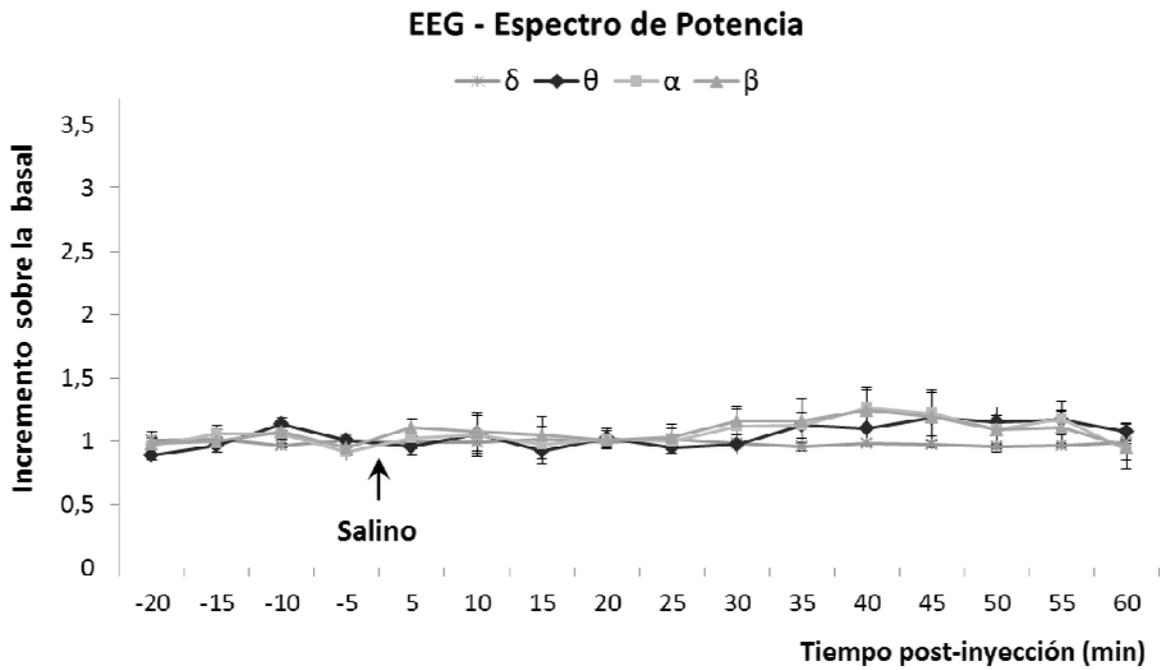
Los resultados se muestran en la Figura 2. Los monos que recibieron IGF-I respondieron de forma idéntica a los ratones, con incrementos en las bandas  $\theta$ ,  $\alpha$ , y  $\beta$  y un ligero decremento en la banda  $\delta$ .

## REIVINDICACIONES

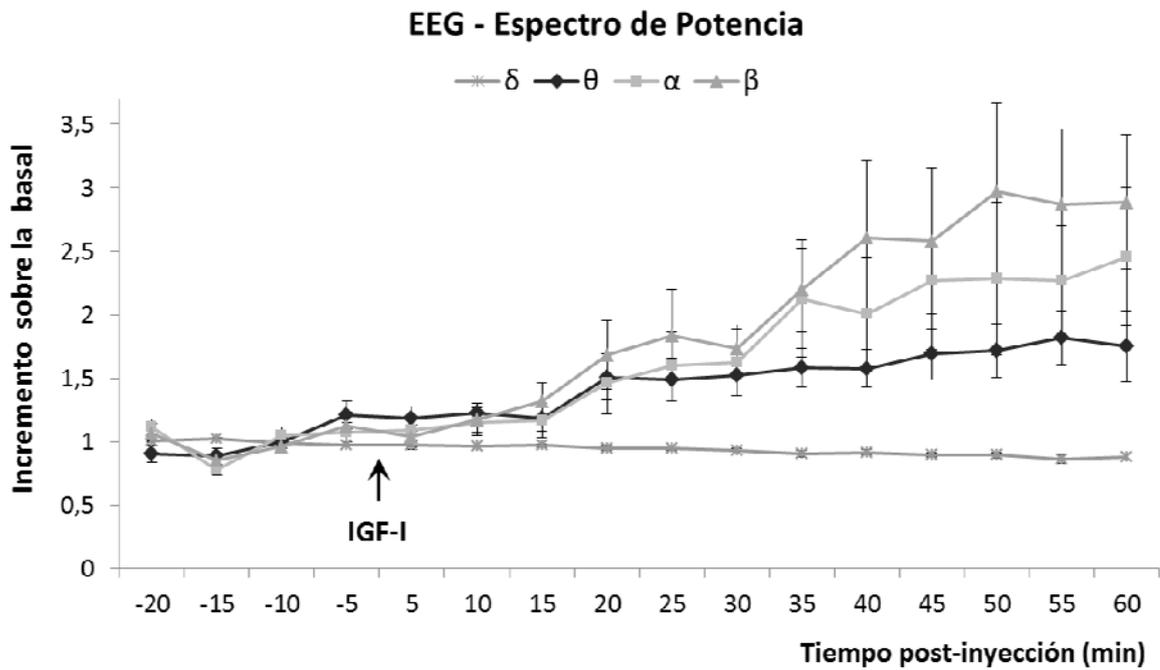
1. Uso de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) como reactivo de diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer.  
5
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la concentración de IGF-1 es de entre 50 y 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en particular, de entre 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .
3. Uso según la reivindicación 2, en el que la concentración de IGF-1 es 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .  
10
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que IGF-1 es empleado secuencialmente con un sedante.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que el sedante pertenece al grupo de las benzodiazepinas.  
15
6. Uso según la reivindicaciones 5, donde el sedante se selecciona del grupo que consiste en triazolam, oxazolam, estazolam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, bentazepam, flurazepam, flunitrazepam, clonazepam clorazepato dipotásico y el clordiazepóxido.  
20
7. Kit que comprende el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y un sedante.
8. Kit según la reivindicación 7, en el que la concentración de IGF-1 es de entre 50 y 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en particular, de entre 100 y 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .  
25
9. Kit según la reivindicación 8, en el que concentración de IGF-1 es de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .
10. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el sedante pertenece al grupo de las benzodiazepinas.  
30
11. Kit según la reivindicación 10, en el que el sedante se selecciona del grupo que consiste en triazolam, oxazolam, estazolam, diazepam, lorazepam, lormetazepam, bentazepam, flurazepam, flunitrazepam, clonazepam clorazepato dipotásico y el clordiazepóxido.

12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 que comprende compuestos para la determinación de la glucosa en sangre.
13. Kit según la reivindicación 12, donde los compuestos para la determinación de la glucosa en sangre son tiras reactivas.
- 5
14. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 para el diagnóstico y/o pronóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer.

A

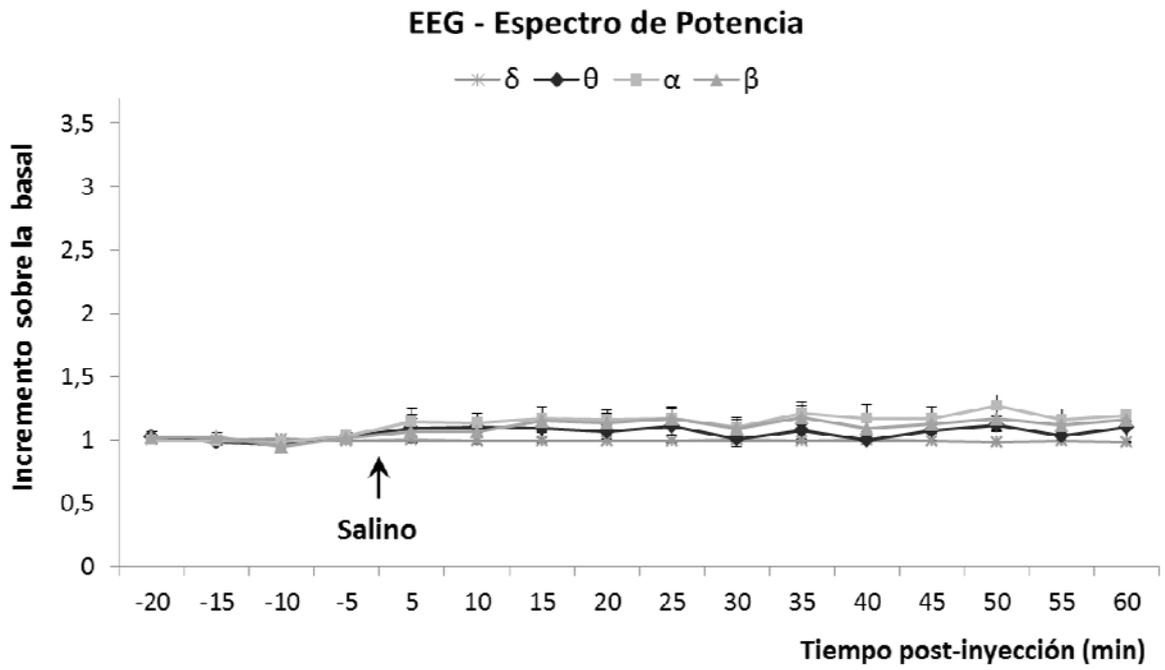


B



**FIG. 1**

A



B

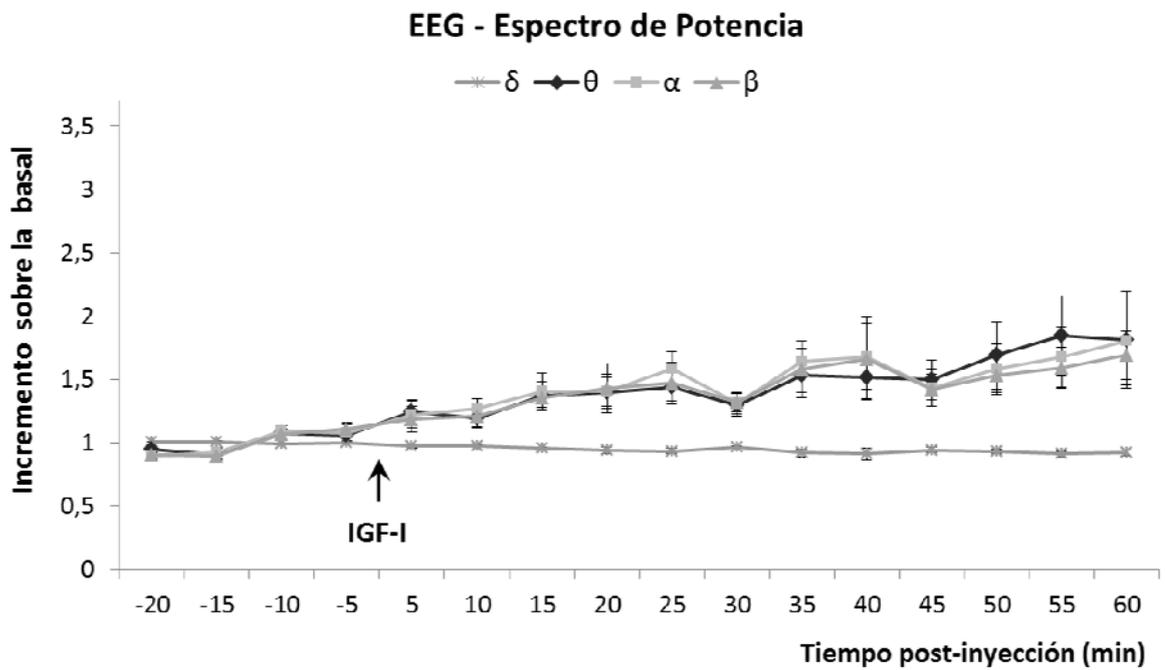
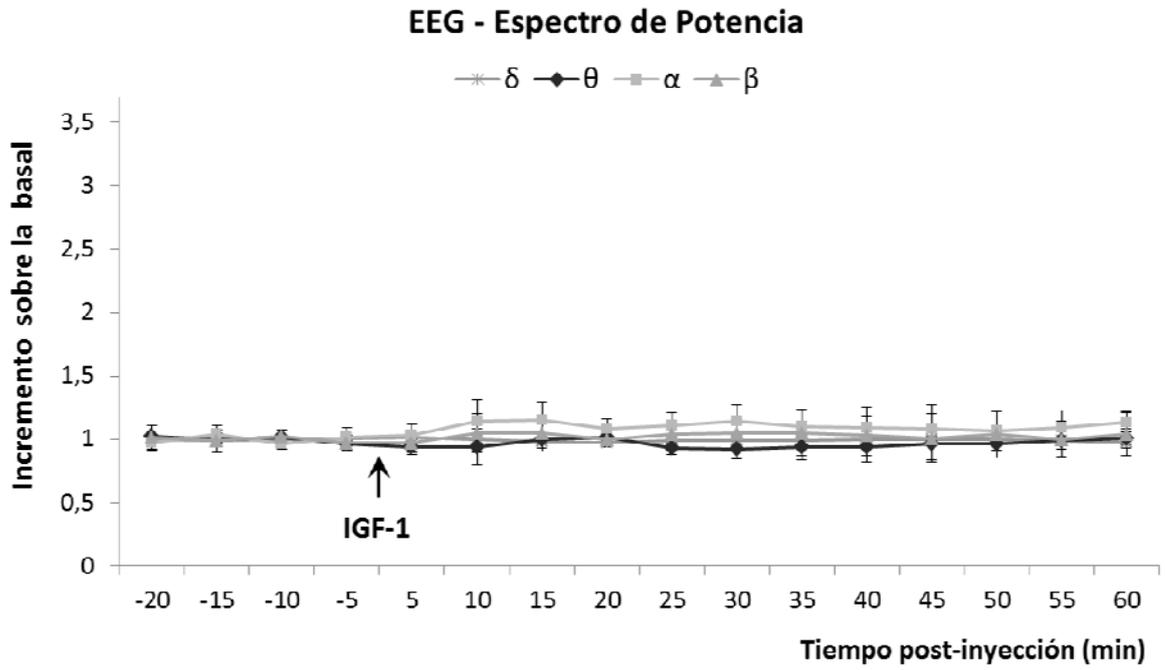
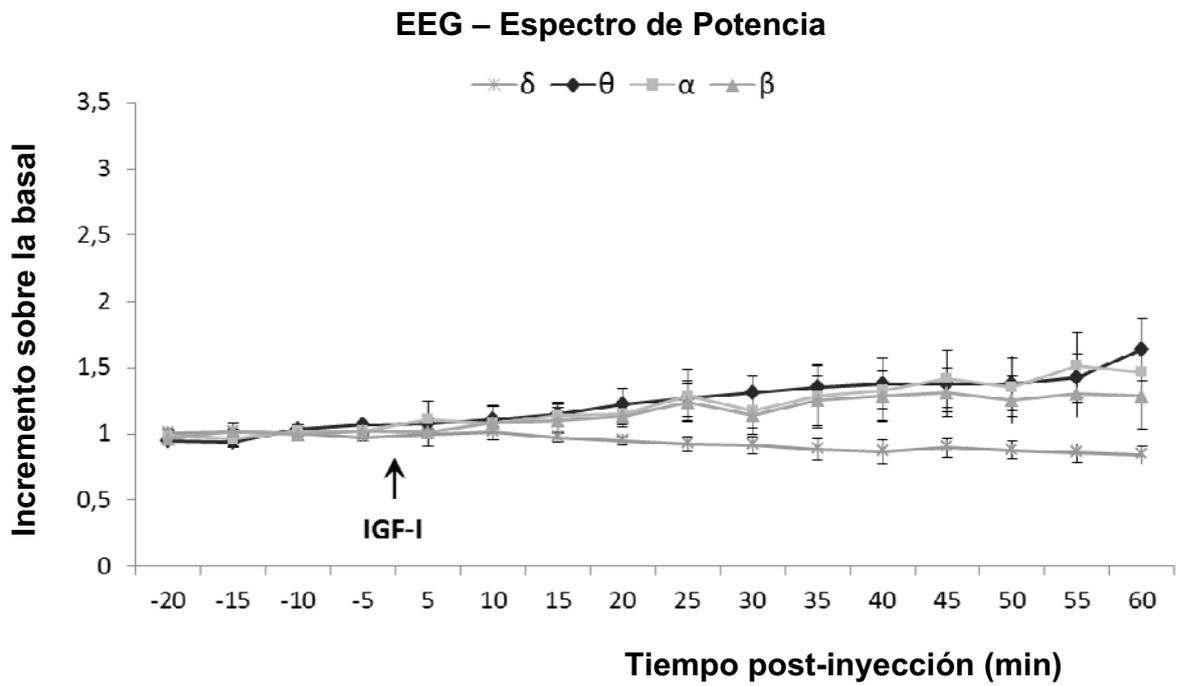


FIG. 2

**A**

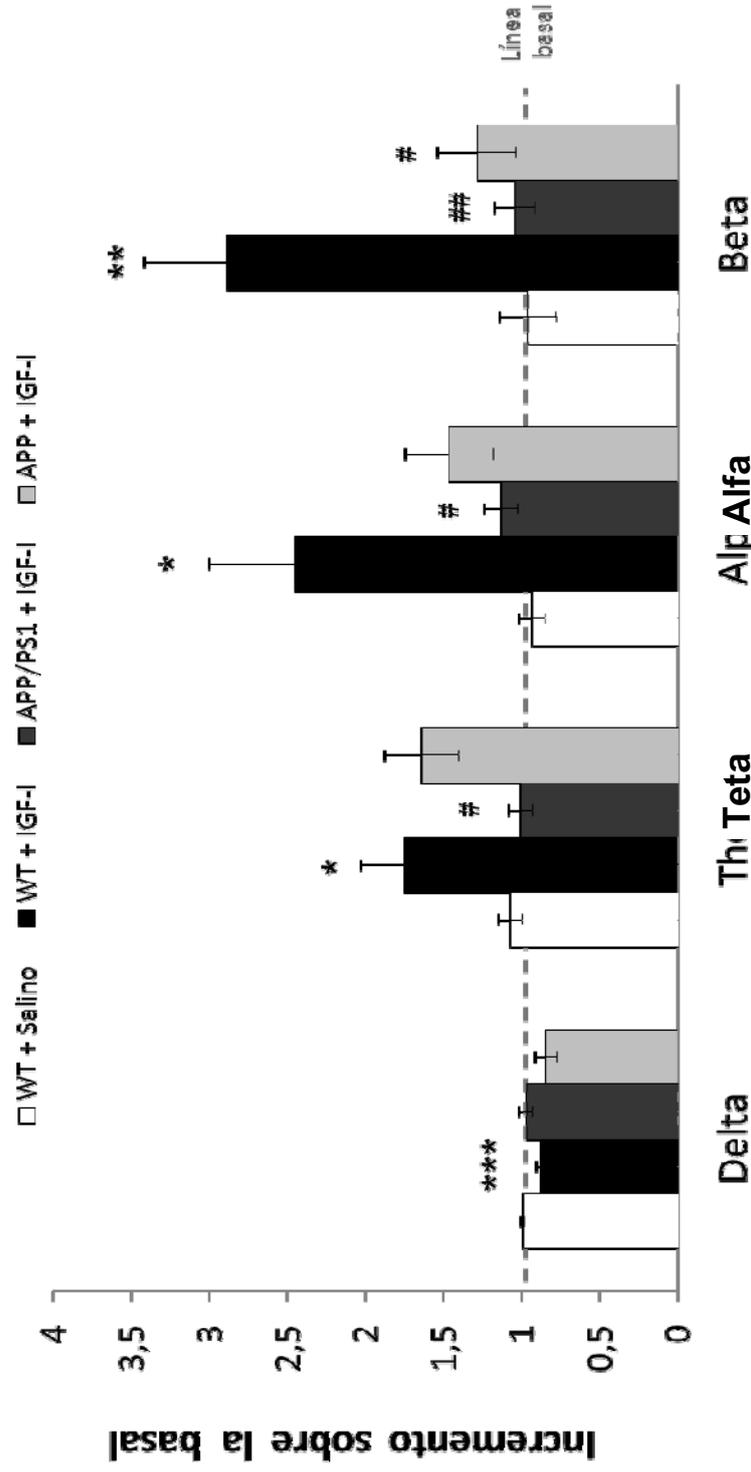


**B**



**FIG. 3**

**C**  
**60 min post-inyección IGF-1**



**FIG. 3**