

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 698**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2011 E 11754519 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2603602**

54 Título: **Método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

11.08.2010 FR 1003337

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

11.02.2015

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(100.0%)**

**3 Avenue Victoria
75004 Paris 4, FR**

72 Inventor/es:

**HUGON, JACQUES;
PAQUET, CLAIRE;
DUMURGIER, JULIEN y
MOUTON-LIGER, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 528 698 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 diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con un método de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, particularmente la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes técnicos

10 El diagnóstico de las enfermedades neurodegenerativas no es fácil. Así, para la enfermedad de Alzheimer, según los criterios clásicos denominados NINCDS-ADRDA (McKhann et al. (1984) *Neurology* 34:939-944), se distingue entre enfermedad de Alzheimer posible, probable y cierta, no pudiendo ser establecido el diagnóstico de una enfermedad de Alzheimer cierta más que post-mortem, después de la autopsia del enfermo y examen neuropatológico del cerebro poniendo en evidencia la existencia de placas seniles de una parte, y una degeneración neurofibrilar de otra parte.

15 El diagnóstico de una enfermedad de Alzheimer posible o probable reposa esencialmente en criterios clínicos y pruebas neuropsicológicas, que apuntan inicialmente a establecer si un individuo presenta un síndrome demencial, en general según los criterios del DSM IV (Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, 4ª edición, American Psychiatric Association, 1994), para determinar luego la etiología de la demencia. Los criterios de demencia comprenden esencialmente la asociación de un problema de memoria y otras funciones cognitivas que repercuten en las actividades socio-profesionales y que conllevan un declinamiento con respecto al funcionamiento anterior. El diagnóstico se refuerza por el seguimiento de la evolución del paciente, lo que permite precisar las causas de la demencia, particularmente las que se apartan de otras causas de declinación cognitiva. Para esto, el diagnóstico por imágenes cerebrales es un
20 elemento importante del diagnóstico que evalúa la atrofia regional hipocámpica, la cual puede sin embargo estar presente en otras enfermedades que atacan a las personas mayores, y que excluyen otras causas de problemas cognitivos, tales como las secuelas de accidentes vasculares cerebrales.

25 Sin embargo, se considera de manera general que aproximadamente solo el 85% de los casos de enfermedad de Alzheimer probables son confirmados post-mortem. El 15% de falsos positivos resultan generalmente de otras enfermedades neurodegenerativas, tales como las demencias frontotemporales, entre las cuales particularmente la demencia con cuerpos de Lewy (Delacourte (1998) *Annales de Biologie Clinique* 56:133-142). La metodología actual de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer carece pues de especificidad. Además, parece que entre el inicio de la enfermedad, definido por la aparición de los primeros problemas cognitivos, y los primeros síntomas de demencia que puedan dar lugar al establecimiento de un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer posible o probable, se puede
30 extender un periodo de más de 10 años (Amieva et al. (2008) *Ann. Neurol.* 64:479-480). El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer es por lo tanto establecido de forma tardía actualmente, cuando la enfermedad se encuentra en un estado muy avanzado. Los tratamientos actuales considerados para la enfermedad de Alzheimer necesitarían sin embargo, para ser eficaces, ser utilizados desde el inicio del proceso patológico, por ejemplo cuando el individuo que se va a tratar no presenta aún más que problemas cognitivos ligeros (*Mild Cognitive Impairment*, (Impedimento Cognitivo Moderado) MCI), lo que implica poder diagnosticar precozmente la enfermedad.
35

40 De hecho, los exámenes complementarios, tales como la dosificación de marcadores bioquímicos en el líquido cefalorraquídeo de pacientes, pueden ser efectuados para mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Así, se ha demostrado particularmente que la determinación de los niveles, en el líquido cefalorraquídeo, del péptido β -amiloide₁₋₄₂ (A β 42) y del nivel total del péptido tau (*Tubulin Associated Unit (Unidad Asociada a Tubulina)*), es decir a la vez bajo forma fosforilada y bajo forma no fosforilada, permitiría diagnosticar la enfermedad de Alzheimer con una sensibilidad de 92% y una especificidad de 89% (Sunderland et al. (2003) *JAMA* 289:2094-2103). Después, ha sido agregado un tercer marcador, además del A β 42 y del tau total (T-tau), a saber tau fosforilado (ptau), particularmente a nivel de la treonina 181 (ptau 181). Además, se ha podido demostrar que la combinación de estos tres marcadores permitiría detectar una enfermedad de Alzheimer naciente en los individuos que sufren de MCI con una sensibilidad del
45 83% y una especificidad del 72% (Mattson et al. (2009) *JAMA* 302:385-393).

Sin embargo, actualmente estas dosificaciones no son realizadas de rutina, en parte porque la ganancia que permiten en términos de fiabilidad y de precocidad del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer no es suficiente para justificar la disposición de recursos para estas últimas sistemáticamente.

50 La proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR) es una serina/treonina quinasa cuyo principal objetivo es el factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α (eIF2 α). La PKR existe bajo una forma activada por fosforilación de la treonina en la posición 446 y/o de la treonina en la posición 451. Niveles elevados de PKR activada han podido ser puestos en evidencia particularmente en el cerebro de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer, de la enfermedad de Huntington, y de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, así como en los linfocitos de la sangre de pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer (para revisión véase Hugon et al. (2009) *Expert Rev. Neurother.* 9:1455-1457).
55

Descripción de la invención

5 La invención se origina a partir de la puesta en evidencia, por parte de los presentes inventores, de que la determinación del nivel de PKR, particularmente bajo su forma activada fosforilada, en el líquido cefalorraquídeo de individuos es útil para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en estos individuos de manera selectiva y específica, comprendiendo un estado naciente o precoz, eventualmente asintomático, de la enfermedad.

Así, la presente invención se relaciona con un método de diagnóstico, particularmente *in vitro*, de una enfermedad neurodegenerativa en un individuo, en el cual:

- se determina el nivel de la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR) en una muestra biológica del individuo, particularmente una muestra de líquido cefalorraquídeo,
- 10 - se deduce si el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa.

La presente invención se relaciona igualmente con un método de diagnóstico, particularmente *in vitro*, de una enfermedad neurodegenerativa de un individuo, en el cual:

- se determina la relación del nivel de PKR activada con respecto al nivel total de PKR en una muestra biológica del individuo, particularmente una muestra de líquido cefalorraquídeo,
- 15 - se deduce si el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa.

La presente invención se relaciona igualmente con un método de diagnóstico, particularmente *in vitro*, de una enfermedad neurodegenerativa en un individuo que no presenta síntomas de demencia, en el cual:

- se determina el nivel de proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR) en una muestra biológica del individuo, particularmente una muestra de líquido cefalorraquídeo,
- 20 - se deduce si el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa.

La presente invención se relaciona igualmente con un método, particularmente *in vitro*, para la determinación del riesgo que tiene un individuo que no presenta síntomas de una enfermedad neurodegenerativa, de declarar la enfermedad neurodegenerativa, en el cual:

- se determina el nivel de la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR) en una muestra biológica del individuo, particularmente una muestra de líquido cefalorraquídeo,
- 25 - se deduce si el individuo está en riesgo de desarrollar la enfermedad neurodegenerativa.

Como se entiende aquí, la expresión "enfermedad neurodegenerativa" designa una enfermedad degenerativa, es decir degradación progresiva, que afecta el sistema nervioso y en particular el cerebro.

30 De manera preferida la enfermedad neurodegenerativa según la invención es una demencia. Las demencias son bien conocidas por el experto en la técnica; se considera generalmente que una demencia se caracteriza por un deterioro progresivo del funcionamiento intelectual de un individuo, que compromete así sus facultades de adaptación a su ambiente, en particular frente a situaciones nuevas, lo que conduce a una pérdida de su autonomía. Preferiblemente, los síntomas de demencia según la invención son en particular los definidos en el Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders, 4ª edición (1994) de la American Psychiatric Association (DSM IV) para las demencias de tipo enfermedad de Alzheimer, a saber:

- A. El desarrollo de déficits cognitivos múltiples que se manifiestan a la vez por:
 - (1) problemas de la memoria (capacidad reducida de aprender nuevas informaciones o de recordar informaciones previamente aprendidas).
 - (2) uno (o varios) de los problemas cognitivos siguientes:
 - 40 (a) afasia (problema de lenguaje)
 - (b) apraxia (capacidad reducida de utilizar actividades motrices a pesar de las funciones motrices intactas)
 - (c) agnosia (incapacidad para reconocer o identificar objetos a pesar de las funciones sensoriales intactas)
 - (d) problemas del funcionamiento ejecutivo (es decir planificar, organizar, fraccionar en secuencia, pensar de manera abstracta)

- B. Los déficits cognitivos de los criterios A1 y A2 que causan cada uno de los problemas significativos del funcionamiento social o profesional y que representan una declinación significativa con respecto a un nivel de funcionamiento anterior.
- C. La evolución es caracterizada por un inicio progresivo y un declinamiento cognitivo continuo.
- 5 D. Los déficits cognitivos de los criterios A1 y A2 no son debidos a ninguno de lo que sigue:
- (1) otras enfermedades del sistema nervioso que causan déficits progresivos cognitivos y de la memoria (por ejemplo, enfermedad cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, hematomas subdurales, hidrocefalia a presión normal, tumor del cerebro).
- 10 (2) enfermedades sistémicas conocidas por causar demencias (por ejemplo, hipotiroidismo, carencia de vitamina B12 o de ácido fólico, carencia de niacina, hipercalcemia, neurosífilis, infección por el VIH).
- (3) enfermedades inducidas por sustancias.
- E. Los déficits no se producen únicamente en el transcurso de un delirio.
- F. La molestia no puede ser comprendida mejor como debida a otro problema de Eje I (en el sentido del DSM IV, es decir que necesita una atención inmediata) (por ejemplo un problema depresivo mayor, o una esquizofrenia).
- 15 De manera preferida, la enfermedad neurodegenerativa según la invención es seleccionada del grupo constituido por la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, y la enfermedad de Parkinson.
- De manera particularmente preferida, la enfermedad neurodegenerativa según la invención es la enfermedad de Alzheimer.
- 20 El individuo según la invención es preferiblemente un humano. El individuo según la invención puede presentar uno o varios síntomas de demencia o ser atacado de demencia.
- Los individuos según la invención pueden igualmente no ser atacados de demencia o no presentar síntomas de demencia. Cuando no presenta demencia, el individuo según la invención puede ser atacado por problemas cognitivos, particularmente problemas cognitivos ligeros, que corresponden a la denominación anglosajona de *Mild Cognitive Impairment* (MCI), bien conocida por el experto en la técnica y particularmente definida por Petersen et al. (1999) Arch Neurol 56:303-308. Un individuo es generalmente definido como uno que presenta un MCI en caso de queja subjetiva asociada con una evidencia objetiva de un déficit del comportamiento amnésico, con restricción del funcionamiento cognitivo e intelectual global e integridad de las actividades de la vida diaria. Preferiblemente, un individuo que presenta un MCI según la invención tiene un marcador en la prueba *Mini Mental State Examination* (MMSE), particularmente en la versión consensual del Grupo de Reflexión sobre las Evaluaciones Cognitivas (GRECO), superior al marcador correspondiente al percentil 5, en función de su edad y de su nivel sociocultural. Por otro lado, el individuo según la invención puede igualmente no presentar problemas cognitivos.
- 25
- 30
- 35 Cuando el individuo según la invención no es atacado por una demencia, particularmente por la enfermedad de Alzheimer, o no presenta síntomas de demencia, principalmente de la enfermedad de Alzheimer, en particular principalmente cuando presenta un MCI, los métodos según la invención permiten en particular determinar si el individuo presenta demencia, principalmente la enfermedad de Alzheimer, en un estado naciente o precoz, incluso asintomático, o si el individuo está en riesgo de desarrollar la demencia, principalmente la enfermedad de Alzheimer.
- 40 De manera preferencial igualmente, el nivel, en una muestra de líquido cefalorraquídeo del individuo, de al menos un marcador biológico de la enfermedad neurodegenerativa es normal. Como se entiende aquí, el nivel de un marcador biológico de enfermedad neurodegenerativa es llamado normal cuando su nivel es inferior al valor del umbral generalmente aceptado por el experto en la técnica para diagnosticar al individuo como atacado por la enfermedad neurodegenerativa con la cual está asociado el marcador. Numerosos marcadores biológicos de enfermedades neurodegenerativas, particularmente de la enfermedad de Alzheimer, son conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, el marcador biológico de la enfermedad neurodegenerativa según la invención es un marcador biológico de la enfermedad de Alzheimer, particularmente escogido del grupo constituido por el marcador β -amiloide ($A\beta$), en particular β -amiloide₁₋₄₂ ($A\beta_{42}$), de tau total (T-tau), y de tau fosforilado (ptau), en particular a nivel de la treonina 181 (ptau 181). Estos marcadores y los métodos de medida de su nivel en una muestra de líquido cefalorraquídeo son bien conocidos por el experto en la técnica y están particularmente definidos en Sunderland et al. (2003) JAMA 289:2094-2103, Blennow et al. (2006) Lancet 368:387-403 y en Mattson et al. (2009) JAMA 302:385-393.
- 45
- 50 La proteína quinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR) igualmente denominada E2AK2 es bien conocida por el experto en la técnica y está particularmente definida en Hugon et al. (2009) Expert Rev. Neurother, 9:1455-1457 o por la referencia de acceso P19525 de la base de datos UniProtKB. Como se entiende aquí, la expresión "proteína quinasa

dependiente de ARN de doble cadena” o “PKR” se refiere indistintamente a PKR no fosforilada, a PKR fosforilada (pPKR) en la treonina de la posición 446 (pPKR466) y/o en la treonina de la posición 451 (pPKR451) o al conjunto de estas formas de PKR. El conjunto de las formas de PKR en la muestra biológica de la invención, fosforiladas y no fosforiladas es denominado también PKR total.

5 Así, en un modo de utilización preferido del método de diagnóstico o de determinación del riesgo de la invención, se deduce que el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa, particularmente de la enfermedad de Alzheimer, a partir de un nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra, del nivel de PKR total en la muestra, o de la relación del nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra. En otro modo de utilización preferido del método de diagnóstico o de determinación del riesgo de la invención, se deduce que el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa, particularmente de la enfermedad de Alzheimer, a partir de la comparación entre:

10 - el nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra, el nivel de PKR total en la muestra, o la relación del nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra, y

15 - al menos un valor predefinido, particularmente cuando el nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra, el nivel de PKR total en la muestra, o la relación del nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra es superior al valor predefinido.

20 El valor predefinido según la invención puede ser determinado de manera fácil por el experto en la técnica. Puede tratarse particularmente del nivel medio de PKR según la invención, o de un múltiplo superior a 1 de este nivel medio, en las muestras de LCR de individuos testigo que no sufran de problemas cognitivos. Puede igualmente tratarse de un valor umbral obtenido a partir de curvas *Receiving Operating Characteristics* (ROC) establecido para PKR total, PKR fosforilada, particularmente pPKR446, o la relación del nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra, fijando valores particulares de selectividad y de especificidad, particularmente para maximizar la suma de la selectividad y de la especificidad como se ilustra en los ejemplos que siguen. Así, a título de ejemplo, según la invención un individuo será diagnosticado por tener la enfermedad de Alzheimer cuando la relación del nivel de PKR fosforilada, particularmente pPKR446, en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra, sea superior a 0,76 o 0,77.

30 Por otra parte, en otro modo de realización particular, el método de diagnóstico o de determinación del riesgo según la invención comprende además la determinación del nivel de al menos otro marcador biológico de enfermedad neurodegenerativa, particularmente de la enfermedad de Alzheimer, tal como se define anteriormente.

La muestra biológica según la invención es preferiblemente una muestra biológica fluida, más preferiblemente del líquido cefalorraquídeo (LCR). El experto en la técnica sabe bien cómo obtener el LCR a partir de un individuo, por ejemplo por punción lumbar.

35 Preferiblemente, en el método según la invención, se determina el nivel de PKR según la invención en la muestra biológica según la invención por un método inmunológico, es decir un método que utiliza anticuerpos, particularmente monoclonales, fragmentos de anticuerpos que comprenden la parte del anticuerpo que se une específicamente al antígeno, o a uno de los aptámeros, específicamente dirigido contra PKR, es decir, no se unen esencialmente a otro constituyente de la muestra biológica, particularmente de la muestra de LCR. Como será evidente claramente para el experto en la técnica los anticuerpos útiles para medir el nivel de PKR total son dirigidos contra una parte de PKR no modificada por fosforilación; al contrario, los anticuerpos útiles para medir el nivel de pPKR446 o pPKR451 se unen en la parte de PKR fosforilada (y no en la misma parte cuando no está fosforilada). Tales anticuerpos anti-PKR son bien conocidos por el experto en la técnica. Los métodos inmunológicos según la invención son bien conocidos por el experto en la técnica y cubren particularmente la transferencia Western o la técnica ELISA.

45 La invención será ilustrada ventajosamente de manera no limitativa con la ayuda de las figuras y los ejemplos que siguen.

Descripción de las figuras

Figuras 1, 2 y 3

50 Las figuras 1 a 3 representan en diagramas de caja los niveles (unidades arbitrarias), medidos en el LCR de pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer (AD), de PKR total (PKR) (figura 1), de pPKR446 (pPKR) (figura 2) y de la relación pPKR446/PKR total multiplicada por 100 (pPKR/PKR) (figura 3), con relación con aquellos medidos en el LCR de individuos testigo que no sufren de problemas cognitivos (testigo).

Figuras 4, 5 y 6

Las figuras 4 a 6 representan las curvas ROC que dan la selectividad (eje de ordenadas) y 1-especificidad (eje de ordenadas) del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer a partir del nivel de PKR total (figura 4), de pPKR446 (figura 5) y de la relación pPKR446/PKR total (figura 6).

5 Figura 7

La figura 7 representa la relación entre la proporción pPKR446/PKR total multiplicada por 100 (pPKR/PKR, eje de ordenadas, unidades arbitrarias) y el nivel de ptau 181 (ptau, eje de abscisas, pg/mL) en el LCR así como la recta de correlación correspondiente.

Figura 8

10 La figura 8 representa la relación del nivel de pPKR446 con respecto al PKR total (eje de ordenadas, unidades arbitrarias) en el LCR de pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer (AD), particularmente con niveles de marcadores A β 42, T-tau y ptau 181 normales (AD-PLn) o intermediarios (AD-PLi); de individuos testigo sin problemas cognitivos (HC); de testigos que presentan problemas cognitivos sin relación con la enfermedad de Alzheimer (CC); de individuos que presentan una demencia alcohólica (OH); y de individuos que presentan un problema cognitivo ligero (MCD).
15

Figuras 9, 10, 11

20 Las figuras 9 a 11 representan respectivamente los niveles en el LCR de PKR total y de pPKR446 (en unidades de densidad óptica), así como la relación pPKR446/PKR total (sin unidades), medidos en el Ejemplo 3, para individuos testigo (NC), individuos que sufren problemas cognitivos ligeros (MCD) amnésicos e individuos que sufren de la enfermedad de Alzheimer. Las barras horizontales planas representan los valores medios y las barras horizontales punteadas el valor umbral.

Ejemplo

Ejemplo 1

1. Pacientes y métodos

25 Pacientes

30 Se incluyeron en el estudio 46 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (AD) y 39 individuos testigo que no tienen la enfermedad de Alzheimer. Los pacientes AD se incluyeron sobre la base de los criterios NINCDS-ADRDA. Todos los pacientes provenían del Centre Mémoire de l'hôpital Lariboisière (París, Francia). Ninguno de los individuos testigo presentaba problemas cognitivos y no cumplían los criterios de la enfermedad de Alzheimer. Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) se recolectaron después de punción lumbar en el marco del procedimiento diagnóstico clásico, en asociación con un examen neurológico, pruebas de sangre de rutina, pruebas neuropsicológicas y un diagnóstico por imágenes IRM del cerebro. El estudio recibió la aprobación del comité de ética del Hôpital Paris Nord Bichat.

35 Análisis del LCR por transferencia Western: determinación de los niveles de PKR total y PKR fosforilada en la treonina 446 (pPKR446)

40 Las muestras de LCR se pretrataron sobre columna (ProteoExtract™, Calbiochem®) para retirar la albúmina y luego se prepararon las IgG, según las técnicas estándar, por una transferencia de tipo Western. Las concentraciones de proteínas se determinaron con la ayuda del kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Las muestras de LCR se separaron sobre gel de poliacrilamida 4-12% NuPAGE Bis Tris (Invitrogen) y luego fueron electrotransferidas sobre membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios de conejo que reconocían respectivamente pPKR446 específicamente a nivel de la treonina 446 fosforilada y la totalidad de proteínas PKR (Santa Cruz), bloqueadas en un 5% de leche en PBS y luego incubadas en presencia de fluoróforo IR Dye™ 800 acoplado a un anticuerpo anticonejo (Rockland Immunochemical Inc.) diluido a 1/5000. Las proteínas enlazadas se visualizaron con la ayuda del sistema de diagnóstico de imágenes Odyssey (LI-COR biosciences) y luego fueron cuantificadas por densitometría con la ayuda del programa Multigauge (Fuji). La relación pPKR446/PKR total se determinó para cada paciente y cada individuo testigo. Todos los resultados se ajustaron con respecto a un testigo interno (cerebro humano atacado por la enfermedad de Alzheimer). El análisis estadístico de la cuantificación se efectuó con la ayuda de la versión 5 del programa Prism (GraphPad).
45

Análisis del LCR por ELISA: β -amiloide₁₋₄₂ (A β 42), tau total (T-tau), tau fosforilado a nivel de la treonina 181 (ptau 181)

Los niveles de A β 42, T-tau y ptau 181 se determinaron por el método ELISA (Innotest tests Abeta, Innotests tau, Innotests ptau 181, Innogenetics, Gand, Bélgica) en las mismas muestras de LCR que las utilizadas para la determinación de los niveles de PKR total y de pPKR446 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Análisis estadístico

- 5 Las estadísticas descriptivas se utilizaron para describir las características de los pacientes y de los testigos. Los grupos se compararon utilizando la prueba t de Student para las medidas continuas y las pruebas de χ^2 para las proporciones. Las distribuciones de los niveles de PKR total y de pPKR446, así como la relación del nivel pPKR446 con respecto al nivel de PKR total (pPKR446/PKR total) en el seno de los dos grupos (pacientes y testigos) se representaron por el método de gráficas en diagramas de caja. El análisis de curvas ROC (Receiving Operating Characteristics) se utilizó para determinar los mejores valores de corte (*cutoff*) del nivel de los marcadores del LCR medidos y para calcular el área bajo la curva (AUC). Los mejores valores de corte se definieron como los que dan la suma de la sensibilidad y de la especificidad más elevada. Se determinaron igualmente el coeficiente de correlación de Spearman entre PKR y pPKR446 de una parte y el A β 42, T-tau y ptau de otra parte.

2. Resultados

- 15 Las características de los individuos estudiados son presentadas en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1: Características de los individuos del estudio

	Testigos (N = 39)	Alzheimer (AD) (N = 46)	P
Edad, en años	69,5 (10.8)	70,7 (8,9)	0,59
Número de mujeres (%)	21 (62)	26 (57)	0.64
MMSE	27.1 (2.9)	19.4 (6.4)	<0.001
A β 42, en pg/mL	798.7 (121.6)	409.8 (149.1)	<0.001
T-tau, en pg/mL	189.2 (55.1)	598.0 (328.0)	<0.001
ptau, en pg/mL	42.5 (11.4)	107.6 (51.9)	<0.001
PKR total, unidades arbitrarias	53.7 (10.6)	71.9 (12.2)	<0.001
pPKR466, unidades arbitrarias	30.9 (19.5)	94.9 (38.5)	<0.001
Relación pPKR446/PKR	0,59 (2,47)	1,28 (3,71)	<0.001

Salvo por el número de mujeres, los valores indicados representan la media de individuos, la desviación tipo está indicada entre paréntesis. MMSE: tanteo y prueba cognitiva *Mini Mental Status Examination*.

- 20 Los datos de la tabla indican que los valores medios de las concentraciones de PKR y de PKR activada (pPKR446) y de la relación de las concentraciones pPKR446/PKR son significativamente más elevadas en el LCR de los pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer con relación a los individuos testigo.

Estas observaciones son confirmadas para los datos en su conjunto para las representaciones en diagramas de caja dadas en las figuras 1, 2 y 3. En particular, el conjunto de los valores obtenidos para las concentraciones de pPKR446 y para la relación pPKR446/PKR total de los individuos testigo es significativamente inferior a la de los pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer.

- 25 Por otro lado, se establecieron las curvas ROC para los PKR total, pPKR446 y la relación pPKR446/PKR total. Los datos de sensibilidad y de especificidad tomados de esas curvas se dan en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2: Área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC

Biomarcadores	AUC	Umbral	Sensibilidad	Especificidad	Cribado correctamente
PKR total	0,87	62	76,1	79,5	77,7
pPKR446	0,96	40	100	76,9	89,4
pPKR446/PKR total	0,96	77	97,8	87,2	92,9
Aβ42	0,95	584	94,4	90,9	91,9
T-tau	0,97	282	93,2	100	95,2
Ptau181	0,98	61	90,9	100	93,6

5 La utilización de los niveles de PKR total y sobre todo de PKR activada (pPKR446) y de la relación pPKR446/PKR total permite detectar los enfermos atacados por la enfermedad de Alzheimer. Se observa particularmente que la determinación del nivel de PKR activada (pPKR446) y de la relación pPKR446/PKR total permite una detección más sensible de la enfermedad de Alzheimer que la ofrecida por los marcadores de diagnóstico Aβ42, T-tau y ptau 181.

Los coeficientes de correlación de Spearman entre los marcadores Aβ42, T-tau y ptau 181 de una parte y PKR total, pPKR446 y pPKR446/PKR total de otra parte están presentes en la Tabla 3 siguiente y en la figura 7.

Tabla 3: Coeficientes de correlación de Spearman

	Aβ42		T-tau		ptau181	
	Rho	P	Rho	P	Rho	P
PKR total	-0,37	0,003	0,45	<0,001	0,46	<0,001
pPKR446	-0,47	<0,001	0,56	<0,001	0,58	<0,001
pPKR446/PKR total	-0,47	<0,001	0,56	<0,001	0,57	<0,001

10 Los coeficientes de correlación de Spearman entre los marcadores Aβ42, T-tau y ptau181 de una parte y PKR total, pPKR446 y pPKR446/PKR son relativamente bajos. Estos dos grupos de marcadores aparecen por lo tanto relativamente independientes los unos de los otros, lo que hace considerar que la combinación de los marcadores de la invención con Aβ42, T-tau y ptau181 podría mejorar la eficacia diagnóstica de estos últimos.

15 Ejemplo 2

20 Siguiendo la metodología del Ejemplo 1, los inventores han igualmente comparado la relación del nivel de pPKR446 sobre el nivel de PKR total en el LCR de pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer (AD), seleccionados como está indicado en el Ejemplo 1, con la misma relación medida en el LCR de individuos testigo sin problemas cognitivos (HC), de testigos que presentaban problemas cognitivos sin relación con la enfermedad de Alzheimer (por ejemplo secundarios a una depresión u otro problema psiquiátrico, o a una demencia frontotemporal, a una demencia vascular o a una enfermedad de cuerpos de Levy) (CC), de individuos que presentan una demencia alcohólica (OH), e individuos que presentan una enfermedad cognitiva ligera (MCD) (figura 8).

25 Se observa que el valor medio de la relación pPKR446/PKR total es más elevada en el LCR de pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer que en el LCR de individuos testigo que no presentan problemas cognitivos (como ya se ha visto en el Ejemplo 1) así como en el LCR de individuos que presentan una demencia alcohólica, cuyo valor medio de la relación es por otro lado similar al de los testigos sin problemas cognitivos. Es el caso presente, esto indica que la elevación de la relación pPKR446/PKR total es específica de la enfermedad de Alzheimer y posiblemente de manera más general de las demencias neurodegenerativas.

30 Se observa además que el valor medio de la relación pPKR446/PKR total en el LCR de individuos atacados de problemas cognitivos ligeros (MCD) es intermedio con respecto al de los pacientes atacados por la enfermedad de

Alzheimer y del de los individuos testigo sin problemas cognitivos. En la medida en que la tasa de conversión anual de individuos que presentan MCI en pacientes que sufren de la enfermedad de Alzheimer es aproximadamente 15%, ciertos individuos que no desarrollan la enfermedad de Alzheimer posteriormente, es probable que la elevación de la relación pPKR446/PKR total en individuos atacados de MCI sea indicativa de la presencia de una enfermedad de Alzheimer naciente o en estado precoz (es decir antes de la aparición de los síntomas de demencia) o que sea indicativa de individuos con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer a corto plazo. Por otro lado, el valor medio de la relación pPKR446/PKR total en el LCR de individuos testigo que presentan problemas cognitivos sin relación con la enfermedad de Alzheimer es similar a la de los testigos sin problemas cognitivos, lo que indica que la elevación de la relación pPKR446/PKR total en los individuos atacados de MCI es específico de la enfermedad de Alzheimer y posiblemente más generalmente de demencias neurodegenerativas.

Finalmente, se observa que mientras que algunos de los pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer presentan niveles de los marcadores A β 42, T-tau y ptau 181 en el LCR normales (AD-PLn) o intermedarios, es decir comprendidos entre el límite normal y el límite patológico (AD-PLi), el valor de la relación pPKR446/PKR total es elevado, lo que indica que esta relación puede ser útil para identificar pacientes atacados por la enfermedad de Alzheimer que no podrían ser identificados con la ayuda de marcadores clásicos.

Ejemplo 3

Se utilizó un estudio clínico, complementario al del Ejemplo 1.

1. Pacientes y métodos

Pacientes

Durante un año, se incluyeron en el estudio 119 individuos consecutivos que venían al Centre Mémoire de l'hôpital Lariboisière (París, Francia) para un análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) con el fin de estudiar problemas cognitivos. Se excluyeron, debido a su bajo número, 5 individuos que presentaban una demencia frontotemporal o una enfermedad de cuerpos de LewyBody y 6 individuos que habían tenido un accidente vascular cerebral que tenían un marcador superior a 4 sobre la escala de isquemia de Hachinski o tenían una enfermedad cardiovascular con una consecuencia visible en IRM del cerebro (infartos múltiples de vasos gruesos, infartos únicos localizados estratégicamente, ganglios basales múltiples, lagunas de la sustancia blanca, lesiones periventriculares extensivas de sustancia blanca). Antes del diagnóstico, todos los individuos se sometieron a un examen clínico estandarizado que incluía una historia médica y exámenes físicos y neurológicos. Se realizaron pruebas de laboratorio a todos los individuos, entre las cuales una medida de tasa sérica de cobalamina y de folato, un panel de química, pruebas de función de la tiroides, una serología para sífilis, una medida de la tasa de proteína reactiva C, una fórmula sanguínea completa, y un IRM del cerebro. Los diagnósticos fueron establecidos por un equipo multidisciplinario de neurólogos y neuropsicólogos especializados en problemas cognitivos. El diagnóstico de las enfermedades de Alzheimer fue establecido conforme a los criterios NINCDS-ADRDA (Mc Khann et al. (1984) *Neurology* 34:939-44) y los individuos que sufrían de problemas cognitivos ligeros (MCI) amnésicos que cumplían los criterios habituales (Petersen et al. (2001) *Arch. Neurol.* 58:1985-92). Este estudio fue aprobado por el comité de ética de los Centros Hospitalo-Universitarios de París (CEERB CHU Bichat, París, Francia). Todos los individuos y el personal sanitario dieron su consentimiento escrito informado concierne al análisis del LCR.

Procedimientos relativos al LCR

Las punciones lumbares se practicaron en los individuos en ayunas en el mes siguiente al diagnóstico Clínico. El LCR se recolectó en tubos de polipropileno de 12 mL. A las dos horas, las muestras de LCR se centrifugaron a 1800 g durante 10 minutos a 4°C. Una pequeña cantidad de LCR se utilizó para los análisis de rutina, entre los cuales están el recuento de células totales, un examen bacteriológico y los niveles de glucosa y de proteínas totales. El LCR se repartió en tubos de polipropileno de 500 μ L y se almacenó a -80°C en espera del análisis. El nivel en el LCR de A β 42, T-tau y ptau 181 se midió con la ayuda de la prueba de ELISA sándwich *Innotest* según las instrucciones del fabricante (Innogenetics, Gant, Bélgica). Los criterios de positividad de los marcadores se definieron en función de las anomalías de los niveles de A β 42, T-tau y ptau 181, según los umbrales de corte utilizados en el Centre Mémoire de l'hôpital Lariboisière (A β 42 < 500 pg/mL; T-tau > 302 pg/mL; ptau 181 > 65 pg/mL). El conjunto de los análisis biológicos se realizó en un único laboratorio. El equipo de biólogos implicados en el análisis del LCR no estaba informado del diagnóstico clínico. La calidad del análisis del LCR se validó por un consorcio europeo (programa de control calidad de biomarcadores del LCR de la asociación Alzheimer).

Determinación de los niveles de PKR total y de pPKR446 en el LCR

Las muestras de LCR se pretrataron en columna (ProteoExtract™, Calbiochem®, Darmstadt, Alemania) para retirar la albúmina y los IgG, según las instrucciones del fabricante. En resumen, se agregaron 800 μ L del tampón de equilibrado a la columna para rehidratarla. A continuación, se depositaron 300 μ L de cada muestra de LCR en columnas individuales para uso único y fueron eluidas por gravedad. Las muestras filtradas se obtuvieron después de eluir de la columna con dos lavados con un regulador de ligazón específico provisto por el fabricante. Las muestras con

eliminación IgG y de albúmina se dividieron en alícuotas y se conservaron a -20°C. La eficacia de la etapa de filtración se evaluó por un análisis de inmunomarcadores utilizando anticuerpos dirigidos contra la albúmina sérica humana (Santa Cruz, Danvers, MA, Estados Unidos). Las concentraciones de proteínas se determinaron con la ayuda del kit Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Cergy-Pontoise, Francia) según las instrucciones del fabricante.

- 5 Las muestras proteicas de LCR se separaron sobre gel de poliacrilamida 4–12% NuPAGE Bis Tris (Invitrogen) y luego fueron electrotransferidas sobre membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) a 400 mA por gel en Tris 25 mM (pH 8.3), glicina 200 mM y etanol 20%. Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon en 5% (peso/volumen) de leche en TBS, y luego fueron incubadas con el anticuerpo primario.
- 10 Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios. Un anticuerpo de conejo anti-PKR446 (Santa Cruz), un anticuerpo de conejo antiPKR (Cell Signaling, Beverly, MA, Estados Unidos), un anticuerpo de ratón antialbúmina sérica (Santa Cruz). Los IgG antirratón conjugados al fluoróforo IR Dye™ 700DX y los IgG anticonejo conjugados al fluoróforo IR Dye™ (Rockland Immunochemical Inc., Gilbertsville, PA, Estados Unidos) se utilizaron como anticuerpos secundarios. Las proteínas enlazadas se visualizaron con la ayuda del sistema de análisis por imágenes Odyssey (LI-COR biosciences, Lincoln, NE, Estados Unidos) y luego fueron cuantificadas por densitometría con la ayuda del programa Multigauge (Fuji Film, Tokyo, Japón). Las medidas son expresadas en unidades de densidad óptica (ODU).
- 15

Con el fin de evaluar la fiabilidad de las medidas de los niveles de PKR total y de pPKR446, los inventores utilizaron un estudio de prueba y de prueba repetida sobre el LCR de 25 individuos seleccionados al azar y calcularon el coeficiente de correlación intraclass entre dos medidas sucesivas de los niveles de PKR total y de pPKR446.

20 **Análisis estadístico**

- Las características de los individuos son presentadas según su diagnóstico clínico (controles neurológicos o testigos (NC), problemas cognitivos ligeros (MCI) y enfermedad de Alzheimer (AD)) y comparadas entre los tres grupos con la ayuda de la prueba de χ^2 para las variables de categoría y análisis de varianza para las variables continuas. El análisis de curvas (ROC) (Receiving Operating Characteristics) se utilizó para determinar el poder discriminante del PKR total, pPKR446 y de la relación pPKR446/PKR total para diferenciar los individuos NC y AD. Los valores de umbrales de cortes óptimos se identificaron maximizando el índice de Youden (sensibilidad + especificidad – 100). La correlación entre los diferentes biomarcadores se evaluó utilizando los coeficientes de correlación de Pearson. Todos los valores de p eran bilaterales y se consideró estadísticamente significativo un valor de P inferior o igual a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda de los programas SAS versión 9.2 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos) y Stata versión 10.0 (Statacorp LP, College Station, Texas, Estados Unidos).
- 25
- 30

2. Resultados

- Entre los 108 individuos incluidos, se excluyeron 6 AD, 10 testigos (NC) y 1 MCI por razones técnicas ligadas con el análisis de LCR (8 debido al hecho de una cantidad insuficiente de LCR y 9 por una concentración proteica demasiado baja en el LCR). Estos individuos no diferían de los individuos incluidos en lo que se refiere a la edad y la relación de sexos. Por lo tanto, se incluyó finalmente un total de 91 individuos en el estudio (AD, n = 45; MCI amnésico, n = 11; NC, n= 35). Los individuos NC se dirigieron hacia el Centre Mémoire de l'hôpital Lariboisiere para informar de problemas cognitivos (problemas ansio depresivos mayores 14, complicación de ataque vascular cerebral 5, demencia alcohólica 4, síndrome de apnea del sueño 2, síndrome de Sjögren 2, sarcoidosis 1, esclerosis en placa 2, esclerosis lateral amiotrófica 1, enfermedad de Lyme 1, hidrocefalia con presión normal 1, epilepsia 1, neuropatía periférica 1).
- 35

- 40 Las características clínicas de los individuos AD, MCI y NC se presentan en la Tabla 4 siguiente:

Tabla 4: Características de los individuos del estudio

	NC	MCI	AD	
Características	(n = 35)	(n = 11)	(n = 45)	p
Edad, (años)	64,0 (9,2)	76,9 (10,5)	70,8 (9,1)	<0,001
Mujeres, n (%)	23 (65,7)	7 (63,6)	28 (62,2)	0,95
MMSE	25,7 (3,4)	24,1 (1,7)	19,6 (6,5)	0,001

Biomarcadores del LCR (pg/mL)

Aβ42	808,8 (183,9)	608,7 (276,4)	414,7 (150,6)	<0,001
T-tau	189,6 (59,2)	316,1 (124,2)	590,7 (328,7)	<0,001
ptau 181	45,1 (12,8)	63,1 (18,8)	106,3 (52,2)	<0,001
PKR† en el LCR				
PKR total	52,2 (9,6)	75,3 (21,6)	72,5 (12,6)	<0,001
pPKR446	29,0 (13,9)	85,0 (40,4)	92,3 (38,0)	<0,001
pPKR446/PKR total	0,55 (0,23)	1,10 (0,37)	1,25 (0,38)	<0,001

Salvo por el número de mujeres, los valores indicados representan la media de individuos, la desviación tipo está indicada entre paréntesis; MMSE: tanteo y prueba cognitiva *Mini Mental Status Examination*; † unidades de densidad óptica.

5 La edad media es ligeramente más baja en los individuos NC con respecto a los individuos AD. Los biomarcadores del LCR, Aβ42, T-tau y ptau 181, son significativamente diferentes en los individuos AD y MCI con respecto a los individuos NC. La determinación de los niveles de PKR total, de pPKR446 y de la relación pPKR446/PKR total se realiza en las mismas muestras de LCR para los tres grupos de individuos. El nivel de PKR total, y particularmente el nivel de pPKR446, son elevados en los individuos AD.

10 Se observa en particular que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos en lo que concierne a los niveles de PKR total y de pPKR446, y la relación pPKR446/PKR total. Por ejemplo, el nivel medio de pPKR es de 29,0 +/- 13,9 en los individuos NC, 85,0 +/- 40,4 en los individuos MCI y 92,3 +/- 38,0 en los individuos ADts (ODU). Esto es igualmente visible en las figuras 9–11 que presentan los resultados de los individuos y el valor umbral determinado más adelante.

La Tabla 5 más abajo presenta los resultados de las curvas ROC establecidas para el nivel de PKR total, el nivel de pPKR446 y la relación pPKR446/PKR total en relación con la discriminación de los individuos AD y NC.

Tabla 5: Área bajo la curva (AUC) de las curvas ROC

Biomarcadores	AUC (SE)	Valor umbral	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Youden
Aβ42	0,95 (0,02)	606	96,7	88,9	0,86
T-tau	0,95 (0,02)	282	91,1	96,7	0,88
Ptau181	0,95 (0,02)	61	88,9	90,0	0,79
PKR total	0,90 (0,03)	57,8	91,1	71,4	0,63
PPKR446	0,98 (0,01)	51,8	91,1	94,3	0,85
PPKR446/PKR total	0,95 (0,02)	0,76	95,6	82,9	0,79

SE : Error estándar

15 El área bajo la curva (AUC) es de 0,98 para pPKR446 y 0,95 para pPKR446/PKR total. Así, un valor umbral de 51,8 ODU para pPKR446 permite distinguir individuos AD de individuos NC, con una sensibilidad de 91,1% y una especificidad de 94,3%. Estos valores son del mismo orden que los determinados para Aβ42, T-tau y ptau181 en las mismas muestras de LCR. Se constata que el valor AUC asociado a pPKR446 es el mejor cualquiera que sea el marcador considerado, incluidos los marcadores del LCR clásicos Aβ42, T-tau y ptau181.

20

La prueba-prueba repetida, es decir la doble determinación de los niveles de marcadores en una misma muestra con el fin de estudiar la fiabilidad de las medidas, se utilizó en 25 muestras de LCR (10 NC, 2 MCI y 13 AD). Los valores bajos de los coeficientes de correlación intraclase entre dos medidas consecutivas de PKR total y el pPKR446 han podido ser puestos en evidencia (respectivamente 0.94 y 0.97).

5 En cambio, no ha podido ser establecida ninguna correlación entre los niveles de PKR total y de pPKR446 y la edad y los tanteos de MMSE. Por otra parte, se observa que en los individuos AD, el nivel de pPKR446 es más elevado en los hombres que en las mujeres.

Los inventores han estudiado igualmente la correlación entre el nivel de PKR total, el nivel de pPKR446, la relación pPKR446/PKR total y los niveles de Aβ42, T-tau y ptau 181 en los individuos AD y NC (Tabla 6).

10 Tabla 6: Correlación entre el nivel de PKR total, el nivel de pPKR446, la relación de pPKR446/PKR total y los niveles de Aβ42, T-tau y ptau181

	Coeficiente de correlación de Pearson					
	Aβ42		T-tau		ptau 181	
	r	P	r	P	r	P
AD (n = 45)						
PKR total	-0,10	0,33	0,29	0,06	0,31	0,041
pPKR446	0,04	0,79	0,17	0,26	0,30	0,045
pPKR445/PKR total	0,14	0,36	0,05	0,73	0,19	0,21
NC (n = 35)						
PKR total	-0,12	0,51	0,17	0,36	0,20	0,40
pPKR446	-0,02	0,90	0,27	0,15	0,04	0,83
pPKR445/PKR total	0,06	0,77	0,25	0,18	0,15	0,44

15 Se observa que en los individuos AD, las concentraciones de ptau 181 están correlacionadas con los niveles de PKR total y de pPKR446 pero con un coeficiente de correlación bajo. En cambio, no se encuentra ninguna correlación entre los niveles de PKR total o de pPKR446 y los de Aβ42 y de T-tau en los individuos AD. Además, no se ha podido poner en evidencia ninguna correlación entre el nivel de PKR total o el nivel de pPKR446 y los niveles de Aβ, T-tau y ptau 181 en los individuos NC.

20 Esto indica por lo tanto que el nivel PKR total, el nivel de pPKR446, o la relación pPKR446 aportan una información esencialmente independiente con relación a los marcadores clásicos de LCR, lo que permite particularmente anticipar que la asociación del nivel de PKR total, del nivel de pPKR446 o de la relación pPKR446, en los niveles de Aβ42, T-tau y ptau 181 permitiría mejorar los rendimientos de las pruebas actuales basadas en estos marcadores.

Por otro lado, los inventores han observado que en los 45 individuos AD, 6 presentaban muestras de LCR que no respondían a los criterios de positividad para los niveles de Aβ42, T-tau y ptau 181, sino que presentaban por lo tanto niveles aumentados de pPKR446 y de la relación pPKR446/PKR total (Tabla 7)

Tabla 7: Determinación del nivel de PKR total, del nivel de pPKR446, y de la relación pPKR446/PKR total en los individuos AD para los cuales los niveles de Aβ42, T-tau y ptau 181 son normales

Individuos	Sexo	Edad	Diagnóstico	MMSE	Biomarcadores					
					Aβ42	T-tau	ptau181	T-PKR	pPKR	pPKR/T-PKR
Paciente 1	F	77,5	AD	26	647	195	41	49,8	73,7	1,48
Paciente 2	F	82,2	AD	27	802	282	59	57,9	55,3	0,96
Paciente 3	F	81,6	AD	22	865	184	47	53,6	63,1	1,18
Paciente 4	F	88,0	AD	19	641	191	46	85,2	92,6	1,09
Paciente 5	M	66,7	AD	26	279	195	56	84,5	141,1	1,67
Paciente 6	F	67,8	AD	26	751	420	74	68,9	135,7	1,97

T-PKR = PKR total; pPKR = pPKR446

5 Así, la evaluación de PKR total y de pPKR446 puede poner en evidencia una anomalía, mientras que los biomarcadores clásicos no lo muestran, lo que refuerza su interés y confirma que los biomarcadores de la invención aportan una información esencialmente independiente de la de los biomarcadores clásicos.

Finalmente, los inventores han comparado los niveles de los diferentes biomarcadores en los individuos MCI (Tabla 8).

Tabla 8: Determinación del nivel de PKR total, del nivel de pPKR446 y de la relación pPKR446/PKR total en los individuos MCI amnésicos

Individuos	Sexo	Edad	MCI	MMSE	Biomarcadores					
					Aβ42	T-tau	ptau181	T-PKR	pPKR	pPKR/T-PKR
Paciente 1	F	76.7	Estable	26	924	399	85	90,9	131,6	1,45
Paciente 2	F	82.1	Convertido	22	664	206	35	55,9	72,4	1,29
Paciente 3	F	85.3	Estable	24	312	288	59	113,2	72,6	0,64
Paciente 4	M	82.4	Convertido	26	870	328	79.5	64,5	43,5	0,67
Paciente 5	F	79.5	Convertido	26	447	270	44	102,5	154,9	1,51
Paciente 6	F	86.5	Estable	24	265	602	89	94,0	126,6	1,34
Paciente 7	F	66.9	Estable	24	854	253	64	53,3	51,4	0,97
Paciente 8	M	49.9	Estable	23	309	109	36	49,9	20,5	0,41
Paciente 9	F	79.6	Estable	27	332	357	58	72,4	98,8	1,36
Paciente 10	M	74.5	Convertido	22	795	358	74	59,4	79,6	1,34
Paciente 11	M	83.2	Convertido	23	924	307	71	72,2	82,8	1,15

T-PKR = PKR total; pPKR = pPKR446; estable indica una ausencia de paso hacia la enfermedad de Alzheimer a lo largo de la duración del estudio; Convertido indica un paso hacia la enfermedad de Alzheimer a lo largo de la duración del estudio

5 Se observa que para un valor de corte de 51,8 ODU relacionado con el nivel de pPKR446, 81,8% de los individuos MCI amnésicos presentan un nivel de pPKR446 anormal. Entre los cinco individuos que declararon la enfermedad de Alzheimer a lo largo de la duración del estudio que duró 1 año, uno solo de los individuos presentaba niveles de PKR total y de pPKR446 normales. Por comparación, uno solo de los cinco individuos presentaba un nivel de A β 42 anormal y solo tres de los cinco individuos presentaban un nivel anormal de T-tau y de ptau 181. Parece pues que los biomarcadores de la invención podrían ser más sensibles que A β 42, T-tau y ptau 181 para identificar entre los individuos MCI aquellos que están en un estado precoz, asintomático, de la enfermedad de Alzheimer o aquellos que están en riesgo de desarrollar a corto plazo la enfermedad de Alzheimer.

10 Por otro lado, entre los seis pacientes MCI estables, cuatro presentaban niveles de PKR total y de pPKR446 anormales. Un estudio en un periodo más largo permitirá evaluar si estos individuos declaran efectivamente la enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico *in vitro* de una enfermedad neurodegenerativa en un individuo, en el cual:
- se determina el nivel de la proteína quinasa dependiente de ARN de doble-cadena (PKR) en una muestra de líquido cefalorraquídeo del individuo,
- 5 - se deduce si el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa.
2. Método según la reivindicación 1, en el cual la enfermedad neurodegenerativa es seleccionada del grupo que comprende la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Creutzfeld-Jakob, y la enfermedad de Parkinson.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el cual la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el individuo no está afectado por demencia.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el individuo sufre de trastornos cognitivos leves (MCD).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual el nivel, en una muestra de líquido cefalorraquídeo, de al menos un marcador biológico de enfermedad neurodegenerativa es normal.
- 15 7. Método según la reivindicación 6, en el cual el marcador biológico se selecciona del grupo que comprende marcador β -amiloide ($A\beta$), tau total (T-tau), y tau fosforilado (ptau).
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual se deduce que el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa a partir del nivel de PKR fosforilada en la muestra, del nivel de PKR total en la muestra, o de la relación del nivel de PKR fosforilada en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra.
- 20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual se deduce que el individuo sufre de una enfermedad neurodegenerativa a partir de la comparación entre:
- el nivel de PKR fosforilada en la muestra, el nivel de PKR total en la muestra, o la relación del nivel de PKR fosforilada en la muestra con respecto al nivel de PKR total en la muestra, y
 - al menos un valor predefinido.
- 25 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la determinación del nivel de al menos otro marcador biológico de enfermedad neurodegenerativa tal como se define en las reivindicaciones 6 o 7.

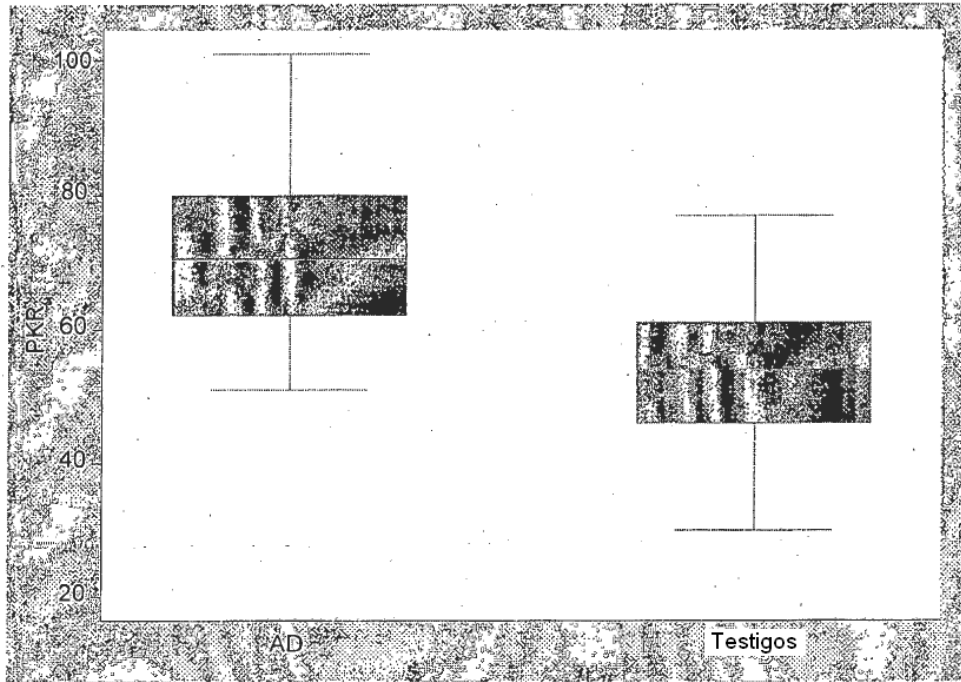


Figura 1

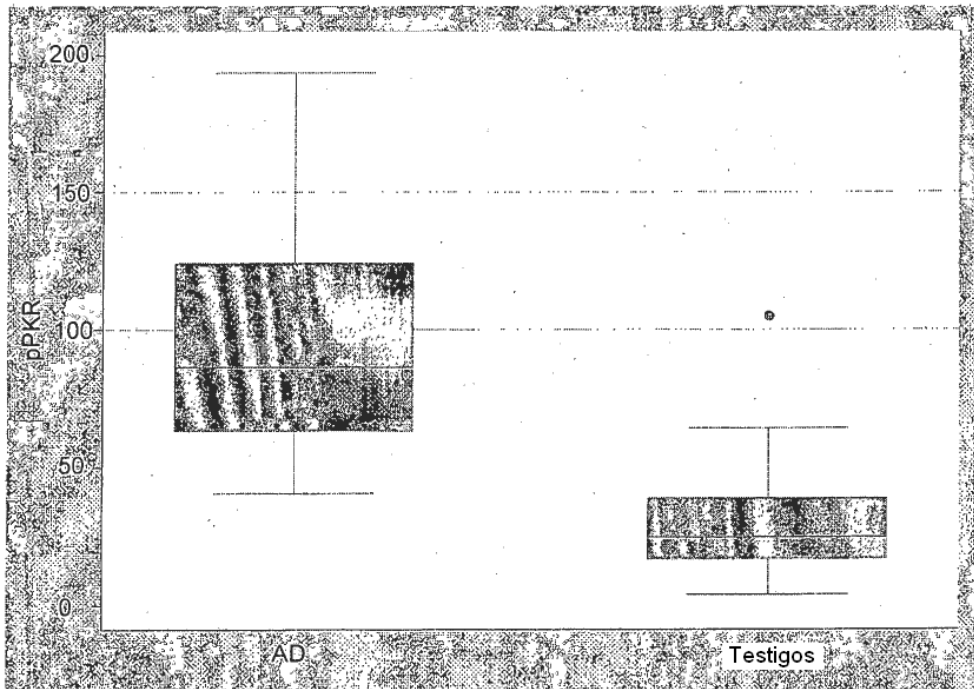


Figura 2

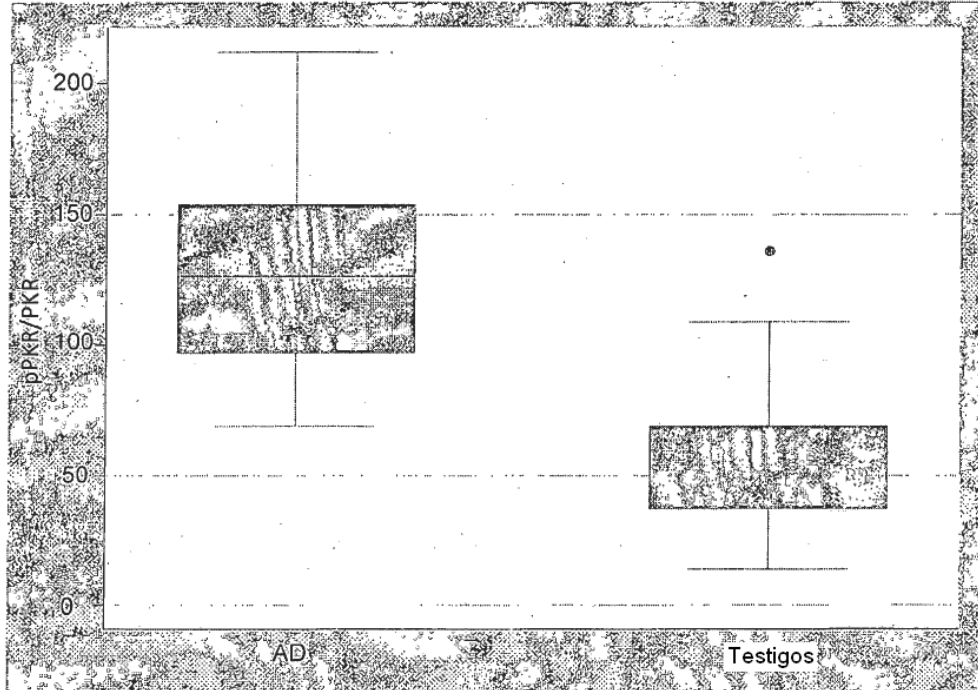


Figura 3

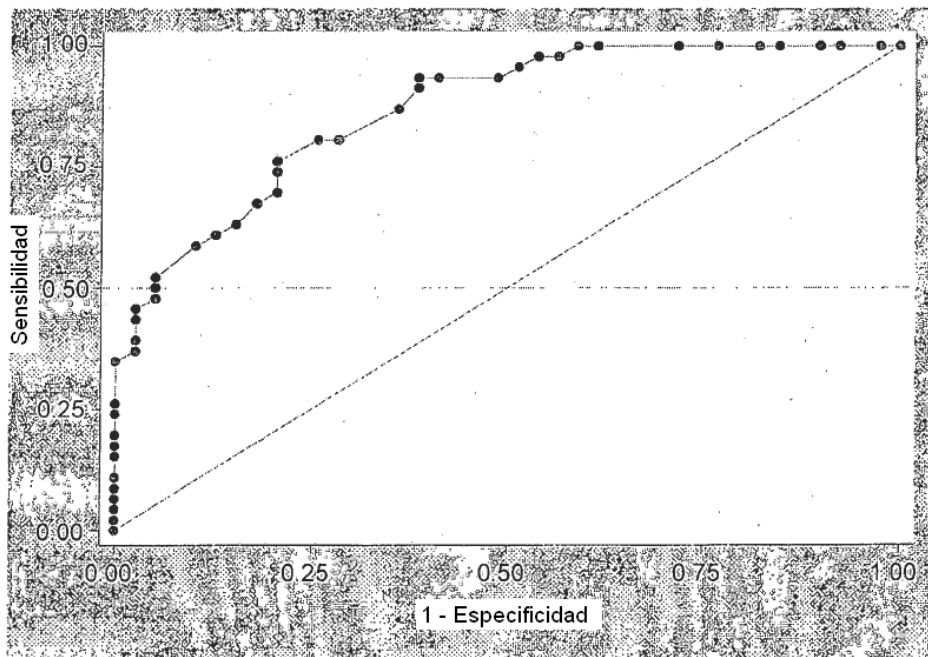


Figura 4

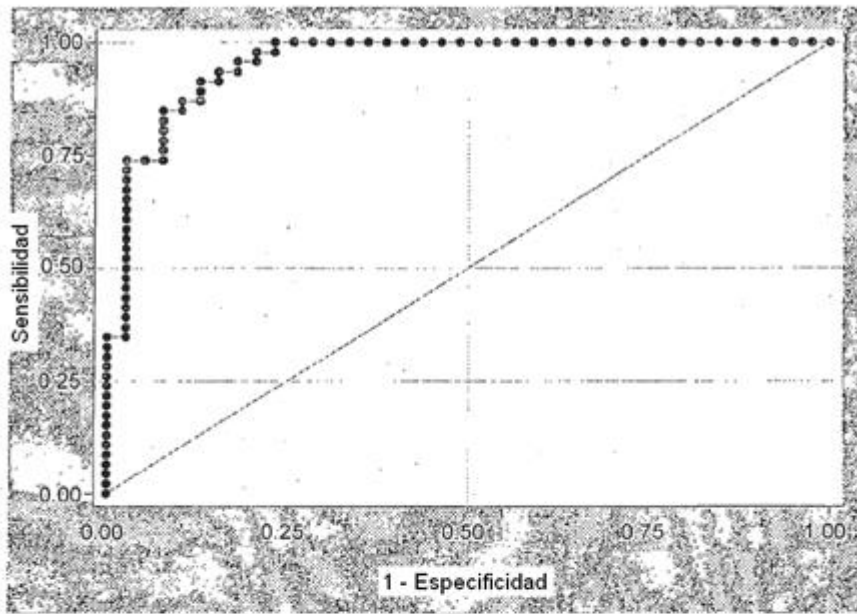


Figura 5

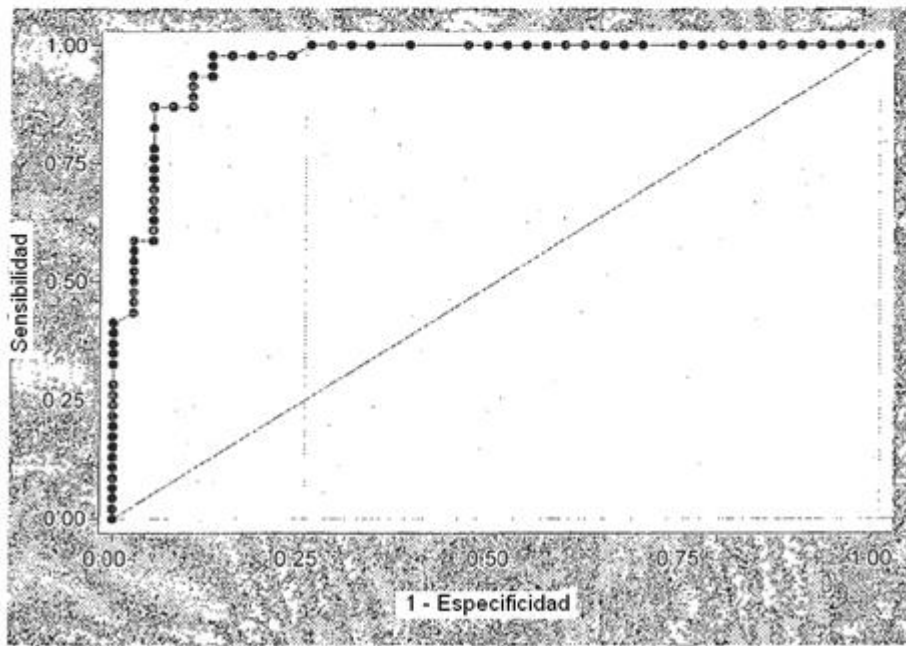


Figura 6

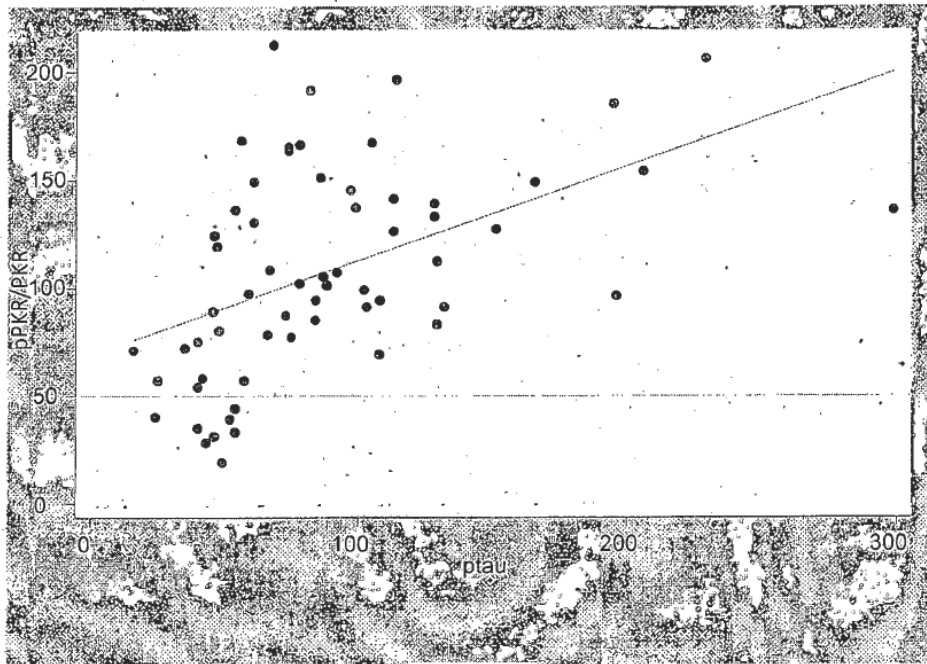


Figura 7

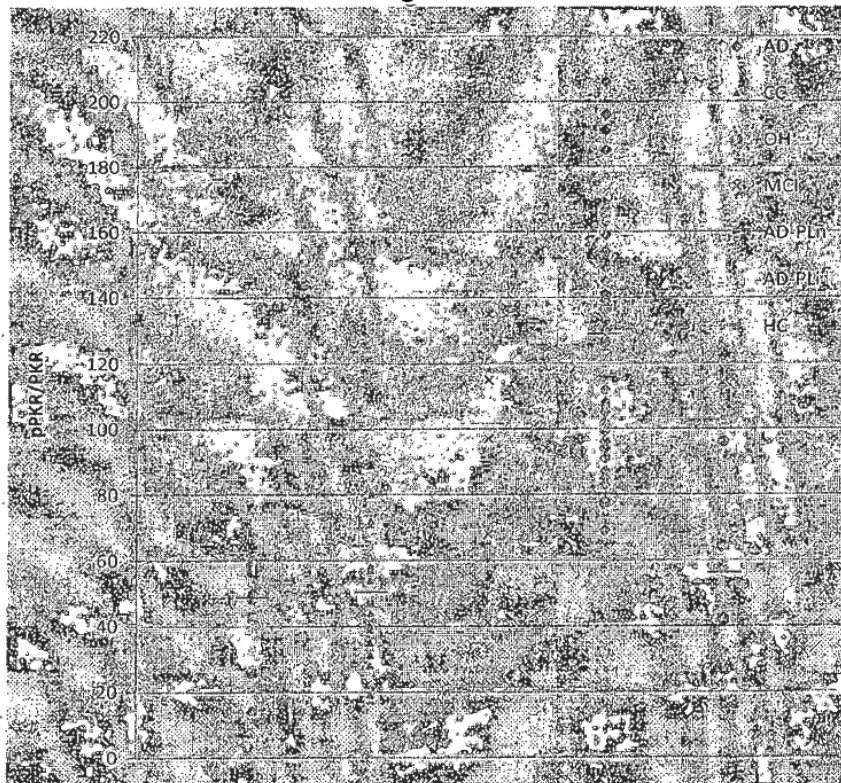


Figura 8

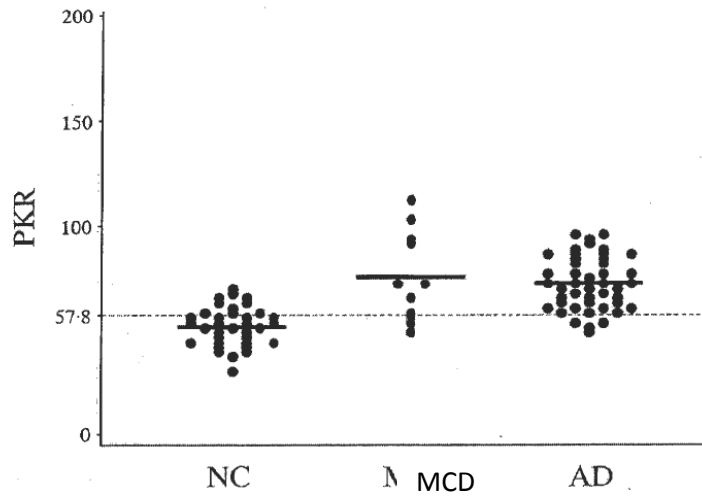


Figura 9

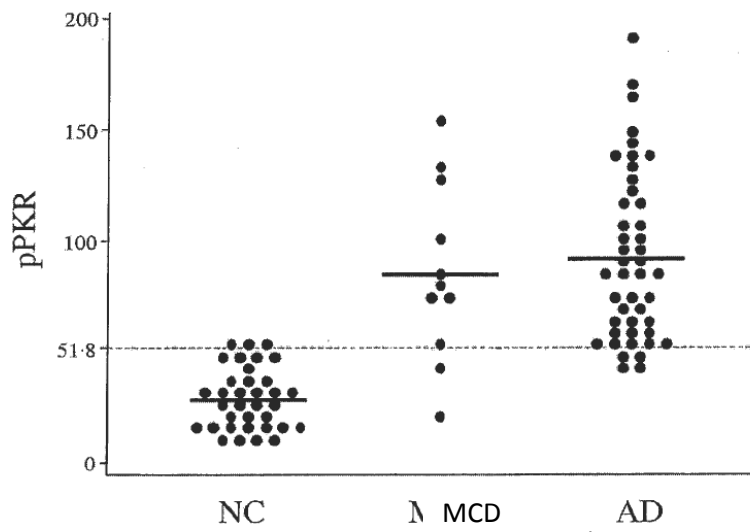


Figura 10

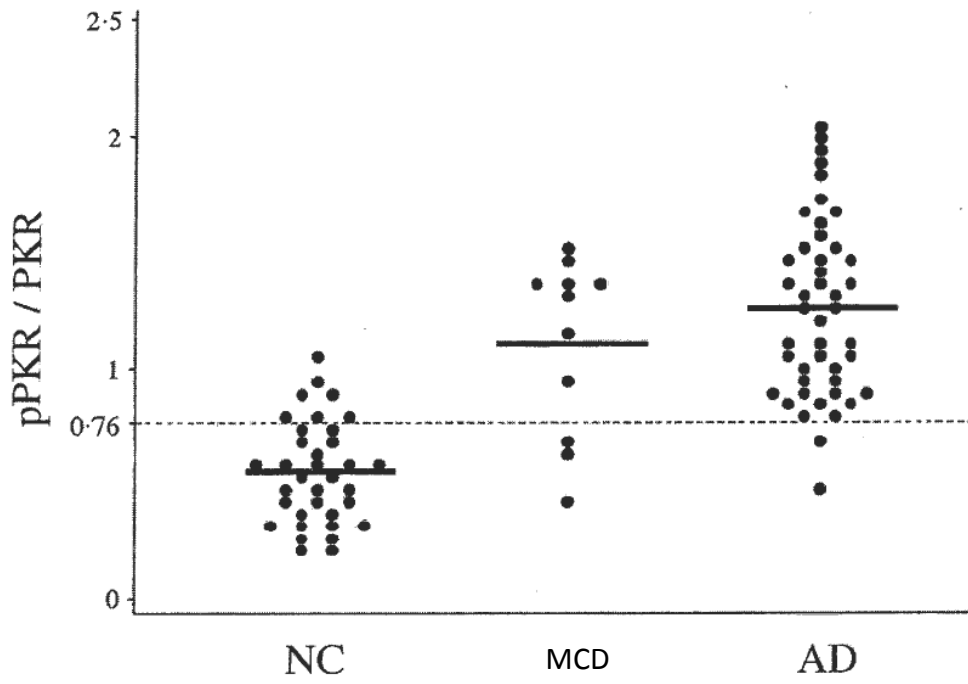


Figura 11