(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 533 086**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 10183043 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2293073**

(54) Título: **Método para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa**

(30) Prioridad:

17.06.2005 GB 0512401

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2015

(73) Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
Ardmore, Diamond Road
Crumlin, Co. Antrim, Northern Ireland, BT29 4QY, GB

(72) Inventor/es:

ZELLNER, MARIA y
OEHLER, RUDOLF

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurodegenerativas están aumentando drásticamente. Los datos sugieren que los problemas sanitarios neuronales se encuentran entre los factores que más contribuyen a la carga mundial de enfermedad y discapacidad.

Los marcadores diagnósticos para trastornos neurológicos son especialmente importantes en el diagnóstico temprano en el curso de la enfermedad, cuando los compuestos terapéuticos tienen mayor efecto potencial, pero un diagnóstico exacto es difícil. Se dispone de pocos marcadores diagnósticos para trastornos neuronales en estadio temprano; los que están disponibles se basan en el análisis de material de una muestra (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo), cuya obtención es difícil y dolorosa. Por lo tanto, la caracterización de marcadores diagnósticos que son detectables en la sangre periférica es de gran importancia. Tales marcadores periféricos permitirían la detección preventiva de una población en riesgo.

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en los países industrializados. En una menor parte de los casos hay una clara historia familiar, con mutaciones autosómicas en el gen de la proteína precursora de amiloide. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con enfermedad de Alzheimer no tienen una historia familiar obvia y se clasifican como con enfermedad de Alzheimer esporádica. La etiología de la enfermedad de Alzheimer esporádica se desconoce en gran parte (Blennow K y VanMechelen E, J. Neural. Transm. Suppl. 1998; 53:223-35).

Actualmente, la enfermedad de Alzheimer se diagnostica principalmente por la exclusión de otras causas conocidas de demencia. El diagnóstico en un estadio temprano antes de que tengan lugar cambios irreversibles es prácticamente inexistente. Sin embargo, la terapia farmacéutica es probablemente la más eficaz al principio en el curso de la enfermedad, antes de que la neurodegeneración sea demasiado grave y generalizada. Por lo tanto, existe una gran necesidad de marcadores diagnósticos mínimamente invasivos para el diagnóstico temprano en el curso de la enfermedad.

Cattabeni et al (2004. Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry 28(5):763-770) describen que las plaquetas expresan y procesan la proteína precursora de amiloide (APP) de una manera similar a la observada en el cerebro.

El documento de solicitud de patente de Estados Unidos US 2003/0064411 describe la reducción de la expresión de la proteína S-transferasa de glutatión identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt en tejidos cerebrales obtenidos a partir de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en la identificación de proteínas, aisladas a partir de plaquetas, que se pueden utilizar como marcadores para la enfermedad de Alzheimer.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, un método para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer comprende medir el nivel de expresión de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt en una muestra de plaquetas aisladas a partir de una persona sospechosa de tener la enfermedad de Alzheimer, y determinar si los niveles de expresión están alterados en comparación con un control, en donde un nivel de expresión reducido cuando se compara con un control no enfermo, sano, de proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por nº de orden P78417 de SwissProt, indica que existe un riesgo de contraer la enfermedad de Alzheimer.

El diagnóstico implica el aislamiento de plaquetas. En una realización preferida, las plaquetas no se deben activar durante la purificación a partir de una muestra de sangre.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, el uso de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en una persona de la cual se sospecha que padece la enfermedad de Alzheimer, en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el kit una sonda que permite la identificación de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D y reactivos para un inmunoensayo, electroforesis en gel 2D o una reacción de polimerasa para detectar el nivel de expresión de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por nº de orden P78417 de SwissProt.

Descripción de los dibujos

La invención se describe haciendo referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La Figura 1 ilustra los niveles de activación celular para plaquetas sin tratar, plaquetas preparadas usando cromatografía y plaquetas preparadas mediante centrifugación; y

la Figura 2 ilustra la técnica de electroforesis diferencial en gel (DIGE).

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona métodos para diagnosticar que existe un riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, basados en la detección del nivel de expresión de una proteína específica, que se expresa en las plaquetas de una persona de la cual se sospecha que padece la enfermedad. El nivel de expresión de la proteína en las plaquetas se determina fuera del cuerpo (*ex-vivo*) de la persona sospechosa de tener la enfermedad, en un ensayo *in vitro*. La proteína que se puede detectar para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer se indica en la Tabla 1. La columna "% de cambio" representa el aumento o la disminución (número negativo) de la expresión relacionada con la enfermedad, en comparación con un control no enfermo.

Tabla 1 Marcadores de la enfermedad de Alzheimer

nº de orden de SwissProt *	Nombre de la proteína	Variante	pI calculado	PM (kDa)	% de cambio EA/Control
P78417	S transferasas de glutatión ω1	A140D	5,87	30,0	-32

* La base de conocimientos de proteínas SwissProt es una base de datos de secuencias de proteínas anotadas, establecida en 1986. Se gestiona en colaboración con el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). La versión de SwissProt a la que se hace referencia en esta memoria es v50.1, del 13 de junio de 2006. Se puede acceder a SwissProt en http://expasy.ch y en los sitios web de SIB y EBI, www.isb-sib.ch y www.ebi.ac.uk, respectivamente. Una revisión de la base de datos SwissProt la proporcionan Bairoch A et al, Brief Bioinform. 2004 Mar; 5(1)39-55.

La Tabla 1 indica el número de orden de Swiss Prot para la proteína. Este identifica el producto del ARNm que codifica la proteína.

La variante específica indicada en la columna 3 de la Tabla 1 se utiliza de acuerdo con la invención. Más preferiblemente, la proteína tiene el pI (cuando se indica) y el peso molecular (PM) indicados en las columnas 4 y 5 de la Tabla 1. La determinación del PM de una proteína es un experimento de rutina para un experto en la técnica, por ejemplo, esto se puede realizar mediante SDS-PAGE. La determinación del pI también es rutinaria para un experto en la técnica, usando la técnica de enfoque isoeléctrico. El pI de la proteína en la Tabla 1 se determinó mediante el programa informático DeCyder® 2D analysis (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido).

El método requiere la detección del nivel de expresión de la proteína especificada, a partir de plaquetas de una persona, por lo general una persona de la cual se sospecha que padece la enfermedad de Alzheimer o una persona que se cree que tiene una predisposición a la enfermedad. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "nivel de expresión" se refiere a la cantidad de la proteína especificada (o de ARNm que codifica la proteína) en las plaquetas de la muestra. El nivel de expresión se compara después con el nivel de expresión de la proteína procedente de las plaquetas de un control. El control puede ser una muestra de plaquetas de una persona de la que se sabe que padece la enfermedad, o una muestra de una persona de la que se sabe que no padece la enfermedad. Para el experto en la técnica será evidente que la comparación de los niveles de expresión de un control y la muestra del ensayo permitirá tomar una decisión en cuanto a si el nivel de expresión en la muestra del ensayo y en el control son similares o diferentes y, por lo tanto, si el paciente padece la enfermedad o corre el riesgo de padecerla. En la invención, la expresión de la proteína procedente de la muestra del ensayo se comparará con un control sano, es decir, que no está enfermo. La proteína puede tener el mismo incremento o disminución de la expresión o uno similar (en comparación con el control), en comparación con la muestra del ensayo. El que un aumento o disminución de la expresión sea indicativo de la presencia de enfermedad, se indica en la columna seis de la Tabla 1, en donde un valor negativo indica una disminución de la expresión.

Para evitar dudas, un nivel reducido en comparación con un control sano sin la enfermedad, de la variante omega 1 pI 5.87 de la S-transferasa de glutatión, indica que existe un riesgo de contraer la enfermedad de Alzheimer. El control puede ser una muestra tomada a partir de una persona de la que se conoce que está sana o se sabe que está enferma (según sea necesario) y se puede analizar al mismo tiempo que la muestra del ensayo. Sin embargo, es preferible que el control sea un valor conocido, o el nivel de expresión, que se sabe que es indicativo de una persona sana (o enferma). Una vez que se conoce este nivel de control, no es necesario realizar pruebas de control cada vez que se analiza una muestra de ensayo; la muestra simplemente se puede comparar con los valores conocidos del control.

Para el experto en la técnica será evidente que se puede detectar la proteína de longitud completa, por ejemplo, tal y

como se describe en la base de datos Swiss Prot. Alternativamente, es posible la identificación de un fragmento (o una cantidad de fragmentos), siempre que esto permita la identificación precisa de la proteína de longitud completa; por ejemplo, la digestión con proteasas de una proteína (de longitud completa), seguida de espectrometría de masas de una pequeña cantidad de los péptidos resultantes, se utiliza rutinariamente para identificar una proteína. Este método se utiliza frecuentemente para identificar una mancha sobre un gel de proteínas. Si la proteína es un oligómero, la identificación de una sola cadena puede ser suficiente.

Los métodos para medir el nivel de expresión de una proteína a partir de una muestra biológica son bien conocidos en la técnica y se puede utilizar cualquier método adecuado. La proteína o el ácido nucleico de la muestra se pueden analizar para determinar el nivel de expresión. Un ejemplo de un método adecuado es una reacción de PCR cuantitativa sobre ARNm (o ADNc) obtenido a partir de las plaquetas de la muestra. El uso de PCR cuantitativa para detectar los niveles de expresión génica es bien conocido en la técnica. Los kits para el análisis de la expresión génica cuantitativa basados en la PCR están disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema Quantitect fabricado por Qiagen. Un análisis simultáneo de los niveles de expresión en múltiples muestras usando un sistema de matriz de ácidos nucleicos basado en la hibridación, es bien conocido en la técnica y está también dentro del alcance de la invención.

El nivel de proteína específica (o proteínas) en una muestra se puede detectar directamente usando una variedad de técnicas que serán evidentes para un experto en la materia. En resumen, las técnicas adecuadas implican típicamente poner en contacto la muestra que contiene potencialmente una proteína de la Tabla 1, con una molécula de la sonda que se une específicamente a dicha proteína. Una etapa de lavado elimina las moléculas no unidas. Después se detecta la cantidad de moléculas de la sonda unidas, determinando de este modo la cantidad de moléculas diana en la muestra. Preferiblemente, para ayudar a la detección, la sonda está marcada.

Para el análisis de un número relativamente pequeño de proteínas, se puede utilizar un inmunoensayo cuantitativo, tal como una transferencia Western o ELISA para detectar la cantidad de proteína (y por lo tanto el nivel de expresión) en una muestra.

Para analizar un mayor número de muestras simultáneamente, se puede utilizar una matriz de proteínas. Las matrices de proteínas son bien conocidas en la técnica y funcionan de una manera similar a las matrices de ácido nucleico, utilizando principalmente proteínas inmovilizadas conocidas (sondas) para "capturar" una proteína de interés, por ejemplo, una proteína identificada en la Tabla 1. Cuando la proteína es una enzima, se puede utilizar un ensayo enzimático para analizar la cantidad de enzima presente en una muestra. Una matriz de proteínas contiene una pluralidad de proteínas como sondas inmovilizadas. Preferiblemente, la matriz contiene proteínas como sondas con afinidad hacia diferentes proteínas diana, lo que permite analizar una cantidad de proteínas diferentes sobre la misma superficie del soporte, preferiblemente de forma simultánea. Dos o más moléculas de sondas con afinidad hacia una proteína identificada en la Tabla 1 se pueden inmovilizar sobre un material de soporte adecuado para una matriz de proteínas. Más preferiblemente, 3, 4, 5 o más moléculas de sondas diferentes se pueden inmovilizar, por ejemplo, 10 o más. Las ventajas de esta multiplexación son un análisis más rápido de muestras múltiples y la capacidad para detectar marcadores múltiples simultáneamente lo que permite someter a ensayo combinaciones de marcadores, aumentando de este modo la precisión del diagnóstico. Un material de soporte adecuado para el uso en una matriz de proteínas se describe en el documento EP-A-0874242. Una matriz de proteínas se puede analizar mediante el Sistema de Randox Evidence®, que está disponible comercialmente en Randox Laboratories Limited, Ardmore, Irlanda del Norte, Reino Unido.

Alternativamente, se puede utilizar una electroforesis en gel 2D para analizar simultáneamente el nivel de expresión de una variedad de proteínas. Este método es bien conocido en la técnica; una muestra que contiene una gran cantidad de proteínas se separa típicamente en una primera dimensión mediante enfoque isoeléctrico y en una segunda dimensión según el tamaño. Cada proteína se encuentra en un lugar particular (una "mancha") en el gel resultante. La cantidad de proteína en cada mancha, y por lo tanto el nivel de expresión, se puede determinar utilizando una serie de técnicas. Un ejemplo de una técnica adecuada es la tinción del gel con plata seguida por una exploración con un escáner de Bio-rad FX y análisis asistido por ordenador, usando el programa informático MELANIE 3.0 (GeneBio). Alternativamente, se puede utilizar una electroforesis diferencial en gel (DIGE) para cuantificar el nivel de expresión (véase Von Eggeling et al; Int. J. Mol. Med. 2001 Oct; 8(4):373-7). Esta técnica se resume en la Figura 2.

Las plaquetas de la sangre son fragmentos de células no nucleadas implicadas en la coagulación sanguínea. Las plaquetas se pueden analizar directamente a partir de una preparación de sangre completa. Sin embargo, se prefiere que al menos se lleve a cabo alguna purificación para separar las plaquetas de otros componentes de la sangre. En una realización, una preparación de plasma se prepara a partir de una preparación de sangre completa y los niveles de expresión en las plaquetas se detectan directamente desde el plasma. Los métodos para separar el plasma de otros componentes de la sangre son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el plasma se puede preparar a partir de sangre anticoagulada mediante centrifugación. Las plaquetas se pueden purificar adicionalmente a partir del plasma de manera que se obtiene una preparación de plaquetas que está sustancialmente exenta de otros componentes de la sangre. Esto normalmente requiere una centrifugación suave inicial a aproximadamente 200 g, para separar el plasma de los componentes sanguíneos glóbulos rojos y blancos, seguido por una centrifugación fuerte a aproximadamente 2000 g, para separar las plaquetas del plasma. Preferiblemente, las plaquetas (que han sido separadas del plasma) se lisan a continuación y se obtiene un extracto de plaquetas. Los métodos para lisar

células y obtener extractos exentos de células son bien conocidos en la técnica.

La purificación de plaquetas y extractos de plaquetas a partir de sangre completa usando métodos convencionales (que implican una centrifugación fuerte) conduce frecuentemente a la activación de las plaquetas. En particular, la etapa de centrifugación fuerte requerida para separar el plasma de las plaquetas conduce a una activación considerable de las plaquetas. La activación de las plaquetas es un fenómeno bien conocido que da como resultado la exocitosis de vesículas de secreción y gránulos ("desgranulación") junto con una variedad de otros cambios bioquímicos y un cambio en la forma. La activación conduce frecuentemente a una exocitosis de proteínas de interés diagnóstico y, sin desear estar vinculado a la teoría, disminuye el valor diagnóstico de las plaquetas obtenidas. Ensayos para detectar el nivel de activación de las plaquetas en una muestra son conocidos en la técnica. Se puede utilizar un ensayo de agregometría de protrombinasa o plaquetas, o la expresión de marcadores de activación tales como CD62-P (selectina P) y el factor plaquetario 4 se puede detectar para medir la activación de las plaquetas, como será evidente para un experto en la técnica. La detección de CD62-P mediante citometría de flujo se describe en el Ejemplo 1.

De acuerdo con la presente invención, se prefiere que las plaquetas a partir de las cuales se mide el nivel de expresión de una o varias proteínas, estén sin activar. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "no activada" se refiere a las plaquetas que no han sido activadas por el proceso de purificación. Preferiblemente, las plaquetas están totalmente sin activar, aunque la persona experta apreciará que las plaquetas que han sido activadas ligeramente por el proceso de purificación, todavía pueden ser útiles. Preferiblemente, el nivel de activación de las plaquetas es del 50% o menos. Más preferiblemente, las plaquetas muestran 40% o menos, por ejemplo, 30% o 20% de activación. Para evitar dudas, el Ejemplo 1 y la Figura 1 muestran que las plaquetas preparadas de acuerdo con la presente invención muestran un nivel de activación plaquetaria, tal y como se mide mediante el % de células positivas CD62-P, detectadas por citometría de flujo, de aproximadamente el 20%, mientras que las plaquetas preparadas según las técnicas convencionales están activadas en más del 60%.

Un método para aislar extractos de plaquetas no activadas a partir de una muestra de sangre completa se puede utilizar en el método de acuerdo con las reivindicaciones. Se ha encontrado que evitar una centrifugación fuerte durante la purificación de las plaquetas, permite que se obtengan plaquetas no activadas. La separación de las plaquetas de los glóbulos rojos y blancos usando la sedimentación o la centrifugación suave seguida por una separación del plasma mediante filtración con exclusión por tamaño (en lugar del método convencional que requiere una centrifugación fuerte), permite que se aíslen extractos de plaquetas no activadas. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "centrifugación fuerte" se refiere a las fuerzas de centrifugación utilizadas típicamente para sedimentar plaquetas para separarlas del plasma. Una centrifugación fuerte normalmente requiere una centrifugación a 1000 g o mayor, por ejemplo, 1500 g o 2000 g. "Centrifugación suave" se refiere a fuerzas de centrifugación que no causan la activación de las plaquetas. En una realización preferida, la centrifugación débil implica fuerzas de 500 g o menos, más preferentemente 250 g o menos, por ejemplo, 100 g o 50 g. En la realización en la que se utiliza la sedimentación para separar los glóbulos rojos y blancos de la sangre, se prefiere que antes de la sedimentación, la muestra de sangre completa se diluya con un tampón isotónico, que puede contener aditivos para obtener una densidad de plasma adecuada. Por ejemplo, la sangre (anticoagulada) se puede mezclar con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la sedimentación. Alternativamente, la sangre (anticoagulada) se puede mezclar directamente con Dextrano 500 (en PBS, por ejemplo, 1,25% de dextrano) para tener una concentración final de entre 0,1% y 5%, preferiblemente 0,25%.

El uso de la sedimentación para separar muestras biológicas es bien conocido en la técnica y se puede utilizar cualquier método de sedimentación. Preferiblemente, se utiliza la técnica de sedimentación con dextrano, en la que la muestra de sangre completa se aplica a una solución que contiene dextrano a una densidad adecuada para separar las plaquetas y el plasma de otros componentes de la sangre (véase, por ejemplo, Bertoluzzo et al, 1999 Blood Cell. Mol. Dis. 25(22):339-349). Cuando se deja intacto, el plasma y las plaquetas se separan de los otros componentes de la sangre, formando un material sobrenadante amarillento. Una ventaja de usar la sedimentación en lugar de una centrifugación suave, para separar las plaquetas de los glóbulos rojos y blancos de la sangre es que se evita la necesidad de un equipamiento costoso para la centrifugación.

La sedimentación o la centrifugación suave de una muestra de sangre completa da como resultado un material sobrenadante que contiene plaquetas y plasma. Aunque este material sobrenadante se puede analizar directamente, se prefiere que tenga lugar una purificación adicional, para separar las plaquetas del plasma. Esta separación se lleva a cabo tradicionalmente sometiendo la suspensión de plaquetas (material sobrenadante) a una etapa de centrifugación fuerte, lo que conduce a una activación sustancial de las plaquetas. Ahora se ha descubierto que evitar esta etapa de centrifugación fuerte permite la preparación de plaquetas no activadas. Preferiblemente, las plaquetas se separan del material sobrenadante de la etapa de sedimentación mediante filtración con exclusión por tamaño, tal como cromatografía en gel de exclusión por tamaño. El gel de exclusión por tamaño tiene una exclusión por el peso molecular que es capaz de fraccionar o excluir las plaquetas para separarlas de los componentes del plasma. Geles de exclusión por tamaño con puntos de corte del peso molecular adecuados, serán evidentes para la persona experta. Se prefiere que el punto de corte del peso molecular sea de 40 MDa o mayor. Típicamente, el gel de exclusión por tamaño se empaqueta en una columna y la suspensión de plaquetas que es el resultado de la sedimentación o centrifugación suave de la muestra de sangre completa (por ejemplo, el material sobrenadante de la etapa de sedimentación), se pasa a través de la columna, proporcionando un material eluido temprano de la columna que contie-

ne componentes de peso molecular muy elevado que han sido excluidos por el gel de exclusión por tamaño y un material eluido tardío de la columna que contiene componentes de peso molecular más bajo que han sido incluidos en el gel de la cromatografía. Las plaquetas estarán presentes en la fracción excluida.

Para obtener un extracto, las plaquetas (es decir, la fracción excluida) se ponen en contacto con un agente de precipitación para la lisis de las plaquetas y precipitar la proteína liberada. También se puede utilizar un agente de lisis distinto. Los agentes de lisis son bien conocidos en la técnica y son generalmente detergentes. Se puede utilizar cualquier agente de precipitación, ya que son bien conocidos en la técnica. Un agente de precipitación preferido es el etanol. El ácido tricloroacético (TCA), se puede utilizar alternativamente como agente de precipitación. Preferiblemente, el material eluido temprano de la columna a partir de la etapa de exclusión por tamaño (que contiene las plaquetas) se transfiere directamente desde la columna a un recipiente que contiene la solución de precipitación. Una vez precipitadas, las macromoléculas en el extracto de las plaquetas permanecen estables durante un período prolongado de tiempo, incluso a temperatura ambiente.

Después de la precipitación, el material precipitado se puede centrifugar para obtener un sedimento de proteínas precipitadas.

El método preferido para proporcionar extracto de plaquetas no activadas comprende, por tanto, dos etapas principales, una primera etapa de sedimentación o centrifugación suave y una segunda etapa de exclusión por tamaño. La falta de centrifugación fuerte en estas dos etapas evita la activación de las plaquetas. El Ejemplo 1 muestra esta técnica y la Figura 1 ilustra su eficacia para la preparación de plaquetas no activadas, en comparación con las técnicas convencionales (centrifugación).

Una vez que las plaquetas no activadas han sido lisadas, proporcionando un extracto no activado, se pueden utilizar otras etapas que implican la centrifugación, por ejemplo, para obtener un sedimento de las proteínas precipitadas.

La proteína precipitada producida por este método se resolubiliza preferiblemente en solución acuosa antes de un procedimiento analítico.

El método de proporcionar plaquetas no activadas se utiliza preferiblemente para producir extractos de plaquetas que contienen una proteína, o una combinación de proteínas mencionadas en la Tabla 1. Un ensayo para cuantificar la cantidad de cualquier proteína identificada en la Tabla 1 presente en una muestra de sangre, comprende por lo tanto la obtención de un extracto de plaquetas no activadas tal y como se ha descrito anteriormente y la determinación de la cantidad de proteína precipitada producida, como se ha descrito anteriormente.

El uso de un kit que comprende los medios para llevar a cabo cualquier aspecto de la invención para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, está dentro del alcance de la invención según las reivindicaciones. En una realización, un kit comprende los reactivos necesarios para permitir que el nivel de expresión de la proteína en la Tabla 1 sea detectado, y para permitir realizar un diagnóstico. El kit comprende una sonda que permite la identificación de la proteína en la Tabla 1. Preferiblemente, la sonda es específica de la proteína identificada en la Tabla 1. Cualquier sonda que identifica específicamente la presencia de la proteína, se puede utilizar. La persona experta se dará cuenta de que la detección de la cantidad de una sonda unida permite que se determine la cantidad de molécula diana. Preferiblemente, la sonda está marcada con un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados serán evidentes para la persona experta e incluyen marcadores radiactivos, marcadores quimioluminiscentes y marcadores bioluminiscentes. Como se ha indicado anteriormente, las sondas se pueden inmovilizar en una matriz, para permitir la multiplexación.

En una realización preferida, la sonda es una molécula de anticuerpo. Tal y como se emplea en esta memoria, el término anticuerpo debe tener su significado convencional en la técnica, es decir, una molécula de inmunoglobulina. La persona experta entenderá que se puede utilizar cualquier tipo de molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma, siempre que conserve la capacidad para unirse a la molécula diana especificada. Fragmentos de anticuerpos preferidos incluyen moléculas Fab y scFv. Los anticuerpos recombinantes y los anticuerpos monoclonales están dentro del alcance de la invención. Cuando la sonda es un anticuerpo, se emplea preferiblemente un inmunoensayo cuantitativo para detectar la presencia del anticuerpo unido a la proteína diana de la Tabla 1, y por lo tanto, el nivel de expresión de esa proteína diana. Los inmunoensayos tales como transferencias Western o ELISAs, y los reactivos necesarios para llevar a cabo tales inmunoensayos, son bien conocidos en la técnica. El kit puede contener todos los reactivos necesarios para llevar a cabo el inmunoensayo. En una realización preferida alternativa, la sonda es un ácido nucleico que se puede hibridar con un ácido nucleico, preferiblemente ARNm, que codifica la proteína identificada en la Tabla 1. En esta realización, el kit contiene preferiblemente reactivos, tales como cebadores y una enzima polimerasa, que se requieren para llevar a cabo una reacción de polimerasa, preferiblemente una reacción de polimerasa cuantitativa, que (como se ha descrito anteriormente) se puede utilizar para detectar el nivel de expresión de una proteína.

La sonda puede ser un aptámero. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aptámero" tiene su significado convencional en la técnica, es decir, un oligonucleótido que se puede unir a una molécula diana. De acuerdo con la presente invención, el aptámero se une a la proteína identificada en la Tabla 1.

El nivel de expresión de la proteína se puede determinar por electroforesis en gel 2D, o DIGE, como se ha indicado

anteriormente. En esta realización, el kit comprende los reactivos necesarios para identificar la proteína identificada en la Tabla 1, utilizando estas técnicas.

En una realización, se puede utilizar un kit para realizar el método de acuerdo con las reivindicaciones, utilizando la preparación de plaquetas no activadas. Preferiblemente, este kit comprende un agente de sedimentación, un dispositivo de filtración y un agente de precipitación. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente de sedimentación" se refiere a un reactivo que se puede utilizar para separar el plasma sanguíneo de la sangre anticoagulada, mediante sedimentación a través del agente de sedimentación. Un agente de sedimentación preferido es el dextrano (como se ha descrito anteriormente). Un "dispositivo de filtración" se refiere a un dispositivo que separa las plaquetas del plasma. Un dispositivo de filtración preferido es una columna de exclusión por tamaño, lo más preferiblemente con un punto de corte del M_r de 40 MDa o mayor. Un "agente de precipitación" se ha definido anteriormente.

La invención se describe adicionalmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

(a) Se obtuvieron muestras de sangre a partir de individuos normales y se trataron con tampón de dilución con el fin de demostrar la eficacia de la eliminación de los glóbulos rojos y blancos de la sangre de acuerdo con la presente invención.

Sangre anticoagulada (4 ml), para ser utilizada como control, se diluyó 1:1,25 con una solución salina isotónica tamponada con fosfato ($Na_2HPO_4.NaH_2PO_4$ 10 mM, pH = 7,4, NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, EDTA 5 mM) y se dejó sin modificar durante 50 minutos. Los 100 µl superiores del material sobrenadante amarillento se analizaron en un hemocitómetro (Coulter MicroDiff 18, Beckmann-Coulter, FL). El material sobrenadante contenía 395 x 10^3/µl de plaquetas, 0,03 x 10^6/µl de glóbulos rojos sanguíneos y 3,4 x 10^3/µl de glóbulos blancos sanguíneos. Antes de la sedimentación, la sangre contenía 187 x 10^3/µl de plaquetas, 5,7 x 10^6/µl de glóbulos rojos sanguíneos y 4,3 x 10^3/µl de glóbulos blancos sanguíneos. Por lo tanto, aproximadamente el 98% de los glóbulos rojos sanguíneos y el 21% de los glóbulos blancos sanguíneos se eliminaron mediante la etapa de sedimentación. El material sobrenadante contiene las plaquetas con una pureza de más del 92%. El resto de otras células son glóbulos rojos sanguíneos (7%) y glóbulos blancos sanguíneos (1%), que consisten principalmente en linfocitos.

La recogida de solo las 3/4 partes superiores del material sobrenadante mejora la reducción de los glóbulos blancos sanguíneos en la etapa de sedimentación. Un material sobrenadante típico preparado usando solo las 3/4 partes superiores contiene 97,4% de plaquetas, 1,8% de glóbulos rojos y 0,8% de glóbulos blancos sanguíneos. Las concentraciones de células en la muestra de sangre completa/material sobrenadante eran: glóbulos rojos 5,0 x 10^6/µl / 2,0 x 10^3/µl; glóbulos blancos 4,7 x 10^3/µl / 0,9 x 10^3/µl; plaquetas 322 x 10^3/µl / 108 x 10^3/µl. El 99,6% de los glóbulos rojos y el 80,8% de los glóbulos blancos se separan por sedimentación y se eliminan de las 3/4 partes superiores del material sobrenadante.

(b) El material sobrenadante que contenía las plaquetas se trató después con un gel de exclusión por tamaño con el fin de mostrar la eficacia de la eliminación de las proteínas del plasma de acuerdo con la presente invención, como se detalla a continuación.

Sefarosa 2B, un gel a base de agarosa que tiene un fraccionamiento del peso molecular de aproximadamente 80 MD, se adquirió de Amersham-Pharmacia. Aproximadamente 15 ml del gel se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se desgasificó, se empaquetó en una pequeña columna que tenía un diámetro de 12 cm x 1,4 cm, y se lavó con PBS. El exceso de tampón se drenó desde la parte superior de la columna y 200 µl del material sobrenadante que contenía las plaquetas se aplicó a la parte superior del gel sin alterar la superficie del gel. Después de que los 200 µl habían entrado por completo en el lecho del gel, se añadieron 15 ml de PBS por etapas (1 ml por etapa) a la columna empaquetada con el gel. Cada mililitro de eluyente se recogió y se dividió en 3 partes: una parte se utilizó para determinar el recuento de plaquetas utilizando un hemocitómetro, la segunda se usó para determinar la concentración de proteínas de acuerdo con el protocolo estándar de Bradford y la tercera parte se utilizó para investigar las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE).

Las plaquetas contenidas en el material sobrenadante eluyeron temprano a aproximadamente 3 ml. Las proteínas del plasma, sin embargo, eluyeron mucho más tarde a aproximadamente 8 ml. El análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE reveló que la proteína principal del plasma, albúmina, eluía entre 8 ml y 19 ml y estaba ausente en las fracciones plaquetarias. Estos datos muestran que la aplicación de material sobrenadante de sangre sedimentada que contiene plaquetas, a una cromatografía en gel de exclusión por tamaño, conduce a la eliminación de las proteínas plasmáticas. También se observó que los glóbulos blancos sanguíneos restantes en el material sobrenadante se separaron de las plaquetas durante la cromatografía de exclusión por tamaño; parecía que había habido una unión inespecífica de los glóbulos blancos sanguíneos a la Sefarosa, lo que retarda su elución.

(c) A continuación, las proteínas de las plaquetas preparadas se analizaron mediante electroforesis en gel de 2 dimensiones y se compararon con proteínas de plaquetas preparadas mediante centrifugación, como se describe a continuación.

El material eluido preparado anteriormente, que contenía las plaquetas no activadas, se precipitó en etanol.

Para el aislamiento mediante centrifugación, la sangre periférica se centrifugó a 50 g durante 15 minutos. El material sobrenadante contenía el plasma rico en plaquetas (PRP). En presencia de PGE1 150 nM (prostaglandina E1), el PRP fue sometido a una segunda centrifugación (fuerte) a 1500 g durante 15 minutos. El sedimento de plaquetas se lavó dos veces en tampón isotónico y se precipitó en etanol.

El material precipitado de cada preparación se sedimentó por centrifugación a velocidad elevada y se resolubilizó en un tampón acuoso que contenía urea 8 M. El patrón de las proteínas de ambos grupos de tratamiento se analizó mediante electroforesis en gel de dos dimensiones, de acuerdo con Gerner et al. J Biol Chem 2000; 275:39018-26.

Ambas preparaciones de proteínas plaquetarias contenían varios cientos de proteínas. Sin embargo, la preparación de proteínas procedente de las plaquetas centrifugadas contenía proteínas adicionales de peso molecular bajo, que fueron identificadas como proteínas plasmáticas. Estos resultados muestran que la presente invención proporciona una preparación de proteínas de plaquetas de alta calidad, que es adecuada para estudios de proteómica y que no está contaminada por proteínas plasmáticas.

(d) Finalmente, se midió la expresión del marcador de la activación CD62P (selectina P) en plaquetas preparadas tal como se ha descrito anteriormente y se comparó con plaquetas preparadas por centrifugación. Sangre sin tratar se usó como control negativo. El grado de activación de las plaquetas se determinó por la expresión del marcador específico de la activación CD62P, medida por citometría de flujo.

Las plaquetas filtradas en gel muestran los mismos niveles de expresión bajos de CD62P que las plaquetas en sangre sin tratar, mientras que las plaquetas preparadas por centrifugación mostraron un fuerte aumento del nivel de expresión. Incluso la etapa de centrifugación aislada para obtener plasma rico en plaquetas (PRP) conduce a un pequeño aumento de la expresión de CD62P. Estos datos se ilustran en la Figura 1, que ilustra que la preparación de extractos de plaquetas de acuerdo con la presente invención, da como resultado un nivel de activación muy reducido de las plaquetas en comparación con el método de purificación convencional.

Ejemplo 2

2.1 Selección de pacientes

2.1.1 Control sano

Como mínimo se seleccionó para este estudio una cantidad correspondiente de controles emparejados según la edad y el sexo, sin ninguna evidencia de trastorno neurosiquiátrico o disfunción cognitiva. Los sujetos controles tenían un perfil clínico estandarizado basado en exámenes neurológicos, análisis clínicos de sangre y de orina y evaluación neurosicológica.

2.1.2 Evaluación de los pacientes con enfermedad de Alzheimer

Un diagnóstico fiable de la EA solo es posible, hasta la fecha, mediante un análisis post mortem del cerebro. Sin embargo, hay algunos parámetros que indican la enfermedad. Por lo tanto, era importante evaluar a conciencia los pacientes que debían ser incluidos en el estudio. Se examinaron pacientes con demencia en estadio temprano. Estos pacientes se supone que padecen EA según se determina a través de una evaluación médica, epidemiológica y neurosicológica. Para confirmarlo adicionalmente, se tomaron muestras de plaquetas aisladas de la sangre de estos pacientes y se analizó la expresión y el patrón de los fragmentos de la proteína precursora de β-amiloide (APP) mediante transferencia Western. Se sabe que la relación entre los dos fragmentos de APP cambia durante el curso de la enfermedad de Alzheimer (Di Luca, et al, 1998, Arch. Neurol. 55: 1195-1200). Las relaciones entre las APPs en los pacientes con demencia en estadio temprano no se distinguían de las de los controles sanos.

Las relaciones entre las APPs normales que se encuentran en los pacientes con demencia en estadio temprano, pueden indicar que los pacientes pueden padecer un trastorno neurodegenerativo que es diferente de EA o que procede de su tratamiento médico. Los pacientes fueron tratados con un inhibidor de la acetilcolinesterasa, del que se había descrito recientemente que inhibía los cambios de las relaciones entre las APPs en EA, inducidos por la enfermedad. Por lo tanto, los pacientes con demencia en estadio temprano no son adecuados para el estudio.

Para encontrar un grupo de pacientes más adecuados, se examinaron pacientes con demencia en estadio tardío. Un estudio publicado recientemente mostraba mediante análisis post mortem que el grupo de pacientes con demencia en estadio tardío consiste en un 70% de EA, 15-20% de demencia con cuerpos de Lewy y 2-8% de demencia vascular hipóxica (Jellinger, 2001, J Neural Neurosurg Psychiatry. 2001 noviembre; 71:707-8). Además, estos pacientes no reciben inhibidores de acetilcolinesterasa u otros tratamientos que son conocidos por interferir con las plaquetas. Por lo tanto, los pacientes con demencia en estadio tardío parecían ser el mejor grupo de pacientes para el estudio.

Con el fin de reducir el número de falsos positivos (30%) en los pacientes con demencia en estadio tardío, las relaciones entre los fragmentos de la proteína precursora de amiloide (APP) de estos pacientes se analizaron y se compararon con las relaciones entre las APPs de sujetos controles emparejados según la edad y el sexo. Visualmente

se podían distinguir dos grupos de relaciones entre las APPs en ambos grupos de estudio, a partir del análisis de transferencia Western de las proteínas plaquetarias procedentes de todas las muestras recogidas. La mayoría de los sujetos controles (n = 13) tienen relaciones elevadas entre las APPs. Esto se corresponde con la bibliografía. Ocho sujetos controles habían reducido las relaciones entre las APPs.

En 14 de los 21 pacientes con demencia, la relación entre las isoformas de 130 y las de 106-110 kd era marcadamente baja, correspondiéndose a la descrita para la enfermedad de Alzheimer. Las relaciones entre las APPs de los 7 pacientes restantes eran tan altas como las relaciones de los sujetos controles, lo que sugiere que estos pacientes tendrían otras formas de demencia. Esta proporción es similar al anterior resultado del estudio patológico, ya que los siete pacientes excluidos con demencia con relaciones elevadas entre las APPs eran equivalentes al 30% de demencias que no tenían Alzheimer.

A continuación se midió la densidad óptica de las bandas de APP de los cuatro grupos y se calcularon las relaciones. La selección visual se confirmó con estas mediciones. Un nivel de punto de corte para relaciones bajas entre las APPs se fijó en 1,2. Catorce de los 21 pacientes con demencia tenían una relación entre las APPs por debajo de este nivel de punto de corte, con un valor medio de 1,06 ± 0,21 (n = 14). Este grupo tiene una alta probabilidad de EA y se utilizó en el ensayo de proteómica. Trece de los 21 controles sanos emparejados según la edad mostraron una relación entre las APPs mayor que 1,2 con un valor medio de 1,44 ± 0,21 (n = 13). Estos voluntarios tienen una alta probabilidad de no tener problemas de EA, incluso en el estadio temprano, y se iban a utilizar como controles.

La edad media del grupo con demencia clasificado para el grupo de estudio de Alzheimer era de 82,8 ± 5,8 y la media de edad del grupo de control con relaciones elevadas entre las APPs era de 81,7 ± 6,1.

2.2 Preparación de las muestras

2.2.1 Elección del material de la muestra

Las plaquetas son células sanguíneas sin núcleo que tienen un papel esencial en la coagulación de la sangre. Es probable que los mecanismos de regulación post-transcripcional tengan una función importante en los cambios específicos de la enfermedad. Por lo tanto, se adoptó un enfoque proteómico y se investigaron los cambios específicos de la enfermedad a nivel de proteínas.

2.2.2 Muestra de sangre

La sangre venosa periférica se recogió sin estasis y la coagulación se inhibió con citrato. Las plaquetas se prepararon inmediatamente después de la extracción de sangre.

2.2.3 Preparación de las plaquetas

Para evitar cualquier activación de las plaquetas y una desgranulación, la preparación de proteínas plaquetarias se llevó a cabo a partir de sangre humana sin centrifugar, inmediatamente después de recoger la muestra de sangre en el ambulatorio. La separación de las plaquetas de otros componentes de la sangre se produjo en dos etapas: (1) la eliminación de los glóbulos rojos y blancos mediante sedimentación y (2) la separación de las plaquetas de otros componentes del plasma mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

2.2.4 Electroforesis en gel bidimensional

El material proteico precipitado de las plaquetas se solubilizó en tampón de muestra que contenía urea, tiourea y CHAPS y se aplicó a la primera dimensión a un enfoque isoeléctrico (tiras de 24 cm de Immobiline Dry, en un intervalo de pH de 4-7 y 6 a 9). Esto produjo una separación de las proteínas de acuerdo a su pl. A continuación, la tira con IPG (gradiente de pH inmovilizado) se aplicó a la segunda dimensión sobre un gel al 11% de SDS-PA y las proteínas se separaron según su peso molecular. Las manchas de proteínas se visualizaron mediante tinción con plata. Los geles se escanearon empleando un escáner FX de Bio-Rad y las imágenes se analizaron con el programa informático MELANIE 3.0 de análisis de formación de imágenes de GeneBio. Con el sistema de electroforesis diferencial en gel fluorescente (DIGE) 2-D, las muestras de proteínas plaquetarias se marcaron con colorante fluorescente antes de la electroforesis y los geles 2D se escanearon con un escáner Typhoon (Amersham Biosciences).

Las imágenes de los geles eran muy uniformes. Por ejemplo: en cuatro geles paralelos de las mismas muestras 2463, 2645, 2710 y 2487 se detectaron manchas de proteínas respectivamente. Esto indica un coeficiente de variación muy bajo de solo el 4,7%. Sin embargo, algunas manchas eran muy débiles y por lo tanto no eran adecuadas para un análisis adicional. Teniendo en cuenta solamente las manchas claras y nítidas, se encontró que estaban presentes 1.983 manchas (77%) en los cuatro geles. Esta uniformidad está a un nivel similar a la publicada por otros grupos de investigación proteómica (por ejemplo, O'Neill, et al. 2002, Towards complete analysis of the platelet proteome, Proteomics 2 288-305).

2.3 Enfermedad de Alzheimer

Para determinar si las plaquetas de los pacientes con EA tienen modificaciones específicas en su perfil de expresión de proteínas, se tenían que superar variaciones entre los individuos. Por lo tanto se eligió una estrategia de dos

etapas:

1. Análisis de geles 2D de muestras agrupadas de pacientes con EA (esto estabiliza las diferencias interindividuales) para obtener una visión general de las diferencias específicas de la enfermedad y para obtener una lista de manchas candidatas.

2. Análisis de geles 2D de cada paciente individual con el fin de evaluar la significación estadística de las manchas candidatas.

Con el programa informático MELANIE-3.0, los geles 2x2 de EA se compararon y se calculó una imagen sintética de EA que contenía todas las manchas comunes (1925). La imagen de control sintética correspondiente tenía 1983 manchas comunes. Una comparación de estos dos geles sintéticos mostró que 1501 manchas están presentes tanto en las muestras de EA como de los controles. Las aproximadamente 400 manchas no comunes eran todas muy débiles y probablemente se habían debido a las variaciones en la metodología. Todas las 1501 manchas comunes se introdujeron en una evaluación estadística. Se calculó el nivel de expresión medio de cada mancha individual en el grupo de EA y se comparó con la media del grupo de controles sanos. Además, se calculó el nivel de significación de cualquier diferencia mediante una prueba de la t de Student.

Empleando este enfoque se encontraron 72 manchas de proteínas que mostraban un incremento o una disminución significativa ($p < 0,05$) de las intensidades de las manchas de muestras de EA, en comparación con controles sanos. Con el fin de evaluar la especificidad de estas 72 manchas, se analizó el nivel de expresión de estas manchas en geles 2D de cada paciente individual con EA y de cada control individual.

De los 20 valores individuales de la intensidad de cada mancha por grupo, el valor medio se calculó junto con la prueba de la t de Student. Se encontró que veinticinco manchas aún eran estadísticamente significativas (véase la Tabla 1).

2.3.1 Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas a partir de manchas de proteínas relacionadas con el Alzheimer

A partir de este estudio, se identificaron veinticinco proteínas. Las proteínas se muestran en la Tabla 1.

3. Conclusión

Los experimentos detallados en el presente documento indican que la proteína identificada en la Tabla 1 es un marcador útil de la presencia de enfermedad de Alzheimer o del riesgo de padecerla.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende medir el nivel de expresión de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt en una muestra de plaquetas aisladas a partir de una persona sospechosa de tener la enfermedad de Alzheimer, y determinar si el nivel de expresión está alterado en comparación con un control, en donde un nivel de expresión reducido cuando se compara con un control sano sin la enfermedad, de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt, indica que existe un riesgo de enfermedad de Alzheimer.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la detección de la expresión de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt se lleva a cabo en una muestra de plasma.

3. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que las plaquetas se purifican para estar sustancialmente exentas de otros componentes de la sangre.

4. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que las plaquetas no están activadas.

5. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que el nivel de expresión de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt en las plaquetas se determina a partir de un extracto de proteína plaquetaria.

6. El método según la reivindicación 5, en el que un extracto de proteína plaquetaria se aísla a partir de una muestra de sangre usando un método que comprende las etapas de:

(i) retirar los glóbulos rojos y blancos de la sangre de la muestra mediante sedimentación o centrifugación suave;

(ii) retirar las plaquetas de la muestra resultante;

(iii) poner en contacto las plaquetas obtenidas en la etapa (ii) con un agente para lisar las plaquetas y precipitar el extracto de proteínas plaquetarias;

(iv) opcionalmente centrifugar el lisado resultante para obtener las proteínas precipitadas.

7. Uso de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en una persona sospechosa de tener la enfermedad de Alzheimer en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el kit una sonda que permite la identificación de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D y reactivos para un inmunoensayo, una electroforesis en gel 2D o una reacción de polimerasa para detectar el nivel de expresión de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt.

8. El uso según la reivindicación 7, en el que la sonda se une específicamente a la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt.

9. El uso según la reivindicación 8, en el que la sonda es un anticuerpo o un aptámero.

10. El uso según la reivindicación 7, en el que la sonda es un ácido nucleico que se hibrida con un ARNm que codifica la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por nº de orden P78417 de SwissProt.

11. El uso según la reivindicación 7, en el que el kit comprende dextrano, un gel de exclusión por tamaño, ácido tricloroacético o etanol y una sonda que permite la identificación de la proteína mutante S-transferasa de glutatión A140D identificada por el nº de orden P78417 de SwissProt.

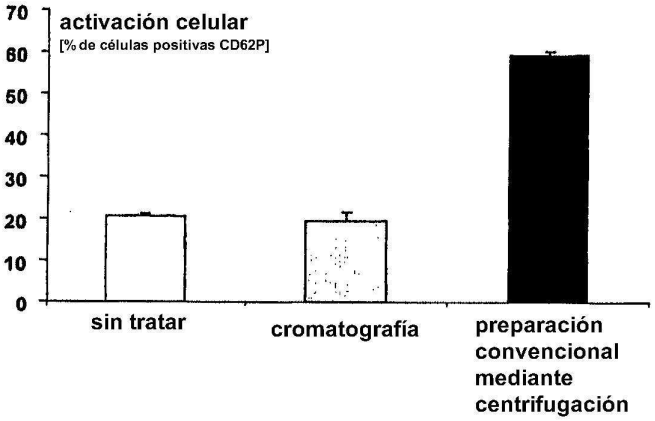
70
60
50
40
30
20
10
0
activación celular
[% de células positivas CD62P]
sin tratar
cromatografía
preparación convencional mediante centrifugación

Figura 1

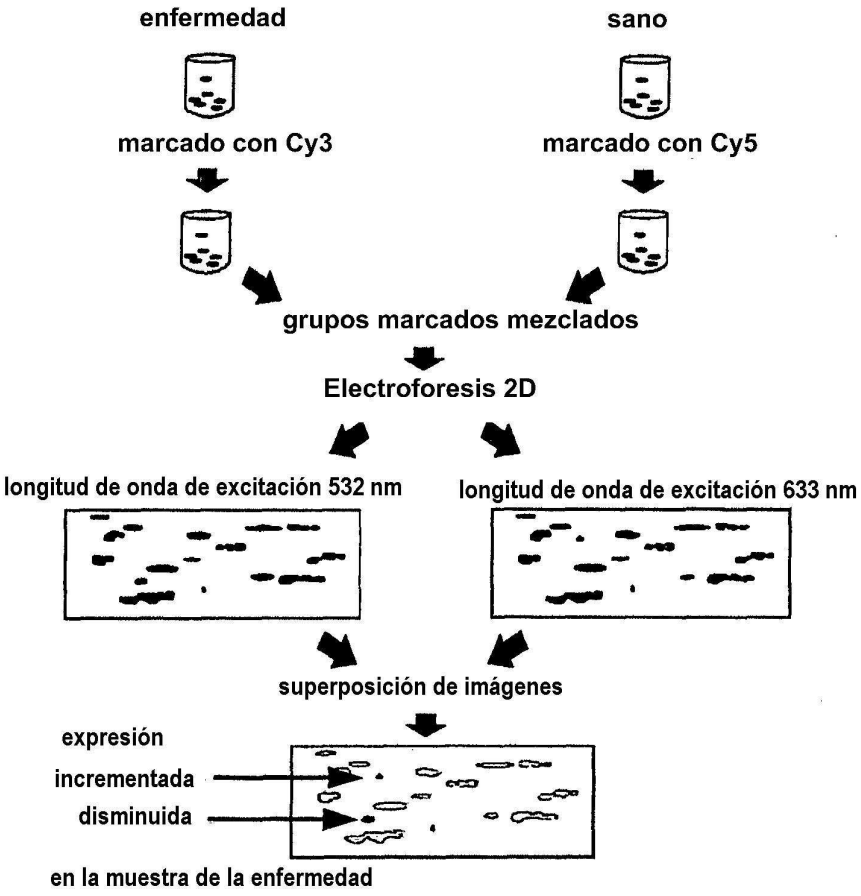
enfermedad
sano
marcado con Cy3
marcado con Cy5
grupos marcados mezclados
Electroforesis 2D
longitud de onda de excitación 532 nm
longitud de onda de excitación 633 nm
superposición de imágenes
expresión
incrementada
disminuida
en la muestra de la enfermedad

Figura 2