

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 208**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011** **E 11745005 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 2539709**

54 Título: **Alteraciones específicas de la enfermedad de Alzheimer de los niveles de proteína quinasa C épsilon (PKC-épsilon)**

30 Prioridad:

**09.07.2010 US 362893 P**

**08.07.2010 US 362512 P**

**22.02.2010 US 306922 P**

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

**18.06.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KHAN, TAPAN K. y  
ALKON, DANIEL L.**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 538 208 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

Alteraciones específicas de la enfermedad de Alzheimer de los niveles de proteína quinasa C épsilon (PKC-épsilon)

## 5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante la detección de alteraciones en la proporción de los niveles de proteína PKC épsilon en una o más células periféricas en un paciente humano en comparación con los niveles de PKC épsilon en una o más células periféricas en un sujeto de control. Los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer dados a conocer en la presente invención son útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y para procedimientos de cribado para la identificación de compuestos para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer. La presente invención da a conocer además procedimientos para elevar los niveles de proteína PKC épsilon que comprenden las etapas de poner en contacto una o más células periféricas humanas con una cantidad de un activador de PKC eficaz para elevar los niveles de PKC épsilon en comparación con una célula periférica humana no contactada.

## TÉCNICA ANTERIOR

La enfermedad de Alzheimer (EA), la forma más común de demencia, comienza con la pérdida de la memoria reciente y está asociada con dos características patológicas principales en el cerebro: placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. Estos están asociados típicamente con una importante pérdida de la sinapsis. Las placas amiloides están formadas por la agregación de oligómeros peptídicos A $\beta$  que se generan a partir de la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP) por la vía de la secretasa  $\beta$  y secretasa  $\gamma$ , mientras que la secretasa  $\alpha$  genera la APP- $\alpha$  no tóxica, sinaptogénica soluble. Observaciones acumuladas indican que los isoenzimas  $\alpha$  e isoenzima  $\epsilon$  de la proteína quinasa C (PKC) activan directamente la escisión de APP mediada directamente por la secretasa  $\alpha$  (Slack y otros, 1993; Kinouchi y otros, 1995; Jolly-Tornetta y Wolf 2000; Yeon y otros, 2001, Lanni y otros, 2004), y/o indirectamente a través de la fosforilación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2) (Devari y otros, 2006, Alkon y otros, 2007). Muchas observaciones indican también que las vías de señalización de PKC regulan los eventos importantes en la fisiopatología neurodegenerativa de la EA, tales como la degradación de A $\beta$  mediada por la enzima convertidora de endotelina (ECE) (Nelson y otros, 2009). La sobreexpresión *in vivo* de PKC- $\epsilon$  en ratones transgénicos EA redujo las placas amiloides (Choi y otros, 2006). Otros estudios han proporcionado pruebas de que anomalías patológicas específicas de la EA se pueden encontrar en tejidos distintos al cerebro entre los que se incluyen sangre, fibroblastos de la piel y los tejidos oculares (Gurreiro y otros, 2007, Ray y otros, 2007). En fibroblastos de la piel de EA, por ejemplo, se encontraron defectos de canales específicos de K $^{+}$  (Etcheberrigaray y otros, 1993; 1994), isoenzimas PKC (Govoni y otros, 1993, Favit y otros, 1998), señalización de Ca $^{+}$  (Ito y otros, 1994), fosforilación de quinasa MAP Erkl/2 (Zhao y otros, 2002; Khan y Alkon, 2006), y PP2A (Zhao y otros, 2003). Para los pacientes de EA familiar, los fibroblastos de la piel mostraron una mayor secreción de A $\beta$  (Citron y otros, 1994; Johnston y otros, 1994) mientras que se indujo una reducción específica de EA de canales específicos de K $^{+}$  por A $\beta$ <sub>1-40</sub> en fibroblastos humanos normales (Etcheberrigaray, y otros, 1993; 1994). Recientemente, se ha demostrado que un biomarcador periférico fosforilado de Erkl/2 en fibroblastos de piel, confirmado por autopsia y controlado internamente, tiene una sensibilidad y especificidad prometedoras (Khan y Alkon, 2006; 2010). Aún otros estudios han sugerido un déficit de la PKC en regiones particulares del cerebro de pacientes con EA (Masliah y otros, 1991). Finalmente, se ha demostrado recientemente además que los activadores farmacológicos de PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  pueden proteger dos cepas diferentes de ratones con EA de todas las características patológicas y anomalías cognitivas de la EA (Hongpaisan y otros, 2011). De forma consistente con estas observaciones, se encontró que PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  se redujeron significativamente en los ratones transgénicos con EA y se restauraron a niveles normales mediante el tratamiento con activadores farmacológicos de PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  (Hongpaisan y otros, 2011). La publicación de Matsushima y otros, Journal of Neurochemistry, julio de 1996, vol. 67, no. 1, páginas 317 a 323 hace referencia a estudios respecto a la actividad de la proteína quinasa C (PKC) en condiciones de ensayo de PKC dependiente de Ca $^{2+}$  (actividad de PKC dependiente de Ca $^{2+}$ ) y PKC independiente de Ca $^{2+}$  (actividad de PKC independiente de Ca $^{2+}$ ) en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) y controles de la misma edad. Seung y otros, en Biochemical and Biophysical Research Communications 280, páginas 782-787, 2001, investiga el papel de PKC- $\epsilon$  en el procesamiento de proteínas precursoras de amiloide (APP) APP utilizando células B103 que sobreexpresan APP. En el Journal of Biochemistry (JB) Minireview, vol. 132, páginas 847-852, 2002, Yoshiko Akita analiza la estructura única y la función PKC- $\epsilon$ . De Barry y otros, en Experimental Gerontology, vol. 45, páginas 64 a 69 de 2010, estudian el papel de la PKC como un biomarcador periférico para la enfermedad de Alzheimer.

En conjunto, estos y otros estudios anteriores tienen dos implicaciones importantes: I. La EA tiene expresión patológica sistémica con consecuencias sintomáticas limitadas a la función cerebral, y II. Las isoenzimas PKC, en particular  $\alpha$  y  $\epsilon$ , juegan un papel fundamental en la regulación de los aspectos principales de la patología de la EA, incluyendo la pérdida de sinapsis, la generación de placas A $\beta$  y amiloides y la hiperfosforilación mediada por GSK-3 $\beta$ -de tau en ovillos neurofibrilares. Por estas razones los presentes inventores han analizado la PKC- $\epsilon$  en fibroblastos de piel de pacientes con EA, controles de la misma edad (AC) y con demencia no de EA (DNEA) en los niveles de estado estacionario. Este informe revela que la PKC- $\epsilon$ , así como los cambios en estos niveles inducidos

por la aplicación de oligómeros A $\beta$  solubles, pueden proporcionar una base para el diagnóstico de EA en los tejidos periféricos.

5 Existe una necesidad de pruebas muy sensibles y altamente específicas para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer y para cribar compuestos útiles en el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer. Los presentes inventores han identificado, por primera vez, biomarcadores moleculares específicos únicos de la enfermedad de Alzheimer útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de una manera muy sensible y altamente específica en comparación con las pruebas de diagnóstico conocidas previamente. De este modo, los biomarcadores moleculares específicos únicos de la enfermedad de Alzheimer dados a conocer en la presente memoria descriptiva sirven como base para procedimientos de diagnóstico, que tienen un grado de sensibilidad y especificidad elevados para la detección y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Los biomarcadores moleculares específicos únicos de la enfermedad de Alzheimer de la presente invención son útiles además en procedimientos de cribado para identificar compuestos que pueden ser utilizados como agentes terapéuticos en el tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer. Los presentes inventores han descubierto además procedimientos para elevar los niveles de proteína PKC  $\epsilon$  en células periféricas de pacientes humanos.

### CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

20 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que los niveles de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en un sujeto humano son más bajos en sujetos con la enfermedad de Alzheimer (EA) que en controles de la misma edad (AC). En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: a) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas de dicho sujeto humano; y b) comparar el nivel de PKC  $\epsilon$  con el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en un sujeto de control; en el que dicho procedimiento es indicativo de la enfermedad de Alzheimer si el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en dicho sujeto humano es menor que el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en dicho sujeto de control.

30 En ciertas realizaciones, dicho nivel de PKC  $\epsilon$  es un nivel de proteína PKC  $\epsilon$  o un nivel de actividad de PKC  $\epsilon$ . En ciertas realizaciones, el nivel de PKC  $\epsilon$  se mide por RT-PCR. En ciertas realizaciones, el sujeto de control no tiene la enfermedad de Alzheimer. Los procedimientos de diagnóstico de la presente invención se llevan a cabo *in vitro*.

35 En ciertas realizaciones preferentes de la presente invención, dichas una o más células periféricas son un fibroblasto, mucosa bucal, neurona o célula de la sangre.

40 En ciertas realizaciones, las etapas de medición o determinación del nivel de PKC  $\epsilon$  comprenden un procedimiento seleccionado del grupo que comprende radio inmunoensayo, ensayo de transferencia Western, ensayo de inmunofluorescencia, inmunoensayo enzimático, inmunoprecipitación, ensayo quimioluminiscente, ensayo inmunohistoquímico, ensayo de transferencia de punto y ensayo de transferencia de ranura.

45 En ciertas realizaciones, la ausencia de la enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto humano se indica si dicho nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas de dicho sujeto humano es mayor que el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas de dicho sujeto de control o igual al mismo.

50 La presente invención se refiere además a un procedimiento para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de: a) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas de un sujeto humano; b) poner en contacto dicha una o más células de la etapa (a) con un agente que es un activador de PKC  $\epsilon$ ; c) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en dicha una o más células en la etapa (b) después de dicha puesta en contacto en la etapa (b); en el que la enfermedad de Alzheimer se indica en dicho sujeto humano si el nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (c) es mayor que el nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (a).

55 En ciertas realizaciones, la ausencia de la enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto humano se indica si dicho nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (c) es igual o menor que el nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (a).

60 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar o monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto humano que comprende las etapas de: a) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en dicho sujeto humano; b) comparar el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en dicho sujeto humano con el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en un sujeto de control; y c) determinar o monitorizar dicha progresión de la enfermedad de Alzheimer basándose en dicha comparación en la etapa (b).

65 En ciertas realizaciones, el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en dicho sujeto humano disminuye a medida que la enfermedad de Alzheimer progresa con el tiempo.

En ciertas realizaciones, el nivel de PKC  $\epsilon$  aumenta en una o más células periféricas en dicho sujeto humano a medida que la progresión de la enfermedad de Alzheimer se invierte.

5 En ciertas realizaciones preferentes, la presente invención se refiere a procedimientos para elevar el nivel de la proteína PKC  $\epsilon$  en una célula, procedimientos que comprenden la etapa de poner en contacto una o más células humanas con una cantidad de un activador de PKC eficaz para elevar el nivel de proteína PKC  $\epsilon$  en dichas células en comparación con una célula humana no contactada.

10 En ciertas realizaciones, dicha célula humana es un fibroblasto, mucosa bucal, neurona, o célula de la sangre. En ciertas realizaciones, dicho activador de PKC es una lactona macrocíclica. En ciertas realizaciones, dicha lactona macrocíclica es una briostatina. En ciertas realizaciones, dicha briostatina es briostatina-1. En ciertas realizaciones, dicho nivel de PKC  $\epsilon$  es un nivel de proteína PKC  $\epsilon$  o un nivel de actividad de PKC  $\epsilon$ .

15 Además, la presente invención se refiere a procedimientos de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprenden las etapas de: a) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas en un sujeto humano; b) poner en contacto dicha una o más células periféricas de la etapa (b) con un péptido A $\beta$ ; c) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en dicha una o más células periféricas en la etapa (b) después de dicha puesta en contacto de la etapa (b); en el que la enfermedad de Alzheimer se indica si el nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (c) no es significativamente diferente del nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (a).

20 En ciertas realizaciones, la ausencia de la enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto humano se indica si dicho nivel de PKC  $\epsilon$  determinada en la etapa (c) es menor que el nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (a).

25 En ciertas realizaciones, la presente invención está dirigida a kits que comprenden uno o más anticuerpos específicos para PKC  $\epsilon$ . En ciertas realizaciones dicho kit puede comprender un activador de PKC. En ciertas realizaciones, dicho kit puede comprender un activador de PKC  $\epsilon$ . En ciertas realizaciones, dicho kit puede comprender uno o más oligonucleótidos específicos para un gen que codifica PKC  $\epsilon$ .

30 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un kit que comprende uno o más oligonucleótidos específicos para un gen que codifica PKC  $\epsilon$ . En ciertas realizaciones, dicho kit puede comprender un activador de PKC. En ciertas realizaciones, dicho kit puede comprender un activador de PKC  $\epsilon$ .

35 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un compuesto útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprende: a) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en una o más células periféricas de un sujeto con enfermedad de Alzheimer; b) poner en contacto dichas células periféricas con un compuesto candidato; c) determinar el nivel de PKC  $\epsilon$  en dicha una o más células periféricas después de dicha etapa de contacto (b); en el que dicho compuesto candidato se identifica como un compuesto útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer si el nivel de PKC  $\epsilon$  determinado en la etapa (c) es mayor que el nivel de PKC  $\epsilon$  determinada en la etapa (a).

40 Los isoenzimas de la proteína quinasa C (PKC), en particular  $\alpha$  y  $\epsilon$ , tienen un papel fundamental en la regulación de los aspectos principales de la patología EA, entre los que se incluyen la pérdida de sinapsis, la generación de A $\beta$  y placas amiloides y la hiperfosforilación de taumediada por GSK-3 en los ovillos neurofibrilares. La evidencia de los déficits de señalización específicos de la EA se ha encontrado previamente en los tejidos periféricos tales como la sangre, fibroblastos de la piel y los tejidos oculares. La PKC- $\epsilon$  es un biomarcador de EA preciso en fibroblastos de piel con EA.

45 En ciertas realizaciones, los niveles basales de proteína PKC- $\epsilon$  se pueden medir mediante inmunofluorescencia, transferencia Western y en el nivel de transcripción por RT-PCR en los fibroblastos cultivados de piel de pacientes con EA, los casos de control de la misma edad (AC), y pacientes con demencia no EA. Se seleccionan once sujetos AC y diez sujetos con EA de casos tanto esporádicos como familiares, con presencia de placas amiloides y los ovillos neurofibrilares en el cerebro en la autopsia (9 de 10 casos de EA confirmados por autopsia). Se incluyen ocho pacientes con enfermedad de Huntington (HD) hereditaria con evidencia genética de características no EA, un paciente con la enfermedad de Parkinson y un paciente con demencia frontotemporal para establecer que la deficiencia de PKC- $\epsilon$  es sólo debida a la patología de la EA.

50 Se encontró que los niveles de PKC- $\epsilon$  en todos los fibroblastos de EA fueron menores que en los de fibroblastos de AC y de demencia sin EA. La PKC- $\epsilon$  promedio en EA ( $0,501 \pm 0,021$ , A.U.) se encuentra que es un 40% inferior a la de AC ( $0,857 \pm 0,036$ , UA), y mucho menor que en los de casos demencia no EA ( $1,040 \pm 0,288$ , A.U.) en transferencias western cuando se normaliza con respecto a la beta tubulina. Un cambio similar se encuentra además tras el análisis de inmunofluorescencia. El nivel de ARNm de PKC- $\epsilon$  (AC:  $0,904 \pm 0,103$ , EA:  $0,530 \pm 0,061$ ) se encuentra también que ha disminuido respecto al de los pacientes con EA. Después de la aplicación de A $\beta$  oligomérica a fibroblastos de la piel, los niveles de PKC- $\epsilon$  disminuyen en fibroblastos de AC, pero no en los pacientes con EA, indicando un efecto fisiopatológico de la A $\beta$  sobre la PKC- $\epsilon$ .

65

Los presentes inventores han descubierto que los niveles de PKC- $\epsilon$  se reducen significativamente en fibroblastos de piel de EA cultivados en comparación con los casos de AC sanos y de demencia sin EA. La PKC- $\epsilon$  es un biomarcador de diagnóstico periférico y una diana terapéutica para EA.

## 5 DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1A y 1B: Expresión de PKC- $\epsilon$  en fibroblastos humanos cultivados a partir de controles de la misma edad (AC), enfermedad de Alzheimer (EA), y demencia no Alzheimer. Los valores son promedios  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Figura 1A: La inmunoreactividad de PKC- $\epsilon$  y  $\beta$ -tubulina en fibroblastos de AC, EA, y demencia sin EA. AC1, AC2 y AC3 (AG07714, AG11734 y AG 12927) son fibroblastos de controles de la misma edad, AD1, AD2 y AD3 (AG06844, AG04159 y AG08245) son fibroblastos con enfermedad de Alzheimer y HD1 y HD2 (GM06274, GM04198) son fibroblastos de la enfermedad de Huntington, respectivamente.

Figura 1B: Representación gráfica de las relaciones densitométricas normalizadas de PKC- $\epsilon$  a  $\beta$ -tubulina en once AC, diez EA, ocho HD, uno de enfermedad de Parkinson (EP) y uno de demencia frontotemporal (FT). En las células AC las proporciones variaron entre 0,7-1,2 (eje Y), en la demencia no EA las proporciones variaron entre 0,72-1,3 (con dos excepciones HD6 y HD8) mientras que en EA las proporciones de todas las líneas celulares estaban por debajo de 0,6. Inserto en el Panel B: Los valores promedio fueron  $0,857 \pm 0,0361$  (SEM) en células AC,  $1,040 \pm 0,288$  en la demencia no EA y  $0,501 \pm 0,021$  en células de EA. PKC- $\epsilon$  fue significativamente menor en EA en comparación con AC ( $p < 0,0001$ ) y la demencia no EA ( $p=0,0394$ ). El promedio de AC11 ( $0,6213 \pm 0,040$ ) fue el más bajo entre los de EA. Sin embargo, también fue significativamente diferente ( $P=0,0162$ ) en comparación con todos los casos de EA.

Figura 2A y 2B: Detección de inmunofluorescencia de PKC- $\epsilon$  en fibroblastos humanos cultivados de controles de la misma edad (AC) y fibroblastos de la enfermedad de Alzheimer (AD).

Figura 2A: Micrografías con focales de fibroblastos de controles de la misma edad (AC), y con enfermedad de Alzheimer (EA). El canal verde (FITC) representa PKC- $\epsilon$ , el canal azul es indicador de tinción nuclear (DAPI), y el tercer canal representa una imagen fusionada. La intensidad de fluorescencia promedio (IFP) del verde (para PKC- $\epsilon$ ) se midió a partir de todas las células de 5 campos diferentes de cada uno de los cinco fibroblastos de AC y EA. Los valores son el promedio  $\pm$  SEM.

Figura 2B: Representación gráfica de las IFP (intensidad de fluorescencia promedio) de PKC- $\epsilon$  de 5 casos de AC (AG07714, AG11734, AG05840, AG06242 y AG12927) y 5 casos de EA (AG06844, AG04159, AG06840, AG05770 y AG08245). En las células de AC la IFP varió entre 15-20A.U. (eje Y), mientras que en la EA el intervalo es entre 7-10. Las intensidades promedio de la PKC- $\epsilon$  en AC y EA fueron  $18,092 \pm 2,087$  y  $9,110 \pm 1,420$ , respectivamente.

Figura 3A y 3B: Análisis de RT-PCR de la PKC- $\epsilon$ .

Figura 3A: Se aisló ARNm a partir de tres casos de AC, tres de EA y dos de HD. Se hicieron discurrir amplicones RT-PCR de PKC- $\epsilon$ , y  $\beta$ -tubulina en E-geles y se capturaron imágenes sobre un escáner de gel Fuji. (AC1, AC2 y AC3: AG11363, AG09977 y AG12998, respectivamente; AD1, AD2 y AD3: AG06263, AG10788 y AG08259, respectivamente; HD1 y HD2: GM02165 y GM04226, respectivamente).

Figura 3B: (a). Histograma que representa el valor normalizado de PKC- $\epsilon$  con respecto a  $\beta$ -tubulina de tres AC, tres EA y dos HD. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, (b) el promedio del nivel de PKC- $\epsilon$  de ARNm de las células de EA fue significativamente ( $p < 0,0033$ ) más bajo que en las células de AC (AC:  $0,904 \pm 0,103$ , AD:  $0,530 \pm 0,061$  y HD:  $0,701 \pm 0,143$ ).

Figura 4A, 4B y 4C: Oligómeros solubles A $\beta$  inducen fenotipo PKC- $\epsilon$  de Alzheimer de fibroblastos humanos.

Figura 4A: Análisis por SDS-PAGE de los oligómeros A $\beta$  sintetizados a partir de A $\beta_{1-42}$ . Carril M: Marcador de peso molecular de proteínas, el carril o A $\beta$ : Oligómeros A $\beta$  solubles.

Figura 4B: El tratamiento con oligómero A $\beta$  soluble (500 nM) disminuye la PKC- $\epsilon$  en todos los fibroblastos de la piel de controles de la misma edad (cinco casos de EA y cinco de AC). El promedio de los valores densitométricos de PKC- $\epsilon$  normalizados se calcularon a partir de cinco líneas celulares diferentes (fibroblastos de la piel tratados con oligómeros A $\beta$  y sin tratar). En cada caso el valor de AC se calculó considerando el valor promedio de EA como único. Los AC mostraron una disminución significativa en la expresión de PKC- $\epsilon$  después del tratamiento con A $\beta$ , (valores de p son 0,0044, 0,0035, 0,0005, 0,0330 y 0,0253 para AC1, AC2, AC3, AC4 y AC5, respectivamente), mientras que los casos de EA no mostraron disminución en la expresión.

Figura 4C: El tratamiento con oligómero A $\beta$  cambió la AC a un fenotipo EA. Los niveles de PKC- $\epsilon$  no mostraron ninguna diferencia significativa en células de CA y de EA tratadas con oligómero A $\beta$ , mientras que en las células de EA no tratadas se mostró un 40% de reducción de expresión en comparación con AC (P=0,0292).

5 Figura 5: Interacción de la PKC- $\epsilon$  con A $\beta$ , implicación en la enfermedad de Alzheimer. En la patología de EA la producción excesiva de A $\beta$  por una mayor actividad de las secretasas  $\beta$ ,  $\gamma$  y una menor actividad de la secretasa  $\alpha$  disminuye la cantidad de PKC- $\epsilon$ . Por otra parte, PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  aumentan la actividad de la secretasa  $\alpha$ , PKC- $\epsilon$  también aumenta la actividad de enzimas que degradan A $\beta$ , en particular ECE (enzima convertidora de endotelina).

10 Figura 6: Estructuras de moléculas contempladas para su utilización de acuerdo con la presente invención (BR-101 a BR-118).

Figura 7: Diagrama esquemático de la reducción del nivel de PKC  $\epsilon$  con el tiempo como una función de la progresión de la enfermedad de Alzheimer; o la gravedad del deterioro cognitivo; o duración de la enfermedad. El nivel de PKC  $\epsilon$  puede ser un nivel de actividad, el nivel de proteína en una o más células o el nivel de transcripción medido, por ejemplo, por RT-PCR.

15

Figura 8: Briostatina evita la pérdida de PKC- $\epsilon$  en fibras perforadas en ratones Tg2576 (5x FAD)

20 Figura 9: PKC- $\epsilon$  en fibras perforadas con y sin briostatina.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "nivel de PKC  $\epsilon$ " incluye, sin que constituya limitación, uno cualquiera o más de los siguientes significados: la actividad enzimática de PKC  $\epsilon$ , la cantidad de proteína PKC  $\epsilon$ , o la cantidad de ARN que codifica PKC  $\epsilon$ .

Un "ácido graso" es un ácido carboxílico con una cadena alifática no ramificada que contenía, aproximadamente, de 4 a 30 carbonos; la mayoría de los ácidos grasos de cadena larga contenían entre 10 y 24 carbonos. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. Los ácidos grasos saturados no contenían ningún doble enlace u otros grupos funcionales a lo largo de la cadena. Los ácidos grasos insaturados contenían uno o más grupos alqueno funcionales, es decir, enlaces dobles, a lo largo de la cadena. El término "ácido graso poliinsaturado" o "AGPI" significa un ácido graso que contenía más de un doble enlace. Hay tres clases de AGPI, AGPI omega-3, AGPI omega-6 y AGPI omega-9. En los AGPI omega-3, el primer doble enlace se encuentra a 3 carbonos de distancia del último carbono de la cadena (el carbono omega). En los AGPI omega-6 el primer doble enlace se encuentra a 6 carbonos de distancia de la cadena y en AGPI omega-9 el primer doble enlace se encuentra a 9 carbonos del carbono omega.

30

35

Los AGPI son denominados también "ácidos grasos polienoicos". Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término AGPI incluye tanto los ácidos grasos de origen natural como sintéticos. Una fuente importante de AGPI es a partir de aceites de pescado marino y vegetales derivados de cultivos de semillas oleaginosas, aunque los AGPI que encuentran en los aceites de plantas desarrolladas comercialmente se limitan generalmente a ácido linoleico y ácido linolénico (18:3 delta 9,12,15).

40

45 Un "cis-AGPI" es uno en el que los átomos de carbono adyacentes están en el mismo lado del doble enlace.

La abreviatura X:Y indica un grupo acilo que contenía X átomos de carbono e Y dobles enlaces. Por ejemplo, el ácido linoleico se abrevia 18:2.

50 Un "polieno interrumpido por metileno" se refiere a un AGPI que tiene dos o más dobles enlaces cis separados entre sí por un solo grupo metileno.

Un "polieno no interrumpido por metileno" o "ácido graso interrumpido por polimetileno" se refiere a un AGPI que tiene dos o más dobles enlaces cis separados por más de un grupo metileno.

55

Un "ácido graso monoinsaturado" (AGMI) es un ácido graso que tiene un único doble enlace en la cadena de ácidos grasos y de todos los átomos de carbono restantes en la cadena están enlazados por enlaces simples. Entre los ejemplos de AGMI se incluyen ácido oleico, ácido miristoleico y ácido palmitoleico.

60 Un "ácido graso monoinsaturado cis" significa que los átomos de hidrógeno adyacentes están en el mismo lado del doble enlace.

Los ácidos grasos conjugados tales como el ácido linoleico conjugado (ácido 9-cis-11-trans-octadecadienoico) poseen un dieno conjugado, es decir, dos dobles enlaces en los carbonos adyacentes. Algunas evidencias sugieren que el ácido linoleico conjugado tiene actividad antitumoral.

65

Entre los ejemplos de AGPI se incluyen ácido linoleico (ácido 9,12-octadecadienoico);  $\gamma$ -linolénico (GLA; ácido 6,9,12-octadecatrienoico);  $\alpha$ -linolénico (9,12,15-octadecatrienoico); ácido araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico); ácido eicosapentanoico (EPA, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentanoico); docosapentaenoico (DPA; ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico); ácido docosahexaenoico (DHA, ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico); y ácido estearidónico (ácido 6,9,12,15-octadecatetraenoico).

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "ciclopropano" se refiere a una molécula de cicloalcano con la fórmula molecular  $C_3H_6$ , que consta de tres átomos de carbono unidos entre sí para formar un anillo, teniendo enlazado cada átomo de carbono dos átomos de hidrógeno.

Un "epóxido" se refiere a un éter cíclico con tres átomos en el anillo.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "derivado de AGPI" se refiere a un AGPI, o alcohol o éster del mismo, en el que, como mínimo, uno de los dobles enlaces ha sido ciclopropanado o epoxidado.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "derivado de AGMI" se refiere a un AGMI, o alcohol o éster del mismo, en el que el doble enlace se ha ciclopropanado o epoxidado.

La "activación selectiva" de  $PKC-\epsilon$  significa que el compuesto derivado de AGPI de la presente invención activa a  $PKC-\epsilon$  en una medida detectable mayor que a cualquier otra isoforma PKC. En realizaciones específicas, el derivado de AGPI activa a  $PKC-\epsilon$  como mínimo 1 vez, 2 veces o 5 veces más que a otras isoformas PKC tal como se mide utilizando, por ejemplo, el ensayo de activación de PKC descrito en la presente memoria descriptiva. Tras la activación, las enzimas de la proteína quinasa C son translocadas a la membrana plasmática por proteínas RACK (receptor unido a la membrana de proteínas de la proteína quinasa C activada). En general, tras la activación, las enzimas de la proteína quinasa C son translocadas a la membrana plasmática por proteínas RACK. Otras indicaciones de la activación de PKC incluyen fosforilación en el C terminal de residuos específicos de serina/treonina por una quinasa fosfatidilinositol-trifosfato-dependiente (PDK1), como mínimo, con dos fosforilaciones y/o autofosforilaciones de secuencias bien conservadas en cada enzima de la familia PKC. La activación de PKC se describe en Sun y Alkon, Recent Patents SNC Drugs Discov.2006; 1 (2): 147-56.

"Neurodegeneración" se refiere a la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las neuronas.

A los propósitos de la presente invención, una "enfermedad neurológica" se refiere a cualquier enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico (SNP) que está asociada con el procesamiento  $\beta$ -amiloidogénico de APP. Esto puede dar como resultado defectos de células neuronales o gliales entre las que se incluyen, pero sin que constituyan limitación, pérdida neuronal, degeneración neuronal, desmielinización neuronal, gliosis (es decir, astrogliosis), o acumulación neuronal o extraneuronal de proteínas o toxinas aberrantes (por ejemplo,  $A\beta$ ).

Un ejemplo de enfermedad neurológica es la enfermedad de Alzheimer (EA). Otra enfermedad neurológica ejemplar es angiopatía congofílica (CAA), conocida también como angiopatía amiloide cerebral.

El término "enfermedad de Alzheimer" o "EA" se refiere a cualquier estado en la que la deposición de  $A\beta$  se acumulará finalmente en las células del sistema nervioso central. En una forma de realización no limitante,  $A\beta$ , en particular el péptido  $A\beta_{1-42}$ , se forma a partir del metabolismo  $\beta$ -amiloidogénico de APP. EA puede ser heredable en una manifestación familiar, o puede ser esporádica. En la presente memoria descriptiva, EA incluye familiar, esporádica, así como sus intermedios y subgrupos basados en manifestaciones fenotípicas.

Otra enfermedad neurológica es el síndrome de Down (SD). Los sujetos con síndrome de Down desarrollan invariablemente (en su tercera o cuarta década) placas amiloides cerebrales ( $A\beta$ ) y ovillos neurofibrilares (ONF), lesiones características de la EA. Estudios recientes han demostrado que la  $A\beta_{42}$  es la forma más temprana de esta proteína depositada en el cerebro de síndrome de Down, y puede ser observada en sujetos tan jóvenes como de 12 años de edad, y que  $A\beta$  soluble se puede detectar en el cerebro de los sujetos con SD ya a las 21 semanas de edad gestacional, precediendo en gran medida a la formación de placas  $A\beta$ . Gyure y otros, Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2000; 125, 489-92.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "sujeto" incluye un mamífero.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un sujeto. Preferentemente, como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o indicado en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para su utilización en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que el

ingrediente activo puede combinarse y que, tras la combinación, puede utilizarse para administrar el ingrediente activo a un sujeto y se puede referir a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con los que se administra el compuesto.

5 Los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad de un agente terapéutico que da como resultado una respuesta terapéutica medible. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, incluyendo la mejora de los síntomas y los marcadores clínicos subrogados. De este modo, una respuesta terapéutica será generalmente una mejora o inhibición de uno o más síntomas de una enfermedad o estado, por ejemplo, EA. Una respuesta  
10 terapéutica medible también incluye el descubrimiento de que se evita un síntoma o una enfermedad o se tiene un retraso en su aparición, o que por otra parte éste se atenúa por el agente terapéutico.

El término "aproximadamente", de forma general, significará un grado aceptable de error para la cantidad medida por la naturaleza o la precisión de las mediciones. De forma típica, grados ejemplares de error se encuentran dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor determinado o un intervalo de valores. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces y, más preferentemente, dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente memoria descriptiva son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "aproximadamente" se puede inferir cuando no se indique expresamente.

#### **Niveles de PKC- $\epsilon$ son más bajos en los fibroblastos de EA**

En esta población de estudio los presentes inventores han incluido seis casos de EA esporádica (de aparición tardía, sin antecedentes familiares) y cuatro familiares (aparición temprana) para probar que la PKC- $\epsilon$  es disfuncional tanto en casos esporádicos como familiares y es un sello distintivo de la señalización patológica de la EA. El análisis por inmunotransferencia de 10 líneas celulares de EA, de 11 líneas celulares de AC y 10 de fibroblastos de demencia no EA reveló que los niveles de PKC- $\epsilon$  en las muestras de EA fueron inferiores en un 40% con respecto al AC (figura 1). La proporción normalizada promedio de PKC- $\epsilon$  frente a la  $\beta$ -tubulina fue  $0,857 \pm 0,036$  (SEM) en los casos de AC (n=11),  $1,040 \pm 0,288$  en la demencia no EA (n=10), y  $0,501 \pm 0,021$  en células de EA (n=10). Los niveles de PKC- $\epsilon$  fueron significativamente inferiores en los fibroblastos de EA ( $p < 0,0001$ ) en comparación con los casos de AC. El nivel de PKC- $\epsilon$  basal promedio para el caso de AC 11 ( $0,6213 \pm 0,040$ ) fue el más bajo entre todos los AC (figura 1B). Sin embargo, el nivel basal de PKC- $\epsilon$  de AC11 fue también estadísticamente significativo cuando se compara por separado con todos los casos de EA ( $P = 0,0162$ ).

Los datos de los análisis de transferencia Western fueron apoyados por el análisis de inmunofluorescencia de los fibroblastos teñidos que demostraron claras diferencias en la intensidad de la PKC- $\epsilon$  etiquetados con FITC entre células de AC y de EA (figura 2). La intensidad promedio de la PKC- $\epsilon$  en células AC y de EA fue de  $18,092 \pm 2,087$  y  $9,110 \pm 1,420$ , respectivamente. Para probar PKC- $\epsilon$  disfuncional en el nivel de transcripción, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR. Se midieron los niveles promedios de ARNm de tres líneas celulares EA, tres de AC y dos de HD (figura 3). Todos los niveles de ARNm-PKC- $\epsilon$  se normalizaron con los niveles de ARNm de tubulina  $\beta$  de líneas celulares correspondientes. El nivel de ARNm promedio normalizado de células de EA fue significativamente ( $p < 0,003$ ) más bajo que las células AC y las células HD (AC:  $0,904 \pm 0,103$ , EA:  $0,530 \pm 0,061$  y HD:  $0,701 \pm 0,143$ ) (figura 3).

#### **Tratamiento de fibroblastos de la piel con A $\beta$ oligomérica**

A $\beta$  oligomérica sintetizada por el procedimiento descrito con anterioridad produjo oligómeros de alto peso molecular con peso molecular mayor de 100 KDa (figura 4A). Se ha descrito que estos oligómeros son altamente tóxicos y que tenían similitudes con los que se encuentran en el cerebro de EA (Nouguchi y otros, 2009). Para establecer la relevancia fisiopatológica de la EA, se añadió A $\beta_{1-42}$  oligomérica exógena tóxica a los fibroblastos normales (AC) y se evaluó el impacto en el nivel de expresión de PKC- $\epsilon$  en estado basal. Después del tratamiento con A $\beta$  oligomérica, se encontró que los niveles de PKC- $\epsilon$  disminuyeron en los casos de AC, mientras que en los casos de EA no mostraron diferencias estadísticas. La media del promedio de tres experimentos independientes de cinco pacientes diferentes de AC y EA se calculó después del tratamiento con A $\beta$  oligomérica y se comparó con las células no tratadas. Células de AC y de EA no tratadas mostraron una diferencia de ~40% entre ellas, mientras que células de AC tratadas y de EA no mostraron diferencias en la expresión de PKC- $\epsilon$  o fueron en algunos casos más elevados para los casos de EA después del tratamiento con A $\beta$ .

La presente invención también se refiere, en ciertos aspectos, a procedimientos de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en las células periféricas humanas tomadas de los sujetos que han sido identificados para la prueba y diagnóstico. El diagnóstico se basa en el descubrimiento de biomarcadores moleculares únicos específicos de la enfermedad de Alzheimer. En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a procedimientos para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y a procedimientos de cribado para la identificación de compuestos cabeza de serie para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

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

Los presentes inventores han descubierto un biomarcador molecular único para la enfermedad de Alzheimer utilizando tejido periférico (no SNC) que es útil en ensayos de diagnóstico que son muy sensibles y muy específicos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Una gran ventaja de la presente invención es que el tejido utilizado en los ensayos y procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva puede obtenerse a partir de los sujetos utilizando procedimientos mínimamente invasivos, es decir, sin la utilización de una punción lumbar. De este modo, un aspecto de la presente invención se dirige a un ensayo o prueba para la detección precoz de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención también se refiere a procedimientos para el cribado de un compuesto de ensayo (o un compuesto cabeza de serie) útil para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer en el que los procedimientos comprenden un ensayo *in vitro*.

En otras realizaciones de la presente invención, el activador de la proteína quinasa C se selecciona del grupo que comprende bradiquinina, briostatina, bombesina, colecistoquinina, trombina, prostaglandina F2 alfa y vasopresina. Las células son células periféricas. En aún otras realizaciones de la presente invención, las células periféricas se seleccionan del grupo que comprende células de la piel, células de fibroblastos de la piel, células sanguíneas y células de la mucosa bucal. En aún otras realizaciones de la presente invención, las células no están aisladas de fluido espinal cerebral. En aún otras realizaciones de la presente invención, las células no comprenden fluido espinal cerebral. En aún otras realizaciones de la presente invención, las células no se obtienen por una punción lumbar. En aún otras realizaciones de la presente invención, el activador de la proteína quinasa C se pone en contacto con dichas células en medios que comprenden suero. En aún otras realizaciones de la presente invención, el activador de la proteína quinasa C se pone en contacto con dichas células en medios libres de suero. En otras realizaciones de la presente invención, las proteínas PKC épsilon se detectan por inmunoensayo. En aún otras realizaciones de la presente invención, el inmunoensayo es un radioinmunoensayo, un ensayo de transferencia Western, un ensayo de inmunofluorescencia, un inmunoensayo enzimático, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoelectroforesis, un ensayo de transferencia puntual, o una ensayo de transferencia de ranura. En aún otras realizaciones de la presente invención, la medición se realiza utilizando una matriz de proteínas, una matriz de péptidos, o una micromatriz de proteínas.

En otras realizaciones de la presente invención, el activador de PKC, o composición farmacéutica, comprende cualquiera de los siguientes compuestos seleccionados del grupo que comprende DCP-LA; éster metílico de DCPLA, éster metílico de DHA-CP6 (BR-111); éster metílico EPA-CP5 (BR-114); éster metílico AA-CP4 (BR-115); DHA-CP6; EPA-CP5; AA-CP4; alcohol linolénico ciclopropanado (BR-104); alcohol linoleico ciclopropanado (BR-105); alcohol eláidico ciclopropanado (BR-106); ácido eláidico ciclopropanado (BR-107); alcohol oleico ciclopropanado (BR-108); éster metílico del ácido vernólico ciclopropanado (BR-109); ácido linolénico ciclopropanado (BR-118); éster de metilo de ácido eláidico ciclopropanado; ácido vernólico ciclopropanado; éster metílico del ácido linolénico ciclopropanado;

Ácido 8-(2-((2-pentilciclopropil)metil)ciclopropil)octanoico (DCP-LA);

3-(2-((2-((2-((2-((2-etilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)propanoato de metilo

3-(2-((2-((2-((2-((2-etilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)propanoato de metilo (éster metílico de DHA-CP6);

4-(2-((2-((2-((2-((2-etilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)-metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)butanoato de metilo

4-(2-((2-((2-((2-((2-etilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)-metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)butanoato de metilo (éster de metilo de EPA-CP5)

4-(2-((2-((2-((2-pentilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil)metil)ciclopropil)butanoato de metilo

4-(2-((2-((2-((2-pentilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil)metil)ciclopropil)butanoato de metilo (éster metílico de AA-CP4)

En los procedimientos de la presente invención, las células son preferentemente fibroblastos de piel, pero cualquier otra célula de tejido periférico (es decir, fuera del sistema nervioso central) se pueden utilizar en las pruebas de la presente invención si dichas células son más convenientes de obtener o procesar. Entre otras células adecuadas se incluyen, sin que constituyan limitación, células de la sangre tales como eritrocitos y linfocitos, células de la mucosa bucal, células nerviosas, tales como neuronas olfativas, fluido cerebroespinal, orina y cualquier otro tipo de célula periférica. Además, las células utilizadas con fines de comparación no necesariamente tienen que ser de donantes sanos.

Las células periféricas pueden ser frescas o se pueden cultivar (véase, patente de Estados Unidos No. 6.107.050). En una realización específica, una biopsia de punción dérmica puede ser utilizada para obtener fibroblastos de piel de un sujeto. Estos fibroblastos se analizan directamente utilizando las técnicas descritas en la presente memoria descriptiva o se introducen en condiciones de cultivo celular. A continuación, los fibroblastos cultivados resultantes se analizan tal como se describe en los ejemplos y en toda la especificación. Pueden ser necesarias otras etapas para preparar otros tipos de células que podrían ser utilizadas para el análisis, tales como células de la mucosa bucal, células nerviosas, tales como células olfativas, células sanguíneas, tales como eritrocitos y linfocitos, etc. Por ejemplo, las células sanguíneas se pueden obtener fácilmente por extracción de sangre de venas periféricas. Las células se pueden separar mediante procedimientos estándar (por ejemplo, utilizando un clasificador celular, centrifugación, etc.) y posteriormente ser analizadas.

De este modo, la presente invención se refiere, en ciertos aspectos, a procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. La presente invención se refiere además, en ciertas realizaciones, a kits que contenían reactivos útiles para la detección o diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. En ciertos aspectos, la presente invención se refiere a procedimientos para el cribado para identificar compuestos cabeza de serie útiles para tratar la enfermedad de Alzheimer, así como a procedimientos de utilización de estos compuestos o derivados químicos de los compuestos cabeza de serie en formulaciones farmacéuticas para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer en sujetos en necesidad de los mismos.

Entre los activadores de la proteína quinasa C que se contemplan específicamente para su utilización en los procedimientos de diagnóstico, kits y procedimientos de cribado para identificar compuestos de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación: bradiquinina; modulador  $\epsilon$ -APP; Briostatina 1; Briostatina 2; DHI; 1,2-dioctanoilo-sn-glicerol; ITF; Gnidimacrina, *Stellera chamaejasme* L.; (-)-Indolactama V; Lipoxina A4; Lyngbyatoxina A, *Micromonospora* sp.; Ácido oleico; 1-Oleoil-2-acetil-sn-glicerol; 4a-Forbol; Forbol-12,13-dibutirato; Forbol-12,13-didecanoato; 4 $\alpha$ -Forbol-12,13-didecanoato; Forbol-12-miristato-13-acetato; dipalmitoil-L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato, sal pentamónica; dipalmitoil-L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, sal pentamónica; dipalmitoil-L- $\alpha$ -fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, sal heptamónica; 1-estearoil-2-araquidonol-sn-glicerol; Thymeleatoxina, *Thymelea hirsuta* L.; insulina, ésteres de forbol, lisofosfatidilcolina, lipopolisacárido, antraciclina dannorubicina y sulfato de vanadilo. También se incluyen los compuestos conocidos como "bryologos". Bryologos se describen, por ejemplo, en Wender y otros *Organic Letters* (Estados Unidos) del 12 de mayo de 2005, 7 (10) págs. 1995-8; Wender y otros *Organic Letters* (Estados Unidos) 17 de marzo de 2005, 7 (6) págs. 1177-80; Wender y otros *Journal of Medicinal Chemistry* (Estados Unidos) 16 de diciembre 2004, 47 (26) págs. 6638-44. Un activador de la proteína quinasa C se puede utilizar solo o en combinación con cualquier otro activador de proteína quinasa C en los procedimientos de diagnóstico, kits y procedimientos de cribado de compuestos descritos en la presente memoria descriptiva.

La bradiquinina es un nonapéptido vasoactivo potente que se genera en el transcurso de varias condiciones inflamatorias. La bradiquinina se une y activa un receptor o receptores de membrana celular específicos de bradiquinina, desencadenando así una cascada de eventos intracelulares que conducen a la fosforilación de proteínas conocidas como "proteína quinasa activadas por mitógeno" (MAPK). La fosforilación de proteínas, la adición de un grupo fosfato a un residuo de Ser, Thr o Tyr, está mediada por un gran número de enzimas conocidas colectivamente como proteína quinasas. La fosforilación normalmente modifica la función de una proteína, y normalmente activa la misma. La homeostasis requiere que la fosforilación sea un proceso transitorio, que se invierte mediante enzimas fosfatasas que desfosforilan el sustrato. Cualquier aberración en la fosforilación o desfosforilación puede interrumpir las vías bioquímicas y funciones celulares.

Los inmunoensayos de la presente invención para la detección de proteínas pueden ser ensayos inmunofluorescentes, radioinmunoensayos, ensayos de transferencia Western, inmunoensayo enzimáticos, inmunoprecipitación, ensayos quimioluminiscentes, ensayos inmunohistoquímicos, ensayo de transferencia puntual o de ranura y similares. (En "Principios y Prácticas de Inmunoensayo" ("Principles and Practice of Immunoassay") (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds), Stockton Press, Nueva York, Nueva York, Ausubel y otros (eds) (1987) en "Protocolos actuales en Biología Molecular" ("Current Protocols in Molecular Biology") John Wiley and Sons, Nueva York, Nueva York). La detección puede ser mediante procedimientos colorimétricos o radioactivos o cualquier otro procedimiento convencional conocidos por los técnicos en la materia. Las técnicas estándar conocidas en la técnica para ELISA se describen en "Métodos de inmunodiagnóstico", segunda edición, Rose y Bigazzi, eds., John Wiley and Sons, Nueva York 1980 y Campbell y otros, Métodos de Inmunología, W. A. Benjamin, Inc., 1964, ambos se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia. Estos ensayos pueden ser

5 inmunoensayos directos, indirectos, competitivos o no competitivos, tal como se describe en la técnica (En "Principios y Prácticas de Inmunoensayo" ("Principles and Practices of Immunoassay") (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds.), Stockton Pres, Nueva York, NY; Oellirich, M. 1984. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 895-904 Ausubely otros (eds) 1987 en "Protocolos actuales en Biología Molecular" ("Current Protocols in Molecular Biology"), John Wiley and Sons, Nueva York, Nueva York.

10 Tal como se ha mencionado anteriormente, las células periféricas tomadas del paciente que se está diagnosticando puede ser cualquier célula periférica. Entre los ejemplos de células periféricas que pueden utilizarse se incluyen, sin que constituyan limitación, células de la piel, fibroblastos de piel, células de la mucosa bucal, células sanguíneas, tales como eritrocitos, linfocitos y células linfoblastoides, y células nerviosas y cualquier otra célula que expresa la proteína PKC épsilon. Se pueden utilizar además muestras de necropsia y muestras de patología. Los tejidos que comprenden estas células también se pueden utilizar, incluyendo el tejido cerebral o las células del cerebro. Las células pueden ser frescas, cultivadas o congeladas. Las muestras de proteínas aisladas de las células o tejidos se pueden utilizar inmediatamente en el ensayo o procedimientos de diagnóstico para cribar compuestos o se pueden congelar para su utilización posterior. En una realización preferente se utilizan células de fibroblasto. Se pueden obtener células de fibroblastos mediante una biopsia de punción dérmica.

20 Las proteínas se pueden aislar de las células mediante procedimientos convencionales conocidos para un técnico en la materia. En un procedimiento preferente, las células aisladas de un paciente se lavan y se sedimentan en tampón fosfato salino (PBS). Los pellets se lavan a continuación con "tampón de homogeneización" que comprende NaF 50 nM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 20 mg/ml de leupeptina, 50 mg/ml de pepstatina, 10 mM de TRIS-HCl, pH=7,4, y se sedimentan por centrifugación. El sobrenadante se descarta, y se añade "tampón de homogeneización" al sedimento seguido por sonicación del pellet. El extracto de proteínas se puede utilizar fresco o almacenado a -80°C para su posterior análisis.

25 En los procedimientos de la presente invención, los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos descritos pueden ser monoclonales o policlonales en origen. La proteína PKC épsilon completa o partes de la misma utilizadas para generar los anticuerpos pueden ser de fuentes naturales o recombinantes o generadas mediante síntesis química. Se pueden aislar proteínas Erkl/2 naturales de muestras biológicas mediante procedimientos convencionales. Entre 30 los ejemplos de muestras biológicas que se pueden utilizar para aislar la proteína PKC épsilon se incluyen, sin que constituyan limitación, células de la piel, tales como, fibroblastos, líneas de células de fibroblastos, tales como líneas celulares de fibroblastos de la enfermedad de Alzheimer y líneas de células de fibroblastos de control que están disponibles comercialmente de Coriell Cell Repositories, (Camden, Nueva Jersey) y que figuran en el Catálogo de Líneas Celulares del Instituto Nacional de Envejecimiento 1991, y el Catálogo de líneas celulares del Instituto 35 Nacional de Ciencias Médicas Generales 1992/1993 [(NIH Publication 92-2011 (1992)].

40 La presente invención también se refiere a procedimientos para detectar e identificar sustancias útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer. De acuerdo con esta forma de realización, las sustancias que revierten o mejoran los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer descritas en la presente memoria descriptiva (es decir, vuelven a los niveles encontrados en las células normales) se identificarían y seleccionarían como sustancias que son potencialmente útiles para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

45 A modo de ejemplo, uno de estos procedimientos de cribado para identificar sustancias terapéuticas implicaría las etapas de poner en contacto células periféricas de la muestra del paciente con la enfermedad de Alzheimer con una sustancia que está siendo cribada en la presencia de cualquiera de los activadores de la proteína quinasa C descritos en la presente memoria descriptiva y posteriormente medir cualquiera de los biomarcadores moleculares específicos de la enfermedad de Alzheimer descritos en la presente memoria descriptiva. Un agente que revierte o mejora un biomarcador molecular específico de la enfermedad de Alzheimer volviendo a los niveles encontrados en 50 las células periféricas normales (es decir, las células tomadas de un sujeto sin la enfermedad de Alzheimer) se identificaría y seleccionaría como una sustancia potencialmente útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

55 Los compuestos identificados utilizando los procedimientos de selección descritos en la presente memoria descriptiva pueden formularse como composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos en necesidad del mismo.

60 Una composición farmacéutica o un compuesto (o un derivado químico de un compuesto líder) identificado utilizando los procedimientos de cribado descritos en la presente memoria descriptiva se puede administrar de forma segura mediante la mezcla con, por ejemplo, un vehículo farmacológicamente aceptable de acuerdo con procedimientos conocidos para dar una composición farmacéutica, tales como comprimidos (incluyendo comprimidos recubiertos con azúcar y comprimidos recubiertos con película), polvos, gránulos, cápsulas, (incluidas las cápsulas blandas), líquidos, inyecciones, supositorios, agentes de liberación sostenida y similares, para administración oral, subcutánea, transdérmica, transcutánea o parenteral (por ejemplo, tópica, rectal o intravenosa).

65

Entre los ejemplos de vehículos farmacológicamente aceptables para su utilización en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, diversos vehículos orgánicos o inorgánicos convencionales, incluyendo excipientes, lubricantes, aglutinantes y desintegrantes para preparaciones sólidas, y disolventes, solubilizantes, agentes de suspensión, agentes isotónicos, tampones, agentes suavizantes, y objetos similares para preparaciones líquidas. En caso necesario, aditivos convencionales tales como antisépticos, antioxidantes, agentes colorantes, edulcorantes, absorbentes, agentes humectantes y similares pueden ser utilizados adecuadamente en cantidades adecuadas.

Un conjunto creciente de evidencias sugiere que un déficit de señalización de PKC es uno de los principales elementos en la causa de la patología de la EA (Alkon y otros, 2007, Liron y otros, 2007, Choi y otros, 2006). Descubrimientos previos han demostrado que la distribución de las isoenzimas PKC cambia en los cerebros de pacientes con EA (Shimohama y otros, 1993, Masliah y otros, 1990). Se ha encontrado que PKC- $\alpha$ , PKC- $\gamma$  y PKC- $\beta$  son menores en los cerebros con EA. Matsushima y otros, 1996 han descrito que en el cerebro de EA se ha encontrado que el nivel de PKC- $\epsilon$  tanto en fracciones citosólicas y membranosas era reducido, aunque no cambiaron los niveles de PKC- $\delta$  y PKC- $\xi$ , lo que sugiere que entre las isoenzimas PKC independientes de  $Ca^{2+}$ , la alteración de la PKC- $\epsilon$  es un evento específico en el cerebro de EA y tiene un papel crucial en la fisiopatología de la EA. Los medios principales de activación de la escisión de APP promediada por secretasa- $\alpha$  se llevan a cabo mediante la isoenzima PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  o indirectamente a través de ERK 1/2 mediada por PKC o ambos (Alkon y otros, 2006; Skovronsky y otros, 2000; Díaz-Rodríguez y otros, 2002; Robinson y Cobb, 1997). El mayor factor de riesgo para EA esporádica es la edad y se asocia con la distribución diferencial de las isoenzimas de PKC en el cerebro, deterioro de la translocación y reducción del nivel de la proteína RACK1 de anclaje de PKC (receptor de la proteína quinasa activada C) (Battani y otros, 1997).

**Déficit de señalización de PKC- $\epsilon$  relacionado con EA:** Según la hipótesis amiloide, la EA está causada por la agregación y acumulación de péptido A $\beta$  que forma placa amiloide generado por la vía de la secretasa  $\beta$  y la secretasa- $\gamma$ . Los estudios con fibroblastos de piel humana han documentado anomalías en la función de isoenzimas PKC entre pacientes con EA y controles de la misma edad (Van Huynh y otros, 1989, Etcheberrugaray y otros, 1993, Govoni y otros, 1993, Favit y otros, 1998). Sin embargo, no ha habido previamente evidencia que mostrara disminución de los niveles de PKC- $\epsilon$  en los tejidos periféricos, tales como células sanguíneas o fibroblastos de la piel de pacientes con EA. Para investigar, si el nivel basal reducido de PKC- $\epsilon$  es específico de la EA, se seleccionaron pacientes con EA tanto de casos de EA esporádica como familiar con la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en el cerebro en la autopsia y se compararon además con dos conjuntos diferentes de controles de demencia no EA tales como: (i) ocho pacientes que heredaron la enfermedad de Huntington (HD) con una fuerte evidencia de características no EA con identificación genética de HD, y (ii) fibroblastos de un paciente con enfermedad de Parkinson y uno con demencia fronto-temporal. Por lo tanto, los déficits-PKC- $\epsilon$  no se asociaron con otra patología de demencias no EA. Los niveles basales de PKC- $\epsilon$  también pueden disminuir con la edad. Sin embargo, este estudio demuestra claramente que los once AC (controles de la misma edad) tenían niveles de PKC- $\epsilon$  significativamente más elevados. Por lo tanto, el nivel basal reducido de PKC- $\epsilon$  en fibroblastos de piel de EA se debe a la patología de Alzheimer y no al propio envejecimiento.

EA es una enfermedad que implica múltiples déficits patológicos y PKC es uno de los principales controladores mecanicistas de la supervivencia, la diferenciación y la regulación celular. Entre los PKC, PKC- $\epsilon$  controla la sinaptogénesis. Se ha informado además que PKC- $\epsilon$  induce la transcripción del receptor de baja densidad durante el agotamiento de colesterol (Mehta y otros, 2002) y los receptores de LDL han sugerido que desempeñan un papel en el transporte y la degradación de A $\beta$ . En otros estudios, se ha demostrado que los activadores de PKC- $\epsilon$ , mejoran el aprendizaje y la memoria, así como los cambios sinápticos estructuralmente específicos en el aprendizaje de laberinto espacial de ratas (Hongpaisan y Alkon, 2007). Por lo tanto, el agotamiento de la cantidad total de la PKC- $\epsilon$  en pacientes podría llevar a la pérdida de memoria en la EA. Además, los niveles de transcripción de ARNm de PKC- $\epsilon$  también fueron más bajos en las muestras de los pacientes con EA.

**Relevancia fisiopatológica de la PKC- $\epsilon$  en EA:** Se ha demostrado previamente que la PKC- $\alpha$  se degrada por el tratamiento A $\beta$  (Favit y otros, 1998), y que A $\beta$  altera la translocación de membrana de la PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  en células B 103 tras el tratamiento con éster de forbol (Lanni y otros, 2004). Se ha demostrado además que la sobreexpresión de PKC- $\epsilon$  redujo los niveles de A $\beta$  en ratones transgénicos (Choi y otros, 2006; Hongpaisan y otros, 2011). Se ha encontrado que oligómeros de A $\beta$  que tenían masa molecular > 100 KDa eran altamente tóxicos en neuronas de rata primarias (Noguchi y otros, 2009; Hoshi y otros, 2003). Los anticuerpos contra estos oligómeros sintéticos reconocen amiloesferoides nativos del cerebro del paciente con EA (Noguchi y otros, 2009) y, por lo tanto, estos oligómeros son patológicamente significativos con la enfermedad. Los presentes inventores han demostrado (figura 4B) que estos oligómeros altamente tóxicos (>100 KDa) afectan a los niveles de PKC- $\epsilon$  en fibroblastos de AC y los convierten a fenotipo EA. El tratamiento de las células de AC con estos oligómeros redujo el nivel de expresión de PKC- $\epsilon$  mientras que no afectó a las células de EA. Se encontró que la proporción normalizada de PKC- $\epsilon$  de AC-EA en las células tratadas fue ~1, mientras que en las células no tratadas fue 1,4 (figura 4C).

En la patología de EA, la sobreproducción de A $\beta$  por una mayor actividad de secretasa  $\beta$ ,  $\gamma$  y una menor actividad de la secretasa  $\alpha$  puede dar como resultado la disminución de cantidad de PKC- $\epsilon$ , mientras que por otra parte, PKC- $\alpha$  y PKC- $\epsilon$  aumentan la actividad de la secretasa  $\alpha$ , así como PKC- $\epsilon$  aumenta la actividad de las enzimas de degradación A $\beta$ . Dado que se encuentran que los niveles de PKC- $\epsilon$  son significativamente más bajos en los fibroblastos de EA en comparación con los AC y los de demencia no EA, por lo tanto, la disfunción relacionada con la EA de la señalización de PKC- $\epsilon$  y la disminución de las cantidades basales de PKC- $\epsilon$  en fibroblastos de piel, soporta la posibilidad de PKC- $\epsilon$  periférica como un biomarcador para EA y activadores de PKC- $\epsilon$  como candidatos terapéuticos. Es posible que las diferentes formas de oligómeros A $\beta$  tóxicos afecten a los niveles de PKC- $\epsilon$  en las células, que son responsables de la regulación de la enzima convertidora de endotelina (ECE), que degrada A $\beta$ . Estas proteínas juegan un papel importante en la degradación de A $\beta$ . De este modo, una hipótesis razonable es que la acumulación anormal de A $\beta$  debido a la mayor actividad de secretasa  $\beta$ ,  $\gamma$  produce una disminución de PKC- $\epsilon$  que, a continuación, participa en un bucle de realimentación (figura 5) para provocar un aumento de más A $\beta$  y pérdida sináptica.

**Deficiencia de PKC- $\epsilon$  en fibroblastos de EA y biomarcador periférico:** Aunque el estándar de oro para el diagnóstico de la EA es el análisis post-mortem de los parámetros neuropatológicos, varios laboratorios están tratando de encontrar un diagnóstico efectivo utilizando el tejido periférico con la ventaja de la no invasividad, fácil disponibilidad, bajo coste y, lo más importante, la detección temprana de la enfermedad. Los resultados descritos en la presente memoria descriptiva muestran que el déficit de señalización de PKC está detrás de la mayoría de los elementos de EA. En animales de edad avanzada, la función de la PKC está comprometida con la distribución específica de edad de isoenzimas PKC en el cerebro, la reducción de la translocación y el nivel reducido de la proteína RACK1 (Battani y otros, 1997) y la edad es el factor de riesgo más importante en el caso de la EA esporádica. Se ha demostrado que la sobreexpresión de PKC- $\epsilon$  reduce el nivel de A $\beta$  en ratones transgénicos con EA (Choi y otros, 2006). Los presentes inventores han demostrado que sorprendentemente la PKC- $\epsilon$  es deficiente en las células periféricas de pacientes con EA.

**Tabla: 1. Población de pacientes: Descripción e identificación de los fibroblastos dérmicos humanos**

ID	Edad	Sexo	Descripción	
1	AG06844	59 años	Hombre	EA familiar tipo 3 confirmada por autopsia, 11 años de enfermedad
2	AG04159	52 años	Mujer	EA familiar tipo 3 confirmada por autopsia, 40 años de enfermedad
3	AG06840	56 años	Hombre	EA familiar tipo 3 confirmada por autopsia, 1 año de duración de enfermedad
4	AG08245	75 años	Hombre	EA confirmada por autopsia sin antecedentes familiares; 7 años de enfermedad
5	AG05770	70 años	Hombre	EA confirmada por autopsia sin antecedentes familiares; 7 y 1/2 años de enfermedad
6	AG08527	61 años	Hombre	EA confirmada por autopsia; 1 años de enfermedad
7	AG06263	67 años	Mujer	EA confirmada por autopsia sin antecedentes familiares; 7 años de enfermedad
8	AG 10788	87 años		EA familiar confirmada por autopsia; 17 años de enfermedad. Homocigótico para Apoe4
9	AG08259	90 años	Hombre	EA confirmada por autopsia sin antecedentes familiares, 3 años de enfermedad.
10	AG05810	79 años	Mujer	El donante está afectado clínicamente con demencia severa de estadio tardío, típica de EA. El genotipo de APOE del individuo donante es E3/E4
11	AG07714	56 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
12	AG11734	50 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
13	AG05840	55 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
14	AG12927	66 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
15	AG06242	71 años	Hombre	Fibroblasto de control de la misma edad
16	AG04461	66 años	Hombre	Fibroblasto de control de la misma edad
17	AG11363	74 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
18	AG09977	63 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
19	AG12998	65 años	Hombre	Fibroblasto de control de la misma edad
20	AG04560	59 años	Hombre	Fibroblasto de control de la misma edad
21	AG13358	72 años	Mujer	Fibroblasto de control de la misma edad
22	ND27760	55 años	Mujer	Enfermedad de parkinson de tipo 1 familiar. Park1
23	GM20926	35 años	Mujer	Miopatía por cuerpos de inclusión asociada con enfermedad de Paget y demencia frontotemporal

24	GM06274	56 años	Mujer	Enfermedad de Huntington
25	GMO2173	52 años	Mujer	Enfermedad de Huntington
26	GM00305	56 años	Mujer	Enfermedad de Huntington; 10 años de duración de enfermedad
27	GM04198	63 años	Mujer	Enfermedad de Huntington heredada
28	GM05031	60 años	Hombre	Enfermedad de Huntington heredada
29	GMO2165	57 años	Hombre	Enfermedad de Huntington heredada. 11 años de enfermedad
30	GM04226	74 años	Hombre	Enfermedad de Huntington heredada.
31	GM05030	56 años	Hombre	Enfermedad de Huntington heredada

### Activadores de PKC Épsilon

5 PKC- $\epsilon$  es la isoenzima que suprime más eficazmente la producción de A $\beta$ . Racci y otros, *Mol.Psychiatry*. 2003; 8: 209-216; y Zhu y otros, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*2001; 285: 997-1006. De este modo, activadores específicos de isoformas de PKC son muy deseables como potenciales fármacos anti-Alzheimer. Activadores específicos son preferentes a los compuestos tales como briostatina, que muestran menos especificidad, dado que la activación no específica de PKC $\delta$  o  $\beta$  podría producir efectos secundarios indeseables.

10 Por otra parte, PKC $\epsilon$  se expresa además a niveles muy bajos en todos los tejidos normales, excepto para el cerebro. Mischak y otros, *J. Biol.Chem.* 1993; 268: 6090-6096; Van Kolen y otros, *J. Neurochem.* 2008; 104: 1-13. La gran abundancia de PKC- $\epsilon$  en las fibras nerviosas presinápticas sugiere un papel en el crecimiento de neuritas o la liberación de neurotransmisores. Shirai y otros, *FEBS J.* 2008; 275: 3988-3994). Por lo tanto, los efectos de activadores de PKC- $\epsilon$  específicos estarían restringidos en gran medida al cerebro, y es poco probable que produzcan efectos secundarios periféricos no deseados.

### AGPI como activadores de PKC

20 Se conoce desde hace muchos años que algunos AGPI, tales como ácido araquidónico (véase la figura 6), son activadores naturales de PKC. El ácido docosahexaenoico (DHA) es también un conocido activador de la PKC y se ha demostrado recientemente que disminuye la acumulación de A $\beta$  y proteínas tau asociadas con las placas y ovillos que obstruyen el cerebro implicados en EA. Sahlin y otros, *Eur J Neurosci.*2007; 26 (4): 882-9.

25 Kanno y otros describen el efecto del ácido 8-[2-(ciclopropilmetil-2-pentil)ciclopropil]octanoico (DCP-LA), un derivado de ácido linoleico recién sintetizado con anillos de ciclopropano en lugar de los enlaces dobles cis, sobre la actividad de la proteína quinasa C (PKC). *Journal of Lipid Research* 2007; 47: 1146-1156. DCP-LA activó PKC- $\epsilon$ , con una potencia 7 veces superior sobre otras isozimas de PKC. Esto indica que DCP-LA es altamente específico para PKC- $\epsilon$ . Este compuesto también facilitó la transmisión sináptica del hipocampo mediante la mejora de la actividad de los receptores presinápticos de acetilcolina en los terminales glutamatérgicos o neuronas. Sin embargo, DCP-LA requiere concentraciones relativamente elevadas para producir su efecto máximo.

35 El documento WO 2002/50113 de Nishizaki y otros, da a conocer compuestos de ácidos carboxílicos y sus sales correspondientes que tienen anillos de ciclopropano para la potenciación de tipo LTP de la transmisión sináptica o para su utilización como un medicamento para mejorar la cognición o un medicamento para tratar la demencia. Sus ejemplos sintéticos dan a conocer la preparación de ésteres pero sus resultados experimentales enseñan la utilización de ácidos libres. La razón es que el grupo de ácido carboxílico del material de partida de ácido graso reaccionaría con el dietil cinc utilizado en la reacción de Simmons-Smith. El éster de metilo actúa como un grupo protector y se puede escindir por hidrólisis o puede permanecer si es necesario.

40 Las precauciones con los descubrimientos de la técnica anterior incluyen la necesidad de administrar altas concentraciones para lograr los efectos anteriores, la activación no específica de isoformas de PKC, o el metabolismo rápido y secuestro de AGPI no modificados en los tejidos grasos y otros órganos en los que se incorporan en triglicéridos y quilomicrones. *J Pharmacobiodyn.*1988; 11 (4): 251-61. Además, la utilización de AGPI no modificados tendría una gran cantidad de efectos secundarios adversos. Por ejemplo, el ácido araquidónico es un precursor bioquímico en prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, que tienen efectos proinflamatorios potentes. Esto sería no deseable para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en la que la patología implica probablemente la inflamación. Otros ácidos grasos esenciales también pueden poseer una multitud de otros efectos biológicos, entre los que se incluyen la mejora de la señalización de óxido nítrico, efectos antiinflamatorios, y la inhibición de la reductasa HMG-CoA, que puede interferir con la biosíntesis de colesterol.

Debido a las limitadas opciones existentes para el tratamiento tanto de la EA y como el accidente cerebrovascular, son necesarias nuevas terapias que pueden activar selectivamente sólo las isoformas de PKC que provocan la neuroprotección.

5 **AGPI y AGMIs y Enfermedad**

Un creciente número de estudios han sugerido que los AGPI omega-3 pueden ser beneficiosos para otros trastornos de perturbación de ánimo tales como la depresión clínica, trastorno bipolar, trastornos de la personalidad, esquizofrenia y trastornos de déficit de atención. Ross y otros, *Lipid Health Dis.*2007; 18; 6: 21. Hay una gran cantidad de pruebas que vinculan los ácidos grasos omega-3, particularmente ácidos docosahexaenoico y eicosapentaenoico, y un equilibrio saludable de ácidos grasos omega-3 y ácidos grasos omega-6, para reducir el riesgo de depresión. Logan y otros, *Lipids Health Dis.*2004; 3: 25. Se descubrió que los niveles de ácidos grasos omega-3 fueron mediblemente bajos y la proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 fue particularmente elevada en un estudio clínico de pacientes hospitalizados por depresión. Un estudio reciente demostró que había un déficit selectivo en docosahexaenoico en la corteza orbitofrontal de los pacientes con trastorno depresivo mayor. McNamara y otros *Biol Psychiatry.* 2007; 62 (1): 17-24. Varios estudios han demostrado además que los sujetos con trastorno bipolar tienen niveles más bajos de ácidos grasos omega-3. En varios estudios recientes, se ha demostrado que los ácidos grasos omega-3, son más eficaces que el placebo para la depresión en niños y adultos con depresión bipolar. Osher y Belmaker, *CNS Neurosci Ther.*2009; 15 (2): 128-33; Turnbull y otros, *Arch Psychiatr Nurs.*2008; 22 (5): 305-11.

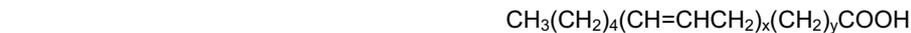
Una amplia investigación también indica que los ácidos grasos omega-3 reducen la inflamación y ayudan a prevenir los factores de riesgo asociados a las enfermedades crónicas, tales como enfermedades del corazón, cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide. Calder y otros, *Biofactors.* 2009; 35 (3): 266-72; Psota y otros, *Am J Cardiol.*2006; 98 (4A): 3i-18i; Wendel y otros, *Anticancer Agents Med Chem.*2009; 9 (4): 457-70.

Se ha demostrado además que los ácidos grasos monoinsaturados son beneficiosos en los trastornos. Hay buena evidencia científica que las dietas AGMI son una alternativa a las dietas bajas en grasa para la terapia de nutrición médica en la diabetes de tipo 2. Ros, *American Journal of Clinical Nutrition.* 2003; 78 (3): 617S-625S. Las dietas altas en ácidos grasos monoinsaturados reducen tanto el colesterol en plasma como las concentraciones de triglicéridos. Kris-Etherton y otros, *Am J Clin Nutr.*1999 Dec; 70 (6): 1009-1015.

Se pueden utilizar derivados ciclopropanados y epoxidados de AGPI o AGMI en los que uno, algunos o todos los enlaces dobles se sustituyen por un grupo ciclopropano o un grupo epóxido. La función terminal puede ser un ácido carboxílico libre, o un éster metílico, éster etílico, o algún otro éster de alquilo con un alcohol alifático o aromático. Este alcohol específicamente también puede incluir glicerol y derivados de los mismos. Derivados de glicerol son biológicamente importantes porque los ácidos grasos con más frecuencia se encuentran conjugados con glicerol en forma de ácidos de fosfatidilcolina, fosfatidilserina, o de fosfátidos. Por ejemplo, los triacilgliceroles son compuestos en los que los grupos carboxilo de los ácidos grasos están esterificados a los hidroxilos de los tres carbonos que se encuentran en el glicerol y se les hace referencia como triacilgliceroles o triglicéridos.

El propósito de esterificación del ácido carboxílico es facilitar el transporte a través de la barrera hematoencefálica mediante la eliminación de la carga negativa. El propósito de un grupo alcohol es también para facilitar el transporte a través de la barrera hematoencefálica.

El ácido graso que constituye la base para los compuestos utilizados en la presente invención es un ácido graso poliinsaturado que tiene la siguiente estructura:



en la que X es entre 2 y 6, e Y es entre 2 y 6, e incluyen polienos interrumpidos por metileno o polimetileno. Entre los ácidos grasos poliinsaturados de ejemplo se incluyen ácido linoleico,  $\gamma$ -linoleico, ácido araquidónico, y ácido adrenico que tienen las siguientes estructuras:

55	Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
	$\gamma$ -Linoléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
	Araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
	Adrenico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$

60 Estos son AGPI omega-6

Además, el ácido graso que constituye la base para los compuestos es un ácido graso poliinsaturado que tiene la siguiente estructura:



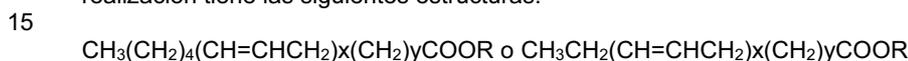
65

en la que X está entre 2 y 6, e Y está entre 2 y 6 e incluyen polienos interrumpidos por metilenos o polimetilenos. Entre los ácidos grasos poliinsaturados de ejemplo se incluyen ácido  $\alpha$ -linoleico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido eicosatetraenoico que tienen las siguientes estructuras:

5	Alfa-linolénico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
	Eicosatetraenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
	Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
	Docosahexaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

10 Estos son conocidos como AGPI omega-3.

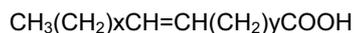
En particular, el compuesto es un éster de un AGPI *cis*, en el que el grupo hidroxilo se sustituye por un grupo alcoxi, y en el que como mínimo uno de los dobles enlaces ha sido ciclopropanado. El material de partida para esta realización tiene las siguientes estructuras:



20 en la que R es el grupo alquilo de un alcohol entre los que se incluyen alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos que incluyen, sin que constituyan limitación, etanol, propanol, butanol, pentanol, glicerol, manitol y sorbitol.

En una realización adicional, el compuesto contenía como mínimo tres dobles enlaces ciclopropanados.

25 En otra realización, el ácido graso que constituye la base para los compuestos es un ácido graso monoinsaturado que tiene la siguiente estructura:



30 en la que X e Y son números impares entre 3 y 11.

Entre los ejemplos de ácidos grasos monoinsaturados que pueden ser la base para los compuestos se incluyen ácidos grasos monoinsaturados *cis* y *trans*tales como ácido oleico, ácido elaidico, ácido obtusilico, ácido caproleico, ácido lauroleico, ácido lindérico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido vaccénico, ácido gadoleico, ácido erúcico, y ácido petroselinico.

35 Un éster significa un monoéster o un poliéster. Ésteres de ácidos grasos incluyen ésteres de metilo, propilo y butilo, y además ésteres resultantes de alcoholes más complejos tales como propilenglicol. En realizaciones no limitantes, R' es lineal o ramificado e incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, y tetradecilo. Un éster también puede formarse a partir de un ácido graso ligado a un alcohol graso en un enlace éster.

40 El éster puede ser un éster de alcohol, incluyendo sin que constituya limitación, un éster de alcohol alifático. En una realización, el éster de alcohol es un éster de glicerol. Ésteres de glicerol de ácidos grasos incluyen éster de glicerol de ácido graso, éster de ácido graso y ácido acético de glicerol, éster de ácido graso y ácido láctico de glicerol, éster de ácido graso y ácido cítrico de glicerol, éster de ácido graso y ácido succínico de glicerol, éster de ácido graso y ácido diacetil tartárico de glicerol, éster de ácido acético y glicerol, éster de ácido graso de poliglicerol, y éster de ácido ricinoleico de condensado de poliglicerol.

50 En otra realización específica, el compuesto es un alcohol de un AGPI *cis* en el que como mínimo uno de los dobles enlaces ha sido ciclopropanado. En una realización adicional, el compuesto es un alcohol de AGPI *cis* que contenía, como mínimo, tres dobles enlaces ciclopropanados. Estos compuestos incluyen, sin que constituyan limitación, alcohol linoleico diciticlopropano (BR-105), o alcohol linolénico triciclopropano (BR-104). En esta realización, R' puede ser un alcohol de cadena normal o ramificada o un alcohol fenólico.

55 En otra realización, el compuesto de la presente invención, el compuesto es un ácido graso poliinsaturado *cis*, o derivado del mismo, en el que como mínimo uno de los dobles enlaces se sustituye con un grupo epoxi. En una realización adicional, el compuesto contenía como mínimo tres dobles enlaces epoxidados.

60 En una realización específica, el compuesto es un éster de AGPI *cis* epoxidado, incluyendo, sin que constituya limitación, un éster de alcohol graso. Los ésteres pueden ser los mismos ésteres tal como se han descrito anteriormente para los AGPI ciclopropanados. En una realización adicional, el alcohol puede ser un éster de alcohol alifático, tal como glicerol.

65 En otra realización específica, el compuesto es un alcohol graso poliinsaturado *cis* epoxidado, tal como alcohol linoleico diciticlopropano o alcohol linolénico triciclopropano. Los alcoholes pueden ser los mismos tal como se han descrito anteriormente para los AGPI ciclopropanados.

En otra realización, el compuesto incluye lípidos ciclopropanados o epoxidados derivados de ácidos grasos monoinsaturados *cis* (ácidos monoenoicos *cis*), tales como ácido oleico, ácido eláidico, alcohol eláidico, alcohol oleílico, y 1-monolinoleilrac-glicerol. Entre los compuestos de ejemplo se incluyen alcohol eliadico-ciclopropano (BR-106), ácido eliadico ciclopropano (BR-107), y alcohol oleico ciclopropano (BR-108).

Una realización adicional incluye lípidos ciclopropanados derivados de ácidos grasos monoinsaturados *cis* o ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos, o alcoholes de ácidos grasos, que contenían uno o más residuos de epoxi, tales como éster metílico del ácido vernólico ciclopropano (por ejemplo, BR-109).

En realizaciones específicas, entre los AGPI que constituyen la base de los compuestos ciclopropanados utilizados en la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, ácido araquidónico (AA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA). Entre los compuestos de ejemplo para su utilización en el procedimiento de la presente invención se incluyen éster metílico del ácido docosahexaenoico hexaciclopropano (BR-111); éster metílico del ácido eicosapentaenoico pentaciclopropano (BR-114); y éster metílico del ácido araquidónico tetraciclopropano (BR-115).

En una realización específica adicional, el compuesto es un derivado de AGPI ciclopropanado de ácido docosahexaenoico que tiene la siguiente estructura:



en el que R es H o un grupo alquilo. En una realización específica, R es CH<sub>3</sub> (BR-111 o éster metílico de DHA-CB6 o metil-3-(2-((2-((2-((2-((2-etilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)propanoato de metilo.

En otra realización específica, el derivado de AGPI tiene la siguiente estructura:



Este compuesto es BR-114 (EPA-CP5 o 4-((2-((2-((2-((2-((2-etilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil) butanoato de metilo).

En aún otra realización específica, el derivado de AGPI tiene la siguiente estructura:



Este compuesto es BR-115 (éster metílico de AA-CP4 o 4-((2-((2-((2-((2-((2-pentilciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)ciclopropil)metil)-ciclopropil)butanoato de metilo).

En otra realización específica, el derivado de AGPI tiene la siguiente estructura: en la que R es H o un éster de alquilo. En una realización específica, R es CH<sub>3</sub>.

AGMI o derivados éster o alcohol de los mismos ciclopropanados o epoxidados naturalmente contemplados para su utilización en la presente invención incluyen ácido malvénico, ácido vernólico, y ácido estercúlico. Un compuesto ejemplar es el éster metílico del ácido vernólico (BR-117).

#### Procedimientos de síntesis

Los ácidos grasos y ésteres y alcoholes de los mismos, se pueden obtener o preparar a partir de la purificación de fuentes naturales, por ejemplo, aceite de pescado, aceite de linaza, soja, aceite de colza, o algas, o sintetizados utilizando una combinación de síntesis enzimática microbiana y síntesis química. Como un ejemplo, ésteres metílicos de ácidos grasos se pueden producir mediante la transesterificación de triglicéridos de aceites de tipo refinado/comestible utilizando metanol y un catalizador alcalino homogéneo.

Los procedimientos de ciclopropanación de dobles enlaces en hidrocarburos son bien conocidos. Como un ejemplo, la reacción de Simmons-Smith modificada es un procedimiento estándar para la conversión de dobles enlaces a ciclopropanos. Tanaka y Nishizaki, *Bioorg.Med.Chem.Let.* 2003; 13: 1037-1040; Kawabata y Nishimura, *J. Tetraedron.* 1967; 24: 53-58; y Denmark y Edwards, *J. Org.Chem* 1991; 56: 6974. En esta reacción, el tratamiento de

alquenos con carbenoides de metal, por ejemplo, yoduro de metileno y dietil cinc, da como resultado la ciclopropanación del alqueno. Véase también, Ito y otros, *Organic Synthesis*.1988; 6: 327. La ciclopropanación de ésteres metílicos de también se llevó a cabo utilizando diazometano en presencia de acetato de paladio (II) como catalizador. Gangadhar y otros, *Journal of the American Oil Chemists' Society*.1988; 65 (4): 601-606.

Los procedimientos de epoxidación son bien conocidos y típicamente implican la reacción de dioxiranos de ácidos grasos en disolventes orgánicos. Sonnet y otros, *Journal of the American Oil Chemists' Society*.1995; 72 (2): 199-204. Como un ejemplo, la epoxidación de los dobles enlaces de AGPI se puede conseguir utilizando dimetildioxirano (DMD) como el agente de epoxidación. Grabovskiy y otros, *Helvetica Chimica Acta*.2006; 89(10): 2243-53.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Población de pacientes y cultivo de células

Se obtuvieron fibroblastos dérmicos humanos de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), pacientes con demencia no EA (enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y la demencia frontotemporal), y casos de control de la misma edad (AC) del Instituto Coriell de Investigación Médica (Camden, Nueva Jersey). Las células de fibroblastos se mantuvieron en DMEM con bajo nivel de glucosa (Invitrogen, EE.UU.) suplementado con 10% FBS, y se hicieron crecer hasta 100% de confluencia antes de los experimentos. Se consideraron para el estudio diez ejemplos diferentes de pacientes con EA (cuatro de tipo familiar y seis esporádica; de ellos nueve de diez fueron confirmados por autopsia), once de AC y ocho con enfermedad de Huntington, uno con enfermedad de Parkinson y uno con demencia frontotemporal (tabla 1). La edad promedio de los casos de EA fue  $69,6 \pm 13,01$  (SD) años, los casos de AC fue  $63,364 \pm 7,65$  (SD) años y los casos de demencia no EA fueron  $56,44 \pm 9,7$  (SD) años.

**Aislamiento de proteínas:** Se lavaron matraces que contenían las células 3x con 1x PBS (pH 7,4) y las células se recogieron utilizando un raspador de células. Las células recogidas se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular obtenido se suspendió en tampón de homogeneización (Tris 10mM pH 7,4, PMSF 1 mM, EGTA 10 mM, EDTA 10 mM y NaF 50 mM) y se sonicó durante 30 s. El homogeneizado se centrifugó de nuevo a 4°C durante 10 min a 10.000 rpm y el sobrenadante se recogió y se transfirió a un nuevo tubo para la estimación de proteínas. La concentración total de proteínas se midió utilizando un kit de ensayo de proteínas de Bradford (Thermo Scientific, EE.UU.).

**Análisis por inmunotransferencia:** Lisados de proteína (20 µg de proteína cada uno) se hirieron en tampón de Laemmli 2X durante 10 min y se separaron utilizando geles de gradiente de Tris-glicina de 4-20%. Las proteínas separadas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa y la membrana se bloqueó en BSA a temperatura ambiente (TA) durante 15 min y se incubaron con una dilución 1: 2000 de anticuerpo policlonal anti-PKC-ε de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.; Cat No: sc-214), y dilución 1: 5000 de anticuerpo monoclonal anti-p-tubulina, clase III de conejo (Millipore Corporation, Billerica MA, Cat No: 04-1049) durante 1 hora a t.a. Después de la incubación, las fracciones de membrana se lavaron 3X con tampón de lavado de transferencia Western estándar y se incubaron adicionalmente con fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EE.UU.) a una dilución 1:10.000 durante 45 min. Las fracciones de membrana se lavaron finalmente 3X con tampón de lavado de transferencia Western estándar y se desarrollaron utilizando el sustrato NBT-BCIP de 1 etapa (Thermo Scientific, Rockford, IL). Las intensidades de señal de las imágenes se grabaron en el ImageQuant RT-ECL (de GE Life Sciences, Piscataway, NJ) y se realizó la cuantificación densitométrica utilizando el software IMAL (Instituto de Neurociencias Blanchette Rockefeller, Morgantown, WV). Las intensidades cuantificadas de esta manera para PKC-ε se normalizaron en frente a β-tubulina para cada carril.

**Inmunofluorescencia:** Se cultivaron células de fibroblastos en portaobjetos con cámaras (Nunc, Rochester, NY) a baja densidad. Para la tinción de inmunofluorescencia, se lavaron las células 3x con 1x PBS (pH 7,4) y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 4 min. Después de la fijación, las células se bloquearon y se permeabilizaron con el 5% de suero y 0,3% de Triton X 100 en 1 x PBS durante 30 min. Las células se lavaron 3x con 1x PBS y se incubaron con anticuerpo policlonal PKC-ε de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 1 hora a una dilución 1:100. Después de incubación los portaobjetos se lavaron 3x en 1x PBS y se incubaron con la anti-IgG FITC de conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EE.UU.) durante 1 hora a una dilución 1:400. Las células se lavaron y se tiñeron además con DAPI (diclorhidrato de 4', 6-diamidino-2'-fenilindol) (Thermo Scientific, EE.UU.). Por último, los portaobjetos se lavaron y se montaron en solución de montaje de glicerol PBS y se observaron bajo el microscopio confocal Meta LSM 710 (Zeiss, Alemania) a 350 nm y 490 nm de excitación y 470 nm y 525 nm de emisión para DAPI y FITC, respectivamente. Cinco campos individuales fueron capturados mediante ampliaciones de objetivos de aceite de 63x y se analizó la intensidad de fluorescencia promedio (IMF) en cada canal.

**RT-PCR:** Se aisló ARN de  $\sim 1 \times 10^6$  células utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, 2 µg de ARN se transcribieron inversamente utilizando oligodT y Superscript III (Invitrogen, EE.UU.) a 50°C durante 1 h. Se amplificaron dos µl del producto ADNc utilizando cebadores para PKC-ε (cebador directo-AGCCTCGTTCACGGTCTATGC, cebador inverso GCAGTGACCTTCTGCATCCAGA) y β-tubulina (cebador directo-TTGGGAGGTGATCAGCGATGAG, cebador inverso CTCCAGATCCACGAGCACGGC) (Origene,

Rockville, MD). Los amplicones fueron analizados en un E-Gel (Invitrogen, EE.UU.) después de la amplificación de 25 ciclos a 55°C de temperatura de recocido. La imagen de gel se documentó mediante un escáner de gel Fuji Image (FLA-9000, Fuji Film) y se realizó la cuantificación densitométrica utilizando el software IMAL (Instituto de Neurociencias Blanchette Rockefeller, Morgantown, WV). Los datos se representan como proporción normalizada de DO (densidad óptica) de PKC-ε frente a DO de β-tubulina de tres experimentos independientes.

**Preparación de Aβ oligomérica soluble:** Se preparó Aβ oligomérica siguiendo el procedimiento descrito por Noguchi y otros, (2009). Se describió que la Aβ generada mediante este procedimiento es altamente neurotóxica, con agrupaciones Aβ esféricas de 10-15nm denominadas amiloesferoides (ASPDs). Para la síntesis de ASPDs, Aβ<sub>1-42</sub> (Anaspec, EE.UU.) se disolvió en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol a una concentración de 100 μM durante la noche a 4°C y posteriormente a 37°C durante 3 horas. Por último, la Aβ disueltas se liofilizó en alícuotas (40nmol/tubo). La Aβ liofilizada se disolvió en 50% de PBS a la concentración de 1 μM y se hizo girar lentamente a 4°C durante 14 h. Después de la incubación los ASPDs tóxicos se purificaron utilizando filtros de masa molecular de corte 100 KDa (Ultrafree-MC, Millipore, EE.UU.). Los materiales retenidos con peso molecular mayor de 100 KDa se utilizaron para el tratamiento de fibroblastos.

**Tratamiento de fibroblastos de la piel con Aβ<sub>1-42</sub> oligomérica:** Se cultivaron fibroblastos de la piel tanto de casos de EA como AC durante 7 días a 100% de confluencia. Las células confluentes se trataron con 500 nM (concentración final) de ASPDs durante 24 horas a 37°C después de que fueran 100% confluentes. Después de la incubación, las células se lavaron 3x con 1x PBS (pH 7,4) y se procesaron para transferencia de Western tal como se ha descrito anteriormente. Las intensidades de las bandas resultantes para PKC-ε se cuantificaron utilizando ImageQuant RT-ECL (GE Life Sciences, EE.UU.) y se realizó el análisis densitométrico utilizando el software IMAL (Instituto de Neurociencias Blanchette Rockefeller, Morgantown, WV).

## **Ejemplo 2: Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos y ésteres metílicos de ácidos grasos ciclopropanados.**

Síntesis de ácidos grasos ciclopropanados. Los ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados se ciclopropanaron utilizando la reacción de Simmons-Smith modificada utilizando cloroyodometano y dietil cinc (Tanaka y otros, Bioorg. Med. Chem. Vamos. 2003; 13: 1037-1040; Furukawa y otros, Tetrahedron. 1967; 53-58; Denmark y otros, J. Org. Chem. 1991; 56: 6974-81). Todos los aparatos se cocieron a 60°C durante 1 h y se secaron utilizando una llama con nitrógeno seco. Un matraz de tres bocas de 100 ml de fondo redondo con una barra de agitación y una sonda de temperatura se rodeó con una mezcla de hielo/hielo seco y se llenó con 1,25 g (4,24 mmol) de éster metílico del ácido linoleico o el éster metílico del ácido docosahexaenoico en 25 ml de diclorometano y se burbujeó N<sub>2</sub>. Se añadió anaeróticamente una solución de dietil cinc 1 M (51 ml, 54,94 mmol) en hexano utilizando una aguja de calibre 20 de 24 pulgadas de largo y la solución se enfrió a -5°C. Se añadió gota a gota diyodometano (8,2 ml, 101,88 mmol) o cloroyodometano (ClCH<sub>2</sub>I), una gota por segundo, con agitación constante. La velocidad de adición se redujo si era necesario para mantener la mezcla de reacción por debajo de 2°C. La mezcla de reacción se volvió turbia durante la reacción y se liberó un producto blanco de zinc insoluble. El matraz se selló y la mezcla se dejó reaccionar durante 1 hora y después se dejó llegar hasta temperatura ambiente gradualmente durante 2 h.

Para evitar la formación de un residuo de explosivo en la campana, no se evaporó el dietil cinc. La mezcla se vertió lentamente en 100 ml de agua con agitación para descomponer cualquier exceso de dietil cinc. Se desprendió etano. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm en tubos de centrifuga de vidrio y la capa acuosa superior se desechó. El precipitado blanco se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se combinó con la fase orgánica. La fase orgánica se lavó con agua y se centrifugó. El producto se analizó por TLC de gel de sílice G utilizando hexano más 1% de acetato de etilo y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice utilizando concentraciones crecientes del 1-10% acetato de etilo en n-hexano y se evaporó bajo nitrógeno, dejando el éster de metilo como un aceite incoloro.

La reacción de Simmons-Smith conserva la estereoquímica de los materiales de partida. Furukawa y otros, Tetrahedron. 1967; 53-58. El éster metílico del ácido docosahexaenoico se convirtió en DHA-CP6 con un rendimiento del 90-95%. El producto era un aceite incoloro con un único máximo de absorbancia a 202 nm en etanol y sin reacción con I<sub>2</sub>. El espectro de IR mostró la absorción del anillo de ciclopropano a 3070 y 1450 cm<sup>-1</sup>. En las mismas condiciones, el éster metílico del ácido eicosapentaenoico se convirtió en EPA-CP5, y el éster metílico del ácido araquidónico se convirtió en AA-CP4. El éster metílico del ácido linoleico se convirtió en el éster metílico DCP-LA que era idéntico a una muestra conocida.

Hidrólisis del éster metílico. El éster de metilo (0,15 g) se disolvió en 1 ml en LiOH y 1 ml de dioxano. Se añadieron dioxano y metanol hasta que se volvió homogéneo y la solución se agitó a 60° durante toda la noche. El producto se extrajo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se centrifugó. La fase acuosa y la interfase blanca se reextrajeron con agua y se lavaron hasta que ya no se formó la capa blanca. El producto se evaporó bajo N<sub>2</sub> y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. El producto, un aceite incoloro, eluyó en 20% de EtOAc en n-hexano. Su pureza se verificó por TLC en 10% EtOAc/hexano y por C18 RP-HPLC utilizando detección UV a 205 nm.

Los grupos epoxi se pueden introducir por medios convencionales, por ejemplo, mediante oxidación del alqueno apropiado con ácido m-cloroperbenzoico o t-butilhidroperóxido.

Otros compuestos sintetizados incluyen los representados en la figura 1 (BR-101 a BR-118).

### Ejemplo 2: La activación de la PKC épsilon purificada utilizando ácido docosahaexanoico

Ensayo de proteína quinasa C. PKC recombinante (1 ng de isoforma alfa o épsilon) se mezcló con BR-101 (DCP-LA) en presencia de histonas 10 micromolar,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, fosfatidil-L-serina 1,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 2-dioctanoilo-sn-glicerol (DAG) 0,18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, HEPES 20 mM (pH 7,4), EDTA 0,8 mM, EGTA 4 mM, 4% de glicerol, 8 mg/ml de aprotinina, 8 mg/ml de leupeptina, y benzamidina 2 mM. Se añadieron 0,5 micro Ci de [ $^{32}\text{P}$ ]ATP. La mezcla de incubación se incubó durante 15 min a 37 grados en un volumen total de 10 microlitros. La reacción se detuvo mediante la extensión de las mezclas de reacción en tiras de 1x2 cm de papel de fosfato de celulosa (Whatman P81) e inmediatamente se lavaron dos veces durante 1 h en 0,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Las tiras de fosfato de celulosa se contaron en un contador de centelleo. En algunos experimentos, se eliminaron la fosfatidilserina, el diacilglicerol y/o el calcio.

El éster metílico DHA fue adquirido de Cayman Chemical (Ann Arbor, ME). Isoenzimas PKC eran de Calbiochem (San Diego, CA). PKC- $\epsilon$  purificada se adquirió de Calbiochem.

### Resultados

Las mediciones de PKC utilizando PKC purificadas mostraron que, a la concentración ensayada más baja (10 nM), el compuesto BR-101 produce una activación de 2,75 veces de PKC. PKC- $\alpha$  no se vio afectada (datos no mostrados). El compuesto BR-102 también provocó selectivamente la activación de PKC- $\epsilon$  a aproximadamente 1,75 veces sobre PKC- $\epsilon$  no activada. La eficacia de estos compuestos en la activación de PKC- $\epsilon$  a concentraciones bajas sugiere que van a ser buenos candidatos terapéuticos.

### Ejemplo 3: La activación de PKC épsilon purificada o celular utilizando otros activadores de PKC.

Materiales. Se obtuvieron medios de cultivo a partir de K-D Medical (Columbia, MD) o Invitrogen (Carlsbad, CA). Se adquirió A $\beta$ 1-42 de Anaspec (San Jose, CA). Ésteres metílicos de ácidos grasos poliinsaturados se obtuvieron de Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI. Otros productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Isoenzimas PKC fueron de Calbiochem (San Diego, CA). PKC $\epsilon$  purificada se adquirió de Calbiochem.

Cultivo celular. Células H19-7/ IGF-IR de hipocampo de rata (ATCC, Manassas, VA) se sembraron en placas recubiertas con poli-L-lisina y se hicieron crecer a 35°C en DMEM/10% FCS durante varios días hasta que se obtuvo la cobertura de, aproximadamente, el 50%. A continuación, las células fueron inducidas a diferenciarse en un fenotipo neuronal mediante la sustitución del medio con 5 ml de medio  $\text{N}_2$  que contenía factor de crecimiento fibroblástico 10 ng/ml y se hicieron crecer a 39°C en matraces T-75 a 37°C. Células SH-SY5Y de neuroblastoma humano (ATCC) se cultivaron en 45% F12K/45% MEM/10% FCS. Células de neuroblastoma de ratón N2A se cultivaron en DMEM/FCS al 10% sin glutamina. Neuronas de hipocampo de rata embrionaria de 18 días de edad.

Cerebros de ratas Sprague Dawley se colocaron en placas de 12 o de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en medio B-27 neurobasal que contenía glutamina 0,5 mM y glutamato 25  $\mu\text{M}$  (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se cultivaron durante tres días en el medio sin glutamato. Las células neuronales se cultivaron a 5%  $\text{CO}_2$  en una incubadora mantenida a 37°C durante 14 días.

Todos los experimentos en células cultivadas se llevaron a cabo por triplicado a menos que se indique lo contrario. Todos los puntos de datos se muestran como promedio  $\pm$  SE. BR-101 (DCP-LA) se utilizó como ácido libre en todos los experimentos, mientras que los BR-111 (DHA-CP6), BR-114 (EPA CP5) y BR-116 (AA-CP4) se utilizaron como sus ésteres metílicos.

Ensayo de la proteína quinasa C. Células del hipocampo de rata se cultivaron y se rasparon en 0,2 ml de tampón de homogeneización (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaF 50 mM, 1 mg/ml de leupeptina, y PMSF 0,1 mM) y se homogeneizaron por sonicación en un sonicador de microondas Marsonix (5 seg, 10W). Para medir la PKC, 10  $\mu\text{l}$  de homogeneizado celular o de isoenzima PKC purificada (adquirida de Calbiochem) se incubaron durante 15 min a 37°C en presencia de histonas 10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CaCl}_2$  89 mM, fosfatidil-L-serina 1,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1,2-dioctanoilo-sn-glicerol 0,18  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, HEPES 20 mM (pH 7,4), EDTA 0,8 mM, EGTA 4 mM, 4% de glicerol, aprotinina 8 mg/ml, leupeptina 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y benzamidina 2 mM. Se añadieron 0,5  $\mu\text{Ci}$  de [ $^{32}\text{P}$ ]ATP y se midió la formación de  $^{32}\text{P}$ -fosfoproteína por adsorción sobre fosfocelulosa tal como se ha descrito anteriormente. Nelson y Alkon, J. Neurochemistry.1995; 65: 2350-57. Para las mediciones de la activación por BR-101 (DCP-LA) y compuestos similares, la actividad PKC se midió en ausencia de diacilglicerol y fosfatidilserina, tal como se describe por Kanno y otros, y PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , y  $\mu$  se midieron en la ausencia de EGTA añadido y  $\text{CaCl}_2$ , tal como se describe por Kanno y otros, J. Lipid Res.2006; 47: 1146-50. Las bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizan debido a que  $\text{Ca}^{2+}$  interactúa con el sitio de unión de fosfatidilserina de PKC y previene la activación. Para las mediciones de la activación de briostatina, se omitió el 1,2-diacilglicerol, a menos que se indique lo contrario.

## Resultados y discusión

Para determinar su especificidad de isozima PKC, los nuevos compuestos se preincubaron con PKC purificada durante cinco minutos y la actividad de la PKC se midió radiométricamente. Tal como se muestra en el ejemplo 2 anterior, BR-101 (DCP-LA) fue un activador eficaz de PKC a 10  $\mu\text{M}$  pero tuvo efectos relativamente pequeños en las otras isoformas de PKC (datos no mostrados). A concentraciones más elevadas, BR-101 (DCP-LA) inhibió parcialmente PKC $\delta$  (aproximadamente 1-100  $\mu\text{M}$ ) y activó PKC  $\gamma$  (50-100  $\mu\text{M}$ ) (datos no mostrados).

BR-111 (DHA-CP6), BR-114 (EPA-CP5), y BR-115 (AA-CP4), que son derivados de ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido araquidónico ciclopropanados, respectivamente, activaron PKC purificada a una medida similar. La concentración necesaria para activar PKC fue aprox. 100 veces menor que para BR-101 (DCP-LA), lo que sugiere una mayor afinidad. Los alcoholes linolenílico y linoleico ciclopropanados (BR-104 y BR-105), ácido epoxiesteárico (BR-116), y éster metílico del ácido vernólico (BR-117) tenían poco o ningún efecto sobre la PKC. El éster metílico del ácido vernólico ciclopropanado (BR-109) inhibió la PKC en concentraciones superiores a 1  $\mu\text{M}$ .

Los activadores de PKC que se unen al sitio de unión de diacilglicerol, entre los que se incluyen briostatina, gnidimacrina, y ésteres de forbol, producen una activación transitoria de la actividad PKC, seguida de una regulación a la baja prolongada. Nelson y otros, Trends in Biochem.Sci.2009; 34: 136-45. Esto se confirmó en las células cultivadas del hipocampo de rata. La incubación de células H19-7/IGF-IR de rata con briostatina (0,04 nM y 0,2 nM) produjo una activación de 2 veces que duró 30 min, seguida de una regulación a la baja del 20% que regresó a la línea de base en 24 horas (datos no mostrados). En contraste, la PKC expuesta a DCP-LA permaneció elevada durante, como mínimo, cuatro horas. Esta activación sostenida sólo se observó en las neuronas primarias.

A pesar de que la briostatina tiene una mayor afinidad por PKC que el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (EC<sub>50</sub>=1,35 nM frente a 10 nM), la briostatina fue mucho menos eficaz que el PMA en la regulación a la baja de PKC. La actividad de la PKC está fuertemente regulada a la baja por el éster de forbol en 8h, mientras que la PKC en células tratadas con briostatina está en la línea de base o cerca de la misma (datos no mostrados). Esta diferencia puede explicar los aumentos en A $\beta$  producidos por PdBu reportados por da Cruz e Silva y otros J. Neurochem.2009: 108: 319-30. Estos investigadores aplicaron 1  $\mu\text{M}$  de PdBu a células COS cultivadas durante 8 h y observaron un aumento en A $\beta$ . Este aumento se atribuye a la regulación a la baja de PKC por el éster de forbol, que es coherente con estos resultados. La regulación a la baja no se pudo medir para DCP-LA y compuestos relacionados.

### Ejemplo 4: Efectos de los activadores de PKC en la producción y degradación de A $\beta$

Cultivo celular. El cultivo celular se realizó tal como se ha descrito anteriormente para el ejemplo 3.

Medición de A $\beta$  y ensayo de viabilidad celular. A $\beta$  se midió utilizando un kit fluorimétrico de ELISA de A $\beta$ 1-42 humana (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los resultados se midieron en un lector de microplacas Biotek Sinergy HT. AlamarBlue y CyQuant NF (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

## Resultados y discusión

Para medir los efectos de la activación de PKC- $\epsilon$  en la producción A $\beta$ , los presentes inventores usaron neuro2a (N2a) células de neuroblastoma de ratón transfectadas con APPS humanos wt/PS ID, que producen grandes cantidades de A $\beta$ . Petanceska y otros, J Neurochem.1996; 74: 1878-84. La incubación de estas células durante 24 h con diversas concentraciones de activadores de PKC, briostatina, BR-101 (DCP-LA) y BR-111 (DHA-CP6) redujo marcadamente los niveles de A $\beta$  tanto intracelular como secretada. Con briostatina, que activa la PKC mediante la unión al sitio de unión de diacilglicerol, la inhibición fue bifásica, con concentraciones de 20 nM o superiores que no produjeron ningún efecto neto. Esto puede explicarse por la capacidad de esta clase de activadores de PKC de regular a la baja PKC cuando se utilizan a concentraciones elevadas. En contraste, **BR-101** (DCP-LA) y **BR-111** (DHA-CP6), que se unen al sitio de fosfatidilserina de PKC, mostraron inhibición monotónicamente creciente a concentraciones de hasta 10 a 100  $\mu\text{M}$  sin evidencia de regulación a la baja a concentraciones más elevadas.

Para determinar si los niveles reducidos de A $\beta$  provocados por los activadores de PKC se debieron a la inhibición de la síntesis de A $\beta$  o la activación de la degradación de A $\beta$ , los presentes inventores aplicaron BR-111 (DHA-CP6) (0,01 a 10  $\mu\text{M}$ ) y bajas concentraciones (100 nM) de A $\beta$ 1-42 exógena monomérica a las células SH-SY5Y cultivadas. Esta concentración de A $\beta$  es demasiado baja para producir toxicidad mensurable o muerte celular. Dado que las células SH-SY5Y sólo producen pequeñas cantidades de A $\beta$ , este experimento fue una prueba efectiva de la capacidad de los activadores de PKC para mejorar la degradación A $\beta$ . En 24 horas, la mayor parte del A $\beta$  había sido absorbida por las células y la concentración de A $\beta$  en el medio de cultivo fue indetectable. La adición de 0,01 a 10  $\mu\text{M}$  de DHA-CP6 a las células redujo los niveles celulares de A $\beta$  un 45-63%, lo que indica que el activador PKC $\epsilon$  aumentó la velocidad de degradación de A $\beta$  exógena.

DHA-CP6, briostatina, y DCP-LA no tuvieron ningún efecto sobre la supervivencia celular o sobre la proliferación tal como se midió por tinción azul Alamar y CyQuant, lo que indica que la reducción en la producción de A $\beta$  no fue resultado de la proliferación celular o un cambio en la supervivencia celular.

**Ejemplo 5: Efectos de los activadores PKC sobre Actividad TACE**

**Ensayo TACE.** Se midió TACE mediante la incubación de 5 µl de homogeneizado celular, 3 µl de tampón (Tris-HCl 7,4, 50 mM más NaCl 25 mM más 4% de glicerol), y 1 µl de sustrato TACE IV 100 µM (Aβ<sub>z</sub>-LAQAVRSSSR-DPa) (Calbiochem) durante 20 min a 37°C en tubos de centrifuga de polipropileno de 1,5 ml (Jin y otros, Anal.Biochem.2002; 302: 269-75). La reacción se detuvo por enfriamiento a 4°C. Las muestras se diluyeron a 1 ml y se midió la fluorescencia rápidamente (ex=320 nm, em=420 nm) en un espectro fluorómetro Spex Fluorolog 2.

**Resultados y discusión**

Investigadores anteriores han reportado que los activadores de PKC tal como forbol 12-miristato 13-acetato producen un gran aumento en la actividad de TACE que se correlacionaba con un aumento de APP $\alpha$  y una disminución de A $\beta$ , lo que sugiere que TACE y BACE1 compiten por la disponibilidad de sustrato de APP, y que los activadores de PKC desplazan la competencia en favor de TACE. Buxbaum y otros, J. Biol.Chem.1998; 273: 27765-67; Etcheberrigaray y otros, Proc.Natl.Acad.Sci.EE.UU. 2006; 103: 8215-20. Sin embargo, muchos de estos estudios anteriores se llevaron a cabo en fibroblastos y otros tipos de células no neuronales, que parecen responder de manera diferente a activadores de PKC que las neuronas. Por ejemplo, Etcheberrigaray y otros encontraron que la activación de PKC en fibroblastos humanos por briostatina de 10 pM a 100 pM aumentó la tasa inicial de actividad de la secretasa- $\alpha$  en 16 veces y 132 veces, respectivamente (Etcheberrigaray y otros, Proc.Natl.Acad.Sci.EE.UU. 2006). Sin embargo, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, células de neuroblastoma de ratón N2a, y neuronas primarias de hipocampo de rata, los activadores de PKC briostatina, **BR-101** (DCP-LA) y/o **BR-111** (DHA-CP6) sólo produjeron pequeños aumentos en actividad TACE. Esto sugiere que la reducción de los niveles de A $\beta$  en las neuronas por los activadores de PKC debe ser provocada por algún otro mecanismo, además de la activación de TACE.

**Ejemplo 6: Efectos de los activadores de PKC sobre la actividad de la enzima convertidora de endotelina**

**Ensayo ECE.** Células de neuroblastoma SH-S757 se incubaron con briostatina (0,27 nM), **BR-101** (DCP-LA) (1 µM) y **BR-111** (DHA-CP6) (1 µM). Se midió la enzima convertidora de endotelina (ECE) fluorimétricamente utilizando el procedimiento de Johnson y Ahn, Anal.Biochem.2000; 286: 112-118. Una muestra de homogeneizado celular (20 µl) se incubó en MES-KOH 50 mM, pH 6,0, 0,01% C12E10 (polioxietileno 10-lauril éter), y McaBK2 15 µM (7-metoxicumarina-4-acetil [Ala7-(2,4-dinitrofenil)Lys9]-bradiquina trifluoroacetato sal) (Sigma-Aldrich). Después de 60 min a 37°C, la reacción se inactivó mediante la adición de ácido trifluoroacético al 0,5%. La muestra se diluyó a 1,4 ml con agua y se midió la fluorescencia a ex=334 nm, em=398 nm.

**Resultados y discusión**

A $\beta$  puede degradarse *in vivo* por una serie de enzimas, incluyendo enzima degradante de insulina (insulinas), nepriliasina, y ECE. Debido a que se ha informado que la sobreexpresión de PKC $\epsilon$  activa ECE (Choi y otros, Proc.Natl.Acad.Sci.EE.UU. 2006; 103: 8215-20), los presentes inventores examinaron el efecto de los activadores de PKC en la ECE. Briostatina, **BR-101** (DCP-LA) y **BR-111** (DHA-CP6) todos produjeron un aumento sostenido de la actividad de la ECE. Dado que ECE no posee un dominio de unión Cl a diacilglicerol, esto sugiere que la activación por la briostatina no fue debida a la activación directa de ECE, sino que debió ser el resultado de la fosforilación por PKC de ECE o algún intermedio activador de ECE. Este resultado sugiere además que la activación indirecta de ECE por activadores de PKC podría ser un medio útil para reducir los niveles de A $\beta$  en los pacientes.

Una ventaja de los compuestos tales como los derivados de AGPI de la presente invención que activan específicamente PKC $\epsilon$  es que producen menos regulación a la baja que los ésteres de forbol y análogos de 1,2-diacilglicerol (DAG) similares. La respuesta bifásica de la PKC a activadores basados en DAG significa que un activador de PKC puede reducir los niveles de A $\beta$  en un punto temporal y aumentarlos en otro, da Cruz e Silva y otros, J. Neurochem.2009; 108: 319-330. Se requerirían una dosificación y seguimiento de los pacientes muy cuidadosos para evitar efectos opuestos a los que están destinados. Debido a la relativa incapacidad de esta nueva clase de activadores de PKC regular a la baja PKC, este problema se puede evitar.

**Referencias**

1. Alkon, D.L., Sun, M.K., Nelson, T. J., 2007. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol. Sci. 28, 51- 60.
2. Battaini, F., Pascale, A., Paoletti, R., Govoni, S., 1997. The role of anchoring protein RACK1 in PKC activation in the ageing rat brain. Trends Neurosci. 20, 410-5.
3. Choi, D.S., Wang, D., Yu, G.Q., Zhu, G., Kharazia, V.N., Paredes, J.P., Chang, W.S., Deitchman, J.K., Mucke, L., Messing, R.O., 2006. PKC epsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid plaque pathology in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 8215-20.
4. Citron, M., Vigo-Pelfrey, C, Teplow, D.B., Miller, C, Schenk, D., Johnston, J., Winblad, B., Venizelos, N., Lannfelt, L., Selkoe, D.J., 1994. Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and

- presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 1 1993-7.
5. Cole, G., Dobkins, K.R., Hansen, L.A., Terry, R.D., Saitoh, T., 1988. Decreased levels of protein kinase C in Alzheimer brain. *Brain Res.* 452, 165-74
- 5 6. Dehvari, N., Isacson, O., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., Cowburn, R.F., 2008. Presenilin regulates extracellular regulated kinase (Erk) activity by a protein kinase C alpha dependent mechanism. *Neurosci. Lett.* 436,77-80.
7. Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., Montero, J.C., Yuste, L., Pandiella, A., 2000. Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem. J.* 346, 359-67.
- 10 8. Etcheberrigaray, R., Ito, E., Kim, C.S., Alkon, D.L., 1994. Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K<sup>+</sup> channels. *Science* 264, 276-9
9. Etcheberrigaray, R., Ito, E., Oka, K., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., Alkon, D.L., 1993. Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8209-13
- 15 10. Favit, A., Grimaldi, M., Nelson, T.J., Alkon, D.L., 1998. Alzheimer's-specific effects of soluble beta-amyloid on protein kinase C-alpha and -gamma degradation in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 5562-7
11. Govoni, S., Bergamaschi, S., Racchi, M., Battaini, F., Binetti, G., Bianchetti, A., Trabucchi, M., 1993. Cytosol protein kinase C downregulation in fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Neurology* 43, 2581-6
12. Guerreiro, R.J., Santana, I., Bras, J.M., Santiago, B., Paiva, A., Oliveira, C, 2007. Peripheral inflammatory cytokines as biomarkers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurodegener. Dis.* 4, 406-12
- 20 13. Hongpaisan, J., Alkon, D.L., 2007. A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 19571-19576
14. Hongpaisan, J., Sun, M.K., Alkon, D.L., 2011. PKC-ε activation prevents synaptic loss, Aβ elevation, and cognitive deficits in Alzheimer's disease transgenic mice. *J. Neurosci.* 31,630-643.
- 25 15. Hoshi, M, Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., Sato, K., 2003. Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 6370-5
16. Hoshino, M., Dohmae, N., Takio, K., Kanazawa, I., Nukina, N., 2003. Identification of a novel amino-terminal fragment of amyloid precursor protein in mouse neuroblastoma Neuro2a cell. *Neurosci. Lett* 353, 135-8
- 30 17. Ito, E., Oka, K., Etcheberrigaray, R., Nelson, T.J., McPhie, D.L., Tofel-Grehl, B., Gibson, G.E., Alkon, D.L., 1994. Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 534-8
18. Joachim, C.L., Mori, H., Selkoe, D.J., 1989. Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease. *Nature* 341, 226-30
- 35 19. Johnston, J. A., Cowburn, R.F., Norgren, S., Wiehager, B., Venizelos, N., Winblad, B., Vigo-Pelfrey, C, Schenk, D., Lannfelt, L., O'Neill, C, 1994. Increased beta-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS. Lett.* 354, 274-8.
20. Jolly-Tornetta, C, Wolf, B.A., 2000. Protein kinase C regulation of intracellular and cell surface amyloid precursor protein (APP) cleavage in CH0695 cells. *Biochemistry* 39, 15282-90.
- 40 21. Khan, T.K., Alkon, D.L., 2006. An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 13203-7.
22. Khan, T.K., Nelson, T.J., Verma, V.A., Wender, P.A., Alkon, D.L., 2009. A cellular model of Alzheimer's disease therapeutic efficacy: PKC activation reverses Aβ-induced biomarker abnormality on cultured fibroblasts. *Neurobiol. Dis.* 34, 332-9.
- 45 23. Khan, T.K., Alkon, D.L., 2010. Early diagnostic accuracy and pathophysiologic relevance of an autopsy-confirmed Alzheimer's disease peripheral biomarker. *Neurobiol. Aging.* 31(6),889-900.
24. Kinouchi, T., Sorimachi, H., Maruyama, K., Mizuno, K., Ohno, S., Ishiura, S., Suzuki, K., 1995. Conventional protein kinase C (PKC)-alpha and novel PKC epsilon, but not -delta, increase the secretion of an N-terminal fragment of Alzheimer's disease amyloid precursor protein from PKC cDNA transfected 3Y1 fibroblasts. *FEBS. Lett.* 364, 203-6.
- 50 25. Lanni, C, Mazzucchelli, M, Porrello, E., Govoni, S., Racchi, M., 2004. Differential involvement of protein kinase C alpha and epsilon in the regulated secretion of soluble amyloid precursor protein. *Eur. J. Biochem.* 271, 3068-75.
26. Liron, T., Chen, L.E., Khaner, H., Vallentin, A., Mochly-Rosen, D., 2007. Rational design of a selective antagonist of epsilon protein kinase C derived from the selective allosteric agonist, pseudo-RACK peptide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 835-41.
- 55 27. Liron, T., Seraya, C.B., Ish-Shalom, M., Souroujon, M.C., Neumann, D., 2007. Overexpression of amyloid precursor protein reduces epsilon protein kinase C levels. *Neuroscience* 146, 152-9.
28. Masliah, E., Cole, G.M., Shimohama, S., Hansen, L.A., DeTeresa, R., Terry, R.D., Saitoh, T., 1990. Differential involvement of protein kinase C isozymes in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 10, 21 13-24
- 60 29. Masliah, E., Cole, G., Hansen, L.A., Mallory, M., Albright, T., Terry, R.D., Saitoh, T., 1991. Protein kinase C alteration is an early biochemical marker in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 11, 2759-2767.
30. Matsushima, H., Shimohama, S., Chachin, M., Taniguchi, T., Kimura, J., 1996. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent protein kinase C changes in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 67, 317-23.
- 65 31. Mehta, K.D., Radominska-Pandya, A., Kapoor, G.S., Dave, B., Atkins, B.A., 2002. Critical role of diacylglycerol- and phospholipid-regulated protein kinase C epsilon in induction of low-density lipoprotein receptor transcription in response to depletion of cholesterol. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3783-93.

32. Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M, Ito, A., Akioka, M, Kikuchi, S., Sato, M., Ideno, S., Noda, M., Tukunari, A., Muramatsu, S., Itokazu, Y., Sato, K., Takahashi, H., Teplow, D.B., Nabeshima, Y., Kakita, A., Imahori, K., Hoshi, M., 2009. Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 284, 32895-905.
- 5 33. Ray, S., Britschgi, M., Herbert, C, Takeda-Uchimura, Y., Boxer, A., Blennow, K., Friedman, L.F., Galasko, D.R., Jutel, M, Karydas, A., Kaye, J.A., Leszek, J., Miller, B.L., Minthon, L., Quinn, J.F., Rabinovici, G.D., Robinson, W.H., Sabbagh, M.N., So, Y.T., Sparks, D.L., Tabaton, M., Tinklenberg, J., Yesavage, J.A., Tibshirani, R., Wyss-Coray, T., 2007. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* 13, 1359-62.
- 10 34. Robinson, M.J., Cobb, M.H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 180-6.
35. Shimohama, S., Narita, M., Matsushima, H., Kimura, J., Kameyama, M., Hagiwara, M., Hidaka, H., Taniguchi, T., 1993. Assessment of protein kinase C isozymes by two-site enzyme immunoassay in human brains and changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1407-13.
- 15 36. Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W., Lee, V.M., 2000. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J. Biol. Chem.* 275, 2568-75.
37. Slack, B.E., Nitsch, R.M., Livneh, E., Kunz, G.M., Jr., Breu, J., Eldar, H., Wurtman, R.J., 1993. Regulation by forbol esters of amyloid precursor protein release from Swiss 3T3 fibroblasts overexpressing protein kinase C alpha. *J. Biol. Chem.* 268, 21097-101.
- 20 38. Slack, B.E., Nitsch, R.M., Livneh, E., Kunz, G.M., Jr., Eldar, H., Wurtman, R.J., 1993. Regulation of amyloid precursor protein release by protein kinase C in Swiss 3T3 fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 128-31.
39. Soininen, H., Helkala, E.X., Laulumaa, V., Soikkeli, R., Hartikainen, P., Riekkinen, P.J., 1992. Cognitive profile of Alzheimer patients with extrapyramidal signs: a longitudinal study. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 4, 241-54.
- 25 40. Soininen, H., Laulumaa, V., Helkala, E.L., Hartikainen, P., Riekkinen, P.J., 1992. Extrapyramidal signs in Alzheimer's disease: a 3-year follow-up study. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 4, 107-19.
41. Soininen, H., Reinikainen, K., Partanen, J., Mervaala, E., Paljarvi, L., Helkala, E.L., Riekkinen, P., Sr., 1992. Slowing of the dominant occipital rhythm in electroencephalogram is associated with low concentration of noradrenaline in the thalamus in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 137, 5-8.
- 30 42. Van Huynh, T., Cole, G., Katzman, R., Huang, K.P., Saitoh, T., 1989. Reduced protein kinase C immunoreactivity and altered protein phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Arch. Neurol* 46, 1 195-9.
43. Yeon, S.W., Jung, M.W., Ha, M.J., Kim, S.U., Huh, K., Savage, M.J., Masliah, E., Mook-Jung, I., 2001. Blockade of PKC epsilon activation attenuates forbol ester-induced increase of alpha-secretase-derived secreted form of amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 782-7.
- 35 44. Zhao, W.Q., Feng, C, Alkon, D.L., 2003. Impairment of phosphatase 2A contributes to the prolonged MAP kinase phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol. Dis.* 14, 458-69.
45. Zhao, W.Q., Ravindranath, L., Mohamed, A.S., Zohar, O., Chen, G.H., Lyketsos, C.G., Etcheberrigaray, R., Alkon, D.L., 2002. MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. *Neurobiol. Dis.* 11, 166-83.
- 40 46. Zhu, G., Wang, D., Lin, Y.H., McMahon, T., Koo, E.H., Messing, R.O., 2001. Protein kinase C epsilon suppresses A $\beta$  production and promotes activation of alpha-secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 997-1006.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 a) determinar el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto humano; y
- b) comparar el nivel de PKC épsilon en dichas una o más células periféricas de dicho sujeto humano con el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto de control;
- 10 en el que dicho procedimiento es indicativo de la enfermedad de Alzheimer si el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de dicho sujeto humano es menor que el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de dicho sujeto de control.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho nivel de PKC épsilon es un nivel de proteína PKC épsilon o un nivel de actividad de PKC épsilon.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto de control no tiene la enfermedad de Alzheimer.
- 20 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la ausencia de la enfermedad de Alzheimer está indicada si dicho nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de dicho sujeto humano es mayor o igual que el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de dicho sujeto de control.
5. Procedimiento *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de:
- 25 b) determinar el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto humano;
- c) poner en contacto dicha una o más células de la etapa (a) con un agente que es un activador de PKC épsilon;
- 30 d) determinar el nivel de PKC épsilon en dicha una o más células en la etapa (c) después de dicha puesta en contacto en la etapa (c);
- en el que la enfermedad de Alzheimer se indica si el nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (d) es mayor que el nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (b).
- 35 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la ausencia de la enfermedad de Alzheimer se indica si dicho nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (d) es igual o menor que el nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (b).
- 40 7. Procedimiento *in vitro* para determinar o monitorizarla progresión de la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de:
- a) determinar el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto humano;
- 45 b) comparar el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas en dicho sujeto humano con el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto de control; y
- c) determinar o monitorizar dicha progresión de la enfermedad de Alzheimer basándose en dicha comparación en la etapa (b).
- 50 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que dicho nivel de PKC épsilon es un nivel de proteína PKC épsilon o un nivel de actividad de PKC épsilon.
9. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que el nivel de PKC épsilon aumenta en una o más células periféricas de dicho sujeto humano a medida que la progresión de la enfermedad de Alzheimer se invierte.
- 55 10. Procedimiento *in vitro* para elevar el nivel de la proteína PKC épsilon en una célula, que comprende la etapa de poner en contacto una o más células periféricas humanas con una cantidad de un activador de PKC eficaz para elevar el nivel de proteína PKC épsilon en dichas células periféricas en comparación con una célula periférica humana no contactada.
- 60 11. Procedimiento *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de:
- b) determinar el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto humano;
- 65 c) poner en contacto dicha una o más células periféricas de la etapa (a) con un péptido A $\beta$ ;

d) determinar el nivel de PKC épsilon en dicha una o más células periféricas en la etapa (c) después de dicha puesta en contacto de la etapa (c);

5 en el que la enfermedad de Alzheimer se indica si el nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (d) no es significativamente diferente del nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (b).

10 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que la ausencia de la enfermedad de Alzheimer se indica si dicho nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (d) es menor que el nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (b).

13. Procedimiento *in vitro* de identificación de un compuesto útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprende:

15 b) determinar el nivel de PKC épsilon en una o más células periféricas de un sujeto con enfermedad de Alzheimer;

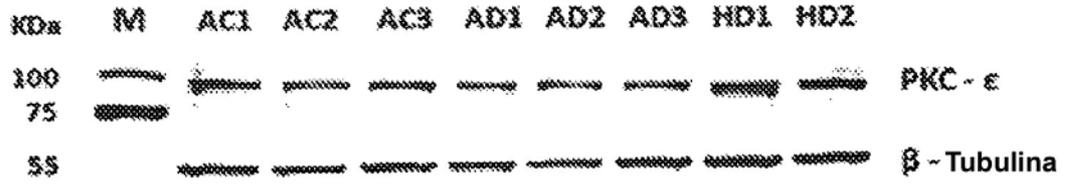
c) poner en contacto dichas células periféricas con un compuesto candidato;

20 d) determinar el nivel de PKC épsilon en dicha una o más células periféricas después de dicha etapa de contacto (c);

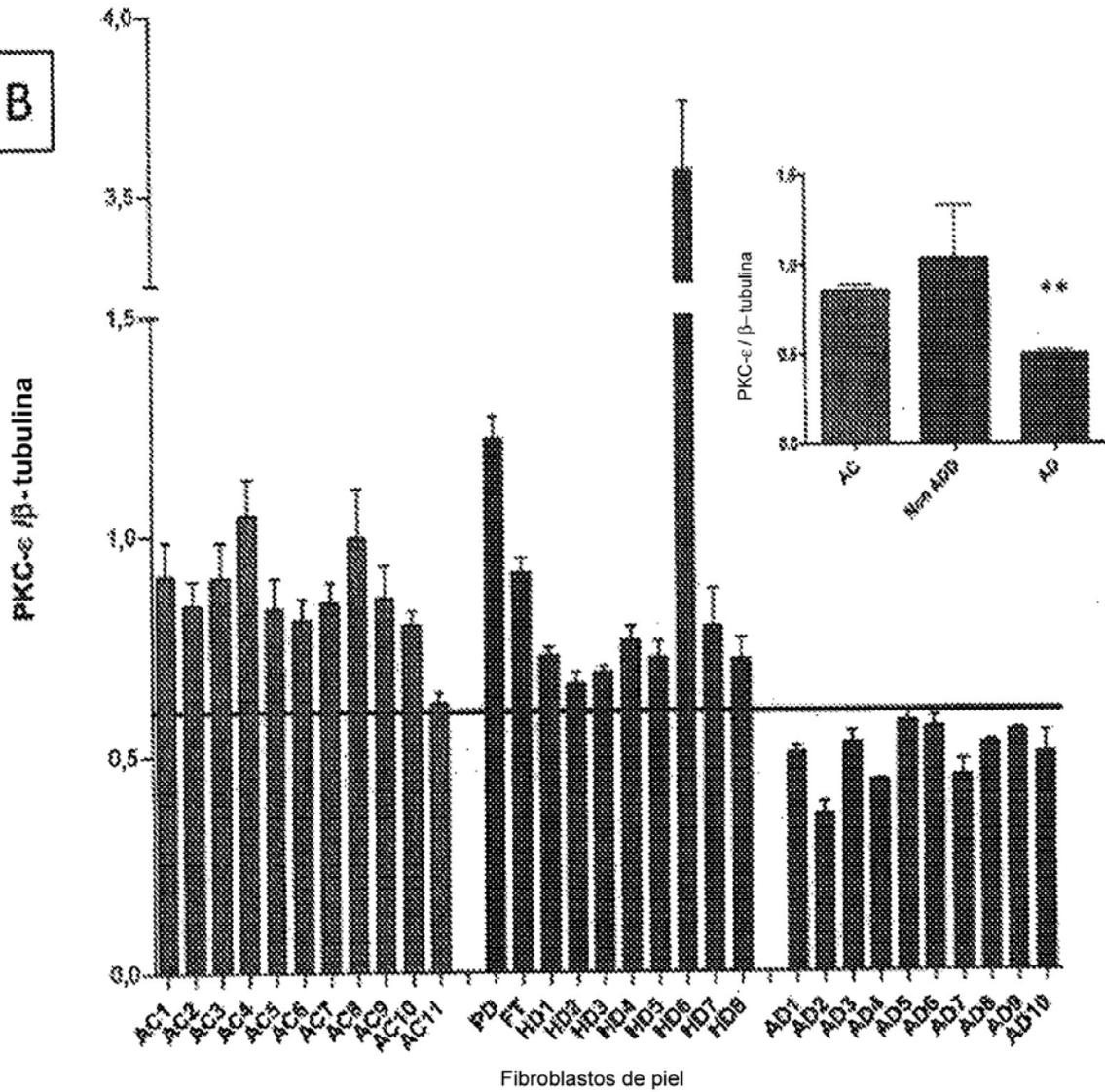
en el que dicho compuesto candidato se identifica como un compuesto útil para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer si el nivel de PKC épsilon determinado en la etapa (d) es mayor que el nivel de PKC épsilon determinada en la etapa (b).

25

**A**



**B**



**Figura 1**

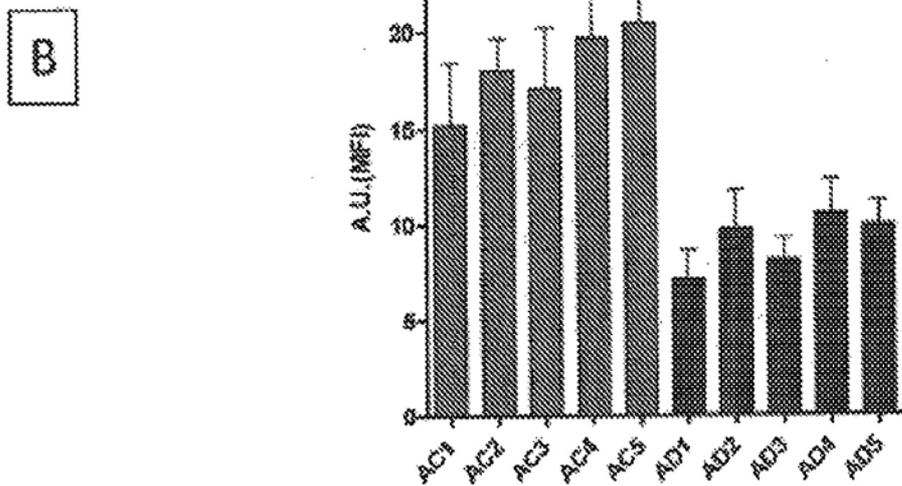
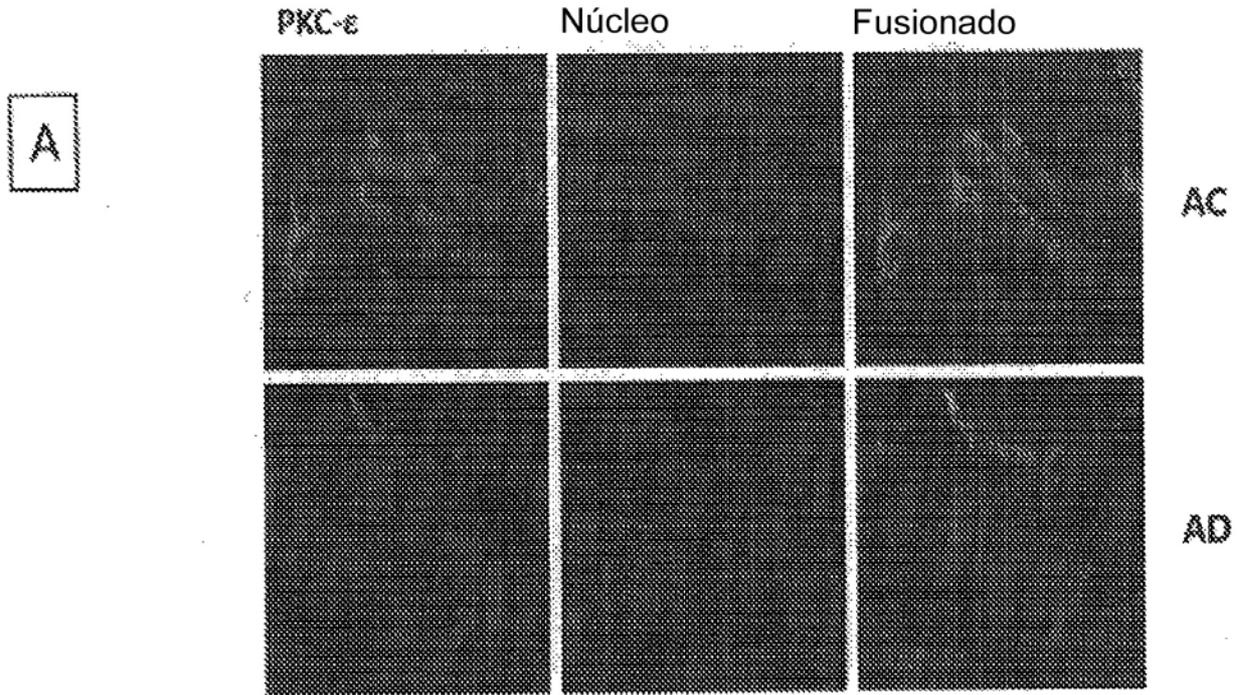
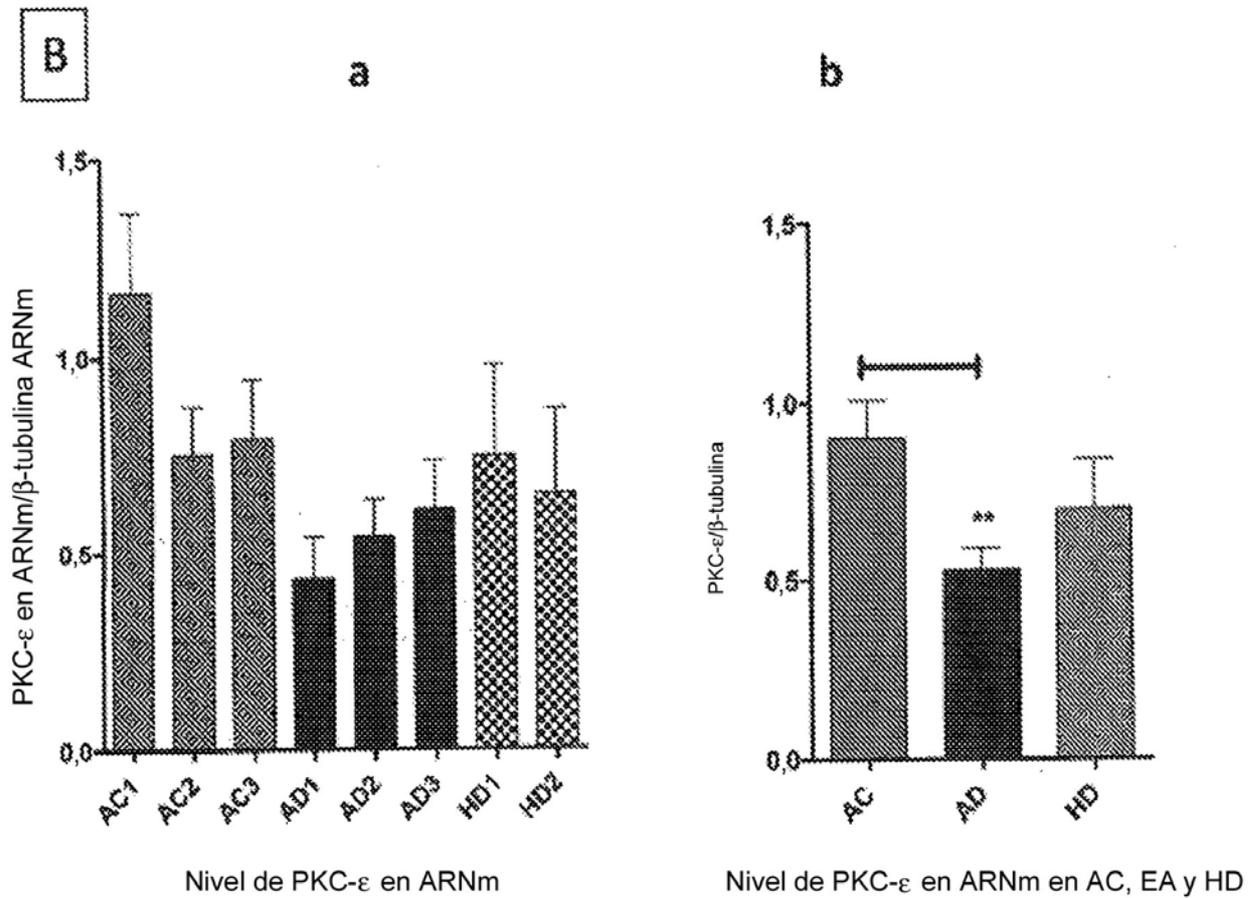
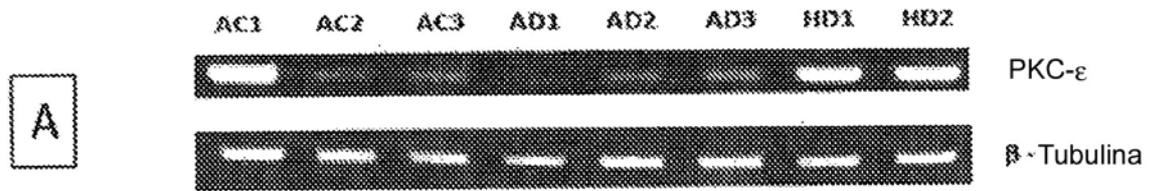


Figura 2



**Figura 3**

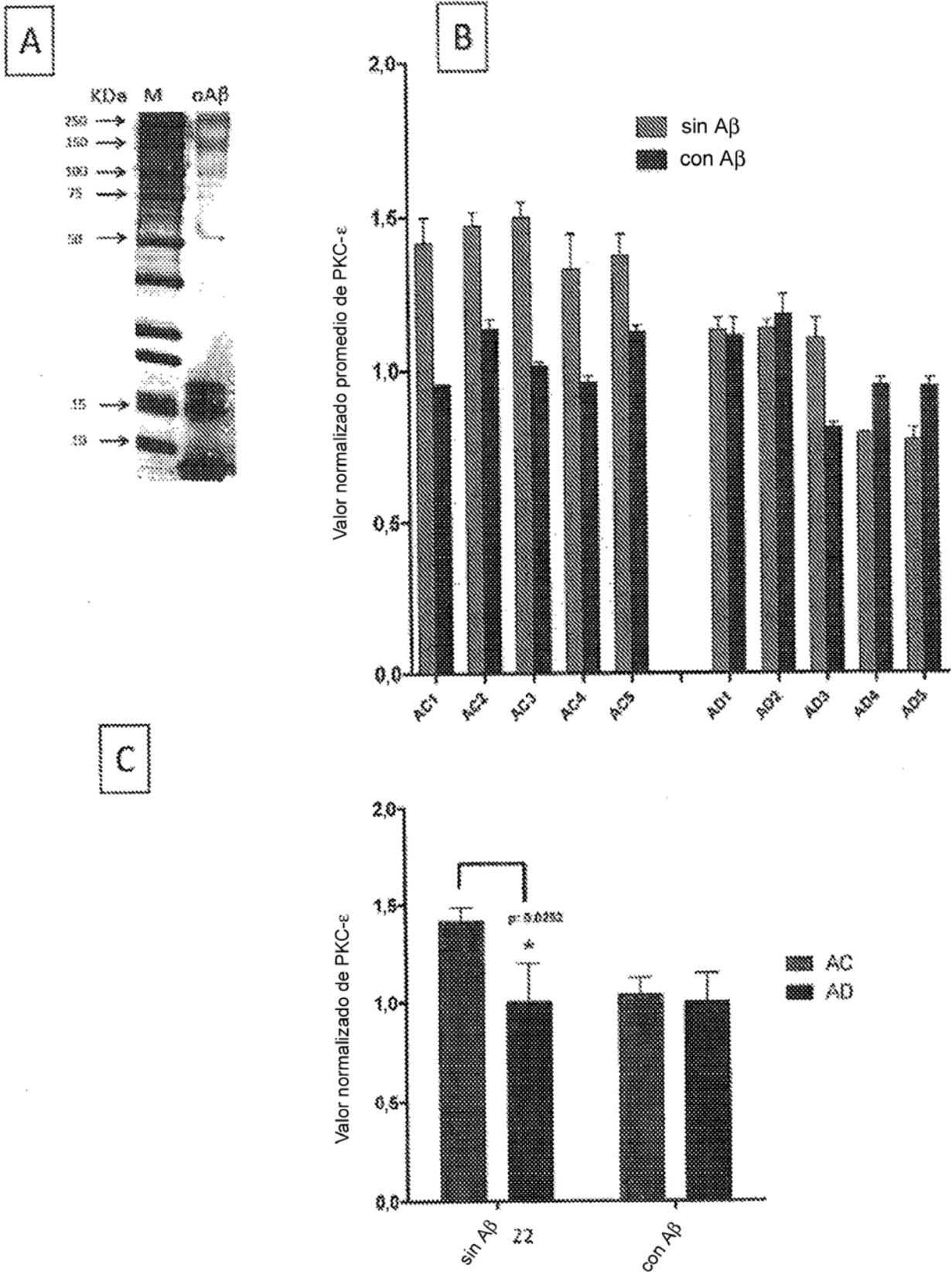


Figura 4

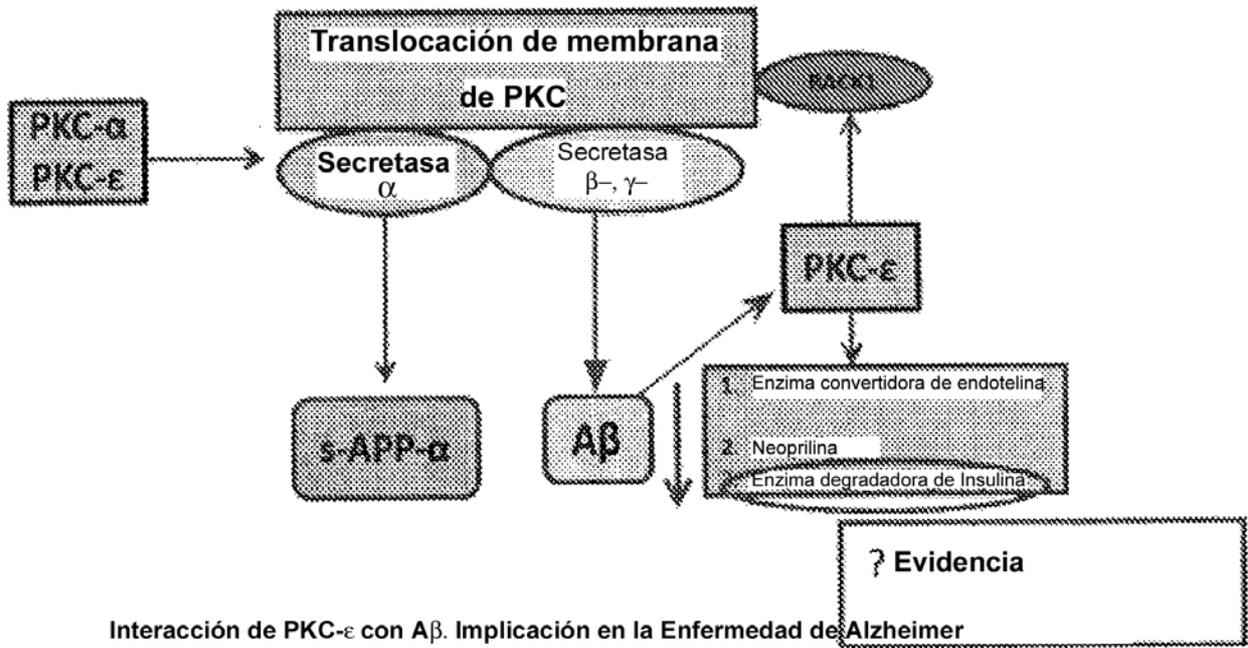


Figura 5

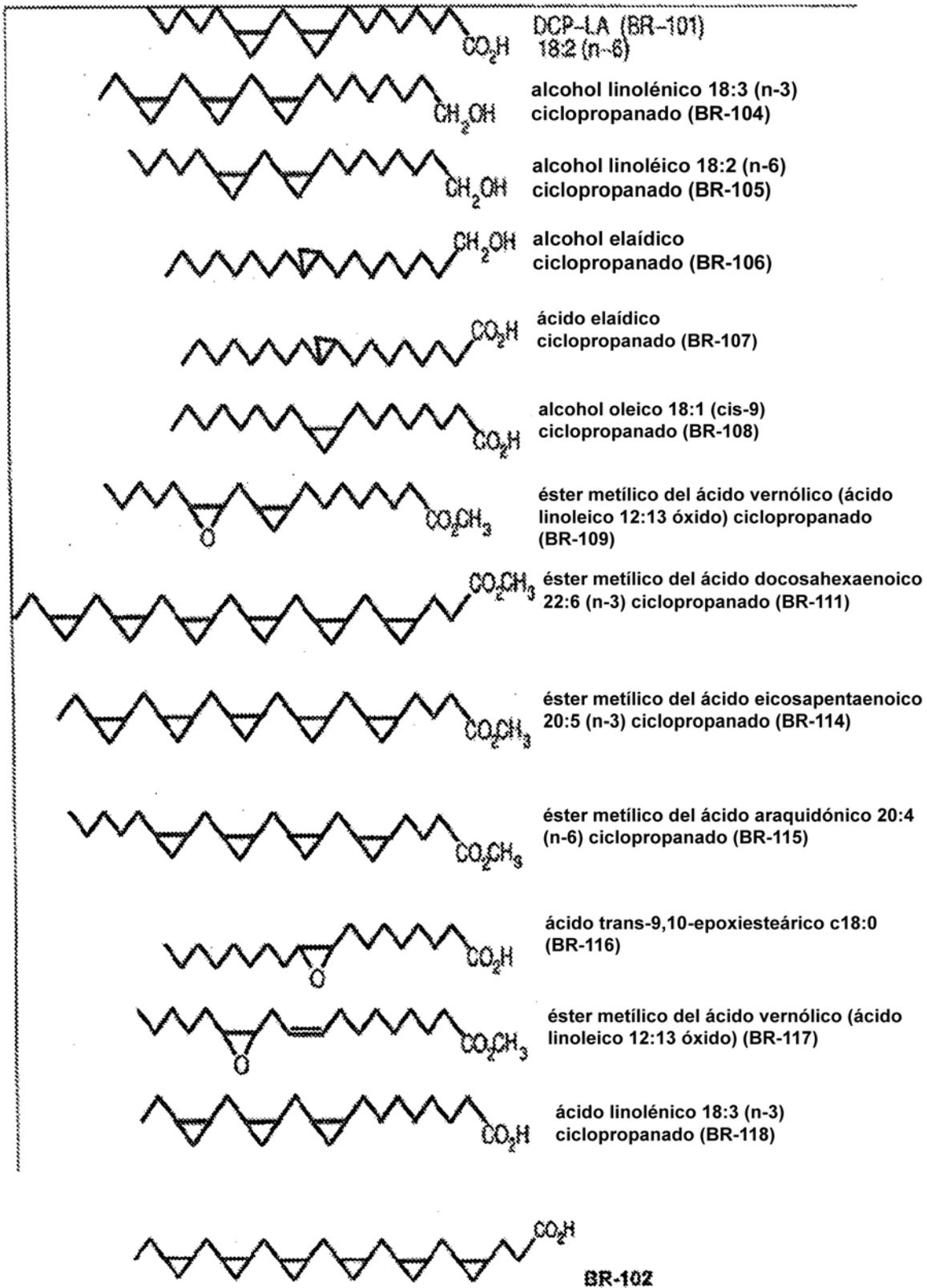
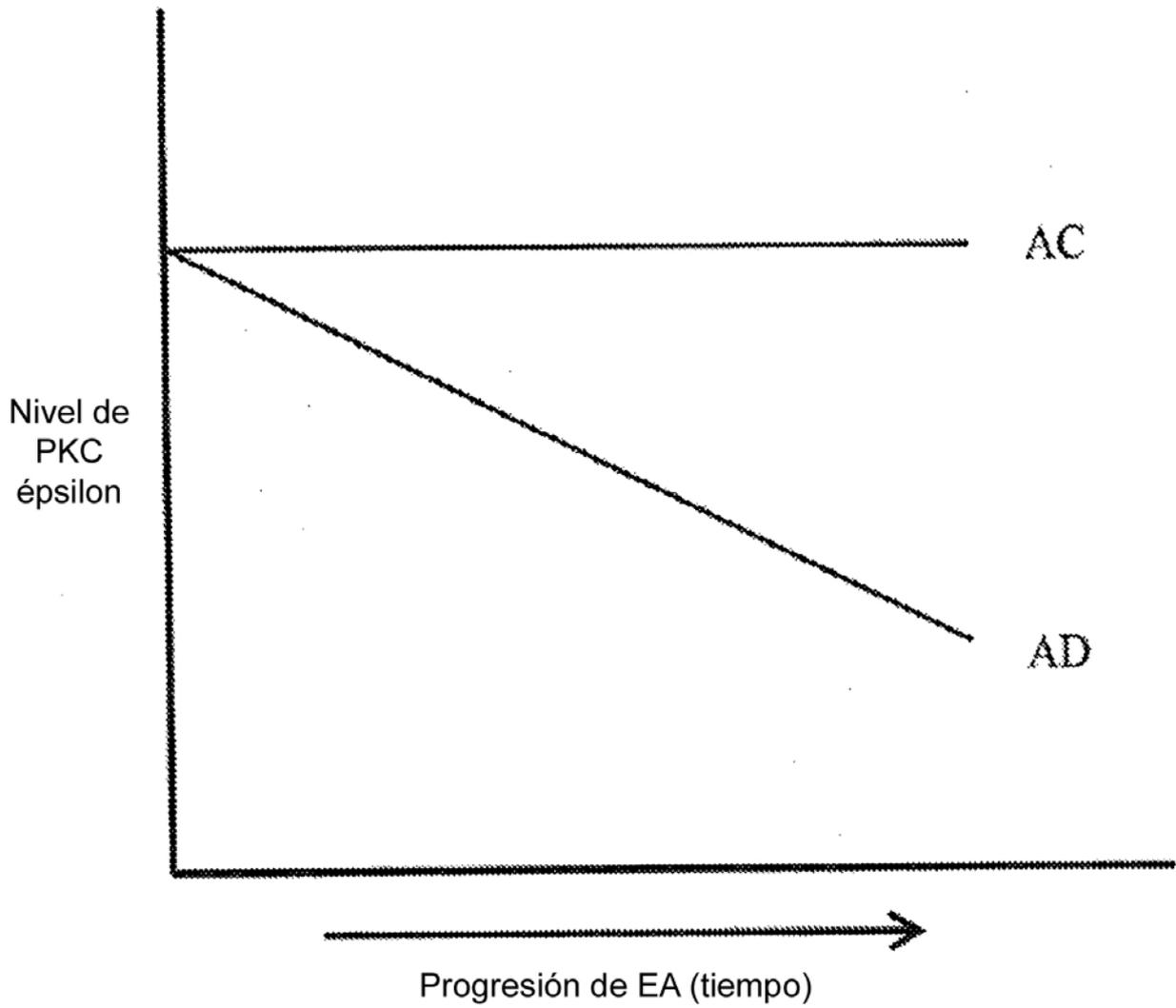


Figura 6



**Figura 7**

Briostatina previene la pérdida de PKCε en fibras perforadas en ratones Tg2576 (5X FAD)

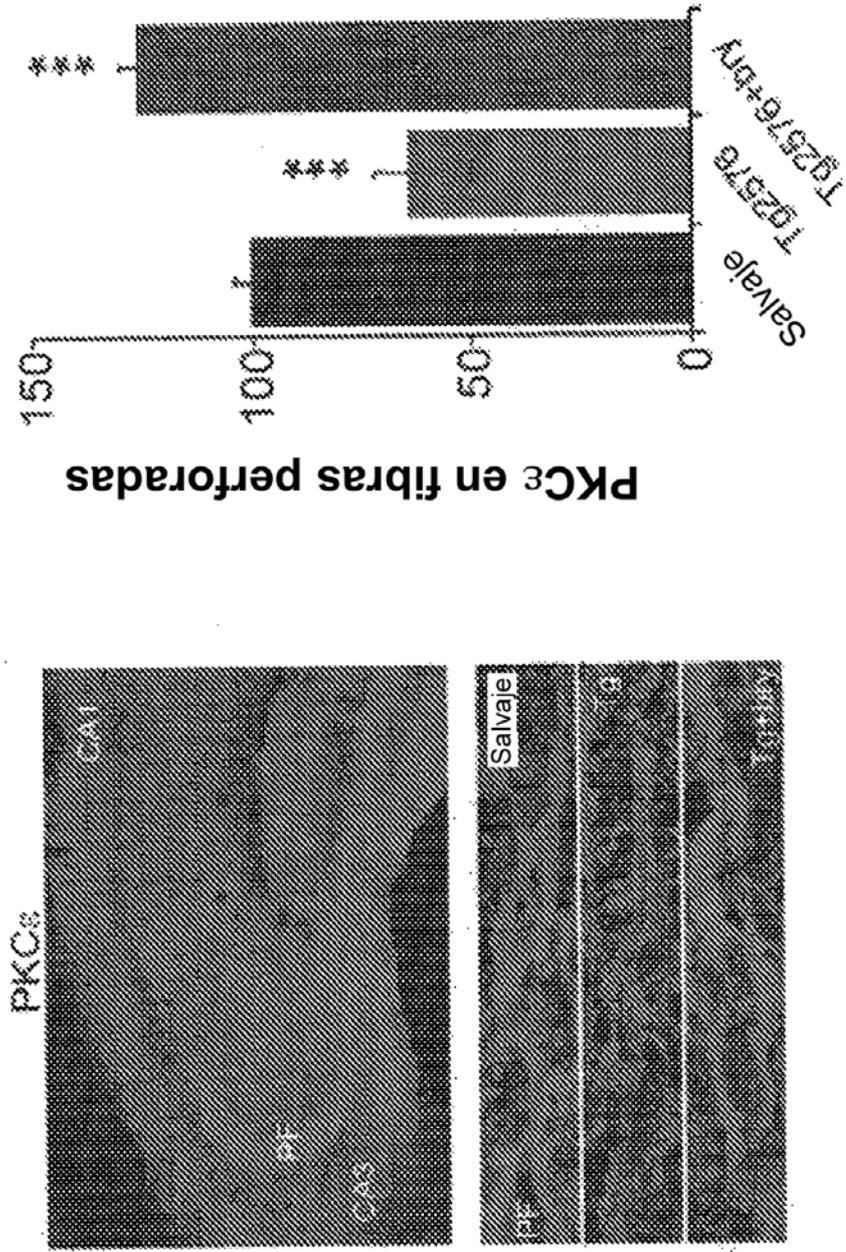


Figura 8

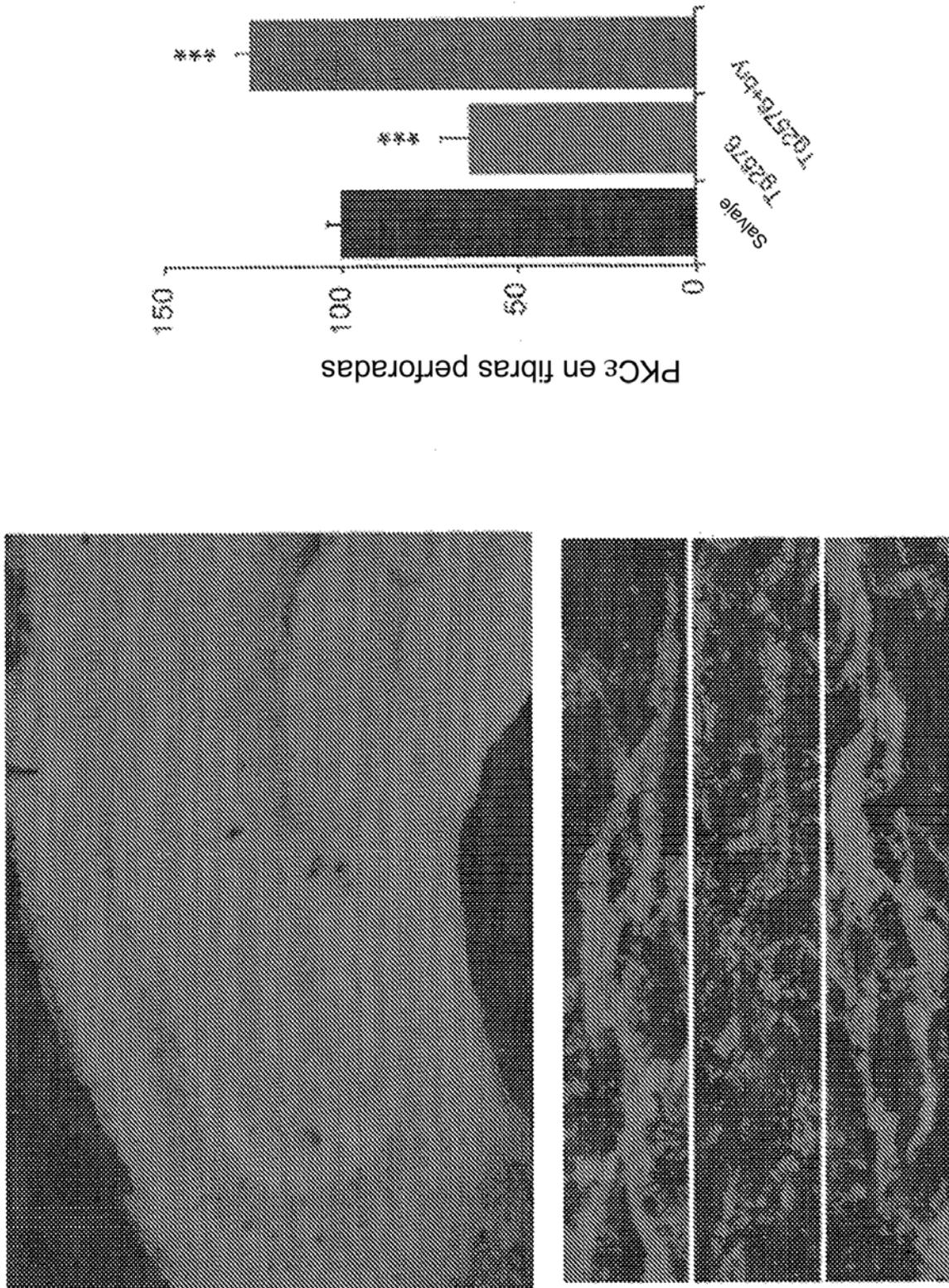


Figura 9