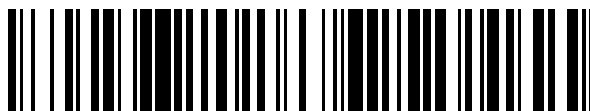


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 754**

51 Int. Cl.:

A61K 38/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2005 E 05826021 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1817050**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

03.12.2004 US 632619 P

18.02.2005 US 654080 P

01.11.2005 US 731862 P

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

13.07.2015

73 Titular/es:

**RHODE ISLAND HOSPITAL (100.0%)
OFFICE OF RESEARCH ADMIN., ALDRICH BLD.
593 EDDY STREET
PROVIDENCE, RI 02903, US**

72 Inventor/es:

**DE LA MONTE, SUZANNE MARIE y
WANDS, JACK RAYMOND**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 540 754 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).

Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer**Descripción****5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] Esta invención es en el campo médico y terapia. En particular, la invención se refiere a los métodos para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer (EA) mediante la determinación del nivel o función de la insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, sus receptores y/o sus moléculas de señalización descendiente. Además, se proporcionan métodos para el tratamiento de la EA mediante la administración de un agonista de insulina y un agonista del factor de crecimiento similar a la insulina. De manera adicional, los métodos proporcionados corresponden a un modelo animal de la EA y los métodos de selección para los agentes es útil en el tratamiento, mejora y prevención de la EA.

[0002] Las lesiones neuropatológicas y moleculares características que se correlacionan con la demencia en la enfermedad de Alzheimer (EA) incluyen la acumulación de proteínas hiperfosforiladas y poliubiquitinadas asociadas a microtúbulos, tales como tau, que resultan en la formación de ovillos neurofibrilares, neuritis distrófica e hilos de neurópilo. Las anomalías del citoesqueleto neuronal se asocian con la atrofia cerebral con pérdida de células y fibra y la desconexión sináptica. El aumento de la deposición de amiloidea beta (A β) alrededor y dentro de las paredes de los vasos meníngeos y corticales, el neurópilo cortical y perikarya neuronal es una característica de ambos EA y el envejecimiento normal. Aunque los factores genéticos pueden predisponer a los individuos a desarrollar depósitos cerebrales prematuros y excesivos de A β en el tipo de demencia tipo EA, la mayoría de los casos son esporádicos y no presentan una agrupación familiar o genética clara. La exploración reciente de anomalías bioquímicas, moleculares, y celulares que precede o acompaña a la enfermedad de Alzheimer clásica EA demostró que la pérdida celular se asocia con aumento de la activación de los genes pro-muerte y vías de señalización, metabolismo energético deteriorado, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo crónico y enfermedad cerebrovascular/hipoperfusión cerebral. Sin embargo, la incapacidad para interconectar estos fenómenos bajo un único mecanismo patogénico principal se tradujo en la aparición y propagación de diversas teorías fuertemente debatidas, cada una de las cuales se centró en sobre cómo un componente particular de la enfermedad de Alzheimer podría desencadenar una cascada que contribuya al desarrollo de todas las otras anomalías conocidas. No obstante, la reevaluación de alguna literatura antigua reveló que el deterioro en la utilización de la glucosa cerebral y el metabolismo energético representan anomalías muy tempranas que preceden o acompañan las etapas iniciales del deterioro cognitivo. Además, hay evidencia emergente que la señalización de insulina deteriorada puede cumplir un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

[0003] Actualmente, existe un creciente interés en el esclarecimiento de las funciones de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, Diabetes Mellitus Tipo de insulina enzima degradante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, y sus lesiones del citoesqueleto neuronal asociadas y depósitos A β en el cerebro. Esta relativamente nueva ola de entusiasmo es alimentada por informes que muestran un desarrollo reducido de cerebro y un aumento de la fosforilación del tau en ratones deficientes ya sea en el receptor de insulina sustrato-2 o en el gen receptor de la insulina neuronal. (Schubert et al., J. Neurosci. 23:7084 (2003); Schubert et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:3100 (2004)). La función potencial del sistema neuroendocrino en la enfermedad de Alzheimer se levantó hace 15 a 20 años cuando se detectaron anomalías en el eje del hipotálamo y la pituitaria. (Beal et al., Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 64:215 (1986); Reubi et al., J. Neurol. 233:370 (1986); Fisman et al., J. Am. Geriatr. Soc. 36:298 (1988); Hoyer, J. Neurol. 234:266 (1987); Tham et al., Acta Psychiatr. Scand. 77:719 (1988); Bucht et al., Acta Med. Scand. 213:387 (1983)). Este concepto casi desapareció con la marea de la investigación acelerada sobre A β y tau, aunque actualmente, el renovado interés en los mecanismos neuroendocrinos hace hincapié en enfermedad sistémica en lugar de la disfunción endocrina del sistema nervioso central intrínseco (SNC). Sin embargo, las investigaciones previas revelaron que muchos componentes importantes de la neurodegeneración del SNC que ocurren en la EA están mediados por la señalización de insulina deteriorada en el cerebro. (de la Monte et al., Cell. Mol. Life Sci. 58:1950 (2001); de la Monte et al., Cell. Mol. Life Sci. 59:882 (2002); de la Monte et al., Alcohol Clin. Exp. Res. 24:716 (2000); Xu et al., J. Biol. Chem. 278:26929 (2003)).

[0004] Gasparini et al, Trends in Neurosci. Vol. 26, 2003, páginas 404-407 describe la función potencial de la insulina y del IGF-1 en la EA. Hoyer: "Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer Disease." ("El metabolismo de glucosa y la transducción de señales del receptor de insulina en la enfermedad de Alzheimer") el European Journal of Pharmacology, 2004, Vol. 490, No. 1-3, páginas 115-125 propone que las alteraciones en la insulina neuronal por la vía de la transducción de señales contribuye a las anomalías celulares y moleculares que ocurren en el cerebro en la EA esporádica. Hallazgos similares son reportados por Schubert et al en: "Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases." ("La función para la resistencia a la insulina neuronal en las enfermedades neurodegenerativas.") Las Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América, Vol. 101, No. 9, 2004, páginas 3100-3105, que describen conclusiones e informes similares de hiperfosforilación de la proteína Tau debida a la resistencia de la insulina neuronal.

[0005] Benedict et al: "Intranasal insulin improves memory in humans." ("Insulina intranasal mejora la memoria en seres humanos.") Psychoneuroendocrinology, Vol. 29, No. 10, 2004, páginas 1326-1334 informa de la mejora de la

memoria en seres humanos después de la administración intranasal de insulina y sugiere un papel potencial en el tratamiento de pacientes con EA.

5 [0006] WO03/077940 A1 describe composiciones terapéuticas de IGF-1 para el tratamiento y prevención de enfermedades neurodegenerativas incluida la EA.

[0007] Grunblatt et al, J. Neural Transmission, Vol. 111, 2004, páginas 367-386 describen la creación de un modelo animal de EA mediante inyección intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ).

10 [0008] Carro et al: "Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels" Nature Medicine, Vol. 8, No. 12, 2002, pages 1390-1397 informa reducidos niveles de IGF-1 en los niveles séricos y el aumento de amiloide- β en el cerebro durante el envejecimiento.

15 [0009] Craft et al: "cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer Disease; relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype", Neurology, Vol. 50, No. 1, 1998, pages 164-168 informa el análisis de plasma y niveles de insulina CSF en pacientes con ED y sujetos sanos.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 [0010] La relación entre la EA y la vía de señalización del factor de crecimiento de insulina / similar a la insulina (IGF) ha sido demostrada mediante el hallazgo de alteración de la insulina y la expresión de IGF en los cerebros de pacientes con EA. Se ha descubierto también que los mediadores intermedios de la insulina y la señalización de IGF están alterados en los pacientes con EA. Esos hallazgos definen una conexión entre la EA y la vía de señalización de la insulina/IGF que pueden ser explotadas tanto para fines diagnósticos como terapéuticos.

25 [0011] Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un método in vitro para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer (EA) en un sujeto, que comprende detectar una disminución en el nivel de crecimiento del factor I (IGF-I) similar a la insulina en el fluido cerebroespinal obtenido de dicho sujeto, en donde una disminución en el nivel de IGF-I con respecto al nivel en sujetos sanos es un indicador de diagnóstico de EA.

30 [0012] Se describe también un método para identificar un sujeto en riesgo de desarrollar EA, que comprende determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina/IGF en dicho sujeto, donde la disminución en el nivel de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en sujetos saludables es un indicador de diagnóstico de riesgo de desarrollar EA.

35 [0013] También se describe un kit de diagnóstico para el diagnóstico de la EA. Los kits pueden utilizarse para determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina/IGF en un sujeto.

40 [0014] Se dan a conocer también los métodos para el tratamiento, mejora o prevención de la EA en un sujeto también. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

45 [0015] Lo que se describe también es un método para mejorar la lucidez de un sujeto con EA, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

50 [0016] Se describe también un método para reducir la pérdida de memoria en un sujeto con EA, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

[0017] Se describen también composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de la insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

55 [0018] Se describe también un método para la detección de un agente que es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA, que comprende administrar el agente a un animal y determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina / IGF en dicho animal, donde un incremento en el nivel o función de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente es potencialmente útil para un tratamiento, mejora o prevención de la EA.

60 [0019] Se describe también un método para probar potenciales tratamientos para la EA que comprende administrar el tratamiento potencial para un animal y determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina / IGF en dicho animal, donde un incremento en el nivel o función de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento indica que el tratamiento es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA.

65

[0020] Se describe también como método de prueba un agente para un potencial efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA, que comprende administrar el agente a un animal y determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina / IGF en dicho animal, donde una disminución en el nivel o función de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente potencialmente tiene un efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA.

[0021] Se describe también un modelo animal de EA producido mediante una inyección intracerebralmente a un animal no humano con estreptozotocina (STZ), en el que se inyecta a dicho animal no humano a una edad inferior a 1 semana. En otra representación, la invención proporciona un modelo animal de EA producida por una inyección intracerebral de STZ a un animal no humano, donde a dicho animal no humano se le inyecta una dosis de STZ de al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal.

[0022] Se describe también un método para la detección de un agente que es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA, que consiste en administrar un agente al modelo animal de EA producido por medio de inyección intracerebral de STZ a un animal no humano y determinar el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente, donde una mejora en el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA.

[0023] Se describe también un método para probar un tratamiento potencial para la EA, que consiste en administrar el tratamiento potencial al modelo animal de la EA producido por medio de la inyección intracerebral de STZ a un animal no humano y no determinar el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento potencial, donde una mejora en el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento potencial indica que el tratamiento es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA.

[0024] Se describe también un método para probar un agente para un potencial efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA, que consiste en administrar el agente a un modelo animal de EA producido por medio de una inyección de STZ a un animal no humano y determinar el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento potencial, donde una disminución en el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente potencialmente tiene un efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

[0025]

Las figuras 1A-1D muestran los niveles reducidos de insulina, IGF-I, y la expresión del receptor IGF-II en cerebros con EA demostrado utilizando tiempo real cuantitativo RT-PCR. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para la corteza frontal (A), el hipocampo (B), el hipotálamo (C). (D) Para mejor representar las diferencias regionales e intergrupo en la expresión del receptor de insulina, esos datos fueron regráficos a escala. Los valores-P significativos (incluida la evolución) se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 2A-2D muestran la expresión modificada de la insulina, el IGF-I y el IGF-II en la EA, demostrado utilizando tiempo real cuantitativo RT-PCR. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para la corteza frontal (A), el hipocampo (B), el hipotálamo (C). (D) Para mejor representar las diferencias regionales e intergrupo en la expresión del gen de insulina, esos datos fueron regráficos a escala. Los valores-P significativos (incluida la evolución) se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 3A-3H muestran la ubicación de la insulina (A-B), el IGF-I (C-D), el receptor de insulina (E-F) y la inmunoreactividad del receptor de IGF-I (G-H) en la EA (A,C,E,G) y el control de edad (B,D,F,H) del hipocampo usando la tinción inmunohistoquímica.

Las flechas apuntan hacia las neuronas marcadas.

Las figuras 4A-4E muestran la detección de la insulina, el IGF-I y la expresión del receptor IGF-I en cultivos neuronales primarios post-mitóticos diferenciados generados a partir de la corteza cerebral postnatal de la rata (CBM) y la corteza cerebral fetal de la rata (CTX), el hipocampo (HIPPO) y el hipotálamo (HYPO). Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para los niveles de expresión del receptor de insulina (A), del receptor de IGF-I (B), y del receptor de IGF-II (C). (D, E) Para mejor representar las diferencias regionales e intergrupo en la expresión del receptor del factor de crecimiento, los datos correspondientes a las neuronas del cerebelo (D) o corticales, las neuronas del hipocampo y del hipotálamo (E) fueron regráficos a escala.

Las figuras 5A-5E muestran la detección de insulina, IGF-I, y expresión de gen IGF-II en cultivos neuronales primarios post-mitóticos diferenciados generados a partir de la corteza del cerebelo postnatal de la rata (CBM), y la corteza cerebral fetal de la rata (CTX), el hipocampo (HIPPO) y el hipotálamo (HYPO). Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para los niveles de expresión de insulina (A), IGF-I

(B), e IGF-II (C). (D, E) Para mejor representar las diferencias regionales e intergrupo en la expresión del factor de crecimiento, los datos correspondientes a las neuronas del cerebelo (D) o corticales, las neuronas del hipocampo y del hipotálamo (E) fueron regraficados a escala.

Las figuras 6A-6G muestran los niveles reducidos de sustrato de receptor de insulina, tipo 1 (IRS-1) y la insulina deteriorada y los mecanismos de señalización IGFI en cerebros con EA. Los niveles IRS-1, 2, y 4 mRNA fueron medidos en la corteza frontal (A), el hipocampo (B) e hipotálamo (C) de la EA y los cerebros de control envejecidos utilizando cuantitativa en tiempo real RT-PCR. Los niveles de estado estacionario de tirosina fosforilada (PY) de los receptores de insulina (E) e IGF-I (G), y asociaciones entre la subunidad p85 catalíticamente activa de quinasa PI3 y el IRS-1 (D; que refleja la actividad de la quinasa PI3 asociado-PY-IRS-1) fueron evaluados en muestras de tejido del hipocampo mediante análisis Westernblot de inmunoprecipitados. La expresión de la proteína del receptor de insulina (INR; F) y del receptor IGFI (IGFI-R; H) fueron examinadas en muestras de tejido del hipocampo mediante análisis de transferencia Western directa. Los valores P-significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 7A-7E muestran los mecanismos de señalización de supervivencia deteriorados en los cerebros con EA. Los niveles de estado estacionario del (A) fosfo-Akt (p-Akt), (B) total Akt, (C) fosfo-glucógeno sintasa quinasa 3β (p-GSK- 3β), (D) total GSK- 3β , y (E) P-Actin fueron evaluados en muestras del hipocampo mediante análisis de transferencia Western. Los valores-P significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 8A-8H muestran la medición de la expresión del gen tau (A, B), de la proteína precursora de amiloide (APP; C, D), del transportador de glucosa 4 (GLUT4; E,F) y de la enzima degradante de la insulina (IDE; G,H) en la EA y el control del hipocampo (A,C,E,G) y el hipotálamo (B,D,F,H) que se demuestra utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los valores-P significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 9A-9C muestran niveles reducidos de la expresión del receptor de insulina y del receptor IGF con la progresión de la EA que se demuestra utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para el receptor de insulina (A), el receptor IGF-I (B) y el receptor IGF-II (C). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA con la prueba de significancia de Tukey-Kramer post-hoc. Los valores-P significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 10A-10C muestran una expresión reducida de la insulina, del IGF-I y del IGF-II con la progresión de la EA, que se demuestra utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para los genes polipéptidos de la insulina (A), el IGF-I (B) y el IGF-II (C). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA con la prueba de significancia de Tukey-Kramer post-hoc. Los valores-P significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 11A-11C muestran la relación entre la progresión de la EA y proteína tau (A) o de la proteína precursora amiloide (APP; B) la expresión de ARNm demostrado utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para los genes de la tau (A) y la APP (B). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA con la prueba de significancia de Tukey-Kramer post-hoc. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 12A-12C muestra un factor de crecimiento reducido unido a la progresión de la neurodegeneración de la EA. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para la unión de la insulina (A), el IGF-I (B), y el IGF-II (C). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA con la prueba de significancia de Tukey-Kramer post-hoc. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 13A-13L muestran niveles de unión de saturación del factor de crecimiento reducido con la progresión de la EA. Los gráficos representan la unión específica (proteína fmol/mg) $\pm$ 6 95% CI correspondiente a insulina (A-D), IGF-I (E-H) y el IGF-II (I-L) de unión en los cerebros con la EA en las etapas de Braak 0-1 (A, E, I), 2-3 (B, F, J), 4-5 (C, G, K), or 6 (D, H, L).

Las figuras 14A-14B muestran la relación entre la progresión de la EA y el contenido de colesterol en la membrana del cerebro (A) o los niveles de ATP en estado de equilibrio (B). Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de unidades de luz de fluorescencia (FLU)/mg proteína (A) o luminiscencia (B). Los datos se analizaron estadísticamente utilizando ANOVA con la prueba de significancia de Tukey-Kramer post-hoc. Los valores-P significativos (incluida la evolución) se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 15A-15D muestran la ausencia de destrucción de los islotes pancreáticos en el modelo STZ-ic. (A, B) Las secciones de control teñidas con hematoxilina y la eosina (A) y los páncreas tratados con STZ-ic (B) demuestran la arquitectura del tejido intacto e islotes que aparecen normales (flechas) en ambos grupos. (C, D) Las secciones adyacentes fueron inmunoteñidas con anticuerpos monoclonales a la insulina. La inmunoreactividad fue revelada mediante el método ABC utilizando diaminobencidina (precipitado marrón) como cromógeno. Las secciones fueron ligeramente teñidas por contraste con hematoxilina. La inmunorreactividad a la insulina prominente fue detectada en islotes pancreáticos (flechas) o ambos, las ratas de control (C) y las tratadas con STZ-ic (D). Los insertos (inferior derecha de los paneles C y D) muestran imágenes de alta magnificación de los islotes de insulina inmunorreactiva.

Las figuras 16A-16D muestran los efectos del STZ-ic en los niveles de glucosa en la sangre, el peso corporal y el tamaño del cerebro. (A) La concentración de glucosa en la sangre (mg/dl) se midió justo antes del sacrificio (día 14) utilizando el Medidor de Glucosa en la Sangre One-Touch Ultra.

(B) El peso corporal (gm) y (C) el peso del cerebro (mg) se midieron en el momento del sacrificio. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.D. del nivel de glucosa, del peso corporal y del tamaño del cerebro medido en 20 ratas por grupo. Las comparaciones intergrupales se hicieron utilizando las pruebas-t de Estudiantes (los valores-P significativos se indican sobre las barras). (D) La fotografía representativa en bruto de control (izquierda) cerebros de ratas tratadas con STZ-ic 14 días después del tratamiento. Tenga en cuenta el cerebelo

extremadamente pequeño (flechas) y múltiples pequeñas hemorragias meníngeas (flechas de doble punta) en el cerebro tratado con STZ-ic.

Las figuras 17A-17J muestran la neuropatología del STZ-ic. Los cerebros recogidos de las ratas de control (panel izquierdo) e STZ-ic (panel derecho) (día 14) fueron fijados y procesados para histopatología. Las secciones de parafina fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Las secciones coronales a través de los lóbulos frontales incluido el caudado-putamen (cp) (A, B), y lóbulo temporal con la formación del hipocampo y el tálamo (C,D), y la corteza del cerebelo (E,F) se muestran para control (A,C,E) y las ratas tratadas con STZ-ic (B,D,F) fueron fotografiadas con la misma ampliación. El tamaño mas pequeño del cerebro se asoció con la dilatación de los ventrículos (V), el marcado adelgazamiento de la corteza temporal (T), y el tamaño reducido de los ganglios basales (bg), el hipocampo (h), el hipotálamo y el tálamo (Th) en los cerebros tratados con STZ-ic. Los cerebelos de las ratas tratadas con STZ-ic se redujeron notablemente en tamaño (F) con respecto al control (E, G). El cerebelo de las ratas tratadas con STZ-ic tenía una laminación cortical mal definida, de capa simplificada y desorganizada, debido a la ausencia de capas celulares y capas moleculares granulares internas(igl) y externas (egl). En su lugar, la corteza del cerebelo con STZ-ic estaba repleto con un colección desorganizada de las grandes neuronas piramidales / elementos neuroblásticos que se parecían a las células de Purkinje (Pc) (F,H). Las secciones adyacentes se inmunotiñeron con anticuerpos monoclonales a p53. La inmunoreactividad se detectó utilizando el método ABC con DAB como cromógeno (precipitado marrón). Los fotomicrográficos el marcado representativo de control (I) y el lóbulo temporal con STZ-ic (J). Observe el aumento de la inmunoreactividad de p53 in las neuronas corticales (J) con STZ-ic comparado con el etiquetado casi indetectable en las neuronas corticales de control (I).

Las figuras 18A-18D muestran la pérdida de neuronas y oligodendroglia y el incremento de las poblaciones de células de astrocitos y microgliales en los lóbulos temporales de los cerebros tratados con STZ-ic (día 14). Los niveles de transcripción del mRNA correspondiente a la (A) proteína de unión de ARN Hu neuronal, (B) glucoproteína-1 asociada a la mielina (MAG-1), (C) proteína ácida glial fibrilar astrocítica (GFAP) y (D) microglial AIF-1, se utilizaron para detectar cambios patológicos en tipos de células del cerebro después del tratamiento con STZ-ic. Los gráficos representan la media 6 S.E.M. de los resultados obtenidos de 8-10 muestras por grupo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas-t Student. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 19A-19I muestran los efectos del STZ-ic sobre la expresión SNC del factor de crecimiento de la insulina y similares a la insulina (IGF) genes y receptores (día 14). Los gráficos representan la media 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para el (A) receptor de insulina (InR), (B) el receptor IGF1 (IGF-IR), (C) el receptor IGF-II (IGF-IIR), (D) la insulina, (E) IGF-I, (F) IGF-II, (G) el sustrato del receptor de insulina, tipo 1 (IRS-1), (H) IRS-2 y (I) IRS-4. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas-t Student. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 20A-20C muestran la reducción del factor de crecimiento del SNC vinculada a las ratas tratadas con STZ-ic. Los gráficos representan la media 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para unión específica de (A) insulina, (B) IGF-I, y (C) IGF-II. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas-t Student. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras.

Las figuras 21A-21G muestran índices incrementados de neurodegeneración en cerebros tratados con STZ-ic demostrado mediante análisis de transferencia Western. Los resultados representativos demostrar los niveles de expresión de estado estacionario de (A) proteína ácida gliofibrilar (GFAP), (B) kinasa sintasa fosfo-glicógena 3 (p-GSK-3 β / β (Ser21/9)), (C) total GSK-3 β , (D) fosfotau (pTau), (E) tau, (F) ubiquitina, y (G) β -Actina (control negativo) detectados en el tejido del lóbulo temporal mediante análisis de transferencia Western. Las flechas a la izquierda de cada panel indican la posición de los marcadores de peso molecular indicados a continuación cada flecha.

Las figuras 22A-22F muestran índices incrementados de neurodegeneración en cerebros tratados con STZ-ic demostrado por medio de tinción inmunohistoquímica. Las secciones del cerebro embebidas con parafina fueron inmunoteñidas con anticuerpos monoclonales para (A, B) GFAP, (C, D) phospho-tau, or (E, F) ubiquitina para demostrar el aumento de gliosis, fosforilación tau y ubiquitinación de la proteína en los cerebros tratados con STZ-ic (B, D, F) en relación a los cerebros de control (A, C, E). Todos los paneles representan perfiles representativos de marcado en el lóbulo temporal. La inmunoreactividad (A, B) GFAP se localizó en los astrocitos y fibrillas neurópilas gliales. La inmunoreactividad a la (C, D) pTau se incrementó en la perikarya neuronal cortical con el STZ-ic. La inmunoreactividad a la (E, F) ubiquitin se incrementó en los núcleos de las neuronas corticales con el STZ-ic así como otros tipos de células.

Las figuras 23A-23F muestran que that el STZ-ic aumenta la expresión de la proteína precursora amiloide (APP) y la acumulación de A β en el cerebro, similar a los hallazgos en la EA. La expresión de los genes (A) Tau y (B) APP se midió utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real con los valores normalizados a rRNA 18S. Los gráficos representan la media 6 S.E.M. de los resultados. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas-t Student. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras. Los cerebros de control (C) exhibieron mínima o nula inmunoreactividad para A β , mientras que los cerebros tratados con STZ-ic (D-F) tuvieron una destacada inmunoreactividad A β (D) en los cuerpos celulares neuronales (flechas), (E, F) microvasculatura del parénquima (bv) y (E,F) estructuras similares a las estructuras similares a placas del núcleo denso extracelular (flechas).

Las figuras 24A-24F muestran la pérdida de neuronas y los mecanismos de señalización de insulina/IGF deficientes se correlacionan con la expresión reducida de acetiltransferasa colina (ChAT) en los cerebros tratados con STZ-ic. Se detectaron y cuantificaron transcripciones de ARNm (A) de ChaT y (B) de la

acetilcolinesterasa (AChE) mediante RT-PCR en tiempo real con los valores normalizados a 18S ARN ribosomal medido en las mismas muestras. Los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M. de los resultados obtenidos para los genes (A) ChAT y (B) AChE. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante pruebas-t Student. Los valores P- significativos se indican en los gráficos de barras. Para caracterizar las alteraciones inducidas por el STZ-ic en la expresión de ChAT y AChE, las secciones de cerebro embebidas con parafina fueron inmunoteñidas con anticuerpos para ChAT (C, D) o AChE (E, F). La inmunoreactividad se detectó con anticuerpo secundario biotinilado, reactivos ABC y DAB. En los cerebros en control (C, E), la inmunoreactividad ChAT fue relativamente más elevada, mientras que la inmunoreactividad AChE fue inferior que la observada en los cerebros tratados con STZ-ic (D, F). La inmunoreactividad ChAT se detectó en las neuronas corticales de control (C; flechas), mientras que se detectaron elevados niveles de AChE en las fibras neurópilas y en las neuronas corticales en los cerebros tratados con STZ-ic (D; flechas).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0026] La presente invención se refiere al importante papel que cumple en la aparición de la EA por las vías de señalización de la insulina/IGF en el cerebro. Se ha detectado una disminución significativa en los niveles de varios factores implicados en estas vías de señalización en los cerebros de sujetos con EA comparado a sujetos saludables. Por lo tanto, la invención se refiere a los métodos de diagnóstico de la EA en un sujeto mediante la detección de una disminución en el nivel o función del factor I (IGF-I) similar a la insulina en dicho sujeto. Se describen también, en este documento, los métodos de tratamiento, mejora y prevención de la EA en un sujeto mediante la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

[0027] El término "Enfermedad de Alzheimer", tal como se usa en este documento, se refiere a un desorden neurodegenerativo y comprende la EA familiar y esporádica. Los síntomas indicativos de EA en sujetos humanos normalmente incluyen, pero no se limitan a, demencia leve a severa, deterioro progresivo de la memoria (que van desde falta de memoria leve a la desorientación a la pérdida grave de memoria), escasas habilidades visuoespaciales, cambios en la personalidad, escaso control de impulsos, falta de juicio, desconfianza en los demás, aumento obstinación, intranquilidad, escasa capacidad de planificación, toma de decisiones deficiente y retiro social. Las patologías distintivas dentro de los tejidos cerebrales incluyen placas amiloide [beta] neurítica extracelular, ovillos neurofibrilares, degeneración neurofibrilar, degeneración granulovascular neuronal, pérdida sináptica y extensa muerte celular neuronal.

[0028] Los términos "sujetos que muestran patología resultante de EA" y [0057] "sujetos sospechosos de mostrar la patología resultante de EA," tal como se utilizan en este documento, se refieren a un sujeto que se identifica como que tengan o puedan tener EA basado en los síntomas de la EA conocidos y en la patología.

[0029] El término "sujetos con riesgo de presentar patología resultante de la EA," tal como se usa en este documento, se refiere a un sujeto en riesgo de desarrollar la EA (por ej., debido a la edad o a patrones hereditarios familiares de EA en la familia del sujeto).

[0030] En un aspecto, la invención se refiere a un método para diagnosticar la EA en un sujeto, que consiste en detectar la disminución en el nivel del factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) en un fluido cefalorraquídeo obtenido de dicho sujeto, donde una disminución en el nivel de IGF-I en relación con el nivel en un sujeto sano es un indicador de diagnóstico de EA.

[0031] Se describe también un método para identificar a un sujeto en riesgo de desarrollar EA, que consiste en determinar el nivel o función de al menos un factor un factor en la vía de señalización de insulina / IGF en dicho sujeto, en donde una disminución en el nivel de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en sujetos sanos es un indicador de diagnóstico de un riesgo de desarrollar EA.

[0032] En ciertas representaciones de la invención, se determina el nivel o función de al menos 2, 3, 4, 5, o 6 factores en la vía de señalización de la insulina/IGF.

[0033] Los métodos de diagnóstico de la invención pueden realizarse en sujetos que muestran patología resultante de la EA, sujetos sospechosos de presentar patología resultante de la EA y sujetos en riesgo de presentar la patología resultante de la EA.

[0034] En una representación de la invención, se determinó el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF en el SNC.

[0035] En una representación, los métodos de diagnóstico son realizados in vivo. Por ejemplo, las técnicas de imagen (por ej., imagen de resonancia magnética, tomografía axial computarizada, tomografía computarizada por emisión de fotón único, Rayos X, ultrasonido) pueden utilizarse en combinación con anticuerpos marcados de manera detectable, ligandos, enzimas sustratos, etc., para determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina / IGF en un sujeto. Ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero no se limitan

a, marcadores radioactivos, fluorescentes, paramagnéticos y superparamagnéticos. Cualquier técnica de imagen in vivo adecuada conocida en la técnica puede utilizarse en la presente invención.

Ejemplos de técnicas de imagen se describen en las Patentes Estadounidenses N° 6,737,247, 6,676,926, 6,083,486, 5,989,520, 5,958,371, 5,780,010, 5,690,907, 5,620,675, 5,525,338, 5,482,698 y 5,223,242.

[0036] En otra representación, los métodos de diagnóstico son realizados in vitro, por ej., utilizando una muestra biológica. Una muestra biológica puede ser un tejido o fluido a partir de un sujeto que es adecuado para detectar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF. Ejemplos de muestras útiles incluyen aunque no se limitan a, tejidos neurológicos de biopsias, sangre (por ej., sangre del cerebro), plasma, fluido seroso, fluido cefalorraquídeo, saliva, orina y ganglios.

[0037] Los factores en la vía de señalización de insulina / IGF que pueden detectarse y medirse incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I), IGF-II, receptor de insulina, receptor del IGF-I, receptor del IGF-II, receptor de insulina fosforilado de tirosina, receptor de IGF-I fosforilado de tirosina, receptor de IGF-II fosforilado de tirosina, sustrato-1 receptor de insulina (IRS-1), IRS-2, IRS-4, fosforilado de tirosina IRS-1, fosforilado de tirosina IRS-2, fosforilado de tirosina IRS-4, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3 quinasa), la subunidad p85 de la quinasa PI3, Akt, fosfo-Akt, la glucógeno sintasa quinasa-3β (GSK-3β), y la fosfo-GSK-3β. Las funciones que pueden medirse incluyen, pero no se limitan a, capacidad de unión a ligando del receptor de insulina, receptor IGF-I o receptor IGF-II, actividad de la quinasa del receptor de insulina, receptor IGF-I o receptor IGF-II, interacción de la subunidad p85 de la quinasa PI3 con IRS-1, IRS-2 o IRS-4 fosforilado, unión de fosforilado IRS-1, IRS-2, o IRS-4 a la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2), SHPTP-2 proteína tirosina fosfatasa o la subunidad p85 de la quinasa PI3, la actividad enzimática de la quinasa proteína mitogen-activada (MAPKK), Erk MAPK, Akt/Proteína quinasa B, GSK-3β.

[0038] El nivel o función estándar de un factor en la vía de señalización de insulina/IGF en sujetos sanos puede representar el promedio de un adecuado número de miembros de la población general, típicamente al menos 10, más preferiblemente 50, y aún más preferiblemente más de 100-500 miembros de la población general. En una representación, el nivel estándar en sujetos sanos se determina de manera de emparejar por edad, por ej., el sujeto sobre el cual se han practicado los métodos de la invención se compara con sujetos sanos de la misma edad.

[0039] Los niveles de factores en la vía de señalización de insulina/IGF pueden medirse a nivel de la proteína o del RNA (por ej., mRNA).

[0040] Cualquier método conocido en la técnica para la cuantificación de proteínas específicas en una muestra biológica puede utilizarse en los presentes métodos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos, transferencia de Western, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, electroforesis de gel, electroforesis capilar, cromatografía de columna, ensayos de unión a ligando y ensayos enzimáticos. Véase, por ej., Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Protocolos Actuales en Biología Molecular), John Wiley & Sons, New York 3ª Edición, (1995).

[0041] En una representación preferida, las proteínas are quantitated using inmunoensayos. Tales ensayos incluyen ensayos de unión homogéneas o heterogéneas. Esos ensayos pueden estar en la forma de ensayos de unión no competitiva o ensayos en el que los analitos compiten con ligandos. Cualquier método conocido a un experto ordinario en la técnica que detecta la unión entre un analito (por ej., una proteína de interés) y un reactivo pueden utilizarse en la presente invención. Los ensayos para utilizar en la presente invención son métodos preferentemente simples y de bajo costo, y pueden también involucrar métodos de alto rendimiento, capaz de filtrar grandes números de muestras individuales de un modo rápido. Esto incluye, por ejemplo, métodos métodos que utilizan microglóbulos o placas que tienen múltiples cavidades.

[0042] Los anticuerpos frente a factores en la vía de la insulina/IGF, tales como la insulina, IGF-I, IGF-II, el receptor de insulina, el receptor de IGF-I, el receptor de IGF-II, IRS-1, IRS-2, la subunidad p85 de quinasa PI3, Gsk-3β, fosfo-Gsk-3β, Akt, y fosfo-Akt, están disponibles comercialmente (véase por ej., Cell Signaling (Beverly, MA); Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)). De forma alternativa, los anticuerpos pueden cultivarse utilizando procedimientos técnicos estándar conocidos en la técnica. Véase, por ej., Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Protocolos Actuales en Biología Molecular), John Wiley & Sons, New York 3ª Edición, (1995).

[0043] Ejemplos de ensayos (por ej., inmunohistoquímica, radioinmunoensayo, unión de ligandos, interacción proteína:proteína) para el nivel o función de factores en la vía de la insulina/IGF, que incluyen la insulina, el receptor de insulina, IGF-I, IGF-II, el receptor del IGF-I, los subtipos 1-4 IRS, IRS fosforilada, Grb-2, SHPTP-2, p85, quinasa PI3, Akt y Gsk-3β, se describen en Frolich et al., J. Neural Transm. 105:423 (1998); Folli et al., Mol. Neurobiol. 13:155 (1996); Unger et al., Prog. Neurobiol. 36:343 (1991); Saltiel et al., Trends Cell Biol. 12:65 (2002); Giovannone et al., Diabetes Metab. Res. Rev. 16:434 (2000); Shpakov et al., Membr. Cell Biol. 13:455 (2000); Sun et al., Mol. Cell. Biol. 13:7418 (1993); Lam et al., J. Biol. Chem. 269:20648 (1994); Kulik et al., Mol. Cell. Biol. 17:1595 (1997);

Delcommenne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11211 (1998); Pap et al., J. Biol. Chem. 273:19929 (1998); Connor et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 49:283 (1997); Jafferali et al., Synapse 38:450 (2000); Frolich et al., Ann. NY Acad. Sci. 893:290 (1999); Fernandes et al., Endocrine 16:227 (2001) y la Patente Estadounidense N° 5,198,340.

[0044] Cualquier ensayo homogéneo bien conocida en la técnica puede utilizarse en la presente invención para determinar el nivel de las proteínas específicas. Por ejemplo, se pueden utilizar radioensayos, ensayos de polarización de fluorescencia, ensayos de fluorescencia de tiempo de resolución, ensayos de biotina-avidina, ensayos ligados a enzimas y ensayos electroquimioluminiscentes. Cuando se etiqueta el reactivo, el ensayo puede ser un ensayo de unión no competitiva en el que se determina la capacidad de los analitos (proteína de interés) para unirse al reactivo. Donde se marcan los analitos, el ensayo puede ser un ensayo de unión competitiva en el que se determina la capacidad de una proteína para desplazar el analito unido al reactivo.

[0045] Un ensayo de unión homogéneo utilizado en la presente invención y que utiliza la fluorescencia para detectar la analitelproteína vinculante, pueden emplear analito marcado con fluorescencia o reactivo marcado con fluorescencia. Se puede utilizar cualquier método conocido para un experto ordinario en la técnica para vincular el fluoróforo a un polipéptido o reactivo de interés. Véase, por ej., Richard P. Haugland, Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Manual de Sondas Fluorescentes y Productos Químicos de Investigación) 1992-1994 (5ª ed., 1994, Molecular Probes, Inc.).

[0046] Una representación de la invención se refiere a un ensayo fluorescente no competitivo. Tal ensayo emplea reactivo unido covalentemente a un fluoróforo. El reactivo libre tiene una intensidad de fluorescencia superior que el reactivo unido a un analito (Hwang et al., Biochemistry 31:11536 (1992)). Una vez que se forma el complejo de analito/reactivo, éste gira y da vueltas más lentamente y tiene menos intensidad de fluorescencia ("Introduction to Fluorescence Polarization," (Introducción a la Polarización de la Fluorescencia). Pan Vera Corp., Madison, WI, June 17, 1996; Perrin, J. Phys. Rad. 1:390 (1926)). Por lo tanto, cuando el analito y el reactivo se unen, la intensidad de la fluorescencia del reactivo marcado disminuye en forma proporcional a la unión.

[0047] Los ensayos de fluorescencia homogénea competitiva se pueden utilizar también en la presente invención. Los ensayos competitivos son bien conocidos en la técnica y cualquier método puede utilizarse en la presente invención. Por ejemplo, la Patente Estadounidense N° 6,511,815 describe un ensayo para la cuantificación de unión competitiva de compuestos de ensayo para proteínas que utilizan polarización de la fluorescencia.

[0048] Alternativas de ensayos homogéneos para usar en la invención incluyen los descritos en la Patente Estadounidense N° 6,492,128; la Patente Estadounidense No. 6,406,913; la Patente Estadounidense N° 6,326,459; la Patente Estadounidense N° 5,928,862; la Patente Estadounidense N° 5,876,946; la Patente Estadounidense N° 5,612,221; y la Patente Estadounidense N° 5,556,758.

[0049] El experto en la materia reconocerá que se pueden utilizar también radiomarcadores en ensayos de unión competitiva homogénea. En tales ensayos, el reactivo (por ej., anticuerpo) es radiomarcado y se pudo equilibrar con proteína en solución. Luego, la muestra se introduce dentro de la solución y pueden equilibrarse. Se separa, entonces, el anticuerpo (unido ya sea a antígeno radiomarcado o a la muestra) del antígeno no unido y la muestra no unida. Esto puede detectarse mediante un contador de escintilación, fotoradiografía u otras procedimientos bien conocidos en la técnica.

[0050] La detección y/o cuantificación de una proteína de interés a través de la unión al reactivo puede también lograrse utilizando ensayos heterogéneos. Los ensayos heterogéneos para su uso en la presente invención pueden basarse en radioensayos, ensayos de polarización de fluorescencia, ensayos de fluorescencia de tiempo de resolución, ensayos de biotina-avidina, ensayos ligados a enzimas y ensayos de electroquimioluminiscente. En ensayos heterogéneos, un primer componente está unido a una fase sólida tal como un glóbulo u otro sustrato sólido y uno o más componentes adicionales están en solución. Por ejemplo, el antígeno puede estar unido a una BEAD u otro sustrato sólido y el anticuerpo marcado se introduce como una solución. La marca puede ser una radiomarca, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador cromogénico u otro marcador bien conocido en la técnica. Después que la mezcla se equilibra y se forma el complejo del antígeno/anticuerpo, se introduce una solución de muestra que permite equilibrarla para formar los complejos de antígeno/anticuerpo. Los glóbulos o componentes sólidos se separan de las soluciones. Esto puede hacerse, por ejemplo, utilizando campos magnéticos en los que los glóbulos son campos magnéticos. De manera alternativa, donde el antígeno está unido a un sustrato sólido, la separación puede producirse simplemente enjuagando el sustrato sólido con agua o un tampón para eliminar cualquier solución que contenga un anticuerpo marcado como no unido o muestra no unida. Se mide el grado en el que el antígeno permanece asociado con el anticuerpo marcado como detectables. Tales mediciones se puede realizar mientras el antígeno permanece unido al glóbulo o sustrato sólido. De manera alternativa, tales mediciones pueden realizarse después que el antígeno ha sido removido a partir del glóbulo o sustrato sólido. En tales ensayos de unión competitiva, disminuciones en la señal asociada con la marca detectable están proporcionalmente a los aumentos relacionados con la capacidad del anticuerpo en las muestras para unirse al antígeno mediante el desplazamiento del anticuerpo.

[0051] El experto en la materia reconocer que el anticuerpo puede ser también el componente unido a los glóbulos o al sustrato sólido. En tales ensayos, el antígeno marcado se introduce como una solución y se equilibra para formar complejos de antígeno/anticuerpo. La marca puede ser una radiomarca, un marcador quimioluminiscente, un marcador fluorescente, un marcador cromogénico u otro marcador bien conocido en la técnica. Luego, se añade una muestra como una solución. Si una muestra desplaza a un anticuerpo, a continuación, el antígeno se caerá de nuevo en solución y no estar ligado al glóbulo o sustrato sólido a través del anticuerpo. Como se describe más arriba, el glóbulo o sustrato sólido es retirado de la solución pero se conserva la solución para medir el alcance del marcador detectable. Aquí, los incrementos de señal asociado con la marca detectable son proporcionales a la capacidad de una muestra para unirse al antígeno.

[0052] Los soportes de la fase sólida para su uso en la presente invención incluyen cualquier soporte conocido en la técnica que es capaz de unir el antígeno al anticuerpo. Esto incluye, por ejemplo, vidrio y polímeros naturales y sintéticos tales como agarosas, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosa natural y modificada, poliácridamidas y magnetita. El material de soporte puede tener prácticamente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula de unión al soporte sea capaz de unirse un anticuerpo o antígeno. De este modo, la configuración del soporte puede ser esférica, como un glóbulo, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla, o semiesférica, tal como el pocillo de una placa de microtitulación. De forma alternativa, la superficie puede ser plana tal como una hoja, tira de prueba, etc. Los expertos en la técnica observarán muchos otros vehículos adecuados para unir el anticuerpo al antígeno, o serán capaces de determinar los mismos mediante el uso de experimentación de rutina.

[0053] Un ejemplo de un ensayo heterogéneo para uso en la presente invención es el radioensayo. Una buena descripción de un radioensayo puede encontrarse en el Laboratorio de Técnicas y Bioquímica en Biología Molecular, by Work, T. S., et al., North Holland Publishing Company, NY (1978), con referencia particular al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" (Una Introducción al Ensayo Radioinmune y Técnicas Relacionadas) by Chard, T. Ejemplos de otros radioensayos competitivos se proporcionan en las Patentes Estadounidenses N° 3,937,799; 4,102,455; 4,333,918 y 6,071,705. Inherente a tales ensayos es la necesidad es la necesidad de separar el componente glóbulo o sustrato unido del componente de la solución. Se han desarrollado diversos métodos para lograr la separación requerida, incluidos los que se ejemplifican en las Patentes Estadounidenses N° 3,505,019; 3,555,143; 3,646,346; 3,720,760; and 3,793,445. El experto en la materia reconocerá que la separación puede incluir el filtrado, centrifugado, lavado o el drenado del sustrato sólido para asegurar una separación eficiente de las fases de sustrato unido y la solución.

[0054] Se puede detectar el isótopo radioactivo o radiomarcador a través de medios tales como el uso de un contador gamma o contador por escintilación o por autoradiografía. Los isótopos que son particularmente útiles para el objetivo de la presente invención son: ^3H , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{31}P , ^{14}C , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr and ^{201}Tl . Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados, que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de estos marcadores a antígeno o anticuerpo puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar comúnmente conocido por los expertos normales en la técnica. Técnicas comunes son descritas por Kennedy, et al. (Clin. Chim. Acta 70:1 (1976)), and Schurs et al. (Clin. Chim. Acta 81:1 (1977)). En una representación particular, uno o más átomos de carbono y/o hidrógeno de un antígeno o anticuerpo son reemplazados por ^3H y ^{14}C , mediante métodos bien conocidos de la técnica.

[0055] Marcadores alternativos para uso en los ensayos heterogéneos de la presente invención incluyen marcadores quimioluminiscentes, tales como los descritos en la Patente Estadounidense N° 4,380,580; y en los marcadores de sustratos de las enzimas, tales como aquellos ensayos descritos en la Patente Estadounidense N° 4,492,751. Puede utilizarse, por ejemplo, una etiqueta fluorescente.

[0056] Un ensayo heterogéneo alternativo para uso en la presente invención es el ensayo basado en la biotina/avidina. Para ejemplos de las diversas formas en las que este ensayo se puede llevarse a cabo en la presente invención, véase, por ej., Blake et al. Anal. Biochem. 272:123 (1999); Cho et al. Anal. Sci. 15:343 (1999); Choi et al. Bull. Korean Chem. Soc. 22:417 (2001); las Patentes Estadounidenses N° 6,096,508; 4,863,876; 4,228,237. En la presente invención, el avidina puede identificarse con cualquier marca. Preferentemente, la avidina se etiqueta de manera fluorescente o se lo conjuga a una enzima. Cualquier enzima marcada de forma detectable puede utilizarse en la presente invención. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano silvestre, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, y glucosa oxidasa.

[0057] Para medir el nivel de un ARN específico, cualquier ensayo conocido en la técnica para la detección de ácidos nucleicos puede utilizarse en la invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, transcripción inversa y ensayos de amplificación, ensayos de hibridación, transferencia de Northern, transferencia de punto, hibridación in situ, electroforesis en gel, electroforesis capilar, y cromatografía en columna. Véase, por ej., Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 3rd Edition, (1995); Sambrook et al., Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1-3 (1989). El ensayo puede detectar el ARN mismo o un ADNc producido mediante transcripción inversa del ARN. Los ensayos pueden realizarse directamente en muestras biológicas o sobre ácidos nucleicos aislados a partir de las muestras.

[0058] Los ensayos de detección de ácido nucleico pueden basarse en cualquier característica de la molécula de ácido nucleico, tal como su tamaño, secuencia y, si es el ADN, la susceptibilidad a la digestión por endonucleasas de restricción. La sensibilidad de tales ensayos pueden incrementarse al modificar la forma en que se informa o se señala la detección al observador. Así, por ejemplo, los ensayos de sensibilidad pueden incrementarse a través del uso de reactivos marcados como detectables. Una amplia variedad de tales marcas pueden utilizarse para este propósito. Los marcadores detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes y marcadores enzimáticos. La Patente Estadounidense N° 4,581,333 describe el uso de marcadores enzimáticos para incrementar la sensibilidad en los ensayos de detección. Los marcadores radioisotópicos se describen en las Patentes Estadounidenses N° 4,358,535 y 4,446,237. Los marcadores fluorescentes (EP 144,914), los marcadores químicos (Patentes Estadounidenses N° 4,582,789 y 4,563,417), y las bases modificadas (EP 119,448) también se han utilizado en un esfuerzo por mejorar la eficiencia con que la detección puede llevarse a cabo.

[0059] Muchos métodos actuales de identificación y cuantificación de ácidos nucleicos se basan en técnicas de amplificación y / o hibridación. Si bien muchas de ellas contemplan una fase de separación, varias permiten la detección de ácidos nucleicos sin separar el cebador o sonda marcada a partir de la reacción que se ha generado. Esos métodos tienen numerosas ventajas en comparación con los métodos basados en gel, tales como electroforesis en gel y análisis de transferencia puntual, por ejemplo, y requiere menos tiempo, permite un alto rendimiento, previene la contaminación por arrastre y permite la cuantificación mediante la detección en tiempo real. La mayoría de esos métodos actuales son métodos de fluorescencia basados en soluciones que utilizan dos cromóforos. Esos métodos utilizan el fenómeno de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) en la que se transfiere la energía de un radical fluorescente excitado a un molécula aceptora cuando las dos moléculas están en estrecha proximidad la una de la otra. Esta transferencia impide el radical fluorescente excitado a partir de la liberación de la energía en la forma de un fotón de luz así como el enfriamiento de la fluorescencia del radical fluorescente. Cuando una molécula aceptora no está lo suficientemente cerca, no se produce la transferencia y el radical fluorescente excitado puede entonces emitir fluorescencia. Las principales desventajas de los sistemas basados en FRET son el costo de requerir la presencia de dos nucleótidos modificados en un oligonucleótido de detección y la posibilidad de que la eficiencia de la extinción pueda no ser suficiente para proporcionar una diferencia utilizable en señal bajo un conjunto dado de condiciones de ensayo. Otros métodos conocidos que permiten la detección sin separación son: la transferencia de energía de resonancia de luminiscencia (LRET) en la que la transferencia de energía se produce entre metales lantánidos sensibilizados y tintes aceptores (Selvin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10024 (1994)); y el cambio de color de los tintes excimer de formación donde dos pirenos adyacentes pueden formar un excimer (dímero fluorescente) en la presencia del objetivo complementario, que resulta en un pico de fluorescencia detectable desplazado (Paris et al., Nucleic Acids Re. 26:3789 (1998)).

[0060] Diversos métodos son conocidos por los expertos en la técnica para la amplificación de moléculas de ácido nucleico. En general, se usa una molécula de ácido nucleico objetivo como plantilla para extensión de un cebador de oligonucleótido en una reacción catalizada por la polimerasa. Por ejemplo, Panet et al. (J. Biol. Chem. 249:5213 (1974)) demuestran la replicación de plantillas desoxiribopolinucleótido unido a la celulosa. Kleppe et al. (J. Mol. Biol. 56:341 (1971)) describe el uso de moléculas de ADN de cadena doble y sencilla como plantillas para la síntesis del ADN complementario.

[0061] Otro procedimiento conocido de amplificación del ácido nucleico incluye la transcripción basada en sistemas de amplificación (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989); WO 88/10315). Se han utilizado también los esquemas basados en ligamiento ("Reacción en Cadena de Ligamiento") de dos o más oligonucleótidos en la presencia de un ácido nucleico objetivo que tiene una secuencia complementaria para la secuencia del producto de la reacción de ligamiento (Wu et al., Genomics 4:560 (1989)). Otros métodos adecuados para la amplificación de ácido nucleico basados en la ligación de dos oligonucleótidos después de la hibridación a los ácidos nucleicos complementarios son conocidos en la técnica.

[0062] El WO 89/06700 describe un esquema de amplificación de secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia de promotor/cebador a un ADN objetivo monocatenario ("ssDNA") seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevas plantillas a partir de las transcripciones de ARN resultantes.

[0063] El EP 329,822 describe un procedimiento de amplificación alternativa denominado Amplificación de Ácido Nucleico Basado en la Secuencia (NASBA). El NASBA es un proceso de amplificación del ácido nucleico que implica sintetizar cíclicamente ARN de una sola hebra ("ssRNA"), ssDNA, y ADN (dsDNA). El ssARN es una primera plantilla para un primer cebador oligonucleótido, que es alargada por la transcriptasa inversa (ARN dependiente de la polimerasa de ADN). Se remueve entonces el ARN a partir del ADN resultante:ARN dúplex por la acción de la ribonucleasa H (RNasa H, un RNasa específica para ARN en un dúplex con ADN o ARN). El ADNss resultante es una segunda plantilla para una segunda imprimación. El segundo cebador incluye las secuencias de un promotor ARN RNA de polimerasa (ejemplificado por T7 ARN polimerasa) situado a 5' en la secuencia del cebador que se hibrida a la plantilla ssDNA. Este cebador, entonces, extendido por una polimerasa ADN (ejemplificado por el gran fragmento "Klenow" de E. coli ADN polimerasa I), lo que resulta en la producción de una molécula dsADN, que tiene una secuencia idéntica a la de la porción del ARN original situado located entre los cebadores y que tiene, además,

en un extremo, una secuencia promotora. Esta secuencia promotora puede utilizarse por la ARN polimerasa apropiada para hacer muchas copias ARN del ADN. Estas copias pueden, entonces, volver a entrar en el ciclo dando lugar a una amplificación muy rápida. Con la adecuada elección de enzimas, esta amplificación puede hacerse isotérmicamente sin la adición de enzimas en cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este proceso, la secuencia de inicio puede elegirse ya sea en la forma de ADN o ARN.

[0064] La Patente Estadounidense N° 5,455,166 y EP 684 315 describen un método denominado Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA). Este método se realiza a una sola temperatura y utiliza una combinación de una polimerasa, una endonucleasa y un trifosfato nucleósido modificado para amplificar fragmentos monocatenarios de una secuencia de ADN objetivo. Una secuencia objetivo está fragmentada, se hace monocatenaria y se hibrida a un cebador que contiene un reconocimiento del sitio para una endonucleasa. El complejo cebador:objetivo se extiende con una enzima polimerasa utilizando una mezcla de trifosfatos de nucleósidos, uno de los cuales es modificado. El resultado es una molécula dúplex que contiene la secuencia objetivo original y una secuencia de reconocimiento de endonucleasa. Una de las hebras que componen la secuencia de reconocimiento se deriva a partir del cebador y la otra es un resultado de la es el resultado de la reacción de extensión. Desde que se realiza la reacción de extensión utilizando un nucleósido modificado, se modifica una hebra del sitio de reconocimiento y se hace resistente a la digestión endonucleasa. La molécula dúplex resultante se pone en contacto luego con una endonucleasa que divide la hebra no modificada causando una escisión. La hebra escindida es extendida por una por una enzima polimerasa que carece de 5'-3' exonucleasa lo que resulta en el desplazamiento de una hebra escindida y en la producción de una nueva molécula dúplex. La nueva molécula dúplex puede, entonces, iniciar múltiples rondas de escindir y extender para producir múltiples copias de una secuencia objetivo.

[0065] El más ampliamente utilizado método de ampliación de ácido nucleico es la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Se proporciona una detallada descripción de la PCR en las siguientes referencias: Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 (1986); EP 50,424; EP 84,796; EP 258,017; EP 237,362; EP 201,184; Patentes Estadounidenses N° 4,683,202; 4,582,788; 4,683,194. En su forma más simple, la PCR implica la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de doble hebra objetivo. La secuencia de doble hebra se desnaturaliza y un cebador de oligonucleótido se hibrida para cada una de las hebras simples resultantes. Las secuencias de los cebadores se seleccionan, entonces, ellas pueden hibridar en las posiciones que flanquean la parte de la secuencia del ácido nucleico de hebra doble que se amplificará. Los oligonucleótidos se extienden en una reacción con una enzima de polimerasa, nucleótidos trifosfato y los cofactores adecuados que resultan en la formación de dos moléculas de doble hebra cada una que contienen la secuencia objetivo. Cada ronda subsecuente de reacciones desnaturalización, de hibridación y de extensión da como resultado una duplicación del número de copias de la secuencia objetivo como productos de extensión a partir de rondas anteriores sirven como plantillas para etapas de replicación subsiguientes. En consecuencia, la PCR proporciona un método para incrementar de manera selectiva la concentración de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia particular incluso cuando esa molécula no se haya purificado previamente y esté solo presente en una copia simple en una muestra particular. El método puede utilizarse para amplificar tanto ácidos nucleicos simples como dobles. La esencia del método implica el uso de dos oligonucleótidos para servir como cebadores para la plantilla dependiente, la replicación mediada por polimerasa de la molécula de ácido nucleico deseada.

[0066] Los métodos para detectar productos de amplificación de ácido nucleico habitualmente usan electroforesis en gel, que separan el producto de amplificación de los cebadores sobre la base de una diferencia de tamaño. De manera alternativa, los productos de amplificación pueden detectarse mediante inmovilización del producto, lo que permite eliminar cebadores libres (por ejemplo, en el análisis de transferencia puntual) e hibridación de sondas específicas mediante métodos de hibridación de fase sólida tradicionales. Se han descrito iversos métodos para monitorear el proceso de amplificación sin separación previa del cebador o las sondas. Todos esos métodos se basan en la FRET.

[0067] Un método descrito en la Patente Estadounidense N° 5,348,853 y en Wang et al., Anal. Chem. 67:1197 (1995), utiliza un sistema de transferencia de energía en el que la transferencia de energía ocurre entre dos fluoróforos en la sonda. En este método, la detección de la molécula amplificada se lleva a cabo en el recipiente de reacción de amplificación, sin necesidad de una etapa de separación. El método de Wang et al. utiliza un oligonucleótido "disipador de energía" complementario para el cebador inverso. Los oligonucleótidos "disipador de energía" y del cebador inverso tienen marcadores de donante y aceptor, respectivamente. Previo a la amplificación, los oligonucleótidos marcados forman un dúplex cebador en el que la transferencia de energía se produce libremente. Luego, la PCR asimétrica se lleva a cabo a su fase logarítmica tardía antes que una de las hebras objetivo sea significativamente sobreproducida.

[0068] Un segundo método para detección de un producto de amplificación sin separación previa de cebador y producto es el ensayo de PCR nucleasa 5' (también conocida como ensayo TAQMAN®) (Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276 (1991); Lee et al., Nucleic Acids Res. 21:3761 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de un producto PCR específico mediante hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente marcada (la sonda TAQMAN®) durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste en un oligonucleótido marcado con ambos, un colorante indicador fluorescente y un colorante inhibidor. Durante la PCR, esta sonda se escinde mediante la actividad exonucleasa-5' de la polimerasa del ADN si se hibrida con el segmento que se está

amplificando. La escisión de la sonda genera un incremento en la intensidad de la fluorescencia del colorante indicador. En el ensayo TAQMAN®, el donador e inhibidor se encuentran preferiblemente al final del 3'- y 5' de la sonda, debido al requisito de que se lleve a cabo la hidrólisis 5'-3' entre el fluoróforo y el inhibidor puede cumplirse solo cuando estos dos radicales no están demasiado cerca el uno del otro (Lyamichev et al., Science 260:778 (1993)).

[0069] Otro método de detección de productos de amplificación (a saber BALIZAS MOLECULARES) se basa en el uso de transferencia de energía utilizando una "sonda fluorescente" descrita por Tyagi and Kramer (Nature Biotech. 14:303 (1996)). Este método emplea sondas de hibridación de oligonucleótidos que pueden formar estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (ya sea el extremo 5' o el extremo 3'), hay un fluoróforo donante y en el otro extremo, un radical aceptor. En el caso del método de Tyagi y Kramer, el radical aceptor es un inhibidor, es decir, el aceptor absorbe la energía liberada por el donante, pero no emite fluorescencia por sí mismo. En consecuencia, cuando la baliza está en la conformación abierta, se puede detectar la fluorescencia del fluoróforo donante, mientras que cuando la baliza está en la conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se inhibe. Cuando se utiliza en la PCR, la sonda fluorescente, que se hibrida con una de las hebras del producto de la PCR, está en "conformación abierta," y se detecta la fluorescencia, mientras que los que quedan sin hibridar no emiten fluorescencia. Como resultado, la cantidad de fluorescencia se incrementará tanto como se incrementa la cantidad de producto de la PCR y, en consecuencia, puede utilizarse como una medida del progreso de la PCR.

[0070] Otro método de detección de productos de amplificación que se basa en el uso de la transferencia de energía es el método SUNRISE PRIMER de Nazarenko et al. (Nucleic Acids Res. 25:2516 (1997); Patentes Estadounidenses N° 5,866,336). Los SUNRISE PRIMERS se basan en el FRET y otros mecanismos de un inhibidor no fluorescente. Los SUNRISE PRIMERS consisten en un cebador de hebra única con estructura de horquilla en su extremo-5'. El vástago de la horquilla está marcado con un par donador/inhibidor. La señal se genera sobre el desarrollo y la replicación de la secuencia de horquilla por medio de la polimerasa.

[0071] Otro método de detección de productos de amplificación es la PCR cuantitativa en tiempo real (Xu et al., J. Biol. Chem. 278:26929 (2003); Yeon et al., Hepatology 38:703 (2003)). En esta técnica un indicador fluorescente (por ej., un colorante intercalante tal como el SYBR Green (Sonda Molecular)) se utiliza para monitorear como se produce la reacción de la PCR. La fluorescencia de la molécula indicadora aumenta a medida que los productos se acumulan con cada ronda sucesiva de amplificación. El punto en el cual la fluorescencia se eleva sensiblemente por encima de la línea de base puede utilizarse para determinar la cantidad de partida de la plantilla en una muestra.

[0072] También se describe un kit de diagnóstico para el diagnóstico de la AD. Los kits pueden utilizarse para determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF en una muestra biológica obtenida de un sujeto. En esta representación, se proporciona un kit, con uno o más con uno o más recipientes que contienen al menos un agente de detección que puede utilizarse para determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF. Los agentes de detección incluyen, pero no se limitan a, uno o más anticuerpos que unen de manera específica a un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF, uno o más oligonucleótidos capaces de hibridarse a un polinucleótido que codifica un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF, uno o más pares de cebadores útiles para amplificar un polinucleótido que codifica un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF, o uno o más sustratos enzimáticos que pueden actuar por un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF. En varias otras representaciones, el kit puede también contener por ej., un agente de tamponación, un conservante o un agente estabilizante de proteínas. El kit también puede contener componentes necesarios para detectar los agentes de detección (por ej., una enzima o un sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que puede ensayarse y compararse con la muestra de ensayo. Cada componente del kit generalmente está encerrado dentro de un envase individual y todos los distintos envases están dentro de un paquete único junto con instrucciones para observar si el sujeto ensayado padece o está en riesgo de desarrollar EA.

[0073] Los métodos para el tratamiento, mejora o prevención de la EA en un sujeto se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, los métodos consisten en la administración al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

[0074] También se describe un método para mejorar la lucidez de un sujeto con EA, que consiste en administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

[0075] Se descubre también un método para la disminución de la pérdida de memoria en un sujeto con EA, que consiste en administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF.

[0076] Tal como se describe en este documento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de IGF se le administran a un sujeto que presenta síntomas

tempranos de EA o síntomas sugestivos de una condición pre-EA con el fin de rescatar al sujeto de una mayor progresión de la EA o desarrollo de la EA. Entre tales sujetos se incluyen aquellos que han sido diagnosticados con deterioro cognitivo leve o mínimo, una condición caracterizada por déficits cognitivos no lo suficientemente graves como para clasificarlos como demencia, pero que es precursora de o es una etapa temprana de EA. Las etapas tempranas de la EA en las que la recuperación de los sujetos puede llevarse a cabo incluyen las correspondientes etapas Braak 1-3. En dichas etapas, se han iniciado los cambios en la expresión de los factores de crecimiento y los receptores de los factores de crecimiento en el cerebro, pero la expresión no ha caído a los niveles observados en las fases graves de EA (por ej., las etapas Braak 4-6). En consecuencia, los sujetos en etapas tempranas de EA pueden todavía recuperarse mediante la administración de factores de crecimiento y otros agentes terapéuticos.

[0077] El término "agonista de insulina", tal como se usa en este documento, se refiere a un agente que se ha utilizado y se usa actualmente o se conoce como útil para el tratamiento de la diabetes mediante el incremento del nivel de sensibilidad a la insulina.

[0078] En una representación, el agonista de insulina es cualquier agonista del receptor de la insulina que se ha utilizado y se usa actualmente o se conoce como útil para la estimulación de vías de señalización dependientes de insulina. Ejemplos de agonistas de insulina incluida la natural purificada que produce insulina (por ej., ILETIN), insulina recombinante (e.g., HUMULIN), derivados funcionales de insulina y miméticos y análogos de insulina (por ej., derivados, análogos y miméticos que sean capaces de unirse al receptor de insulina que estimula una o más de las mismas señales que son estimuladas por la insulina). Ejemplos de análogos de insulina y miméticos incluyen insulina aspart (NOVOLOG), insulina glargina (LANTUS), insulina lispro (HUMALOG), Lys^{B28}Pro^{B29}-insulina, Asp^{B28}-insulina, desPro^{B28}-insulina, desPro^{B28}desThr^{B30}-insulina, desPhe^{B25}desThr^{B30}-insulina, desTyr^{B26}desThr^{B30}-insulina, Se^{A21}desPro^{B28}-insulina, Gly^{A21}desPro^{B28}-insulina, Gly^{A21}desPhe^{B25}-insulina, Asp^{A21}desPhe^{B25}-insulina, His^{B25}desTyr^{B26}desThr^{B30}-insulina, Asn^{B25}desTyr^{B26}desThr^{B30}-insulina, Asp^{A21}desPhe^{B25}desThr^{B30}-insulina, Asp^{B28}desPhe^{B25}-insulina, Asp^{B3}desPhe^{B25}-insulina, Lys^{B28}Thr^{B29}-insulin, Arg^{B28}desLys^{B29}-insulin, GlyA21desThrB27-insulin, Gly^{A21}Thr^{B3}desThr^{B27}-insulin, Ala^{A21}Thr^{B3}desThr^{B27}-insulin, Gly^{A21}Asp^{B3}desThr^{B27}-insulin, Ala^{A21}Asp^{B3}desThr^{B27}-insulin, desThr^{B27}desThr^{B30}-insulin, Glu^{B27}-insulin, Ile^{B12}-insulin, Tyr^{B12}-insulin, Asp^{A21}Glu^{B27}-insulin, Asp^{B9}-insulin, Asp^{A21}Asp^{B9}Glu^{B27}-insulin, Asp^{B9}Glu^{B27}-insulin, GLY^{A12}-insulin, Thr^{A12}-insulin, Gly^{A12}His^{A19}-insulin, Phe^{A14}-insulin, Gly^{A14}-insulin, Thr^{A12}Gly^{A14}-insulin, Pro^{A10}Trp^{A13}-insulin, Lys^{B28}-insulin, desPhe^{B25}desThr^{B30}-insulin, desPhe^{B25}-insulin, and Asp^{A21}desPhe^{B25}desThr^{B30}-insulin. Ejemplos adicionales de tales agentes se describen en las Patentes Estadounidenses N° 6,800,606, 6,686,177, 6,630,348, 6,620,780, 6,610,649, 6,451,762, 6,444,641, 6,329,431, 6,323,311, 6,251,856, 6,221,837, 6,221,633, 6,197,926, 6,100,376, 6,093,697, 6,011,007, 5,970,973, 5,962,267, 5,952,297, 5,922,675, 5,851,988, 5,840,680, 5,834,422, 5,830,918, 5,750,497, 5,747,642, 5,716,927, 5,693,609, 5,656,722, 5,650,486, 5,618,913, 5,597,893, 5,559,094, 5,547,930, 5,547,929, 5,514,646, 5,506,202, 5,504,188, 5,474,978, 5,461,035, 5,461,031, 5,268,453, 5,208,217, 5,164,366, 5,157,021, 5,149,777, 5,149,716, 5,049,545, 5,028,586, 5,008,241, 4,992,418, 4,992,417, 4,959,351, 4,946,828, 4,701,440, 4,639,332, y 4,489,064, y WO 95/13823.

[0079] En otra representación, un agonista de insulina es un agente que se ha utilizado, es comúnmente, utilizado o se conoce su utilidad para el tratamiento de la resistencia a la insulina y/o la diabetes tipo II. En una realización, el agente es un sensibilizador de insulina. Los sensibilizadores de insulina incluyen, pero no se limitan a, biguanidas (tales como metformina (GLUCOPHAGE)), tiazolidinedionas (tal como rosiglitazona (AVANDIA), pioglitazona (ACTOS), troglitazona (REZULIN), englitazona y ciglitazona) y MBX-102 (un enantiómero de halogenato). Otra tiazolidinedionas útil incluye aquellas descritas en la Patentes Estadounidenses N° 6,787,551, 6,288,096, 6,130,216, 6,046,202, 5,990,139, 5,965,589, 5,811,439, 5,716,975, 5,489,602, 5,478,852, 5,457,109, 5,441,971, 5,326,770, 4,725,610, 4,697,020, y 4,687,777, y en Hulin et al., J. Med. Chem. 35:1853 (1992). Otros agentes útiles en el tratamiento de resistencia a la insulina incluye secretagogos de insulina, incluyendo meglitinidas (tales como repaglinida (PRANDIN) y nateglinida (STARLIX)), sulfonilureas (tales como tolbutamida, clorpropamida (DIABINASE), tolazamida (TOLINASE), gliburida (MICRONASE, DIABETA), glipizida (GLUCOTROL) y glimepirida (AMARYL)) e inhibidores alfa-glucosidasa (tales como la acarbosa (PRECOSE) y miglitol (GLYSET)). Otros agentes útiles incluyen el agonista del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR), que incluyen agonistas de PPAR- α , PPAR- β , y PPAR- γ , tal como se describen en las patentes estadounidenses N° 6,713,514, 6,677,298, 6,462,046, 5,925,657 y 5,326,770 y en Combs et al., J. Neurosci. 20:558 (2000). El uso de agonistas PPAR- γ en pacientes EA puede tener una ventaja añadida de incrementar el número de tipo I de fibras musculares, que pueden proporcionar resistencia a la obesidad y mejorar los perfiles metabólicos, incluso en ausencia de ejercicio (Wang et al., PLoS Biol. 2:3294 (2004)). Otros agentes útiles incluyen β 3-agonistas de los receptores adrenérgicos (Patentes Estadounidenses N° 6,649,603, 6,605,618, 6,583,140, 6,569,873, 6,537,994, 6,525,202, 6,514,991, 6,509,358, 6,506,901, 6,498,170, 6,465,501, 6,458,817, 6,451,814, 6,444,685, 6,410,734, 6,395,762, 5,972,881) y agonistas receptores retinoides (Patentes Estadounidenses N° 6,593,493, 6,521,633, 6,316,404, 6,228,862, 6,028,052). Agentes adicionales que pueden utilizarse incluyen el cromo, los agonistas de la dopamina (Patentes Estadounidenses N° 5,468,755, 5,597,832, 5,602,120, 5,602,121), piruvato y precursores de piruvato (Patentes Estadounidenses N° 5,472,980, 5,283,260), y las benzotiadiazinas (por ej., diazóxido). Otros ejemplos de agentes útiles para el tratamiento de la resistencia a la insulina se describen en las Patentes Estadounidenses N° 6,787,556, 6,765,021, 6,765,013, 6,713,508, 6,699,896, 6,693,094, 6,683,107, 6,677,352, 6,673,815, 6,649,628, 6,646,004, 6,645,997, 6,624,194, 6,613,802, 6,521,665, 6,521,633, 6,515,003, 6,509,360, 6,451,845, 6,451,827, 6,444,670, 6,414,002, 6,391, 897, 6,376,495, 6,369,072, 6,310,081, 6,284,787, 6,262,118, 6,251,936, 6,251,924, 6,248,764,

6,232,322, 6,221,902, 6,214,877, 6,214,842, 6,207,714, 6,166,069, 6,117,899, 6,110,962, 6,103,708, 6,063,815, 6,015,558, 5,948,810, 5,730,975, 5,693,664, 5,646,168, 5,641,796, 5,545,672, 5,463,070 y 4,980,350, y en Shinkai et al., J. Med Chem. 41:1927 (1998).

5 [0080] El término "agonista de IGF", tal como se usa en este documento, se refiere a un agonista del receptor del IGF que ha sido utilizado, se utiliza actualmente, o se sabe que es útil para la estimulación de las vías de señalización dependientes del IGF.

10 [0081] Los ejemplos de agonistas de IGF incluyen proteínas IGF naturales o recombinantes purificadas, derivados funcionales de IGFs y análogos y miméticos de IGF (por ej., derivados, análogos y miméticos que son capaces de unirse a un receptor del IGF y que estimula una o más de las mismas señales que son estimuladas por un IGF). Ejemplos de análogos de IGF incluyen el analog D del IGF-I, long-Arg³-IGF-I, Val⁵⁹-IGF-I, AlaGlu-IGF-I, Ala⁶³-IGF-I, Ser¹Ala⁶³Val⁷⁰-IGF-I, Leu^{24, 59, 60}, Ala³¹-IGFII, Gln⁶Ala⁷Tyr¹⁸Leu¹⁹Leu²⁷-IGF-II, Gly¹-IGF-II, Leu²⁷-IGF-II, y Gln³⁷Gln³⁸-IGF-EL También se incluyen los agentes que interfieren con la unión de IGF a las proteínas de unión a IGF, aumentando de este modo la cantidad de IGF circulantes disponible para unirse a los receptores de IGF. Ejemplos de otros derivados funcionales, agonistas y miméticos de IGF se describen en las Patentes Estadounidenses N° 6,750,321, 6,743,894, 6,723,699, 6,716,586, 6,713,451, 6,693,079, 6,693,078, 6,693,076, 6,689,751, 6,683,053, 6,680,298, 6,677,305, 6,645,775, 6,635,619, 6,632,794, 6,620,789, 6,608,031, 6,608,028, 6,509,443, 6,506,874, 6,420,518, 6,403,764, 6,358,916, 6,342,227, 6,251,865, 6,235,874, 6,121,416, 5,854,025, 5,776,897, 5,736,363, 5,708,134, 5,703,045, 5,652,214, 5,622,932, 5,473,054, 5,470,828, 5,273,966, 5,028,531, 5,019,500, 4,876,242, and 4,745,179.

25 [0082] El término "cantidad terapéuticamente efectiva", tal como se usa en este documento, se refiere a la cantidad del agente terapéutico suficiente para dar lugar a mejora de uno o más síntomas de un trastorno o prevenir el avance de un trastorno o causar la regresión de la enfermedad. Por ejemplo, con respecto al tratamiento de la EA, una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere preferentemente a una cantidad de un agente terapéutico que disminuye los síntomas de la EA, incrementa el tiempo de progresión de los síntomas de EA o aumenta el tiempo de supervivencia por al menos 5%, preferentemente, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos %, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% en comparación con la que se habría producido sin la presente invención.

35 [0083] Los términos "prevenir" y "prevención" tal como se usan en el presente documento, se refieren a la disminución en la aparición de la patología EA en un sujeto. La prevención puede ser completa, por ej., la ausencia total de patología EA en un sujeto. La prevención puede ser también parcial, de tal manera que la aparición de la patología EA en un sujeto es menor que la que se habría producido sin la presente invención.

40 [0084] El término "sinérgico," tal como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto obtenido cuando un primer agente y un segundo agente se administran juntos (por ej., al mismo tiempo o uno después del otro) que es mayor que el efecto aditivo del primer agente y el segundo agente cuando se administran individualmente. El efecto sinérgico permite por dosis menores del primer agente y/o del segundo agente, que se administre o proporcione mayor eficacia a las mismas dosis. El efecto sinérgico obtenido puede ser de al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 100%, al menos 125%, al menos 150%, al menos 175%, al menos 200%, al menos 250%, al menos 300%, al menos 350%, al menos 400% o al menos 500% más que el efecto aditivo del primer agente y el segundo agente cuando se administran individualmente.

50 [0085] Los métodos terapéuticos pueden llevarse a cabo en sujetos que muestran patología resultante de EA, sujetos sospechosos de presentar patología resultante de EA y sujetos en riesgo de presentar patología resultante de EA. Por ejemplo, sujetos que tienen una predisposición genética a la EA pueden ser tratados profilácticamente. Sujetos que muestran síntomas de EA pueden tratarse para disminuir los síntomas o para retardar o prevenir la progresión de los síntomas. Los cambios físicos asociados con el aumento de la gravedad de la EA se muestran en este documento como algo progresivo. Por lo tanto, en una representación de la invención, los sujetos que muestra signos leves de la patología de la EA (por ej., correspondiente a deterioro cognitivo leve o estadios Braak 1-3) pueden tratarse para mejorar los síntomas y/o prevenir una mayor progresión de los síntomas.

60 [0086] El comportamiento cognitivo en la EA (por ej., lucidez, memoria) puede medirse por cualquiera de las diversas pruebas (Véase Gershon et al., Clinical Evaluation of Psychotropic Drugs: Principles and Guidelines, (Evaluación Clínica de Drogas Psicotrópicas: Principios y Directrices) Prien y Robinson (eds.), Raven Press, Ltd., New York, 1994, p. 467). Una de tales pruebas, BCRS, está diseñada para medir solo funciones cognitivas: concentración, memoria reciente, recuerdo del pasado, orientación, funcionamiento y autocuidado. Esta prueba, así como la Escala de Memoria Weschler y la Escala Asociada a la Enfermedad de Alzheimer para determinar mejora después del tratamiento terapéutico. Un aumento de la lucidez o una reducción en la pérdida de memoria está presente si hay una diferencia estadísticamente significativa en la dirección de normalidad en la prueba de Escala de Memoria de Weschler. Por ejemplo, los resultados de pruebas de rendimiento de los pacientes tratados se comparan con los de los miembros del grupo de placebo o con las pruebas posteriores realizadas al mismo paciente.

[0087] El agonista de insulina y el agonista de IGF pueden administrarse de cualquier manera apropiada, por ej., de manera intraventricular (por ej., con un stent intraventricular), o de manera intracraneal, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, nasal u oral. En una representación, el agonista de insulina y el agonista de IGF puede ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. La barrera hematoencefálica de sujetos que sufren EA se encuentra a menudo en condición deteriorada y esto facilita la capacidad de que los agentes que se administran por vía parenteral atraviesen la barrera. En otra representación, los agentes pueden conjugarse con una molécula objetivo, tal como la transferrina, para los que son receptores en la barrera hematoencefálica. Véase, por ej., la Patente Estadounidense N° 4,902,505. En una realización adicional, los agentes pueden modificarse para tener polaridad disminuida o hidrofobicidad incrementada, cuanto más agentes hidrófobos (menos polar) atraviesen la barrera hematoencefálica más fácilmente. Véase, por ej., Patente Estadounidense N° 5,260,308. En una realización adicional, los agentes hidrofóbicos (no polares) pueden seleccionarse y utilizarse. En todavía otra realización, los agentes pueden administrarse en un liposoma, particularmente un liposoma dirigido a la barrera hematoencefálica. Véase, por ej., la Patente Estadounidense N° 6,372,250. La administración de agentes farmacéuticos en liposomas es conocida.

[0088] En una realización, las células que expresan un agonista de insulina y/o un agonista de IGF (por ej., por expresión rrecombinante) puede administrarse al sistema nervioso central. En otra realización, las células expresan tanto un agonista de insulina como un agonista de IGF. Cualquier tipo de célula que pueda modificarse genéticamente para expresar ya sea un agonista de insulina ya sea un agonista IGF puede utilizarse. En otra realización, las células son las células madre, por ej., células madre embrionarias, juveniles o adultas, células madre neuronales, células progenitoras, células multipotentes y similares. Las células a administrar pueden ser heterólogas, autólogas o xenogeneicas para el receptor.

[0089] Las células madre embrionarias pueden obtenerse mediante el aislamiento de células de la masa celular interna de los blastocistos y el cultivo de células sobre una capa de células alimentadoras (por ej., fibroblastos) en la presencia de un factor de crecimiento que inhibe la diferenciación celular (por ej., el factor inhibidor de leucemia). Véase, por ej., las Patentes Estadounidenses N° 6,200,806, 5,843,780, 5,690,926 y 5,453,357. De manera alternativa, aisladas células de la masa celular interna pueden cultivarse en la matriz extracelular (por ej., a partir de capas de células alimentadoras lisadas) en la presencia de medio de cultivo opcionalmente condicionado por células alimentadoras, como se describe en las Patent Estadounidenses N° 6,800,480 y 6,642,048. Los métodos de aislamiento de células madre embrionarias se describen en la Patente N° 5,166,065.

[0090] Las células madre neurales pueden aislarse a partir de cualquier área de la CNS que se sabe que contiene células madre, tales como el prosencéfalo, la corteza cerebral, el cerebelo, el mesencéfalo, el hipocampo, el tronco cerebral, medula espinal y el tejido ventricular, y subáreas específicas de la misma, por ej., los ganglios basales, zona subventricular anterior, diencéfalo, telencéfalo, o la zona ependimaria/subependimaria. Las células madre neurales humanas pueden obtenerse de un tejido fetal abortado, donantes de órganos juveniles o adultos, biopsias de tejido neural o tejidos extraídos durante una neurocirugía. Las células obtenidas a partir de tejido neural pueden proliferarse in vitro mediante el cultivo en suspensión o sobre un sustrato, preferentemente con un medio definido para permitir la diferenciación de las células. Los factores de crecimiento que inducen la proliferación pueden añadirse al cultivo, tal como el factor de crecimiento epidérmico, anfirregulina, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento transformante alfa y sus combinaciones. Las células pueden también diferenciarse in vitro, por ej., en neuronas, astrocitos, y/u oligodendrocitos, mediante la adición de factores de crecimiento que inducen la diferenciación, tales como factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, hormona liberadora de tiotropina, factor de crecimiento transformante beta o factores de crecimiento similar a la insulina. Las células pueden también diferenciarse mediante el cultivo sobre sustratos que provoquen la diferenciación, por ej., MATRIGEL, colágeno, fibronectina, laminina o poli-L-lisina. Ejemplos de células madre neurales adecuadas y métodos de aislamiento incluyen aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses N° 6,812,027, 6,787,353, 6,734,015, 6,497,872, 6,251,669, 5,968,829, 5,851,832, 5,753,505, 5,589,376 y 5,411,883. Ejemplos de células madre no neurales que pueden diferenciarse en células neurales incluyen aquellas descritas en la Patente Estadounidense N° 6,749,850 y la Solicitud Estadounidense Publicada N° 2004/0107453.

[0091] Las células pueden modificarse mediante ingeniería genética para expresar un agonista de insulina y/o un agonista de IGF que utilice cualquier método conocido en la materia. Véase, por ej., Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 3rd Edition, (1995); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Edition, (1989). Los ácidos nucleicos (ADN o ARN) que codifican un agonista de insulina y/o un agonista de IGF pueden ser sintéticos o de origen natural o una combinación de ambos y pueden contener genes, porciones de genes u otras secuencias útiles de ADN, por ej., marcadores seleccionables o secuencias reguladoras tales como promotores, potenciadores y similares. Los promotores pueden ser promotores exógenos, tales como citomegalovirus o virus de simio 40, promotores endógenos no específicos tales como colágeno o promotores específicos de células neuronales tales como tirosina hidroxilasa, feniletanolamina N-metiltransferasa o colina acetiltransferasa. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la insulina, el IGF-I y el IGF-II están fácilmente disponibles. La secuencia de nucleótidos se puede modificar por métodos bien conocidos en la técnica para codificar un agonista de la insulina y/o un agonista de IGF,

tales como los mencionados anteriormente. El ácido nucleico que codifica un agonista de la insulina y/o un agonista de IGF puede ser incorporado en cualquier vector adecuado para el suministro en una célula, por ej., plásmidos, virus, cromosomas artificiales, secuencias de recombinación homóloga y similares. El ácido nucleico puede introducirse dentro de la célula mediante vectores virales (por ej., retrovirus, herpesvirus, adenovirus, virus adeno-asociado) o transfección directa (por ej., lipofección, transfección de fosfato de calcio, electroporación). Ejemplos de métodos para la preparación de construcciones de ácido nucleico y el suministro de las construcciones de las células madre, particularmente células madre embrionarias o células madre neurales, se describen en las Patentes Estadounidenses N° 6,713,247, 6,541,255, 6,528,306, 6,514,761, 6,399,384, 6,392,118, 6,312,949, 6,284,539, 6,281,009, 6,054,575, 5,958,767, 5,849,553, 5,750,376, 5,032,407 y 4,959,313.

[0092] Las células que expresan un agonista de la insulina y/o un agonista del IGF puede administrarse directamente al sistema nervioso central, por ej., directamente al cerebro, dentro de las cavidades ventriculares o de forma subdural. En una representación, la célula se trasplanta en la región de daño o disfunción. Los métodos de administración de células al sistema nervioso central para la expresión de proteínas terapéuticas u otros factores son conocidos en la técnica. Las células se administran preferentemente a una región, preferentemente una región donde está ocurriendo o se ha producido neurodegeneración. Las células pueden introducirse solas o con portadores biocompatibles adecuados, matrices, barreras físicas, etc. Las células pueden administrarse en una sola inyección o en múltiples inyecciones en uno o más sitios. En una representación, se administran de aproximadamente 10⁴ a aproximadamente 10⁸ células. Los métodos adecuados para la administración de células para el SNC incluidos aquellos descritos en las Patentes Estadounidenses N° 6,497,872, 5,871,767, 5,762,926, 5,650,148 y 5,082,670.

[0093] Los métodos para administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de insulina y un agonista del IGF se describen en el presente documento. En algunas representaciones, se espera que la combinación de un agonista de insulina y un agonista del IGF tenga un efecto mayor en comparación con la administración de cualquier agente solo. En otras representaciones, se espera que la combinación de un agonista de la insulina y un agonista del IGF se traduzca en un efecto sinérgico (por ej., más que aditivo) en comparación con la administración de cualquiera de los dos solos.

[0094] En algunas representaciones descritas en este documento, un agonista de la insulina y un agonista del IGF se administran a un sujeto de forma separada, por ej., como dos composiciones separadas. En otras representaciones, un agonista de insulina y un agonista del IGF se administran como parte de una sola composición.

[0095] En algunas representaciones descritas en este documento, se administra un agonista de insulina y un agonista del IGF a un sujeto bajo una o más de las condiciones siguientes: en periodicidades diferentes, con duraciones diferentes y concentraciones diferentes, por diferentes vías de administración, etc. En algunas representaciones, se administra un agonista de insulina previo a un agonista de IGF, por ej., 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 o 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días o 1, 2, 3 o 4 semanas previo a la administración de agonista de IGF. En algunas representaciones, se administra un agonista de insulina después de un agonista de IGF, por ej., 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, o 18 horas, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 días, o 1, 2, 3, o 4 semanas después de la administración de un agonista de IGF. En algunas representaciones, se administra simultáneamente un agonista de insulina y un agonista del IGF, pero en diferentes horarios, por ej., se administra diariamente un agonista de insulina mientras que un agonista de IGF se administra una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas. En otras representaciones, se administra un agonista de insulina una vez a la semana, mientras que se administra diariamente un agonista del IGF una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas.

[0096] La administración de un agonista de insulina puede continuarse simultáneamente con la administración de un agonista del IGF. De manera adicional, la administración de un agonista de insulina puede continuarse más allá de la administración de un agonista de IGF o viceversa.

[0097] Tal como se describe en este documento, el método de administración de un agonista de insulina en combinación con un agonista del IGF se puede repetir al menos una vez. El método puede repetirse cuantas veces sea necesario para obtener o mantener una respuesta terapéutica, por ej., de una a aproximadamente 10 veces o más. Con cada repetición del método, el agonista de insulina y el agonista del IGF pueden ser iguales o diferentes al utilizado en la repetición precedente. Adicionalmente, el período de tiempo de administración del agonista de insulina y el agonista del IGF y la manera en la que éstos se administran puede variar de una repetición a otra.

[0098] Los agentes pueden relacionarse con una molécula portadora para mejorar la captación celular de los compuestos. Ejemplos de tales moléculas portadoras incluyen péptidos portadores tales como los descritos por Fulda et al., Nature Med. 8:808 (2002), Arnt et al., J. Biol. Chem. 277:44236 (2002), y Yang et al., Cancer Res. 63:831 (2003), péptidos fusogénicos (véase, por ej., la Patente Estadounidense 5,965,404), y virus y partes de virus tales como cápsides vacías y hemaglutinina del virus (véase, por ej., la Patente Estadounidense N° 5,547,932). Otras moléculas portadoras incluyen los ligandos para el receptor de superficie celular tales como asialoglicoproteína (que se une al receptor de asialoglicoproteína; véase la Patente Estadounidense N° 5,166,320) y los anticuerpos a los

receptores de superficie celular tales como anticuerpos específicos para las células T, por ej., anticuerpos anti-CD4 (véase la Patente Estadounidense N° 5,693,509).

[0099] Las composiciones descritas en este documento incluyen todas las composiciones en las que los agentes de la presente invención están contenidos en una cantidad que es eficaz para conseguir su propósito previsto. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de rangos óptimos de cantidades efectivas de cada componente está dentro de los conocimientos de la técnica. La dosificación real y el régimen de tratamiento pueden determinarse fácilmente por el médico experto ordinario, teniendo en cuenta la vía de administración, edad, peso y salud del sujeto, así como la etapa de la EA y, y, por supuesto, los efectos secundarios de los agentes, la eficacia de los agentes y de acuerdo con los procedimientos y las prácticas médicas habituales. Normalmente, los agentes pueden administrarse a mamíferos, por ej., humanos, oralmente a una dosis de 0.0025 a 50 mg/kg, o una cantidad equivalente de sal farmacológicamente aceptable de los mismos por día del peso corporal del mamífero que está siendo tratado por la EA. Preferentemente, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg/kg se administra por vía oral para tratar, mejorar o prevenir la EA. Para la inyección intramuscular, la dosis es generalmente aproximadamente la mitad de la dosis oral. Por ejemplo, una adecuada dosis intramuscular sería de aproximadamente 0.0025 a aproximadamente 25 mg/kg, y, preferentemente, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg/kg. En ciertas representaciones, cualquiera o ambos, el agonista de la insulina y el agonista del IGF pueden administrarse en dosis menores que aquellas utilizadas en la técnica para debido al efecto aditivo o sinérgico de la combinación.

[0100] La dosis oral unitaria puede comprender de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 mg, preferentemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg de cada agente. La dosis unitaria puede administrarse una o más veces diariamente como uno o más comprimidos o cápsulas que contienen cada uno de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10, de manera conveniente de aproximadamente 0,25 a 50 mg de los agentes.

[0101] De manera adicional a administrar los productos químicos en bruto, los agentes de la invención pueden administrarse como parte de una preparación farmacéutica que contenga portadores adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos en preparaciones que se puede utilizar farmacéuticamente. De preferencia, las preparaciones, en particular, aquellas preparaciones que pueden administrarse por vía oral o tópica y que pueden utilizarse para el tipo preferido de administración, tales como tabletas, grageas, pastillas de liberación lenta y cápsulas, enjuagues bucales y colutorios, geles, suspensiones líquidas, enjuagues para el cabello, geles para el cabello, champús y también preparaciones que pueden administrarse por vía rectal, tales como supositorios, así como soluciones adecuadas para administración por inyección, por vía oral o tópica, contiene de aproximadamente 0.01 a 99 por ciento, de preferencia, de aproximadamente 0.25 a 75 por ciento de compuesto(s) activo, junto con el excipiente.

[0102] Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a cualquier sujeto que pueda experimentar los efectos beneficiosos de los compuestos de la invención. Los principales de tales sujetos son mamíferos, por ej., humanos, aunque la invención no está destinada a ser tan limitada. Otros animales incluyen los animales veterinarios (vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros, gatos y similares).

[0103] Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de los mismos se pueden administrar por cualquier medio que logre su propósito previsto. Por ejemplo, la administración puede ser por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, bucal, intratecal, intracraneal, intranasal o tópica. De manera alternativa, o simultáneamente, la administración puede ser por vía oral. La dosificación administrada dependerá de la edad, salud, y peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, si lo hay, frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado.

[0104] Las preparaciones farmacéuticas se elaboran en una manera que es en sí conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla convencional, de granulación, de elaboración de grageas, de disolución o de liofilización. En consecuencia, las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse al combinar los compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea o es necesario, para obtener tabletas o núcleos de grageas.

[0105] Los excipientes adecuados son, en particular, cargas such as saccharides, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa y/o fosfatos de calcio, por ejemplo fosfato tricálcico o hidrógeno fosfato de calcio, así como aglutinantes tales como pasta de almidón, utilizando, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinil pirrolidona. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes tales como los almidones mencionados anteriormente y también carboximetil-almidón, polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Los auxiliares son, sobre todo, agentes lubricantes y de regulación de flujo, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico o sales de los mismos, tal como estearato de magnesio o estearato de calcio y/o polietilenglicol. Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados que, si se desea, son resistentes a los jugos gástricos. Con este fin, se pueden utilizar soluciones de sacárido concentradas, que pueden contener opcionalmente goma árabe, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y /

o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Con el fin de producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, se utilizan soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los comprimidos o recubrimientos de las grageas, por ejemplo, para la identificación o para caracterizar combinaciones de dosis de compuestos activos.

[0106] Otras preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los compuestos activos en forma de gránulos que pueden mezclarse con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se disuelven o suspenden preferiblemente en líquidos adecuados, tales como aceites grasos o parafina líquida. Adicionalmente, pueden añadirse estabilizadores.

[0107] Preparaciones farmacéuticas posibles que pueden usarse por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en una combinación de uno o más de los compuestos activos con una base de supositorio. Las bases adecuadas para supositorios son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos o hidrocarburos de parafina. Adicionalmente, también es posible usar cápsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación de los compuestos activos con una base. Los materiales de base posibles incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos, polietilenglicoles o hidrocarburos de parafina.

[0108] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua y soluciones alcalinas. Adicionalmente, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos o polietilenglicol-400. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio sorbitol y/o dextrano. De manera opcional, la suspensión puede también contener estabilizadores.

[0109] Se describen también métodos para la detección de un agente que es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA, que comprenden administrar el agente a un animal y determinar el nivel o función de al menos un factor de la vía de señalización de la insulina/IGF en dicho animal, en donde un incremento en el nivel o función de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA. Se describen también métodos para probar tratamientos potenciales para la EA que comprenden administrar el tratamiento potencial a un animal y determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF en dicho animal, en donde un incremento en el nivel o función de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento indica que el tratamiento es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA.

[0110] Se describe también como método de prueba un agente para un potencial efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA, que comprende administrar el agente a un animal y determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de insulina / IGF en dicho animal, donde una disminución en el nivel o función de uno o más de dichos factores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente potencialmente tiene un efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA.

[0111] Los animales utilizados en el ensayo de exploración puede ser cualquier animal, incluidos animales no humanos (por ej., ratón, rata, pero o primate) que no presentan las características distintivas de EA. De forma alternativa, se pueden utilizar modelos animales de EA. Ejemplos de modelos animales se describen en las Patentes Estadounidenses N° 6,717,031, 6,710,226 y 5,811,633. Finalmente, se pueden utilizar individuos con EA.

[0112] Los métodos para determinar el nivel o función de al menos un factor en la vía de señalización de la insulina/IGF en el sujeto son las mismas son los mismos como se analizó anteriormente para el diagnóstico de EA. El nivel o función puede determinarse en el mismo sujeto antes y después de la administración de un agente. En otra realización, la función o nivel en un sujeto al que se le ha administrado un agente se compara con uno o más sujetos a los que no se les ha administrado el agente.

[0113] Los agentes que pueden ser seleccionados incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, productos naturales, bibliotecas químicas, y similares.

[0114] Se describe también un modelo animal experimental de EA producido por inyección intracerebral de estreptozotocina (STZ). El animal puede ser un mamífero tal como el roedor, perro, gato, caballo, oveja, vaca, cerdo, primate no humano (por ej., chimpancé, macaco, lemur, orangután, gorila, bonobo). En una representación, el animal es un roedor, por ej., una rata o ratón. Al animal se le inyecta preferentemente con STZ a una edad temprana, por ej., menos de una semana de edad, por ej., 2, 3 o 4 días de edad. El STZ puede prepararse en cualquier solución

adecuada para la administración al cerebro de un animal, por ej., solución salina o líquido cefalorraquídeo artificial. La cantidad de STZ inyectada es suficiente para inducir una patología similar a la EA y/o síntomas en el animal. En una realización, se inyecta STZ en una dosis de al menos aproximadamente 10 mg/kg peso corporal (BW), por ej., de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 mg/kg BW, por ej., de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 mg/kg BW, por ej., aproximadamente 40 mg/kg BW. El STZ puede inyectarse de manera bilateral, por ej., 1.0 mm posterior y 1.0 mm lateral a la bregma, y 2.5 mm de profundidad a la superficie del cráneo de cada hemisferio utilizando una microjeringa, por ej., una aguja de calibre 30 colocada en una jeringa microlitro Hamilton. La precisión del procedimiento de inyección puede confirmarse mediante la inyección de un colorante tal como azul de metileno. Los estudios sobre animales inyectados con STZ pueden realizarse aproximadamente 1 a 8 semanas después de la inyección del STZ, por ej., aproximadamente 1 a 3 semanas después de la inyección, por ej., aproximadamente 2 semanas después de la inyección.

[0115] Se describen además los métodos para exploración para un agente que es potencialmente útil para el tratamiento, mejora y prevención de la EA utilizando un modelo animal EA al que se le ha inyectado STZ. En una representación, se proporcionan los métodos para exploración para un agente que inhibe la neurodegeneración en la EA. En otra realización, se proporcionan métodos para la exploración para un agente que inhibe el deterioro cognitivo en la EA. La invención además, proporciona métodos para probar potenciales tratamientos para la EA consistentes en administrar el tratamiento potencial de inyección de STZ a un modelo animal con EA. Los procedimientos comprenden la administración del agente a un animal y la determinación del nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente. Los indicadores de EA que pueden medirse incluyen el nivel o función de uno o más factores en la vía de señalización de la insulina/IGF, signos histopatológicos de EA, tales como peso cerebral, neurodegeneración, ovillos neurofibrilares o placas, niveles de factores relacionados con la apoptosis u otros indicadores de la muerte celular (por ej., p53), cambios en el número de células de diferentes tipos de células, niveles de EA relacionados con proteínas o ácidos nucleicos tales como tau, fosfo-tau, ubiquitina, proteína precursora amiloide, niveles de acetilcolina, acetilcolinesterasa o colina acetyltransferasa y deterioro cognitivo. El deterioro cognitivo puede ser probado por cualquier método conocido en la técnica (por ej., laberinto acuático de Morris, comportamiento alimentario relacionado con la memoria, memoria de reconocimiento espacial, actividad locomotora, reactividad emocional, reconocimiento de objetos). Una mejora en el nivel o función de uno o más de dichos indicadores con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento indica que el agente o tratamiento es potencialmente útil para el mejoramiento, mejora y prevención de la EA. El nivel o función se puede determinar en el mismo animal antes y después de la administración de un agente o tratamiento. En otra realización, la función o nivel en un animal al que se le ha administrado un agente o tratamiento es comparado a uno o más animales a los que no se les ha administrado el agente o tratamiento.

[0116] Se describe también un método para probar un tratamiento potencial para la EA, que consiste en administrar el tratamiento potencial al modelo animal de la EA producido por medio de la inyección intracerebral de STZ a un animal no humano y no determinar el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento potencial, donde una mejora en el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento potencial indica que el tratamiento es potencialmente útil para el tratamiento, mejora o prevención de la EA.

[0117] Se describe también un método para probar un agente para un potencial efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA, que consiste en administrar el agente a un modelo animal de EA producido por medio de una inyección de STZ a un animal no humano y determinar el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el tratamiento potencial, donde una disminución en el nivel o función de al menos un indicador de EA con respecto al nivel en un animal de control al que no se le ha administrado el agente indica que el agente potencialmente tiene un efecto perjudicial en la aparición o progresión de la EA.

[0118] Los agentes que pueden ser seleccionados incluyen proteínas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas, productos naturales, bibliotecas químicas, y similares.

[0119] Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitados, de un método y composiciones de la presente invención.

EJEMPLO 1

Métodos Generales

Fuente de Tejidos

[0120] Se obtuvieron cerebros postmortem desde el banco de cerebros del Centro de Investigación de la Enfermedad de Alzheimer del Hospital General de Massachusetts, el Banco de Cerebros de la Universidad de Brown y del Banco de Cerebros Kathleen Price en el Centro Médico de la Universidad de Duke. Los diagnósticos de EA

(Braak y Etapas Braak 5-6) y el envejecimiento normal (Braak y Etapas Braak 0-1) se confirmaron mediante la revisión de historias clínicas y secciones de cerebro histopatológicas postmortem, incluidas el método Bielschowsky y el fosfo-Tau, ubiquitina, y las secciones amiloides-® inmunoteñidas de la corteza prefrontal, corteza temporal, amígdalas e hipocampo. (Braak et al., Neurobiol. Aging 18:S85 (1997); Nagy et al., Dement. Geriatr. Cogn. Disord 9:140 (1998)). Tejidos congelados de complemento (~100 mg cada uno) del hipocampo, hipotálamo y el lóbulo frontal (Área de Brodmann 11) se utilizaron para extraer ARN y proteína. Se utilizaron bloques de tejido embebidos en parafina fijados con formalina para tinción inmunohistoquímica. Se incluyó un total de 28 EA y 26 casos de control en este estudio. Los intervalos postmortem fueron todos menores a 14 horas. Se rechazaron los casos en los que se detectó degradación del ARN mediante la RT-PCR cuantitativa.

RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real

[0121] Se aisló el total del ARN del tejido cerebral utilizando un reactivo de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de RNA se determinaron a partir de las absorbancias medidas en 260 nm y 280 nm. Se hizo transcripción inversa del ARN (2 mg) utilizando el kit de síntesis AMV First Strand cDNA (Corporación de Diagnóstico Roche, Indianapolis, IN) y cebadores oligodesoxinucleótidos aleatoriamente. Los niveles de ARNm de insulina, los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II, sus correspondientes receptores, sustrato receptor de insulina (IRS subtipos 1, 2 y 4, Tau, proteína precursora amiloide (APP), transportador de glucosa 4 (GLUT4) y enzima degradante de la insulina (IDE) se midieron utilizando la amplificación RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles ribosomales de ARN 18S medidos en reacciones paralelas se midieron para calcular abundancia relativa de cada transcrito de ARNm. (Xu et al., J. Biol. Chem. 278:26929 (2003); Yeon et al., Hepatology 38:703 (2003)).

[0122] Las amplificaciones de PCR se realizaron en 25 mL reacciones que contenían el DNAC generado a partir de 2.5 ng de la plantilla de ARN original, 300 nM de cada gen específico adelante y cebador inverso para genes humanos (Tabla 1) o genes de ratas (Tabla 2) y 12.5 mL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix (Qiagen Inc., Valencia, CA). Las señales amplificadas se detectaron continuamente con el Sistema de Detección BIO-RAD iCycler iQ Multi-Color RealTime PCR (Bio-Rad, Hercules, CA). El protocolo de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial 15-minutos y activación enzimática a 95°C, 40 ciclos de 95°C x 30 seg, 55-60°C x 45 seg y 72°C x 60 seg. Las temperaturas de hibridación se optimizaron utilizando el programa de gradiente de temperatura proporcionado con el software iCycler. Los niveles de ARNm se determinaron utilizando las ecuaciones de las líneas de regresión generadas con diluciones en serie de 10 veces de 20 ng de ADN plásmido recombinante que contenía las secuencias objetivo estudiadas. La abundancia de mRNA relativa se determinó a partir de los ratios ng del mRNA específico a 18S. (Xu et al., J. Biol. Chem. 278:26929 (2003); Yeon et al., Hepatology 38:703 (2003)).

TABLA 1.

	Primera	Secuencia (5'-->3')	Posición (mRNA)	Tamaño del Amplicón (bp)
5	Insulina	TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT C (SEQ ID NO:1)	189	134
		ATC CAC AAT GCC ACG CTT CTG C (SEQ ID NO:2)	322	
10	Receptor de Insulina	GGT AGA AAC CAT TAC TGG CTT CCT C (SEQ ID NO:3)	1037	125
		CGT AGA GAG TGT AGT TCC CAT CCA C (SEQ ID NO:4)	1161	
15	IGF-I	CAC TTC TTT CTA CAC AAC TCG GGC (SEQ ID NO:5)	1032	147
		CGA CTT GCT GCT GCT TTT GAG (SEQ ID NO:6)	1178	
	IGF-I Receptor	AGG GCG TAG TTG TAG AAG AGT TTC C (SEQ ID NO:7)	395	101
20		TAC TTG CTG CTG TTC CGA GTG G (SEQ ID NO:8)	295	
	IGF-II	CTG ATT GCT CTA CCC ACC CAA G (SEQ ID NO:9)	996	76
		TTG CTC ACT TCC GAT TGC TGG C (SEQ ID NO:10)	1071	
25	IGF-II Receptor	CAC GAC TTG AAG ACA CGC ACT TAT C (SEQ ID NO:11)	403	132
		GCT GCT CTG GAC TCT GTG ATT TG (SEQ ID NO: 12)	534	
30	IRS-1	TGC TGG GGG TTT GGA GAA TG (SEQ ID NO:13)	3559	68
		GGC ACT GTT TGA AGT CCT TGA CC (SEQ ID NO:14)	3626	
35	IRS-2	AAA ATT GGC GGA GCA AGG C (SEQ ID NO:15)	753	64
		ATG TTC AGG CAG CAG TCG AGA G (SEQ ID NO:16)	816	
	IRS-4	CCG ACA CCT CAT TGC TCT TTT C (SEQ ID NO: 17)	570	74
40		TTT CCT GCT CCG ACT CGT TCT C (SEQ ID NO:18)	643	
	Tau	AGA AGC AGG CAT TGG AGA CAC C (SEQ ID NO: 19)	543	81
		AAG CAG CCA CTT TGG GTT CC (SEQ ID NO:20)	251	
45	APP	CAA TCC AGG CAC AGA AAG AGT CC (SEQ ID NO:21)	478	96
		TTC CAT AAC CAA GAG AGG CTG C (SEQ ID NO:22)	573	
50	GLUT4	GTA TCA TCT CTC AGT GGC TTG GAA G (SEQ ID NO:23)	394	111
		TTT CAT AGG AGG CAG CAG CG (SEQ ID NO:24)	504	
55	IDE	TGA TGA ATG ATG CCT GGA GAC TC (SEQ ID NO:25)	635	130
		TCA ATC CCT TCT TGG TTT GGT C 764 (SEQ ID NO:26)	764	
	18S	GGA CAC GGA CAG GAT TGA CA (SEQ ID NO:27)	1278	50
60		ACC CAC GGA ATC GAG AAA GA (SEQ ID NO:28)	1327	
	28S	GGT AAA CGG CGG GAG TAA CTA TG (SEQ ID NO:29)	3712	107
65		TAG GTA GGG ACA GTG GGA ATC TCG (SEQ ID NO:30)	3818	

TABLA 2.

Primera	Secuencia (5'-->3')	Posición (mRNA)	Tamaño del Amplicón (bp)
Insulina	TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT C (SEQ ID NO:1)	189	134
	ATC CAC AAT GCC ACG CTT CTG C (SEQ ID NO:2)	322	
Receptor de Insulina	GGT AGA AAC CAT TAC TGG CTT CCT C (SEQ ID NO:3)	1037	125
	CGT AGA GAG TGT AGT TCC CAT CCA C (SEQ ID NO:4)	1161	
IGF-I	CAC TTC TTT CTA CAC AAC TCG GGC (SEQ ID NO:5)	1032	147
	CGA CTT GCT GCT GCT TTT GAG (SEQ ID NO:6)	1178	
IGF-I Receptor	AGG GCG TAG TTG TAG AAG AGT TTC C (SEQ ID NO:7)	395	101
	TAC TTG CTG CTG TTC CGA GTG G (SEQ ID NO:8)	295	
IGF-II	CTG ATT GCT CTA CCC ACC CAA G (SEQ ID NO:9)	996	76
	TTG CTC ACT TCC GAT TGC TGG C (SEQ ID NO:10)	1071	
IGF-II Receptor	CAC GAC TTG AAG ACA CGC ACT TAT C (SEQ ID NO:11)	403	132
	GCT GCT CTG GAC TCT GTG ATT TG (SEQ ID NO: 12)	534	

[0123] En estudios preliminares, los productos PCR etiquetados SYBR Green se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se verificó la autenticidad de cada amplicón mediante secuenciación de ácidos nucleicos. Diluciones en serie de cantidades conocidas de ADN plásmido recombinante que contenía las secuencias objetivo específicas se utilizaron como estándares en las reacciones PCR y las líneas de regresión generadas a partir de los valores Ct de los estándares se utilizaron para calcular la abundancia del ARNm. Los resultados se normalizaron con respecto al ARN 18S, debido a que los niveles fueron altamente abundantes y esencialmente invariables, mientras que los genes de limpieza fueron modulados con estado de enfermedad. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se hicieron utilizando los ratios de mRNA/18S calculados.

Análisis transferencia Western

[0124] Los análisis de transferencia Western se utilizaron para evaluar los niveles de Akt, fosfo-Akt, GSK-3®, fosfo-GSK-3®, Tau y α -actina. El Tejido fresco congelado (~100 mg) se homogeneizó en 5 volúmenes de ensayo de radio-inmunoprecipitación (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.25% Na-desoxicolato, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA) que contiene inhibidores de proteasa (1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK, 1 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml pepstatina A, 0.5 mg/ml leupeptina, 1 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇) y fosfatasa (2 mM Na₃VO₄). La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo el ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Las muestras que contenían 100 mg de proteína se fraccionaron por medio de dodecil sulfato de sodio, electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (2000)). Las proteínas se transfirieron a Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA) membranas PVDF y sitios de unión no específicos se absorbieron con SuperBlock-TBS (Pierce, Rockford, IL). Se incubaron las membranas durante la noche a 4°C con un anticuerpo primario (0.5-1 mg/ml) diluido en Solución salina tamponada con Tris (TBS; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) que contiene 1% de albúmina de suero bovino y 0.05% Tween-20 (TBST-BSA). Se detectó inmunoreactividad utilizando peroxidasa de rábano silvestre (HRP) conjugado IgG (Pierce, Rockford, IL), Reactivos de quimioluminiscencia Lightning Western (Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA) y lámina para autorradiografía. Todas las incubaciones se realizaron con agitación suave de la plataforma. Se cuantificó la inmunoreactividad utilizando la Estación de Imagen Kodak Digital Science (NEN Life Sciences, Boston, MA).

Inmunoprecipitación

[0125] Se utilizaron estudios de inmunoprecipitación para examinar las interacciones entre la subunidad p85 de quinasa PI3 y el sustrato receptor de insulina (IRS) tipos 1 y 2. Las muestras de tejido se homogenizaron en tampón RIPA que contenía inhibidores de la proteasa y fosfatasa (1 mg/ml aprotinina, 0.5 mg/ml leupeptina, 1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK, 1 mg/ml pepstatina A, 2 mM vanadato de sodio) y se diluyeron en tampón de lisis HEPES que contenía 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA y 0.1% Triton X-100 justo antes de usar en los ensayos de

inmunoprecipitación. Después de pre-limpieza, las muestras que contenían 250 mg de proteína se incubaron con el anticuerpo primario durante 2 horas a 4°C con rotación constante. Se capturaron complejos inmunes en el UltraLink immobilized Protein A/G (Pierce, Rockford, IL) durante dos horas de incubación a 4°C con rotación suave. Los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces en 0.5 ml de tampón de lisis Hepes y, luego, se utilizaron en ensayos de quinasas. (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (2000)).

Tinción inmunohistoquímica

[0126] Las secciones del hipotálamo y neocorteza temporal o frontal embebidas con parafina y tamponadas y fijadas con formalina se inmunotñieron con anticuerpos al receptor de la insulina, el receptor del IGF-I utilizando la avidina biotina método de peroxidasa de rábano silvestre y, o bien NovaRed o diaminobencidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) como el cromógeno. (de la Monte et al., Lab. Invest. 80:1323 (2000)). Las secciones tiñeron por contraste con hematoxilina y examinadas por microscopio de luz.

Fuente de Reactivos

[0127] Los anticuerpos para el receptor de insulina, el receptor del IGF-I, el IRS-1, el IRS-2 y la subunidad p85 de la quinasas PI3 se obtuvieron de la Cell Signaling (Beverly, MA). Anticuerpos contra el GSK-3®, Akt y anticuerpos fosfo específicos contra GSK-3® y Akt se adquirieron de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Proteína agarosa A/G se obtuvo de Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Los reactivos para la tinción inmunohistoquímica se adquirieron a Vector Laboratories, (Burlingame, CA). Todos los otros productos químicos finos se adquirieron ya sea de CalBiochem (Carlsbad, CA) o de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Análisis Estadísticos

[0128] Los datos representados en los gráficos representan la media $\pm$ 6 S.E.M.s para cada grupo. Las comparaciones intergrupo se hicieron utilizando pruebas-t Student o medidas repetidas de análisis de la varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Tukey-Kramer para la significancia. Se realizaron análisis estadísticos utilizando el Sistema Estadístico Number Cruncher (Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT). El programa informático generó los valores-P que se indican en los gráficos. Los valores-P < 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

EJEMPLO 2

Reducción de la expresión del receptor de factor de crecimiento en EA

[0129] Los estudios de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real demuestran transcritos de ARNm correspondientes a receptores de la insulina, el IGF-I y el IGF-II en la corteza cerebral, el hipocampo y el hipotálamo de ambos, control y cerebros con EA (FIG. 1). La insulina, los receptores de IGF-I e IGF-II se expresaron en 400 a 2.000 veces mayores niveles en el hipocampo y el hipotálamo que en la corteza frontal. Los receptores de IGF-I e IGF-II se expresaron, en general, más abundantemente que los receptores de insulina, y en los cerebros en control, IGF-I se expresaron más abundantemente que los receptores IGF-II. En la EA, los transcritos de ARNm en IGF-I e IGF-II se expresaron en niveles similares, excepto en la corteza frontal donde el receptor del IGF-I se expresó a niveles superiores que los receptores del IGF-II, como fue el caso para el grupo de control. Los niveles de insulina y la expresión del receptor IGF-I fueron significativamente mayores en la corteza frontal de control, el hipocampo y el hipotálamo, que en las regiones correspondientes de cerebros con EA, mientras que los niveles medios de del ARNm receptor del IGF-II fueron similares en el control y en las muestras de EA (FIG. 1). Después de volver a trazar los datos del receptor de insulina para poner en relieve las diferencias regionales e intergrupo, se hizo evidente que los niveles medios del receptor de transcritos de ARNm de la insulina y del IGF-I en el hipocampo y el hipotálamo fueron de 8 a 10 veces inferiores en la EA que las correspondientes regiones de los cerebros de control, mientras que en la corteza frontal, las diferencias intergrupo fueron mucho más pequeñas, ya que los transcritos de ARNm de los receptores de la insulina y del IGF-I se redujeron en aproximadamente un 40% en la EA (FIG. 1D).

[0130] Los niveles de expresión reducida de los receptores de la insulina y del IGF-I no podrían explicarse únicamente sobre la base de la pérdida neuronal debido a que muchas neuronas intactas histológicamente en los cerebros con EA muestran bajos niveles o ausencia de inmunoreactividad.

Por otra parte, el hipotálamo, que no presenta una amplia pérdida de células o neurodegeneración hasta en las fases avanzadas de la enfermedad, mostró sorprendentes reducciones en la expresión del receptor de ARNm y en la inmunoreactividad en la EA. Los niveles reducidos de expresión del receptor de factor de crecimiento podrían deteriorar la señalización y, efectivamente, dar lugar a la resistencia a la insulina/IGF-I en el cerebro. Aquí, es importante destacar que las anomalías en la EA no se limitan a las vías de señalización de insulina, ya que también implican claramente mecanismos estimulados de IGF-I y, posiblemente, de IGF-II. Una segunda conclusión es que existen anomalías en las cascadas activadas del de crecimiento a nivel del receptor.

EJEMPLO 3

Reducción de expresión del factor de crecimiento local en cerebros con EA

[0131] Los estudios de RT-PCR cuantitativa en tiempo real detectaron la expresión del ARNm de la insulina, el IGF-I y el IGF-II en los cerebros de control envejecidos y en los cerebros con EA. Los niveles más altos en la expresión del factor de crecimiento se observaron en el hipocampo y el hipotálamo, donde los niveles medios fueron de 30 veces a 50 veces mayor que en la corteza frontal (FIG. 2). La expresión del gen de insulina fue mayor en el hipocampo, pero fue indetectable en la corteza frontal. La expresión del ARNm del IGF-I fue 10 a 30 veces mayor en el hipocampo que en el hipotálamo o la corteza frontal. El ARNm del IGF-II se expresó en altos niveles de manera similar tanto en el hipocampo como en el hipotálamo, y ambos fueron aproximadamente 40 veces mayor que en la corteza frontal. Un nuevo análisis de los datos por región demostró niveles relativamente altos de insulina y de IGF-II en el hipocampo, y la expresión del IGF-II > IGF-I >>> la insulina en el hipotálamo y la corteza frontal (FIG. 2).

[0132] En la EA, la expresión del gen de insulina en el hipocampo y en el hipotálamo fue se redujo significativamente con respecto al control (no se detectó la expresión del gen de la insulina en la corteza frontal). Los niveles medios de transcritos de ARNm de insulina en el hipocampo y en el hipotálamo fueron 4 veces a 5 veces menores que en los controles. Los niveles medios de la expresión génica de IGF-I en el hipotálamo y en la corteza frontal en la EA fueron significativamente (4 a 5 veces) menores que en las regiones correspondientes de los cerebros de control (FIG. 2). Finalmente, los niveles de ARNm del IGF-II fueron también significativamente reducidos en la corteza frontal, el hipocampo y el hipotálamo en la EA. Una vez más, las mayores diferencias intergrupos (4 a 5 veces) se observaron en el hipocampo y en el hipotálamo, mientras que en la corteza frontal, la expresión del IGF-II fue solo levemente reducida (~35%) en la EA.

[0133] Por lo tanto, en la EA, el problema no es simplemente de resistencia a la insulina/IGF-I, sino que hay también una deficiencia significativa en la producción local del factor de crecimiento del SNC. La escasez de expresión del gen del factor de crecimiento SNC sería, sin duda, de esperar que deteriore sustancialmente la señalización del factor de crecimiento. Además, si el SNC fuera dependiente de la producción local del factor de crecimiento, una reducción del suministro produciría un estado de retirada del factor de crecimiento, que es un mecanismo bien establecido de la muerte celular neuronal. A fin de mantener la integridad de las funciones del SNC dependientes de la insulina/IGF-I, deben aumentarse ya sea los niveles de sensibilidad o de expresión del receptor, o se debe activar o mejorar un mecanismo para aumentar la absorción de CNS de factores de crecimiento a partir de sangre periférica. Cabe destacar que: 1) el problema de la EA no es solo la resistencia a la insulina, ya que también se ven afectados los factores de crecimiento relacionados; y 2) la resistencia a la insulina, el IGF-I, y, posiblemente, el IGF-II derivan de problemas relacionados con la deterioro de la producción del factor de crecimiento del SNC, y, o bien la baja regulación de los genes de los receptores correspondientes o la pérdida progresiva de neuronas que soportan esos receptores.

EJEMPLO 4

La Inmunoreactividad a la Insulina Neuronal Reducida, el IGF-I, el Receptor de Insulina y el Receptor de IGF-I en cerebros con EA

[0134] Las distribuciones celulares de insulina, IGF-I y de los correspondientes receptores se examinaron por tinción inmunohistoquímica de formalina fija, secciones embebidas en parafina de la corteza frontal, el hipocampo y el hipotálamo a partir de 14 cerebros con EA y 10 controles. Se observó en las neuronas y procesos neuríticos la inmunorreactividad correspondiente a la insulina o polipéptidos de IGF-I, mientras que los receptores de la insulina y del IGF-I se encontraron expresados en neuronas, neuritas neurópilas, glia y células musculares lisas tanto del parénquima como los vasos leptomeníngeos. En correspondencia con los resultados de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, las neuronas positivas de insulina-, del IGF-I-, del receptor de insulina-, y del receptor del IGF-I- fueron menos abundantes en la EA en comparación con las muestras de hipocampo de control de edad normales (FIG. 3). El marcado neuronal reducido en los casos de EA se debió a la pérdida de neuronas, así como la reducción de expresión neuronal de los factores de crecimiento y los receptores del factor de crecimiento correspondientes. Este último era evidente por las reacciones negativas de inmunotinción observadas en las neuronas que aparecen histológicamente intactas (FIG. 3). En contraste, los grados de etiquetado receptor del factor de crecimiento en recipientes fueron similares en la EA y en las muestras de control.

[0135] Los estudios de tinción inmunohistoquímica demostraron la expresión tanto de los factores de crecimiento como de los receptores del factor de crecimiento en las neuronas del SNC. Aunque se identificó la inmunoreactividad del factor de crecimiento principalmente en las neuronas, otros tipos de células, incluidas las glia, pueden también expresar esos mismos factores de crecimiento así como los receptores correspondientes. Una posible explicación para el cambio en el factor de crecimiento y los perfiles de expresión del receptor observados en la EA en relación con los cerebros de control es que la activación de células glial combinada con la pérdida de células puede jugar un papel. La expresión del receptor de la insulina y del IGF-I se detectó en la vasculatura, así como en las células epiteliales del plexo coroideo, neuronas y glía. Se ha informado previamente la expresión del receptor de la insulina / IGF-I y se ha sugerido que los vasos del SNC pueden ser sensibles a los cambios en los niveles circulantes del factor de crecimiento. No se encontraron diferencias obvias entre la EA y los grupos de control con respecto a la expresión del receptor del factor de crecimiento en recipientes, lo que sugiere que las alteraciones en los niveles de

sangre periférica de la insulina o el IGF-I no podrán afectar negativamente la función del SNC en mayor medida en la EA que en el envejecimiento normal. En cambio, la producción local SNC endógenos puede ser más relevante con respecto a la regulación del factor de crecimiento de las funciones neuronales del SNC.

5 EJEMPLO 5

La detección de insulina, IGF-I, IGF-II y el Correspondiente Receptor de Transcritos de mRNA en Cultivos Neuronales Primarios

[0136] Para confirmar los hallazgos del factor de crecimiento neuronal y la expresión del receptor del factor de crecimiento en el SNC, se ampliaron las investigaciones por medio de mediciones de los niveles de los mismos transcritos de ARNm en las neuronas del SNC cultivadas mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando cebadores específicos de genes de rata (Tabla 2). Se generaron cultivos neuronales primarios a partir de corteza cerebral, el hipotálamo y el hipocampo de un feto de rata y de las neuronas granulares del cerebelo de una rata postnatal, como se ha descrito previamente. (de la Monte et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1950 (2001); de la Monte et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 59:882 (2002); Xu et al., *J. Biol. Chem.* 278:26929 (2003); Chen et al., *J. Alzheimers Dis.* 5:209 (2003); Nillni et al., *Endocrinology* 137:5651 (1996)). En el momento de la recolección, las neuronas eran post-mitóticas y tenían abundantes procesos característicos de las células diferenciadas.

Los estudios de RT-PCR cuantitativa en tiempo real demostraron la expresión de insulina, del IGF-I, del IGF-II, los transcritos del ARNm del receptor de insulina, del receptor del IGF-I y del receptor del IGF-II en neuronas cultivadas (FIG. 4). Los receptores de la insulina, del IGF-I y del IGF-II se expresaron a más altos niveles en las neuronas granulares del cerebelo comparadas con neuronas de origen cerebral (FIGS. 4A- 4C). Entre las estructuras cerebrales, los receptores de la insulina y el IGF-I se expresaron a altos niveles en las neuronas corticales seguidas por las neuronas del hipotálamo, mientras que las neuronas del hipocampo tuvieron los más bajos niveles de expresión de los receptores de la insulina e del IGF. Los cultivos corticales, del hipocampo y del hipotálamo tuvieron igualmente bajos niveles de expresión del receptor de IGF-II, aunque las neuronas corticales tuvieron los niveles más altos. Análisis adicionales de los datos para destacar las diferencias regionales en la expresión del receptor del factor de crecimiento demostró que la expresión del receptor de la insulina en el cerebelo fue la más abundante, seguida por el receptor del IGF-I y, luego, por el receptor del IGF-II, mientras que en las neuronas corticales y del hipotálamo, el orden de la abundancia del receptor fue IGF-I > IGF-II > Insulina (FIGS. 4D and 4E). En las neuronas del hipocampo, el ARNm receptor del IGF-II fue el más abundante, seguido por el receptor de la insulina y, luego, el receptor del IGF-I.

[0137] Los genes de insulina, IGF-I y IGF-II se expresaron a niveles significativamente más altos en las neuronas del cerebelo en comparación con las neuronas aisladas del hipocampo, del hipotálamo y de la corteza cerebral. Entre las estructuras cerebrales estudiadas, la expresión del gen de insulina fue la más alta en las neuronas del hipocampo, seguida por las neuronas del hipotálamo (FIG. 5A). Las neuronas corticales tuvieron una muy baja, pero sin embargo detectable expresión de genes de insulina. En contraste, los transcritos del ARNm del IGF-I se expresaron a niveles relativamente bajos en las neuronas del hipocampo y del hipotálamo, y niveles altos en las neuronas corticales cultivadas (FIG. 5B). La expresión del gen del IGF-II fue más alta en las neuronas del hipocampo, seguida por las neuronas corticales y del hipotálamo (FIG. 5C). Análisis adicionales de las diferencias regionales en la expresión del gen del factor de crecimiento revelaron que el IGF-II expresó de manera más abundante el factor de crecimiento tanto en las neuronas del cerebelo como en las del hipocampo, seguido por el IGF-I, y la insulina. En las neuronas corticales e del hipotálamo, el orden del factor de crecimiento de la abundancia de ARNm fue: IGF-I > IGF-II > insulina. (FIGS. 5D y 5E).

EJEMPLO 6

Análisis de Descenso de las Moléculas de Señalización Clave de los Receptores de la insulina / IGF-I

[0138] La insulina y el IGF-I mediaron sus efectos por medio de la activación de las vías de señalización intracelulares complejas que se inició por la unión del ligando a los receptores de la superficie de la célula y la activación consiguiente de la tirosina quinasa receptora intrínseca. (Ullrich et al., *Nature* 313:756 (1985); Myers et al., *Trends Biochem. Sci.* 19:289 (1994); O'Hare et al., *Int J Biochem* 22:315 (1990)). Insulin/IGF-I receptor tyrosine kinases phosphorylate IRS molecules. (Myers et al., *Trends Biochem. Sci.* 19:289 (1994); Sun et al., *Nature* 352:73 (1991); White et al., *Nature* 318:183(1985); Sun et al., *Mol. Cell. Biol.* 13:7418 (1993)). El tirosil fosforilado IRS-1 (PY-IRS-1) transmite señales intracelulares que median el crecimiento, las funciones metabólicas y de supervivencia por medio de la interacción con moléculas que contienen src-homology 2 (SH2) en descenso a través de a través de motivos específicos localizados en la región C-terminal del IRS-1, con activación consiguiente del Erk MAPK y la quinasa/Akt del PI3, y la inhibición de GSK-3 β . (Giovannone et al., *Diabetes Metab. Res. Rev.* 16:434 (2000)). En este sentido, la unión del PY-IRS-1 al p85 estimula el transporte de glucosa e inhibe la apoptosis mediante la activación de la quinasa B Akt/Proteína o la inhibición del GSK-3 β . (Kulie et al., *Mol. Cell. Biol.* 17:595 (1997); Dudek et al., *Science* 275:661 (1997); Burgering et al., *Nature* 376:599 (1995); Delcommenne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11211 (1998); Kido et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:972 (2001)). La quinasa Akt inhibe la apoptosis mediante la fosforilación GSK-3 β y BAD, volviéndolas inactivas. (Delcommenne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11211 (1998); Datta et al., *Cell* 91:231 (1997); Kennedy et al., *Mol. Cell. Biol.* 19:5800 (1999); Brunet et al., *Cell*

96:857 (1999)). Los bajos niveles de Akt quinasa y altos niveles de actividad o BAD activado GSK-3®, se asociación aumentada y disfunción mitocondrial en las células neuronales. La permeabilidad de la membrana mitocondrial disturb MAL y y promueve la liberación del citocromo c, que activa las caspasas. (Kennedy et al., Mol. Cell. Biol. 19:5800 (1999); Brunet et al., Cell 96:857 (1999)). Las alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial puede incrementar los radicales en la célula que provocan daño al ADN mitocondrial, deteriorar la función mitocondrial, y activar cascadas pro-apoptosis. Jaeschke et al., Toxicol. Sci. 65:166 (2002); Pastorino et al., J. Biol. Chem. 273:7770 (1998)).

[0139] Para examinar la integridad de las vías de señalización que se activan mediante la expresión génica de la insulina/IGF-I, el IRS-1, el IRS-2 y el IRS-4, se hizo la medición. No se examinó el IRS-3 debido a que el porque esa isoforma sólo se expresó en el tejido adiposo de roedores. Dado que una de las vías de señalización clave ha sido activada por la disminución de la señalización de la insulina/IGF-I mediante del IRS es la PI3 quinasa-Akt, la que es mediada por la unión de la subunidad p85 de la quinasa PI3 a un motivo específico ubicado dentro de la región terminal de carboxilo de las proteínas IRS, hemos investigado la integridad de esta vía en la EA. Giovannone et al., Diabetes Metab. Res. Rev. 16:434 (2000)). Esto se logró mediante el examen de los niveles de tirosina fosforilados (PY) de los receptores de la insulina y IGF-II, la expresión de la proteína de la insulina y del IGF-I y los grados de interacción entre la subunidad p85 de la quinasa del PI3 y del PY-IRS por medio de inmunoprecipitación/análisis de transferencia Western (FIG. 6). Los niveles de Akt, fosfo-Akt, GSK-3®, fosfo- GSK-3®, y ®-actina (control) se evaluaron mediante análisis de transferencia Western con densitometría de imagen digital (FIG. 7).

De manera adicional, se midieron los niveles de ARNm de la proteína precursora (FIG. 8) porque ambas moléculas se expresan y procesan de manera anormal en la EA y estudios previos demostraron que la expresión de la tau, pero no la APP se regula mediante la estimulación de la insulina/IGF-I. (de la Monte et al., Cell. Mol. Life Sci. 60:2679 (2003); Hong et al., J. Biol. Chem. 272:19547 (1997)). Los análisis se enfocaron en las regiones del hipocampo y del hipotálamo, dados sus niveles relativamente altos de factor de crecimiento y de expresión del receptor del factor de crecimiento en comparación con la corteza frontal.

[0140] Los transcritos de ARNm del IRS-1 fueron significativamente más abundantes que en el IRS-2 o el IRS-4 ($P<0.001$). El IRS-4 fue el siguiente en abundancia, mientras que el IRS-2 expresó muy bajos niveles (FIGS. 6A-6C). En la Ea, los niveles de ARNm en el IRS-1 en la corteza frontal, el hipocampo y el hipotálamo se redujeron significativamente en relación al control, en tanto que la expresión del IRS-4 fue similar en las muestras de control y en la EA. Los análisis de inmunoprecipitación/transferencia Western demostraron que niveles significativamente reducidos de tirosina fosforilada en los receptores de la insulina y el IGF-I, así como reduce la expresión del receptor de la insulina y el IGF-I (FIGS. 6E-6G). Como era de esperar, los niveles reducidos de tirosina fosforilada en los receptores y expresión de receptores de la insulina/IGF-I se asociaron con niveles significativamente reducidos de p85 asociada a IRS-1 en EA con respecto a los tejidos de control del hipocampo y del hipotálamo (FIG. 6D), que refleja un descenso en la señalización deteriorada a través de las moléculas del IRS. No se hizo un seguimiento a las interacciones del IRS-2 y el IRS-4 con el p85, porque esas moléculas son difíciles de detectar mediante el análisis de transferencia Western debido a los bajos niveles de expresión.

[0141] Se condujeron investigaciones adicionales de los mecanismos de señalización de supervivencia estimulada de la insulina y del IGF-I utilizando muestras de tejido del hipocampo y del hipotálamo debido a sus relativamente altos niveles de factor de crecimiento y expresión del factor de crecimiento en comparación con la corteza frontal. El descenso de la señalización de supervivencia de la quinasa PI3 se asocia con niveles crecientes de fosfo-Akt y fosfo-GSK-3® ya que conduce a la fosforilación para la activación de la quinasa Akt y la inhibición de la actividad del GSK-3®. Los análisis de transferencia Western con densitometría demostraron niveles medios significativamente reducidos de fosfo-Akt (FIG. 7A) y de fosfo-GSK-3® (FIG. 7C) pero niveles medios similares de Akt totales. (FIG. 7B) y GSK-3® (FIG. 7D) proteína en el tejido del hipocampo. Resultados similares se obtuvieron utilizando muestras de tejido del hipocampo. Los niveles relativamente reducidos de fosfor-Akt y fosfor-GSK-3® refleja niveles constitutivamente reducidos de actividad de la quinasa Akt y niveles incrementados de la actividad del GSK-3® en la EA. En contraste, la expresión de la ®-actina no se vio reducida significativamente en la EA con respecto a cerebros de control envejecidos (FIG. 7E).

[0142] Considerando que la expresión de la tau se regula mediante la insulina/IGF-I y el volumen de A® está mediada en parte por la enzima que degrada la insulina (IDE), se llevaron a cabo estudios para medir los niveles de ARNm de la tau y la IDE. De manera adicional, considerando que la captación y la utilización de la glucosa se regulan en parte por moléculas transportadores de glucosa, que incluyen GLUT4 y expresión APP incrementada podría ser responsable de la acumulación A® en el cerebro, los estudios de RT-PCR en tiempo real se extendieron a la medición de los niveles del ARNm de los transcritos de ARNm de GLUT4 y APP en los tejidos del hipocampo y del hipotálamo. Esos estudios demostraron niveles significativamente reducidos de tau y niveles significativamente elevados de transcritos de ARNm de APP en la EA con respecto a los casos de control (FIGS. 8A-8D). En contraste, no se observaron diferencias significativas en los niveles medios del GLUT4 o de los transcritos de ARNm de IDE entre los grupos de EA y de control (FIGS. 8E-8H).

[0143] Los estudios demostraron que el ARNm del IRS-1 se expresó de manera más abundante que el IRS-2 o el IRS-4, y en la EA, los niveles del ARNm del IRS-1 se redujeron significativamente. Aunque no se conoce el

mecanismo de la expresión de IRS-1 reducida, estudios exploratorios en líneas de células neuronales demostraron que la expresión del IRS-1 se regula mediante la estimulación de la insulina y del IGF-I (Carter, et al, 2004, No publicado). Los niveles marcadamente reducidos de expresión génica del IRS-1 son una reminiscencia de los modelos knock-out del receptor murino del IRS-1 y la insulina que exhiben peso corporal y cerebral reducido debido a que la insulina deteriorada estimuló la señalización de supervivencia y de crecimiento. (Schubert et al., J. Neurosci. 23:7084 (2003); Doublier et al., Growth Horm. IGF Res. 10:267 (2000); Nishiyama et al., Gene 141:187 (1994)). De manera adicional, los humanos con diabetes Tipo 2 y el Síndrome X tienen niveles significativamente reducidos de expresión del IRS-1 que se asocia con una señalización de insulina deteriorada que desciende a través de la quinasa de PI3 y del Akt. (Smith et al., Ann. NY Acad. Sci. 892:119 (1999)).

[0144] Dado que la insulina y el IGF-I transmiten señalización pro-supervivencia y pro-crecimiento a través de las moléculas IRS, la expresión de niveles reducidos de IRS pudo contribuir a la resistencia del factor de crecimiento en el SNC. En correspondencia con los niveles reducidos de factor de crecimiento, de receptor del factor de crecimiento y de la expresión génica del IRS, análisis adicionales de las vías de señalización descendientes demostraron que un nivel reducido del IRS asociado a la actividad de la quinasa PI3 (se refleja en la reducción de los niveles de p85 asociada IRS-1), niveles disminuidos de fosfo-Akt (que se refleja en la actividad disminuida de Akt) y niveles reducidos de fosfo-GSK-3 β (que se reflejan en la actividad incrementada de GSK-3 β). Por lo tanto, el factor de crecimiento disminuido y la expresión del receptor se asociaron con mecanismos de supervivencia de señalización deteriorados en la EA.

[0145] El hallazgo de niveles reducidos de ARNm de tau en la EA es de interés debido a que estudios previos demostraron que el IGF-I y la insulina regulan la expresión de ARNm e las neuronas. (de la Monte et al., Cell. Mol. Life Sci. 60:2679 (2003)).

Por consiguiente, el nivel bajo de ARNm correlaciona la tau con mecanismos de señalización de insulina e IGF-I deteriorados. Por otra parte, los niveles incrementados de fosfo-tau en cerebros con EA pudieron también reflejar la señalización de insulina/IGF-I deteriorada con niveles incrementados consiguientes de la actividad de GSK-3 β , ya que el GSK-3 β es una de las principales quinasas responsables de la hiper-fosforilación de tau. (Hong et al., J. Biol. Chem. 272:19547 (1997)). El nivel incrementado del ARNm del APP en los cerebros con EA es de interés, porque esto sugiere el mecanismo basado en la transcripción por la deposición amiloide- β en el cerebro. Este resultado también es consistente con demostraciones anteriores de que la expresión de APP se incrementa con el estrés oxidativo (Chen et al., J Alzheimers Dis. 5:209 (2003)), y que los niveles incrementados de amiloide- β pueden ser neurotóxicos (Lorenzo et al., Ann. NY Acad. Sci. 777:89 (1996); Niikura et al., J. Neurosci. Res. 70:380 (2002); Tsukamoto et al., J. Neurosci. Res. 73:627 (2003)). El deterioro de la señalización de la insulina ya se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en las células neuronales. (de la Monte et al., Cell. Mol. Life Sci. 59:882 (2002); Hoyer et al., Ann. NY Acad. Sci. 920:256 (2000); Hoyer et al., Ann. NY Acad. Sci. 893:301 (1999)). Estudios adicionales demostraron que las anomalías asociadas a EA en los mecanismos de señalización de insulina / IGF-I no estuvieron acompañados por una expresión reducida de GLUT4 o de IDE. En conjunto, los resultados sugieren que la alteración de la insulina / IGF-I estimuló la señalización de la supervivencia y el estrés oxidativo crónico consiguiente representa importantes anomalías en la EA.

EJEMPLO 7

Reducción de la Expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Durante la Progresión de la EA

[0146] La reducción en la expresión del receptor del factor de crecimiento se analizó de manera adicional mediante el análisis postmortem de tejido cerebral con diferentes grados de gravedad de EA. Se utilizó tejido rápidamente congelado (~100 mg each) de la corteza frontal anterior para extraer ARN y proteína. Las muestras se dividieron en cuatro grupos: Control (Braak 0-1), Braak 2-3, Braak 4-5 y Braak 6. Estudios de RT-PCR cuantitativa en tiempo real demostraron que los transcritos de ARNm correspondientes a los receptores de insulina, de IGF-I y de IGF-II en la corteza frontal tanto de los cerebros con EA como de los cerebros de control (FIG. X). Entre los casos del grupo Braak 0-1, los transcritos de ARNm del receptor de IGF-I fueron más abundantes y casi diez veces mayor que el gen receptor del IGF-II y 500 veces mayor que el receptor de la insulina. Con una creciente severidad en la etapa Braak de la neurodegeneración de la EA, disminuyeron los niveles medios de ARNm en la insulina y el IGF-I y fueron y eran significativamente más bajos que el control incluso en el cerebro con gravedad de la enfermedad en el grupo Braak 2-3 (FIGS 9A and 9B). Se observaron los niveles medios más bajos de expresión del receptor de insulina y del IGF-I en los cerebros con EA en el grupo Braak 6. Consecuentemente, los niveles medios de ARNm de la insulina y del receptor IGF-I fueron significativamente mayores en el grupo Braak 2-3 en relación con los grupos Braak 4-5 y Braak 6. La expresión del receptor del IGF-II no se vio significativamente modificada en ninguno de los grupos de EZ con respecto a los de control (FIG. 9C).

[0147] El hallazgo de reducida expresión del receptor de insulina y del IGF-I en la EA es consistente con los resultados de estudios previos que demostraron reducciones significativas de ambos transcritos de ARNm en la etapa tardía de la EA con respecto a los cerebros de control. En esos estudios, se obtuvo evidencia también, respecto de que los receptores de insulina y del IGF-I se expresaron en las neuronas del SNC y que, en la EA, la reducida expresión del receptor es relacionaba tanto con la pérdida neuronal como con la baja regulación de los

genes. Los hallazgos en el presente documento sugieren que la pérdida de la insulina y el receptor del IGF-I que conducen a las neuronas se produce tempranamente en el curso de la neurodegeneración de la EA, pero la caída más abrupta es evidente en el Braak Etapa 6 o en la fase terminal de la enfermedad. Niveles reducidos de expresión del receptor del factor de crecimiento podría afectar de señalización, y causar efectivamente resistencia a la insulina/IGF-I en el cerebro. Es importante destacar que estos resultados proporcionan evidencia de que las anomalías en la EA no se limitan a las vías de señalización de insulina, sino que también implican claramente IGF-I mecanismos estimulados.

EJEMPLO 8

Reducción de la Expresión del Factor de Crecimiento Durante la Progresión de la EA

[0148] Estudios de RT-PCR cuantitativa en tiempo real detectaron transcritos de ARNm polipéptido en la insulina, el IGF-I y el IGF-II en cerebros de control por edad y cerebros con EA (FIGS. 10A-10C). Los niveles de ARNm en el IGF-II fueron más altos en cerebros del grupo Braak 0-1, seguidos por la insulina y, luego, el IGF-I. Reducciones notables y significativas tanto en la expresión génica de la insulina como del IGF-II se observaron en casos del grupo Braak etapas 2-3, y aunque los niveles disminuyeron aún más con el aumento de la gravedad de EA, éstos no disminuyeron significativamente con respecto al grupo Braak 2-3 (FIGS. 10A y 10C). La expresión del ARNm del IGF-I solo se redujo ligeramente en el grupo Braak 2-3, pero sustancialmente y significativamente reducida tanto en el grupo Braak 4-5 como en el grupo Braak 6 con respecto al control (FIG. 10B).

[0149] Los estudios demostraron reducciones progresivas en la expresión génica del factor de crecimiento con el aumento de la gravedad de la neurodegeneración EA. Por lo tanto, en la EA, el problema no es solamente la resistencia a la insulina/IGF-I debido a que hay también deficiencias en la producción del factor de crecimiento del SNC local. Es importante destacar que se detectaron niveles significativamente reducidos de expresión génica del factor de crecimiento en cerebros del grupo Braak Etapa 2-3, lo que indica que la anomalía se desarrolla tempranamente en el curso de la enfermedad.

[0150] La gravedad de la enfermedad declina en la expresión del factor de crecimiento indica que estas anomalías empeoran con la progresión de la enfermedad. Al menos con respecto a la insulina y el IGF-II, las reducciones relativas en la expresión de genes del factor de crecimiento eran más pronunciadas que la expresión del receptor correspondiente, lo que sugiera una retirada del factor de crecimiento local puede preceder a la pérdida de neuronas portadoras del receptor del factor de crecimiento. Una escasez de la expresión génica del factor de crecimiento podría sustancialmente deteriorar la señalización del factor de crecimiento en el SNC. Además, si el SNC fuera dependiente de la producción local del factor de crecimiento, la reducción del suministro produciría un estado de retirada del factor de crecimiento, que es un mecanismo bien establecido de la muerte neuronal. A fin de mantener la integridad de las funciones del SNC dependientes de la insulina/IGF-I, deben aumentarse ya sea los niveles de sensibilidad o de expresión del receptor, o se debe activar o mejorar un mecanismo para aumentar la absorción de CNS de factores de crecimiento a partir de sangre periférica.

EJEMPLO 9

Alteraciones en la Expresión de la Tau y de la Proteína Precursora Amiloide Durante la Progresión de la EA

[0151] Estudios de RT-PCR en tiempo real encontraron que los transcritos de ARNm en la tau eran más abundantes en los casos de control del grupo Braak 0-1 y los niveles se redujeron progresiva y significativamente con el aumento de la Etapa Braak, por ej., la gravedad de la neurodegeneración en la EA (FIG. 11 A), correspondiente con las tendencias observadas con respecto a los genes de polipéptidos de insulina y de IGF-I. El grupo Braak 0-1 tuvo el nivel medio más bajo de ARNm en la APP. En los cerebros con Etapa Braak 2 o superior, los niveles de ARNm de APP fueron elevados de manera similar y aproximadamente 4 veces mayores que en los de control (FIG. 11B).

[0152] La reducida expresión de tau observada en la EA es de interés, porque estudios previos demostraron que la expresión del ARNm de la tau neuronal estuvo regulada mediante la estimulación del IGF-I y la insulina. Por lo tanto, las reducciones de ARNm en tau asociadas a la EA correlacionó con los niveles significativamente reducidos de polipéptido de insulina e IGF-I y la expresión del gen receptor en la EA. Fue particularmente notable que la disminución asociada a la EA en la expresión de la insulina y el receptor de la insulina fue paralela a la tendencia con respecto a la tau.

[0153] El presente trabajo muestra que la expresión de APP es significativamente elevada en la enfermedad en el grupo Braak Etapa 2-3, lo que indica que esta anomalía se produce temprano en el curso de la EA. En este sentido, el incremento de la disposición amiloidea- β , que prevalece en los cerebros con EA, puede ser mediada por niveles elevados de ARNm en la APP, ya que las transcripciones más abundantes proporcionarían un sustrato adicional para la escisión enzimática potencialmente aberrante y el procesamiento de la proteína. Estudios previos demostraron que el aumento de la expresión y la escisión de APP con el estrés oxidativo, y que la señalización de insulina deteriorada causa el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en las células neuronales. Dados los altos

niveles de amiloide- β puede ser neurotóxico, el estrés oxidativo inducido por expresión de la APP puede potenciar la cascada de la neurodegeneración en la EA secundariamente a continuación de la acumulación de amiloide- β . En conjunto, los resultados sugieren que la alteración de la insulina / IGF-I estimuló la señalización y el estrés oxidativo crónico consiguiente, representa las principales anomalías que se desarrollan temprano en el curso de la EA.

EJEMPLO 10

Análisis del Ligando de Unión a los Receptores del Factor de Crecimiento Durante la Progresión de la EA

[0154] La insulina y el IGF-I median sus efectos mediante la activación de vías de señalización intracelular complejas que se inician mediante la unión del ligando a los correspondientes receptores de la superficie celular. Por lo tanto, el ligando de unión efectivo es crítico para la cascada de señalización y muchos de los efectos de descenso de la señalización de la insulina deteriorada que ya han sido identificadas en los cerebros con EA, incluida la reducción de la supervivencia neuronal, el aumento de la activación incrementada de GSK-3 β , y el aumento de la fosforilación de tau podría estar mediado por la reducción de la insulina de unión en el SNC. Para examinar este aspecto de la señalización del factor de crecimiento, equilibrio competitivo y afinidad de unión se realizaron ensayo utilizando insulina, IGF-I or IGF-II marcados con [125I], como trazadores y extractos de membrana de tejido del lóbulo frontal postmortem como las fuentes de los receptores.

[0155] Se homogenizó tejido congelado fresco (~100 mg) en 5 volúmenes de ensayo radio-inmunoprecipitación (RIPA) regulador (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.25% Na-desoxicolato, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA) que contiene los inhibidores de proteasa (1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK, 1 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml pepstatina A, 0.5 mg/ml leupeptina, 1 mM NaF, 1 mM Na4P2O7) y fosfatasa (2 mM Na3VO4). La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo el ácido bicinónico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Estudios preliminares determinaron las cantidades y concentraciones de de ligando radiomarcado requerido para alcanzar el 20% de unión específica.

[0156] Se realizaron ensayos de unión del receptor de la insulina con 200 mg de proteína. Los ensayos de unión de IGF-I requirieron 25 mg de proteína por muestra y los ensayos de unión del receptor IGF-II se realizaron con 10 mg proteína. Se utilizaron ensayos de unión de equilibrio para evaluar los niveles de unión del factor de crecimiento en relación con la gravedad de la etapa EA. Esto se logró mediante la determinación de la unión específica neta después de la incubación de las muestras de proteínas a 4°C durante toda la noche con una cantidad fija de radioligando, en presencia o ausencia de exceso de ligando frío y luego luego restando los valores obtenidos para la unión no específica de los correspondientes a la unión total. Para medir la unión total, se incubaron muestras de proteína individuales en 100 ml reacciones que contienen tampón de unión (100 mM HEPES, pH 8.0, 118 mM NaCl, 1.2 mM MgSO4, 8.8 mM dextrosa, 5 mM KCl, 1% de albúmina de suero bovino) y 100 nCi/ml [125I] (2000 Ci/mmol; 50 pM) de insulina, IGF-I, or IGF-II. Para medir una unión no específica, Se prepararon muestras replicadas como se indica adicionado un ligando (frío) no marcado de 0.1 mM.

[0157] Se realizaron ensayos de unión de saturación para evaluar de nivel superior (máximo) de unión y afinidad de unión en relación con la gravedad de la etapa de EA. Se combinaron muestras de 8-12 cerebros por grupo de etapa Braak en proporciones iguales y se utilizaron para generar curvas de unión. Las concentraciones de proteína de los homogeneizados combinados se determinaron con el ensayo de BCA.

Se incubaron muestras duplicadas en 100 ml volúmenes de reacción que contienen tampón de unión y 0.0031 to 1 mCi/ml de [125I] (2000 Ci/mmol) de insulina, IGF-I, o IGF-II. Para medir una unión no específica, se incubaron reacciones duplicadas con las mismas concentraciones de ligando radiomarcado más 0.1 mM de ligando competitivo (frío) no marcado. Se graficaron y analizaron los datos utilizando el programa GraphPad Prism 4 para calcular el Bmax, kD (constante de disociación) y sus desviaciones estándar y 95% intervalos de confianza.

[0158] Se realizaron reacciones en tubos Eppendorff de 1.5 ml a 4°C durante 16 horas con agitación suave de la plataforma. Se precipitó, luego, el ligando trazador de radiomarcado de unión al añadir 500 μ l de 0.15% gamma globulina bovina (preparada en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) seguida por 400 μ l 37.5% glicol polietileno 6000 (PEG-6000; preparado en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) en cada tubo, con agitación vortical a fondo de las muestras e incubándolas en hielo durante al menos 2 horas. Se recogieron los precipitados al centrifugar las muestras a 15,000 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las fracciones de sobrenadante que contienen ligando no unido (libre), se transfirieron en su totalidad a tubos Gamma de recuento individuales (Sarstedt). Los extremos de los tubos de Eppendorff con los sedimentos fueron cortados y se liberaron directamente en tubos Gamma de conteo independiente. Se contaron las muestras durante 1 minuto cada una en un contador LKB CompuGamma CS Gamma. La unión específica se calculó restando CPM o fmol de unión no específica, por ej., cantidad unida en presencia de ligando frío del total CPM o unión fmol (ausencia de ligando competitivo no marcado). Después de determinar que los datos se ajustan a un solo sitio en lugar de un modelo de dos sitios, se analizaron los resultados utilizando regresión no lineal para calcular la unión de saturación (Bmax) y la afinidad de unión (kD) con la realización del análisis de Scatchard para medir de unión de saturación y afinidad de unión utilizando el programa informático GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

[0159] Los estudios de unión de equilibrio demostraron niveles significativamente mayores de unión específica al receptor de insulina en cerebros de control (Braak 0-1) en relación con cerebros con EA. Se detectó unión significativamente reducida en cerebros Braak Etapas 2-3, y con el aumento de la gravedad de EA, los niveles medios de unión a insulina (proteína fmol/mg) se redujeron aún más (FIG. 12A).

La unión al IGF-I fue también significativamente más alta en el Braak 0-1 en comparación con el Braak 2-3 o etapas posteriores de la EA. Sin embargo, lo que corresponde con las reducciones más modestas o ausentes en la expresión del receptor con la progresión de la EA, los niveles medios de unión al IGF-I (fmol/mg) tampoco disminuyó significativamente con la gravedad de la neurodegeneración (FIG. 12B). Los perfiles asociados a EA relativos a la unión de IGF-II fueron más parecidos a aquellos ya descritos para la insulina. Los cerebros de control (Braak 0-1) tuvieron niveles medios significativamente superiores de unión de IGF-II (fmol/mg) en comparación con todos los otros grupos de EA (FIG. 12C). De manera adicional, con la progresión de la neurodegeneración de EA, los niveles medios de unión de IGF-II disminuyeron de tal manera que se observaron los niveles más bajos en los casos de Braak 6. La unión del IGF-II no se redujo en la EA en relación con los cerebros de control.

En lugar de ello, se detectó un aumento significativo de los niveles medios de unión específica en cerebros con Braak 2-3 o etapas más avanzadas de la EA (FIG. 12C). En contraste con los hallazgos obtenidos con respecto a la insulina de unión, no se observaron reducciones progresivas en la unión del IGF-I con el aumento de la gravedad de la EA (FIG. 12B).

[0160] Se utilizaron análisis de Scatchard para determinar si, además de la reducción de expresión de receptor, los bajos niveles de unión de ligando estaban asociados con la afinidad de unión del receptor modificado. Las gráficas de Scatchard revelaron menor unión Bmax (nivel superior) para la insulina, el IGF-I, y el IGF-II en todos los casos de EA en relación con los grupos de control (FIGS. 13A-13L y Tablas 3-5). La tendencia para niveles progresivamente reducidos de Bmax con el aumento de la gravedad de EA fue estadísticamente significativa tanto para la insulina como para el IGFII ($P < 0.001$). Se calcularon las afinidades (KD) de unión al receptor utilizando el programa informático Graphpad Prism 4. El análisis mostró afinidades (menor KDs) de unión al receptor de la insulina, el IGF-I y el IGF-II en la EA con respecto a los cerebros de control. De manera adicional, el análisis de correlación reveló asociaciones negativas significativas entre la etapa Braak y la afinidad de unión de la insulina o el IGF-II, por ej., grados más altos de EA se correlacionaron con los niveles más bajos de la unión máxima / saturación y afinidades (menor KD) de unión más altas (Tablas 3-5). En contraste, esas líneas de tendencia no fueron estadísticamente significativas con respecto al Bmax o al KD del receptor del IGF-I.

Tabla 3. Análisis Scatchard de insulina vinculante en el Cerebro

Valores mejor ajustados	Braak 0-1	Braak 2-3	Braak 4-5	Braak 6
BMAX*	7.155	3.974	2.638	2.508
KD*	195.2	69.23	39.99	42.23
Std. Error				
BMAX	1.209	0.1915	0.201	0.2242
KD	49.57	6.23	6.73	8.13
95% Intervalos de Confianza				
BMAX	4.461 a 9.849	3.547 a 4.400	2.190 a 3.086	2.009 a 3.008
KD	84.80 a 305.7	55.19 a 83.28	24.99 a 54.98	24.12 a 60.35
Bondad del Ajuste				
R ²	0.9876	0.9964	0.9833	0.9777
*P<0.001 para la EA asociada a la etapa disminuye en BMAX (unión reducida de nivel superior) y KD (aumento de la afinidad) mediante pruebas de análisis de correlación Pearson.				

Tabla 4. Análisis Scatchard de IGF-I vinculante en el Cerebro

Valores mejor ajustados	Braak 0-1	Braak 2-3	Braak 4-5	Braak 6
BMAX*	5.607	3.957	3.381	0.6775
KD*	89.36	85.41	70.48	9.342
Std. Error				
BMAX	0.9428	0.5355	0.2632	0.06524
KD	25.57	20.7	10.35	2.622
95% Intervalos de Confianza				
BMAX	3.506 a 7.707	2.764 a 5.150	2.795 a 3.968	0.5321 a 0.8228
KD	32.39 a 146.3	39.29 a 131.5	47.42 a 93.53	3.499 a 15.18
Bondad del Ajuste				
R ²	0.9673	0.9789	0.9912	0.8841
*P<0.001 para la EA asociada a la estapa disminuye en BMAX (unión reducida de nivel superior) y KD (aumento de la afinidad) mediante pruebas de análisis de correlación Pearson.				

Tabla 5. Análisis Scatchard de IGF-II vinculante en el Cerebro

Valores mejor ajustados	Braak 0-1	Braak 2-3	Braak 4-5	Braak 6
BMAX*	16.83	12.53	8.136	4.713
KD*	196.9	137.5	74.31	43.2
Std. Error				
BMAX	3.638	1.257	0.6763	0.3796
KD	57.77	20.43	10.72	6.974
95% Intervalos de Confianza				
BMAX	9.281 a 24.37	9.918 a 15.13	6.734 a 9.539	3.926 a 5.500
KD	77.05 a 316.7	95.13 a 179.9	52.07 a 96.54	28.74 a 57.67
Bondad del Ajuste				
R ²	0.9757	0.9895	0.9816	0.9618
*P<0.001 para la EA asociada a la estapa disminuye en BMAX (unión reducida de nivel superior) y KD (aumento de la afinidad) mediante pruebas de análisis de correlación Pearson.				

[0161] Esos estudios demostraron saturación (máxima) significativamente reducida de unión a los receptores de insulina, de IGF-I y de IGFII en la EA con respecto a los cerebros de control. Los niveles de unión a la insulina y el IGF-II descendieron en la etapa de gravedad de la EA, mientras que los niveles medios de unión IGF-I se redujeron de manera similar a través de las diferentes etapas de la neurodegeneración en la EA. Los análisis de Scatchard de los datos de la insulina, el IGF-I y el IGF-II demostraron afinidades de unión mayores (constantes de disociación inferiores-kD) con niveles menores de unión de saturación y de expresión del receptor en la EA. Por consiguiente, los mecanismos de señalización de la insulina, el IGF-I y probablemente el IGF-II deteriorados en la EA son mediados probablemente mediante la expresión disminuida del receptor así como la disponibilidad local reducida del ligando, en lugar de afinidad de unión reducida.

EJEMPLO 11

Alteraciones en el Contenido de Colesterol Durante la Progresión de la EA

5 [0162] El contenido de colesterol de la membrana puede influir en la unión del ligando a los receptores de la superficie celular. Por ejemplo, la disminución o el aumento del contenido de colesterol en las membranas se ha asociado con la alteración o la unión del factor de crecimiento disminuida y transducción de señales. Para determinar si las diferencias observadas en la afinidad de unión al receptor se correlacionaban con el contenido de colesterol en la membrana, se midieron los niveles de colesterol en extractos del lóbulo frontal utilizando el kit de ensayo Amplex Red (Sondas moleculares, Eugene, Oregón) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se prepararon homogeneizados de tejido en tampón RIPA como se describió anteriormente. Las muestras se diluyeron en serie en un tampón de reacción 1x (proporcionado con el kit) y se incubaron con 150 mM de reactivo Amplex Red, 1 U/ml peroxidasa de rábano silvestre, 1 U/ml de colesterol oxidasa y 0.1 U/ml colesterol esterasa en un volumen de reacción final de 100 ml. Se incubaron reacciones a 37°C durante 30 minutos y se midió la fluorescencia en un lector de microplacas Fluorocount (Packard Instrument Co., Meriden, CT) (Ex 560 nm/Em 590 nm). Se generó simultáneamente una curva estándar utilizando un colesterol estándar proporcionado con el kit. Los niveles de colesterol se normalizaron a la concentración de proteína en las muestras. Estudios preliminares demostraron que los niveles de colesterol medidos y las diferencias intergrupo fueron los mismos en los extractos de lípidos en comparación con los extractos de tampón RIPA, tal como lo indicaba el fabricante. Por lo tanto, no fue necesario realizar el análisis con extractos de lípido. Los estudios demostraron niveles significativamente incrementados de colesterol en cerebros con Braak Etapas 4-5 o 6 con respecto a los cerebros con Braak etapas 0-1 o 2-3 (Figure 14A). Los niveles medios de colesterol fueron similares en cerebros con Braak etapas 4-5 y Braak etapa 6 de la EA.

EJEMPLO 12

Alteraciones en los Niveles de ATP Durante la Progresión de la EA

30 [0163] El deterioro de la señalización de la insulina y el IGF-I puede tener como resultado una reducción de la función mitocondrial, del metabolismo energético y de la producción de ATP. Para investigar los efectos del deterioro de la insulina y de la función del IGF-I en la EA, se midieron los niveles estacionarios del ATP en los homogenizados de la corteza utilizando el sistema de ensayo ATPLite (Perkin Elmer, Boston, MA). Los lisados se diluyeron en series y 50 ml de sustrato de ATP se añadieron por cada 150 ml lisato. Muestras de tejido de cerebro congelado instantáneamente fueron homogenizadas con Polytron (Glen Mills Inc., Clifton, New Jersey) en tres volúmenes de PBS que contienen 20 mM glicina, 50 mM de MgSO₄ y 4 mM de EDTA. 100 ml de alícuotas se transfirieron a placas de 96 pocillos negros y 50 ml de tampón de lisis ATPLite se añadieron a cada muestra. Las placas se cubrieron con láminas de plástico adhesivo y se agitaron a 700 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 50 ml de sustrato de ATPLite a cada muestra, y las placas de sellado, cubiertas con papel de aluminio, se agitaron durante 5 minutos adicionales (700 rpm a temperatura ambiente). Se midió la luminescencia en la máquina de TopCount (Packard Instrument Co., Meriden, CT), y se normalizaron los valores de luminescencia del ATP a la concentración de la proteína. Los estudios demostraron niveles significativamente reducidos (~50%) de ATP en la EA (todos los grupos) con respecto a los cerebros de control (Figura 14B). En la EA, los niveles medios de ATP se redujeron consistentemente y no disminuyeron significativamente con la progresión o la gravedad de la neurodegeneración.

EJEMPLO 13

Ensayo de Diagnóstico para la Enfermedad de Alzheimer

50 [0164] Los sujetos que mostraron la patología resultante de EA o en riesgo de mostrar la patología resultante de E fueron sometidos a pruebas de diagnóstico de EA. Muestras de tejido cerebral se obtendrán de cada sujeto. Se aislará ARN de las muestras y sometidas a RT-PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en los Ejemplos 2 y 3 anteriores para determinar el nivel de expresión de la insulina, el IGF-I, el IGF-II, el receptor de la insulina, el receptor de IGF-I y el receptor de IGF-II en el tejido cerebral. Los niveles de expresión medidos serán, entonces, comparados con los niveles de expresión en sujetos sanos emparejados por edad. Si se encuentra que el nivel de expresión medido de dos o más de los factores medidos sería al menos 2 veces menor que el nivel de expresión en los sujetos sanos que el sujeto de la prueba que se considera que tiene EA.

EJEMPLO 14

Modelo Animal de la Enfermedad de Alzheimer

65 [0165] En estudios previos, se utilizó el tratamiento con estreptozotocina intracerebral (STZ-ic) para generar un modelo de neurodegeneración por EA en ratas adultas. Plaschke et al., Int. J. Dev. Neurosci. 11:477 (1993); Duelli et al., Int. J. Dev. Neurosci. 12:737 (1994); Hoyer et al., J. Neural Transm. Suppl. 44:259 (1994); Lannert et al., Behav. Neurosci. 112:1199 (1998). El nombre químico del STZ es 2-Desoxi-2[[metil-nitrosoamino] carbonil] amino} D-glucopiranos (C₈H₁₅N₃O₇) y su masa molecular es de 265 daltons. El STZ es un compuesto de glucosamina-

nitrosourea que cuando se metaboliza genera un producto citotóxico que destruye preferentemente las células beta en los islotes pancreáticos y produce diabetes melitus. Si bien no se comprende el mecanismo preciso de citotoxicidad, las propiedades alquilantes de metabolitos STZ generan especies reactivas de oxígeno y causan estrés oxidativo y daño en el DNA. Esos efectos llevaron al uso del STZ intracerebroventricular para producir un modelo de neurodegeneración. En ratas adultas, la inyección intracerebroventricular de STZ provoca reducciones crónicas (10-30%) en glucosa y metabolismo de glicógeno en la corteza cerebral y el hipocampo. Plaschke et al., *Int. J. Dev. Neurosci.* 11:477 (1993). Esos efectos se asocian con están asociados con el metabolismo oxidativo cerebral reducido significativamente (Duelli et al., *Int. J. Dev. Neurosci.* 12:737 (1994)), inhibición de la función receptora de la insulina (Hoyer et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 920:256 (2000)), y déficits progresivos en el aprendizaje, la memoria, el comportamiento cognitivo, el balance energético cerebral (Lannert et al., *Behav. Neurosci.* 112:1199 (1998); Hoyer et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 893:301 (1999)). Por consiguiente, este modelo proporciona al menos una coincidencia parcial con las anomalías bioquímicas y fisiológicas que se producen en la EA. Sin embargo estudios previos no caracterizan la neuropatología, patología molecular, anormalidades en la expresión de los genes pertinente a la señalización de la insulina y el IGF-1, o la integridad de la arquitectura y la expresión de insulina en el páncreas.

[0166] El presente ejemplo demuestra que el tratamiento de jóvenes animales con STZ intracerebral (ic) produce neurodegeneración que tiene un parecido sorprendente a las características moleculares y patológicas de la EA, incluido el deterioro tanto de los mecanismos de señalización de la insulina como del IGF. Una característica distintiva importante entre este modelo y el modelo STZ -ic caracterizado previamente es que estas eran crías de ratas en lugar de ratas adultas. La justificación del uso de las crías fue la siguiente. Nuestro objetivo inicial al generar el modelo STZ-ic era demostrar las funciones críticas de señalización de la insulina y el IGF durante el desarrollo del cerebelo ya que ya habíamos descubierto que la hipoplasia del cerebelo causada por exposición gestacional crónica se asociaba con deficiencias en la señalización de la insulina y la expresión del gen de la insulina. de la Monte et al., *Cell Mol. Life Sci.* 62:1131 (2005). Sin embargo, nuestras evaluaciones neuropatológicas de los cerebros revelaron atrofia cerebral notable, pérdida neuronal y estructuras seniles similares a placas en la corteza cerebral de las ratas tratadas con STZ-ic. Estas observaciones nos llevaron a seguir esta línea de investigación al caracterizar aún más el modelo de STZ-ic con respecto a las anormalidades neuropatológicas y moleculares y en relación con nuestros hallazgos recientes en los cerebros humanos con EA. Rivera et al., *J. Alzheimers Dis.* 7 (2005), (In Press); Steen et al., *J. Alzheimers Dis.* 7:63 (2005).

Modelo Experimental:

[0167] A crías de ratas Long Evans de tres días de edad se les aplicó inyecciones de STZ intracerebral (ic) bilateral. El STZ se les inyectó a 1,0 mm posterior y 1,0 mm lateral a la bregma, y a 2.5 mm de profundidad a la superficie del cráneo de cada hemisferio utilizando una aguja de calibre 30 colocada en una jeringa microlitro Hamilton. Las ratas de control se inyectaron de forma idéntica con solución salina estéril. Estudios iniciales evaluaron los efectos o dosis de STZ que oscilaban entre 5 y 70 mg/kg como se informó previamente a generar modelos de diabetes mellitus. Andican et al., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32:663 (2005); Saad et al., *Arch. Toxicol.* (2005); Srinivasan et al., *Pharmacol. Res.* 52:313 (2005); Karabatas et al., *Pancreas* 30:318 (2005); Mabley et al., *Pancreas* 28:E39 (2004). Los estudios preliminares que la neurodegeneración mediada por el STZ en todas las dosis probadas, pero se alcanzaron resultados consistentes utilizando al menos 25 mg/kg. Los resultados mostrados aquí se obtuvieron de crías de ratas tratadas con 40 mg/kg STZ-ic. Las inyecciones se completaron dentro de 3 minutos y se retiraron la agujas lentamente desde el cerebro. Todas las crías se recuperaron inmediatamente y, entonces, fueron rápidamente devueltas a sus madres con un 100% de aceptación por parte de las madres. La precisión del procedimiento de inyección se confirmó al inyectar tintura de azul de metileno, que se encontraba localizada en la materia blanca subcortical y dentro de los ventrículos laterales. Los animales sobrevivieron a la inyección y fueron monitoreados diariamente hasta que fueron sacrificados 7, 14 o 21 días después de los tratamientos con solución salina o STZ.

[0168] En el punto de culminación del experimento, las ratas se pesaron y luego se sacrificaron mediante inhalación de isoflurano. Se extrajo sangre mediante una punción cardíaca para medir la concentración de glucosa utilizando el Medidor de Glucosa en la Sangre OneTouch Ultra (Lifescan, Inc). Los páncreas se recogieron y se fijaron en inmersión Histofix (Amresco Corp, Solon, OH) mediante inmersión en parafina. Se pesaron los cerebros frescos y luego se cortaron en el plano coronal para obtener una rebanada gruesa de ~3 mm que flanqueaba el infundíbulo. La rebanada cerebral de 3-mm se congeló instantáneamente entre dos placas de hielo seco y almacenada a -80°C para extracciones posteriores de ARN y proteína. El tejido residual se fijó mediante inmersión (Histofix) y humedecido en parafina para estudio histopatológico y tinción inmunohistoquímica. En aproximadamente el 20% de los casos, los cerebros se pesaron, se fijaron mediante inmersión completa y luego se seccionaron en el plano coronal a lo largo de puntos de referencia estandarizados por inclusión en parafina y seccionamiento histopatológico. El modelo de STZ-ic se generó en 4 experimentos independientes utilizando 180 crías de rata.

Se estudió en paralelo un número comparable de controles.

Estudios por Tinción histopatológica e inmunohistoquímica:

[0169] Se tiñeron secciones histológicas del páncreas embebidas en parafina (5 mm de grosor) y del (8 mm de grosor) con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron por lesiones histopatológicas, por.ej., inflamación, necrosis y degeneración de las células de los islotes. Secciones adyacentes del páncreas se inmunotiñeron para detectar

inmunoreactividad a la insulina en los islotes. Secciones de cerebro en parafina se inmunotifieron con anticuerpos monoclonales o policlonales para fosfo-tau, A β , p53, ubiquitina, proteína ácida glial fibrilar (GFAP), colina acetiltransferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE) para caracterizar la naturaleza de neurodegeneración tipo EA inducida por STZ-ic. Como controles negativos para las reacciones de inmunotinción, ya sea que se omitiera el anticuerpo primario, ya sea que el anticuerpo monoclonal no relevante para el virus de la Hepatitis B se hubiera utilizado en lugar del anticuerpo relevante.

[0170] Previo al inmunotefido, las secciones de tejido rehidratado desparafinadas se trataron de manera secuencial con 0.1 mg/ml de saponina en tampón fosfato salino (10 mM fosfato de sodio, 0.9% NaCl, pH 7.4; PBS), durante 20 minutos a temperatura ambiente. La actividad peroxidasa endógena se desactivó al tratar las secciones de tejido con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol durante 10 minutos, y los sitios de unión no específica se bloquearon durante un período de incubación de 30 minutos en SuperBlock-TBS (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) a temperatura ambiente. Después de la incubación durante la noche a 4°C con anticuerpos diluidos a 0.1-1 mg/ml (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante), se detectó la inmunoreactividad utilizando anticuerpos secundarios biotinilados de rata preadsorbido, reactivos (ABC) complejo de de biotina-avidina peroxidasa de rábano silvestre, y diaminobencidina como cromógeno (Vector Laboratories, Burlingame, CA). de la Monte et al., Lab. Invest. 80:1323 (2000). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se preservaron con cubreobjetos y medio de montaje. Todas las secciones se examinaron bajo código.

RT-PCR

[0171] Los niveles de ARN en los factores de crecimiento de la insulina, el IGF-I el IGF-II, sus receptores correspondientes, el sustrato de receptor de insulina (IRS) subtipos 1, 2 y 4, tau, la proteína protectora amiloide (APP), AChE y ChAT se midieron mediante amplificación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real como se describe anteriormente y utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 6. De manera adicional, se realizaron estudios para detectar cambios patológicos en tipos celulares asociados con la neurodegeneración mediada por el STZ-ic, como se describe en estudios previos sobre la EA. Steen et al., J Alzheimers Dis 7:63 (2005). Brevemente, se realizó la RT-PCR cuantitativa en tiempo real con pares de cebadores específicos de genes diseñados para detectar Hu (neuronas), GFAP (astrocitos), glicoproteína asociada a la mielina (MAG-1; oligodendroglia) y los transcritos de ARN del factor-1 inflamatorio de aloinjerto (AIF-1; microglia) como se muestran en la tabla 6.

TABLA 6

Primera	Dirección	Secuencia (5'-->3')	Posición (mRNA)	Tamaño del Amplicón (bp)
18S	Ade	GGA CAC GGA CAG GAT TGA CA (SEQ ID NO:27)	1278	50
18S	Rev	ACC CAC GGA ATC GAG AAA GA (SEQ ID NO:28)	1327	
Insulina	Ade	TTC TAC ACA CCC AAG TCC CGT C (SEQ ID NO:1)	145	135
Insulina	Rev	ATC CAC AAT GCC ACG CTT CTG C (SEQ ID NO:2)	279	
Receptor de Insulina	Ade	TGA CAA TGA GGA ATG TGG GGA C (SEQ ID NO:31)	875	129
Receptor de Insulina	Rev	GGG CAA ACT TTC TGA CAA TGA CTG (SEQ ID NO:32)	1003	
IGF-I	Ade	GAC CAA GGG GCT TTT ACT TCA AC (SEQ ID NO:33)	65	127
IGF-I	Rev	TTT GTA GGC TTC AGC GGA GCA C (SEQ ID NO:34)	191	

(continuada)

	Primera	Dirección	Secuencia (5'-->3')	Posición (mRNA)	Tamaño del Amplicón (bp)
5	IGF-I Receptor	Ade	GAA GTC TGC GGT GGT GAT AAA GG (SEQ ID NO:35)	2138	113
10	IGF-I Receptor	Rev	TCT GGG CAC AAA GAT GGA GTT G (SEQ ID NO:36)	2250	
15	IGF-II	Ade	CCA AGA AGA AAG GAA GGG GAC C (SEQ ID NO:37)	763	95
20	IGF-II	Rev	GGC GGC TAT TGT TGT TCA CAG C (SEQ ID NO:38)	857	
25	IGF-II Receptor	Ade	TTG CTA TTG ACC TTA GTC CCT TGG (SEQ ID NO:39)	1066	91
30	IGF-II Receptor	Rev	AGA GTG AGA CCT TTG TGT CCC CAC (SEQ ID NO:40)	1156	
35	IRS-1	Ade	GAT ACC GAT GGC TTC TCA GAC G (SEQ ID NO:41)	604	134
40	IRS-1	Rev	TCG TTC TCA TAA TAC TCC AGG CG (SEQ ID NO:42)	737	
45	IRS-2	Ade	CAA CAT TGA CTT TGG TGA AGG GG (SEQ ID NO:43)	255	109
50	IRS-2	Rev	TGA AGC AGG ACT ACT GGC TGA GAG (SEQ ID NO:44)	363	
55	IRS-4	Ade	ACC TGA AGA TAA GGG GTC GTC TGC (SEQ ID NO:45)	2409	132
60	IRS-4	Rev	TGT GTG GGG TTT AGT GGT CTG G (SEQ ID NO:46)	2540	
65	Tau	Ade	CGC CAG GAG TTT GAC ACA ATG (SEQ ID NO:47)	244	65
	Tau	Rev	CCT TCT TGG TCT TGG AGC ATA GTG (SEQ ID NO:48)	308	
	APP	Ade	GCA GAA TGG AAA ATG GGA GTC AG (SEQ ID NO:49)	278	199
	APP	Rev	AAT CAC GAT GTG GGT GTG CGT C (SEQ ID NO:50)	476	
	AChE	Ade	TTC TCC CAC ACC TGT CCT CAT C (SEQ ID NO:51)	420	123

(continuada)

	Primera	Dirección	Secuencia (5'-->3')	Posición (mRNA)	Tamaño del Amplicón (bp)
5	AChE	Rev	TTC ATA GAT ACC AAC ACG GTT CCC (SEQ ID NO:52)	542	
10	ChAT	Ade	TCA CAG ATG CGT TTC ACA ACT ACC (SEQ ID NO:53)	478	106
15	ChAT	Rev	TGG GAC ACA ACA GCA ACC TTG (SEQ ID NO:54)	583	
20	Hu	Ade	CAC TGT GTG AGG GTC CAT CTT CTG (SEQ ID NO:55)	271	50
25	Hu	Rev	TCA AGC CAT TCC ACT CCA TCT G (SEQ ID NO:56)	320	
30	GFAP	Ade	TGG TAA AGA CGG TGG AGA TGC G (SEQ ID NO:57)	1245	200
35	GFAP	Rev	GGC ACT AAA ACA GAA GCA AGG GG (SEQ ID NO:58)	1444	
40	MAG-1	Ade	AAC CTT CTG TAT CAG TGC TCC TCG (SEQ ID NO:59)	18	63
45	MAG-1	Rev	CAG TCA ACC AAG TCT CTT CCG TG (SEQ ID NO:60)	80	
50	AIF-1	Ade	GGA TGG GAT CAA CAA GCA CT (SEQ ID NO:61)	168	158
55	AEF-1	Rev	GTT TCT CCA GCA TTC GCT TC (SEQ ID NO:62)	325	

Ensayos de Unión al Receptor:

[0172] Se realizaron estudios para determinar si el tratamiento con STZ-ic deterioró la unión al receptor de la insulina, del IGF-I del IGF-II en el cerebro. Se extrajeron proteínas de la membrana de tejido del lóbulo temporal fresco congelado (~100 mg) por Polytron (Glen Mills Inc., Clifton, Nueva Jersey) homogeneización en 5 volúmenes de tampón de lisis NP-40 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% NP-40) que contenían inhibidores de proteasa (1 mM PMSF, 0.1 mM TPCK, 1 mg/ml aprotinina, 1 mg/ml pepstatina A, 0.5 mg/ml leupeptina, 1 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇) y fosfatasa (2 mM Na₃VO₄). Las fracciones supernadantes que se obtuvieron después del centrifugado de las muestras a 10,000 x g durante 15 minutos a 4°C se utilizaron en los ensayos de unión. Steen et al., J Alzheimers Dis 7:63 (2005). Las concentraciones de proteína se midieron con la prueba de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL).

[0173] Ensayos de unión de equilibrio competitivo se utilizaron para evaluar la unión del factor de crecimiento en relación con el tratamiento de STZ-ic. Para la unión total, se incubaron muestras de proteínas individuales duplicadas en 100 ml reacciones que contenían un tampón de unión a la insulina, IGF-I, o IGF-II (100 mM HEPES, pH 8.0, 118 mM NaCl, 1.2 mM MgSO₄, 8.8 mM dextrosa, 5 mM KCl, 1% albúmina de suero bovino) y 100 nCi/ml de [¹²⁵I] (2000 Ci/mmol; 50 pM). Para medir uniones no específicas, se prepararon de forma idéntica muestras replicadas, pero añadiendo 0.1 mM ligando (frío) no marcado. Estudios exploratorios se usaron para determinar las cantidades de proteína y concentraciones de ligando radiomarcado necesario para alcanzar el 20% de unión específica.

Los ensayos de unión del receptor a la insulina se realizaron utilizando 100 mg proteína. Los ensayos de unión de IGF-I requirieron 25 mg de proteína por muestra y los ensayos de unión del receptor IGF-II se realizaron con 10 mg proteína.

[0174] Todas las reacciones se realizaron en tubos Eppendorff de 1.5 ml y las incubaciones se realizaron a 4°C durante 16 horas con agitación suave de la plataforma. Entonces, el trazador de radiomarcado unido se precipitó mediante la adición de 500 ml de 0.15% de gamma globulina bovina (preparada en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) seguida por 400 ml 37.5% de glicol polietileno 8000 (PEG-8000; preparado en 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) por cada tubo. Las muestras se mezclaron a fondo por agitación vorticial y, entonces, se las incubó en hielo durante al menos 2 horas. Se recogieron los precipitados al centrifugar las muestras a 15,000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las fracciones de supernadante, que contenían ligando sin unir (libre), se transfirieron a tubos de recuento Gamma (Sarstedt, Newton, NC). Se cortaron los extremos del tubo Eppendorff con sedimento y se liberan directamente en tubos de conteo Gamma individuales. Cada muestra se contó durante 1 minuto en un contador Gamma LKB CompuGamma CS. Se calculó la unión específica al restar fmols de uniones no específicas, por ej., cantidad unida en presencia de exceso de ligando frío, de unión total de fmols (ausencia de ligando competitivo no marcado). Los resultados del ensayo de unión se analizaron utilizando el programa informático GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Análisis de Transferencia Western:

[0175] Se utilizaron análisis de frecuencia Western para evaluar los niveles de tau, fosfo-tau, ubiquitina, GSK-3®, fosfo-GSK- 3®, GFAP y ©-actina, como se ha descrito anteriormente.

Islotes Pancreáticos Permanecen Intactos como Resultado del Tratamiento con STZ-ic:

[0176] Aunque se examinaron los cerebros y páncreas en varios intervalos después del STZ-ic o tratamiento con vehículo, la mayoría de los datos presentados se obtuvieron de las ratas que fueron sacrificadas en el día 14, porque la neurodegeneración de tipo EA prominente y los índices moleculares de señalización de insulina/IGF deteriorados no se detectaron de manera consistente hasta al menos 7 días después del tratamiento con STZ-ic. Debido al interés creciente en caracterización de roles de la diabetes mellitus Tipo 1 y Tipo 2 en la patogénesis de deterioro cognitivo y de la neurodegeneración de tipo EA, se condujeron estudios para determinar si la neurodegeneración mediada por STZ-ic estaba asociada con inflamación, degeneración, necrosis y pérdida de inmunoreactividad a la insulina en los islotes pancreáticos como ocurre característicamente después de la administración parenteral de 40 mg/kg STZ. Mythili et al., Microsc. Res. Tech. 63:274 (2004). Estudios histopatológicos demostraron arquitectura de la exocrina y la endocrina intacta sin evidencia de inflamación, necrosis o degeneración de las células de los islotes tanto en las ratas de control como en las tratadas con STZ-ic (FIGS. 15A y 15B). De manera adicional, la tinción inmunohistoquímica demostró prominente inmunoreactividad a la insulina en todos los islotes pancreáticos tanto en las ratas de control como en las tratadas con STZ-ic (FIGS. 15C y 15D). Correspondientemente, la concentración aleatoria media de glucosa en sangre no se elevó en las ratas tratadas con STZ-ic en relación con las ratas de control (FIG. 16A), y ninguna de las ratas tratadas con STZ-ic presentó concentraciones aleatorias de glucosa en la sangre >180 mg/dl. De hecho, los niveles medios de glucosa en la sangre en el grupo tratado con STZ-ic fue significativamente inferior que las ratas de control, quizás debido a la alimentación reducida, ya que su peso corporal medio fue también significativamente reducido (P=0.04; FIG. 16B).

El STZ Intracerebral Causa Neurodegeneración:

[0177] El peso cerebral medio en el grupo tratado con STZ-ic fue significativamente reducido en el de control (P=0.002; FIG. 16C). Los cerebros inyectados con STZ-ic eran visiblemente más pequeños y tendían a tener pequeños focos múltiples de hemorragia subaracnoidea aguda (FIG. 16D), lo que sugiere una mayor fragilidad cerebrovascular. Una posible explicación para este fenómeno es que la inmunoreactividad A® incrementada (véase a continuación) mostró los vasos más susceptibles a una lesión traumática y relacionada con el flujo. Sin embargo, no hubo casos de hemorragia intracerebral ni en las ratas tratadas con STZ-ic ni en las de control.

[0178] En las ratas tratadas con STZ-ic, tanto el hemisperio cerebral como el hemisferio del cerebelo eran de tamaño visiblemente más reducido, pero los cerebelos estaban severamente disminuidos en relación con el control (FIG. 16D). La mayor vulnerabilidad del cerebelo a la neurodegeneración mediada por el STZ-ic se debió probablemente al hecho que en los roedores, esta estructura se desarrolla principalmente dentro de los primeros 10 días después del parto. Sotelo et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 331:307 (1991). Estudios histopatológicos revelaron notables anormalidades en los hemisferios cerebrales de las ratas tratadas con STZ-ic, incluyen: 1) estrechamiento difuso de la banda cortical; 2) reducción del volumen de la materia blanca en el cerebro; 3) tamaños reducidos del tálamo y el hipotálamo; y 4) ventrículomegalia, por ej., hidrocefalia, probablemente ex vacuo (FIGS. 17A-17D). Las anormalidades más prominentes observadas en los cerebelos de las ratas tratadas con STZ-ic fueron: 1) foliación reducida y simplificada de la corteza; 2) hipoplasia o aplasia de las capas de células granulares tanto internas como externas; 3) expansión y desorganización de la capa de células de Purkinje; y 4) la atenuación de las fibras/extensiones de la materia blanca subcortical (FIGS. 17E-17H). La tinción inmunohistoquímica de muestras de post-tratamiento del séptimo día reveló la inmunoreactividad prominentemente

incrementada de la p53 (molécula pro-apoptosis) en todos los cerebros tratados con STZ-ic, pero particularmente en la corteza temporal, el hipocampo, el hipotálamo/tálamo, materia blanca y cerebelo (FIGS 17I-17J). Sin embargo, en los puntos de tiempo en el día 14 y 21 posterior al tratamiento, los niveles de inmunoreactividad del p53 en los cerebros tratados con STZ-ic se incrementaron solo ligeramente en relación con los cerebros de control, lo que indica que la ola de la apoptosis ocurre temprano y antes de los índices moleculares de neurodegeneración de tipo EA.

[0179] Dado que frecuentemente se asocia la neurodegeneración con la arquitectura alterada y la remodelación del parénquima, es difícil caracterizar y cuantificar la pérdida de células y las respuestas celulares a la lesión utilizando métodos histológicos in situ. Por ejemplo, la pérdida de células que resulta en la atrofia de tejido puede asociarse con densidades de células aparentemente normales o incrementadas debido a la remodelación. Para sortear este problema, se desarrolló un método molecular de detección y cuantificación de cambios patológicos en el tipo de células asociadas con la lesión o degeneración en el cerebro mediante la medición de la abundancia relativa de ARNm de los genes expresados en tipos de células específicas. Steen et al., J Alzheimers Dis 7:63 (2005). En el presente estudio, se examinaron los niveles de expresión de los genes que se expresan de manera selectiva en las neuronas (Hu), astrocitos (GFAP), microglia (AIF-1) y oligodendroglia (MAG-1). Debido a que los niveles de 18S se utilizaron como el denominador, este enfoque permitió determinar si la abundancia relativa de un tipo de célula particular se redujo o se incrementó mediante el tratamiento con STZ-ic. Los resultados demostraron que los cerebros tratados con STZ-ic tenían Hu significativamente reducido (FIG. 18A) y expresión génica MAG-1 (FIG. 18B), y expresión de GFAP (FIG. 18C) y AIF-1 (FIG. 18D) incrementada. En contraste, no hubo diferencias significativas intergrupos en los niveles medios de de ARN ribosómico del 18S (FIG. 18E).

El STZ Intracerebral Deteriora los Mecanismos de Señalización del Factor de Crecimiento de la Insulina y Similar a la Insulina en el Cerebro:

[0180] Estudios exploratorios demostraron que el STZ deteriora seriamente el factor de crecimiento y la expresión del receptor del factor de crecimiento en varias regiones cerebrales incluidas el hipotálamo, el hipocampo, la corteza temporal y el cerebelo. Por consiguiente, los resultados generados con las muestras del lóbulo temporal se presentaron como representante de las tendencias generales. De manera adicional, si bien las alteraciones en la expresión génica fueron algo variables a través de los primeros 7 días posteriores al tratamiento con STZ-ic, pero permanecieron estables entre los días 14 y 21, se muestran y se discuten los resultados de cerebros a partir de cerebros recolectados en el día 14 después del tratamiento.

[0181] Estudios con RT-PCR cuantitativa en tiempo real demostraron que la expresión de los transcritos de ARNm correspondientes a los receptores de la insulina, el IGF-I y el IGF-II en la corteza temporal tanto en las ratas de control como en las tratadas con STZ-ic. Sin embargo, los cerebros del grupo tratado con STZ-ic han tenido niveles de expresión significativamente reducidos de los receptores de la insulina y el IGF-I con respecto a los cerebros de control (FIGS. 19A y 19B), mientras que se midieron niveles similares de transcritos de ARNm del receptor del IGF-II en los cerebros tratados con STZ-ic como en los de control (FIG. 19C). Se detectaron ARNm de polipéptidos de insulina, IGF-I e IGF-II tanto en los cerebros de control como en los cerebros tratados con STZ-ic, pero los niveles medios de transcritos de ARNm (FIG. 19D) de la insulina y el IGF-II (FIG. 19F) se redujeron significativamente en los cerebros tratados con STZ-ic en relación con los cerebros de control. En contraste, los transcritos de ARNm DEL IGF-I fueron similarmente abundantes en los cerebros tratados con STZ-ic como como en los grupos de control (FIG. 19E).

[0182] Para examinar la integridad de las vías de señalización que se activaron mediante la expresión de la insulina/IGF-I, del IRS-1, del IRS-2 y del IRS-4, se midieron los niveles. No se examinó el IRS-3, porque éste solo expresó en el tejido adiposo de roedores. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real detectó la expresión de los transcritos de ARNm del IRS-1, del IRS-2 y del IRS-4 tanto en los cerebros de control como en los tratados con STZ-ic. Como se informó previamente, los transcritos de ARNm del IRS-1 fueron significativamente más abundantes que el IRS-2 y el IRS-4 ($P=0.001$). En los cerebros tratados con STZ-ic, los niveles de ARNm del IRS-1 fueron reducidos significativamente con respecto a los cerebros de control ($P=0.004$), mientras que los niveles medios de IRS-2 y de IRS-4 fueron similares al control (FIGS. 19G-19I).

Análisis de Unión de Ligando a los Receptores del Factor de Crecimiento:

[0183] La unión de ligando efectiva es crítica para la cascada de señalización y muchos de los efectos de disminución del deterioro de la señalización de la insulina que ya se ha identificado en la EA, incluso puede mediarse una reducida supervivencia neuronal, un incremento de la activación del GSK-3®, y un aumento de la fosforilación tau mediante reducción de la insulina o unión del receptor del IGF en el SNC. Para examinar este aspecto de la señalización del factor de crecimiento en los cerebros inyectados con STZ-ic, se realizaron ensayos de unión de equilibrio competitivo utilizando insulina, IGF-I o IGF-II marcados-[125I], como trazadores y extractos de membrana de tejido del lóbulo temporal como la fuente de los receptores. Los resultados demostraron niveles significativamente mayores de unión específica al receptor de la insulina receptor en los cerebros de control con respecto a los tratados con STZ-ic. La media de equilibrio de unión al receptor de insulina se redujo en aproximadamente 85% en los cerebros tratados con STZ-ic con respecto a los cerebros de control (FIG. 20A). La unión del IGF-II se redujo también significativamente en los cerebros tratados con STZ-ic (FIG. 20C), mientras que la

unión al IGF-I se incrementó, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa debido al gran error estándar de la media (FIG. 20B).

La Neurodegeneración Tipo EA Resultante del Tratamiento con STZ-ic:

[0184] Se realizaron estudios para determinar si la neurodegeneración inducida con STZ-ic se asociaba con el aumento de la activación de GSK-3 β (reducción de fosfo-GSK-3 β /ratio GSK-3 β /total) e y el aumento de los niveles de fosfo-tau. Dado rasgos característicos de la neurodegeneración de tipo EA también incluye e incremento de ubiquitinación de proteínas, incluido la tau (Godbolt et al., Arch. Neurol. 62:1097 (2005); Kosik et al., Biochim. Biophys. Acta 1739:298 (2005); de Vrij et al., Prog. Neurobiol. 74:249 (2004)) y gliosis asociada con pérdida de células, se utilizaron análisis de transferencia Western para medir también la inmunoreactividad a la ubiquitina y el GFAP. La expresión de la α -actin se midió como un control negativo.

[0185] Los análisis de transferencia Western demostraron que niveles significativamente elevados de GFAP, de GSK-3 β total, de fosfo-tau y de ubiquitina, y niveles reducidos de fosfo-GSK-3 β en los cerebros tratados con STZ-ic con respecto a los de control (FIG. 21 y Table 7).

En contraste, la expresión de la tau y la proteína α -actina fueron similares en ambos grupos (FIG. 21 y Table 7). Los ratios medios calculados (unidades de densitometría) de fosfo-GSK-3 β /total GSK-3 β y fosfo-tau/tau se redujeron también significativamente en el grupo tratado con STZ-ice (Tabla 7), reflejando una activación significativa de GSK-3 β y el aumento de la fosforilación tau.

La tinción inmunohistoquímica demostró un aumento general de la inmunoreactividad GFAP en los cerebros tratados con STZ-ic, pero un marcado prominente en el lóbulo temporal (FIGS. 22A y 22B), el hipocampo, el hipotálamo/tálamo, y el cerebelo, correspondiente con la con la distribución de la visiblemente incrementada de la inmunorreactividad del p53. En los cerebros tratados con STZ-ice, se observó una inmunoreactividad a la fosfo-tau y a la ubiquitina en la corteza temporal, el hipocampo, el hipotálamo y el tálamo, y la corteza del cerebelo. El aumento de la inmunoreactividad phospho-tau se localizó en los cuerpos celulares neuronales y racimos de neuritas neuropilo distribuidas en la corteza cerebral (FIGS. 22C y 22D). No se observaron inclusiones intraneuronales inmunoreactivas de fosfo-tau (ovillos neurofibrilares). El incremento de la inmunoreactividad a la ubiquitina se localizó en varios tipos de células tanto en la materia blanca como gris. Aparte de las densidades más altas de marcado celular, la principal diferencia entre los grupos tratados con STZ-ic y el de control fue que el aumento de la localización de la inmunoreactividad a la ubiquitina en el núcleo de los cerebros tratados con STZ-ic (FIGS. 22E y 22F).

Tabla 7:

Proteína	Control	STZ-ic	Valor-P
GFAP	308370 $\pm$ 77143	983591 $\pm$ 113549	P=0.002
GSK-3 β	68131 $\pm$ 12374	149945 $\pm$ 15588	P=0.0043
p-GSK-3 β	4326 $\pm$ 496	2811 $\pm$ 296	P=0.009
p-GSK-3 β /GSK-3 β	0.066 $\pm$ 0.014	0.0204 $\pm$ 0.0022	P=0.0168
Ubiquitina	765286 $\pm$ 61857	1390824 $\pm$ 133586	P=0.0011
Tau	606944 $\pm$ 24733	686442 $\pm$ 65138	P=0.03
p-Tau	1129 $\pm$ 147	3378 $\pm$ 920	P=0.04
p-Tau/Tau	0.0016 $\pm$ 0.011	0.0025 $\pm$ 0.038	P=0.02
β -acción	188261 $\pm$ 6302	196548 $\pm$ 14314	N.S.
Los valores corresponden a unidades de densitometría arbitraria (Mean $\pm$ S.E.M.). Se analizaron resultados utilizando purebas-t Student.			

[0186] Estudios con RT-PCR en tiempo real demostraron niveles de ARNm significativamente superiores de tau (FIG. 23A) y APP (FIG. 23B) en los cerebros tratados con STZ-ic. De manera adicional, la tinción inmunohistoquímica demostró un aumento de la inmunoreactividad A β en las neuronas (FIGS. 23C y 23D), vasos leptomenínges, micro-vasos cerebrales (FIGS. 23E y 23F), y depósitos de placa similares a extracelulares dispersas (FIG. 23F) en los cerebros tratados con STZ-ic con respecto a los cerebros de control. Los depósitos similares a placas fueron visibles mediante tinción por H&E, y estuvieron presentes en grados variables en todos los cerebros tratados con STZ-ic. Los depósitos similares a placas de la A β -inmunoreactivo tenían un núcleo denso en lugar de una morfología neurítica o fibrilar. Las "placas" estaban principalmente distribuidas en la corteza cerebral, particularmente en los lóbulos temporales (poco distante de los lugares de la inyección), pero también estuvieron

presentes en las estructuras subcorticales que incluyen el hipotálamo/tálamo. Numerosos vasos de paredes delgadas distribuidos tanto en las estructuras de materia gris cortical y subcortical como en la materia blanca cerebral incrementaron la inmunoreactividad A β . Sin embargo, a diferencia de la EA, no se localizaron depósitos A β en los espacios perivascuales. Se observaron microhemorragias leptomeníngicas ocasionales en relación con la angiopatía A β , pero no se detectaron hemorragias parenquimatosas o isquémicas obvias o lesiones hemorrágicas en los cerebros tratados con STZ-ic.

La relación entre la Señalización de la Insulina/IGF Deteriorada y la Producción de Acetilcolina en los Cerebros Tratados con STZ-ic:

[0187] Una mayor correlación de deterioro cognitivo en la EA es la deficiencia de la acetil colina en la EA. Recientemente, se demostró que la expresión del gen ChAT se reguló mediante la estimulación de la insulina y el IGF-1, y que en los cerebros con EA, los mecanismos de señalización de la insulina/IGF-1 deteriorados correlacionan con los déficits de producción de acetilcolina. Steen et al., J Alzheimers Dis 7:63 (2005). Por lo tanto, había interés en determinar si los cerebros tratados con STZ-ic tenían niveles reducidos de expresión de ChAT. Los análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de tejido del lóbulo temporal demostraron niveles significativamente reducidos de ARNm en ChAT y crecientes niveles de ARNm en AChE en los cerebros tratados con STZ-ic con respecto a los cerebros de control (FIGS. 24A y 24B). Estudios de tinción inmunohistoquímica corroboraron los resultados de la RT-PCR en tiempo real al demostrar niveles decrecientes de ChAT (FIGS. 24C y 24D) y niveles crecientes de AChE (FIGS. 24E y 24F) inmunoreactividad en los cerebros tratados con STZ-ic en relación con los cerebros en control. Se observaron alteraciones similares en la expresión de ChAT y de AChE en el hipotálamo, la formación hipocámpal y la corteza del cerebelo de las ratas tratadas con STZ-ic.

Conclusión

[0188] En informes previos, se utilizó STZ-ic para generar un modelo de EA esporádica en roedores adultos, poniendo énfasis en el papel de estrés oxidativo como un mediador de neurodegeneración. Esos estudios investigaron los efectos del STZ-ic sobre los genes en las vías de señalización de la insulina y el IGF, y examinaron la patología molecular asociada en el contexto de lo que se informó recientemente acerca de EA. En este sentido, los resultados demostraron que el tratamiento con STZ-ic causó agotamiento en el SNC de las células que expresan insulina, IGF-II, receptor de insulina y receptor del IGF-I, pero no causaron hiperglicemia, degeneración de los islotes pancreáticos o pérdida de inmunoreactividad a la insulina en el páncreas. Por lo tanto, el modelo de STZ-ic produce enfermedad al SNC y no pancreática, lo que indica que las fuentes periféricas y del sistema nervioso central de insulina están reguladas por separado y distintamente. Por otra parte, este modelo proporciona buena evidencia que pueden ocurrir deterioros en los mecanismos de señalización de la insulina/IGF en el SNC en ausencia de cualquier anomalía periférica en la biosíntesis y función de la insulina/IGF. Finalmente, en estudios preliminares recientes de ratas a las que se les permitió sobrevivir durante 4 semanas o más después del tratamiento, la prueba de Morris Water Maze reveló notables deterioros en la memoria y el aprendizaje en el grupo tratado con STZ-ic respecto de los cerebros en control. En general, este modelo es compatible con la hipótesis que la EA esporádica representa una enfermedad neuro-endocrina causada por deficiencias intrínsecas del SNC en la insulina y el gen de polipéptido IGF y la expresión del receptor y la capacidad de respuesta (resistencia).

[0189] En conjunto, los resultados obtenidos con el modelo STZ-ic vincula deficiencias en las acciones de la insulina / IGF en el cerebro a anomalías prominentes asociadas a la demencia que estrechamente imitan los índices moleculares y patológicos de neurodegeneración que se observan de forma característica en la EA esporádica. Por otra parte, este estudio proporciona evidencia definitiva de que el deterioro en la señalización en la insulina/IGF y las deficiencias en los correspondientes factores de crecimiento pueden ocurrir en el SNC independiente de si es diabetes Tipo 1 o Tipo 2. En este sentido, los datos argumentan fuertemente en favor del concepto que la neurodegeneración de tipo EA representa una enfermedad neuroendocrina intrínseca causada por deterioros selectivos en los mecanismos de selección de la insulina y el IGF, incluidas las deficiencias en la producción local de la insulina. Tres conceptos adicionales que se derivan de este cuerpo de investigación son los siguientes: 1) las anomalías en la expresión y fosforilación tau pueden mediar por deterioros en la señalización de la insulina y el IGF; 2) la sobreexpresión genética de APP acompaña tanto la EA esporádica como el modelo experimental de STZ-ic, que se asemeja a EA esporádica; y 3) el estrés oxidativo persistente con activación de microglia es un evento temprano que puede jugar un papel crítico en exacerbar y perpetuar la cascada de neurodegeneración en la EA. El modelo de STZ-ic parece ser una excelente herramienta in vivo para estudiar la cascada de la neurodegeneración en el tipo de EA esporádica y podría utilizarse para el diseño racional de fármacos para tratar o prevenir la EA. Una característica notable del fenotipo de STZ-ic descrito en este documento es que es que realmente es un modelo de neurodegeneración progresiva. El evento inicial fue la activación de moléculas pro-apoptosis (véase 3-5). Las deficiencias en la señalización de insulina / IGF y en la expresión del gen relacionado se produjo de manera subsecuente. Esto sugiere que la neurodegeneración de tipo EA ocurre de manera secundaria a la pérdida de insulina - y del IGF-que produce de células en el cerebro. La evidencia suministrada tanto por el modelo experimental del STZ-ic como los hallazgos en los inicios de la EA sugiere que se debe abordar los mecanismos y etiologías de deterioro de la señalización de insulina / IGF con el fin de lograr avances significativos en el tratamiento y prevención de la EA esporádica.

[0190] El STZ es metilnitrosourea nitrosamida (MNU) vinculado a la posición C2 de D-glucosa. Las funciones MNU como un agente alquilante que causa daño al ADN, mientras que el resto de glucosa se toma como glucosa en las células productoras de insulina (y posiblemente también el IGF). Una vez metabolizada, se libera el N-nitrosoureido para causar daño al ADN mediante la generación de especies reactivas de oxígeno tales como superóxido, peróxido de hidrógeno, y el óxido nítrico. El modelo STZ-ic de neurodegeneración difiere de los efectos de estrés oxidativo inducido por lesión del SNC, debido a que, de manera adicional al daño en el ADN mitocondrial y la disfunción metabólica, el STZ-ic causa deterioros notables en los mecanismos de señalización de la insulina y del IGF en el cerebro. Los cerebros humanos con EA genuina muestran evidencia inequívoca del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el daño en el ADN, y puesto que muchos índices de estrés oxidativo se detectan tempranamente en el curso de la enfermedad, es probable que el daño oxidativo desempeñe un importante si no crítico papel en la patogénesis de la EA. Esta línea de razonamiento se ha reforzado por el hallazgo de anomalías moleculares y bioquímicas de la EA tipo en modelos experimentales de estrés oxidativo, hipoxia o isquemia, y el aumento de estrés oxidativo en el contexto de un aumento de la deposición cerebral A β , que no es suficiente para causar EA.

Sin embargo, hay tres razones para hacer una pausa en los pasos aparentemente lógicos hacia deducir que el estrés oxidativo es LA respuesta: 1) las lesiones neuropatológicas causadas por hipoxia, isquemia o isquemia-reperfusión aguda en el cerebro humano son claramente distinguible de los cambios neurodegenerativos asociados al deterioro cognitivo en la EA; 2) lesiones hipóxicas e isquémicas son ya sea global o siguen territorios vasculares con relativamente poca selectividad para el tipo celular, mientras que la EA preferencialmente daña las neuronas en las estructuras corticolímbicas en el cerebro; y 3) estudios recientes de cerebros humanos con EA demostraron que el deterioro prominente en los mecanismos de señalización de la insulina y el IGF comienza tempranamente en el curso de la enfermedad y empeora con la progresión de la enfermedad.

[0191] Aunque el agotamiento experimental de los receptores de insulina neuronal del SNC o IRS-2 que transmite insulina y las señales IGF1 provocan anomalías moleculares y bioquímicas similares a las observadas en la EA, la neuropatología asociada es claramente diferente de la EA. La explicación podría ser que los modelos de agotamiento del receptor de la insulina genética carecen de envejecimiento cerebral y de disfunción mitocondrial que son fundamentales en la patogénesis de la EA. De manera adicional, esos estudios mostraron que tanto los mecanismos de señalización de la insulina como el IGF se vean afectados en la EA, al igual que nuestro modelo STZ-ic, que lo hace parecerse a EA.

Finalmente, debe incorporarse una función para la alteración de la plasticidad sináptica en la ecuación hipotética. Se sugiere que la EA requiere tres importantes alteraciones funcionales del SNC: 1) la perturbación de la señalización de la insulina/IGF, causada por la deficiencia del factor trófico y/o resistencia a la insulina; 2) el estrés oxidativo progresivo con disfunción mitocondrial; y 3) el deterioro de la plasticidad neuronal causado por la inhibición de la biosíntesis de acetilcolina y la homeostasis. Se plantea la hipótesis de que el modelo STZ-ic utilizado en el presente estudio produjo un fenotipo de EA de tipo esporádico a causa del tratamiento: 1) deterioró de la señalización de la insulina/IGF debido a la destrucción selectiva de las células productoras de factor de crecimiento específico seguido por las células responsables del factor de crecimiento en el cerebro; 2) provocó estrés oxidativo progresivo, daño al ADN y disfunción mitocondrial debido a las propiedades alquilantes del fármaco; e 3) inhibió la producción de acetilcolina durante un período crítico de plasticidad neuronal del SNC. Las propiedades alquilantes del STZ probablemente imitan los efectos del envejecimiento sobre la función mitocondrial y la integridad del ADN mitocondrial, y el uso de crías de ratas en lugar de ratas adultas puede haber sido fundamental en la generación del fenotipo debido a los altos niveles naturales de plasticidad neuronal del SNC que existe durante el temprano desarrollo postnatal.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0192]

<110> Hospital de Rhode Island
De la Monte, Suzanne Marie
Wands, Jack Raymond

<120> Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

<130> 2306.001PC03

<150> US 60/731,862

<151> 2005-11-01

<150> US 60/654,080

<151> 2005-02-18

<150> US 60/632,619

<151> 2004-12-03

<160> 62

	<170> PatentIn versión 3.3
5	<210> 1 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen de la insulina
15	<400> 1 ttctacacac ccaagtcccg tc 22
20	<210> 2 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
25	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen de la insulina
30	<400> 2 atccacaatg ccacgcttct gc 22
35	<210> 3 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen del receptor de insulina
45	<400> 3 ggtagaaacc attactggct tcttc 25
50	<210> 4 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
55	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen del receptor de insulina
60	<400> 4 cgtagagagt gtagttcca tccac 25
65	<210> 5 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen del IGF-I
	<400> 5 cacttcttc tacacaactc gggc 24
	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen del IGF-I

	<400> 6 cgacttgctg ctgctttga g 21
5	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-I
	<400> 7 agggcgtagt tgtagaagag ttcc 25
15	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-I
	<400> 8 tacttgctgc tgtccgagt gg 22
25	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IGF-II
	<400> 9 ctgattgctc tacccacca ag 22
35	<210> 10 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IGF-II
	<400> 10 ttgctcactt ccgattgctg gc 22
45	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-II
	<400> 11 cacgactga agacacgcac ttatc 25
55	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-II
65	

	<400> 12 gctgctctgg actctgtgat ttg 23
5	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS-1
	<400> 13 tgctgggggt ttggagaatg 20
15	<210> 14 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS-1
	<400> 14 ggcactgttt gaagtccttg acc 23
25	<210> 15 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS-2
	<400> 15 aaaattggcg gagcaaggc 19
35	<210> 16 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS-2
	<400> 16 atgttcaggc agcagtcgag ag 22
45	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS-4
	<400> 17 ccgacacctc attgctctt tc 22
55	<210> 18 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS-4
65	

	<400> 18 tttctgctc cgactcggtc tc 22
5	<210> 19 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen Tau
	<400> 19 agaagcaggc attggagaca cc 22
15	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen Tau
	<400> 20 aagcagccac ttgggttcc 20
25	<210> 21 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen de la APP
	<400> 21 caatccaggc acagaaagag tcc 23
35	<210> 22 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen de la APP
	<400> 22 ttccataacc aagagaggct gc 22
45	<210> 23 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen GLUT4
	<400> 23 gtatcatctc tcagtggctt ggaag 25
55	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen GLUT4
65	

	<400> 24 tttcatagga ggcagcagcg 20
5	<210> 25 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IDE
	<400> 25 tgatgaatga tgcctggaga ctc 23
15	<210> 26 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IDE
	<400> 26 tcaatccctt cttggttgg tc 22
25	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen 18S
	<400> 27 ggacacggac aggattgaca 20
35	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen 18S
	<400> 28 acccacggaa tcgagaaaga 20
45	<210> 29 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen 28S
	<400> 29 ggtaaacggc gggagtaact atg 23
55	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen 28S
65	

	<400> 30 taggtaggga cagtgggaat ctcg 24
5	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor de Insulina
	<400> 31 tgacaatgag gaatgtgggg ac 22
15	<210> 32 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor de Insulina
	<400> 32 gggcaaactt tctgacaatg actg 24
25	<210> 33 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen del IGF-I
	<400> 33 gaccaagggg cttttacttc aac 23
35	<210> 34 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen del IGF-I
	<400> 34 ttttaggct tcagcgagc ac 22
45	<210> 35 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-I
	<400> 35 gaagtctgcg gtggtgataa agg 23
55	<210> 36 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-I
	<400> 36 gaagtctgcg gtggtgataa agg 23
65	<210> 37 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-I

	<400> 36 tctgggcaca aagatggagt tg 22
5	<210> 37 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IGF-II
	<400> 37 ccaagaagaa aggaagggga cc 22
15	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IGF-II
	<400> 38 ggcggctatt gttgtcaca gc 22
25	<210> 39 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-II
	<400> 39 ttgctattga ccttagtccc ttgg 24
35	<210> 40 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen receptor del IGF-II
	<400> 40 agagtgagac ctttgtgcc ccac 24
45	<210> 41 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS 1
	<400> 41 gataccgatg gcttctcaga cg 22
55	<210> 42 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS 1
65	

ES 2 540 754 T3

	<400> 42 tcgttctcat aatactccag gcg 23
5	<210> 43 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS 2
	<400> 43 caacattgac ttggtgaag ggg 23
15	<210> 44 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS 2
	<400> 44 tgaagcagga ctactggctg agag 24
25	<210> 45 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS 4
	<400> 45 acctgaagat aaggggtcgt ctgc 24
35	<210> 46 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen IRS 4
	<400> 46 tgtgtggggt ttagtgtct gg 22
45	<210> 47 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen Tau
	<400> 47 cgccaggagt ttgacacaat g 21
55	<210> 48 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen Tau
65	

	<400> 48 ccttcttggt cttggagcat agtg 24
5	<210> 49 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen de la APP
	<400> 49 gcagaatgga aaatgggagt cag 23
15	<210> 50 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen de la APP
	<400> 50 aatcacgatg tgggtgtgcg tc 22
25	<210> 51 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen AChE
	<400> 51 ttctcccaca cctgtcctca tc 22
35	<210> 52 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen AChE
	<400> 52 ttcatagata ccaacacggt tccc 24
45	<210> 53 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen ChAT
	<400> 53 tcacagatgc gttcacaac tacc 24
55	<210> 54 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen ChAT
	<400> 54 tcacagatgc gttcacaac tacc 24
65	<210> 55 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen ChAT

	<400> 54 tgggacacaa cagcaacctt g 21
5	<210> 55 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen Hu
	<400> 55 cactgtgtga gggccatct tctg 24
15	<210> 56 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen Hu
	<400> 56 tcaagccatt ccactccatc tg 22
25	<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
30	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen GFAP
	<400> 57 tggtaaagac ggtggagatg cg 22
	<210> 58 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
40	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen GFAP
45	<400> 58 ggcactaaaa cagaagcaag ggg 23
	<210> 59 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
50	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen MAG-1
55	<400> 59 aaccttctgt atcagtgtc ctcg 24
	<210> 60 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
60	<220> <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen MAG-1
65	

ES 2 540 754 T3

<400> 60
cagtcaacca agtctcttcc gtg 23

5 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen AIF-1

 <400> 61
 ggatgggatc aacaagcact 20

15 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintetizada Químicamente - cebador usado para amplificar el gen AIF-1

 <400> 62
25 gtttctccag cattcgcttc 20

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un método de diagnóstico in vitro de la Enfermedad de Alzheimer (EA) en un sujeto, consistente en la detección de una disminución del nivel del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo-I (IGF-I) en el líquido cefalorraquídeo extraído de dicho sujeto, donde una disminución del nivel de IGF-I comparado con el nivel en los sujetos sanos es un indicador diagnóstico de la EA..
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el mencionado sujeto presenta una patología resultante de la EA.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el mencionado sujeto es sospechoso de presentar una patología resultante de la EA.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el mencionado sujeto corre el riesgo de presentar una patología resultante de la EA.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho nivel de IGF-I puede determinarse midiendo el nivel del polipéptido IGF-I.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, donde el nivel del polipéptido IGF-I se determina por inmunoensayo, inmunoprecipitación o transferencia Western .
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho nivel de IGF-I se determina por medio de la medición del nivel de ARN que codifica el IGF-I.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 7, donde dicho nivel de ARN que codifica el IGF-I se determina por transcripción inversa y amplificación, transferencia de Northern o hibridación in situ.

30

35

40

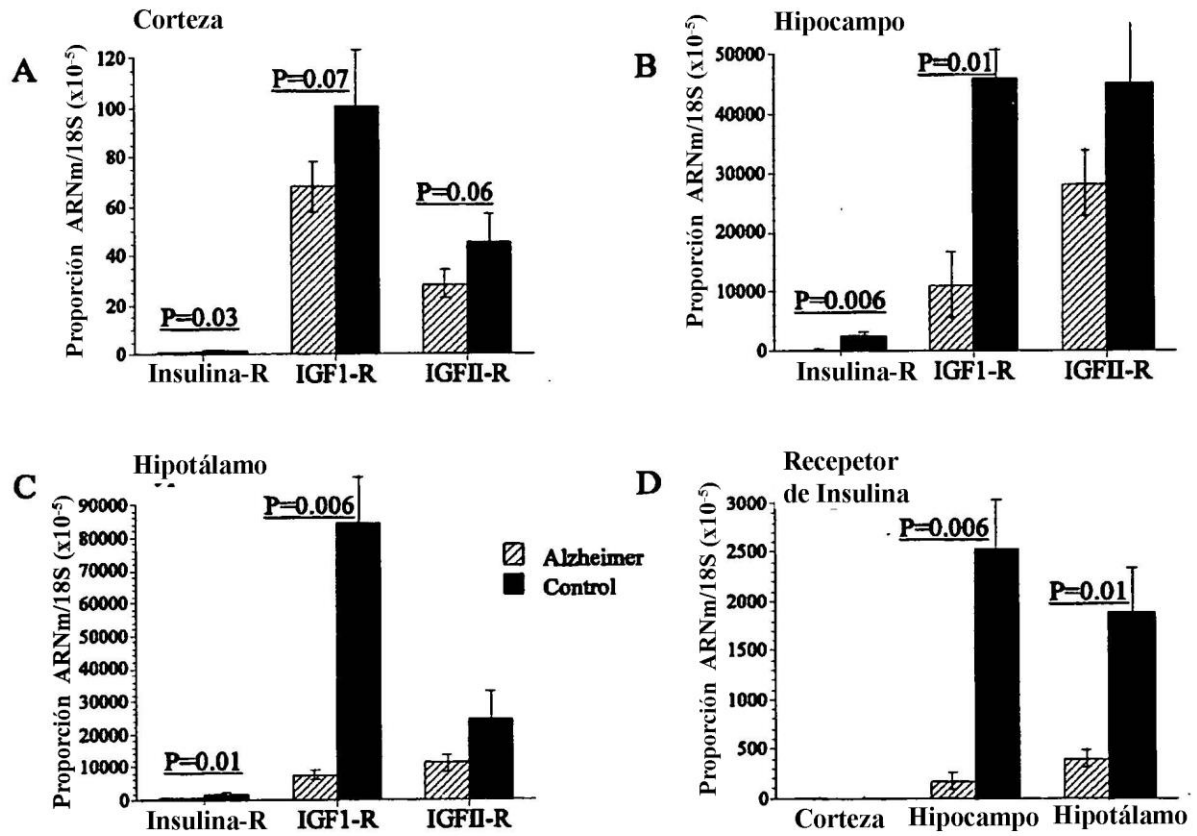
45

50

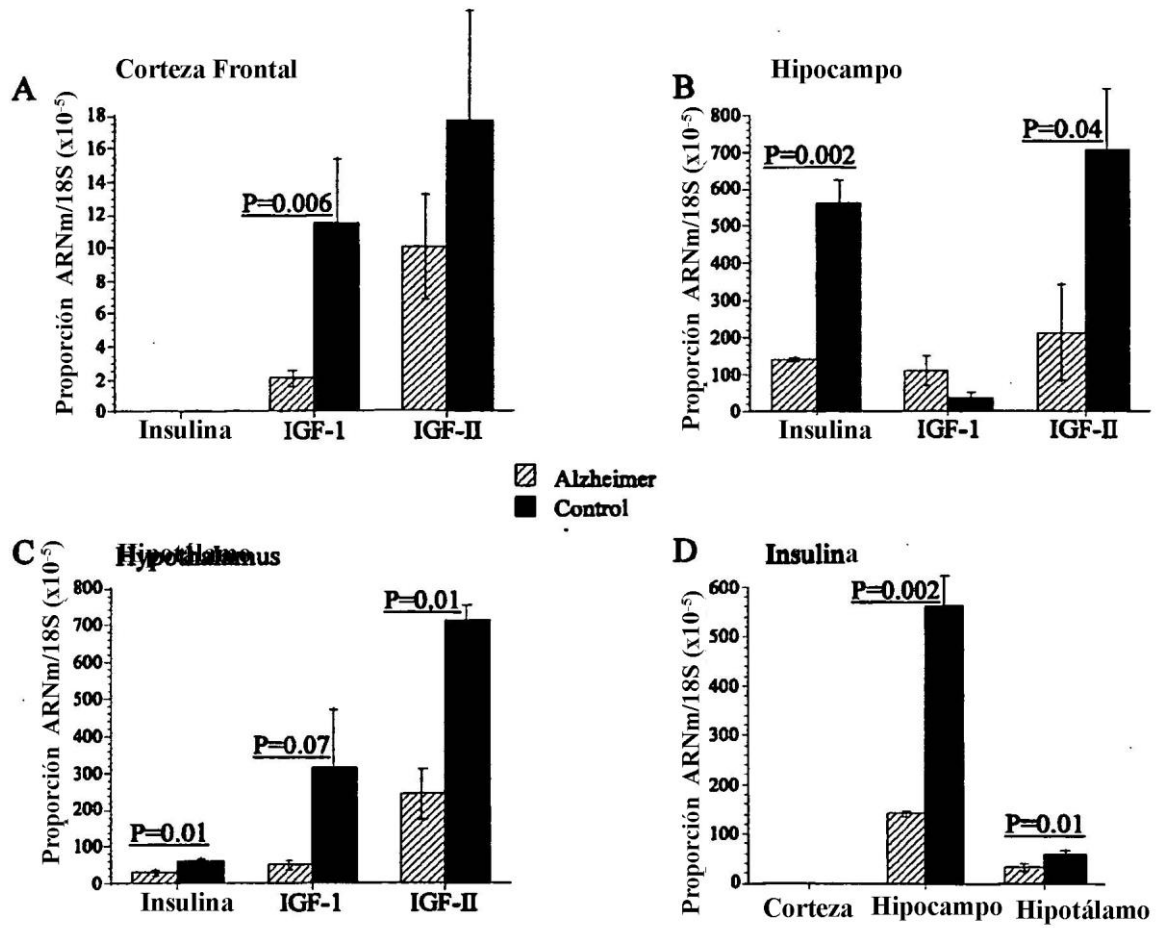
55

60

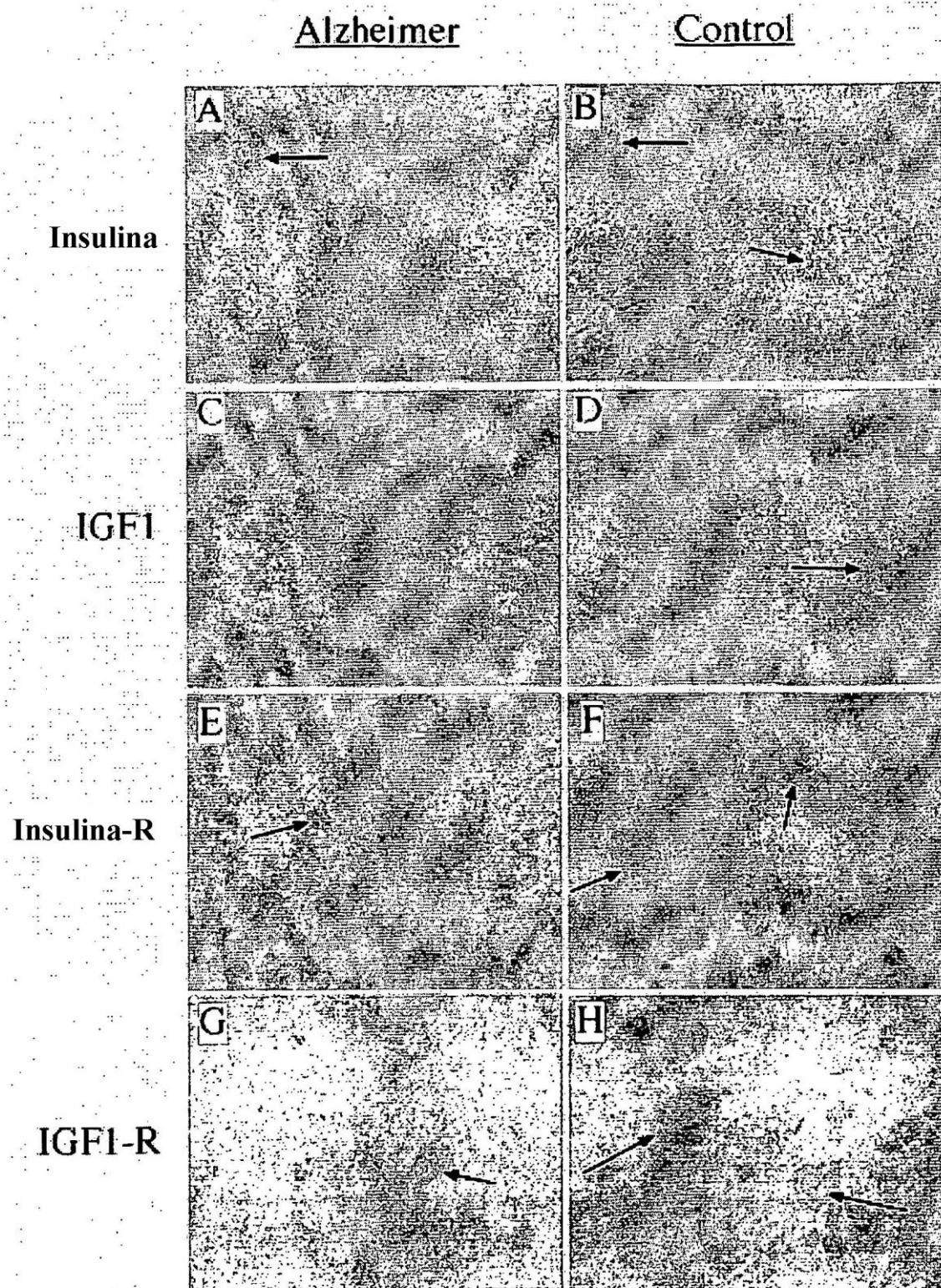
65



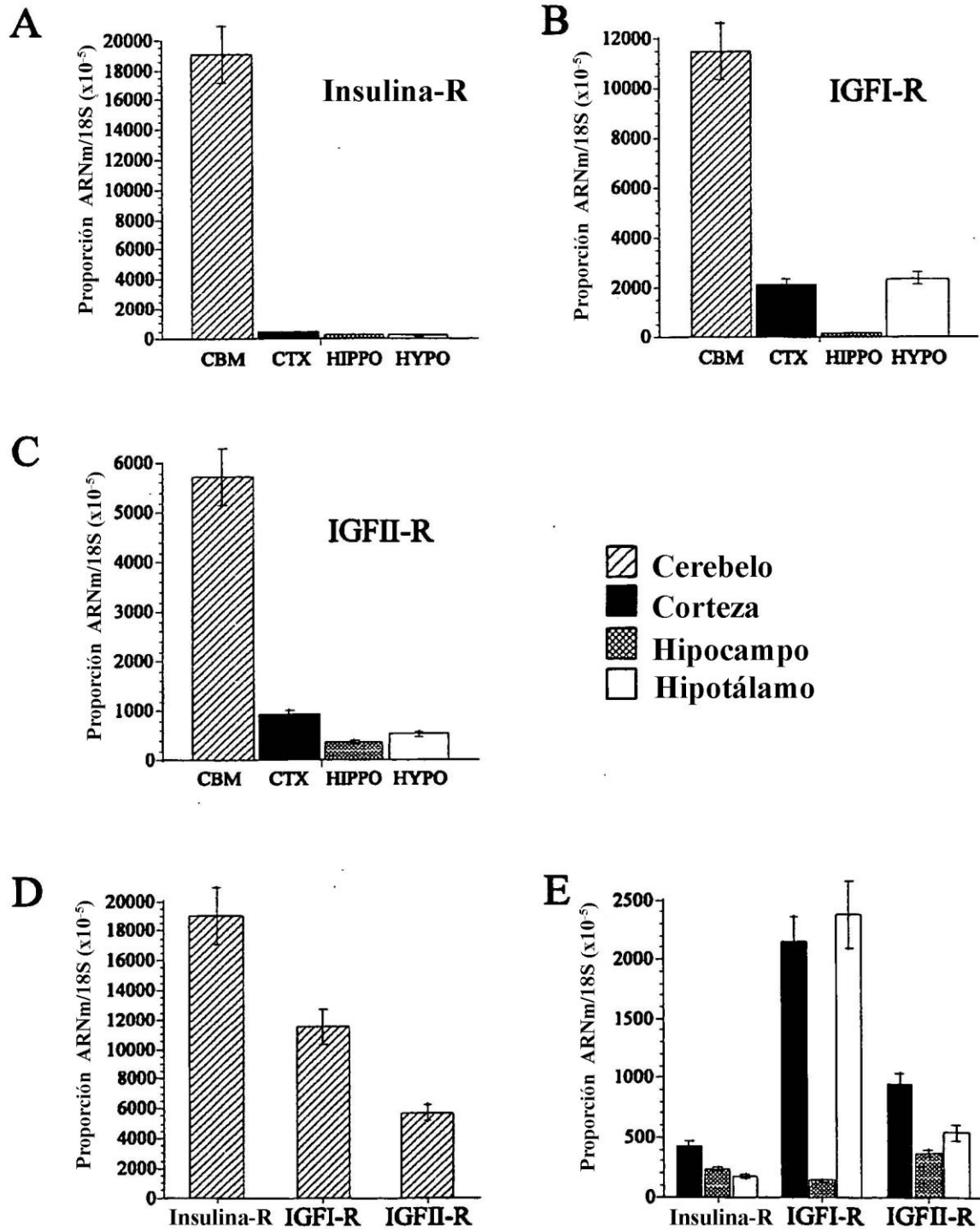
FIGS. 1A-1D



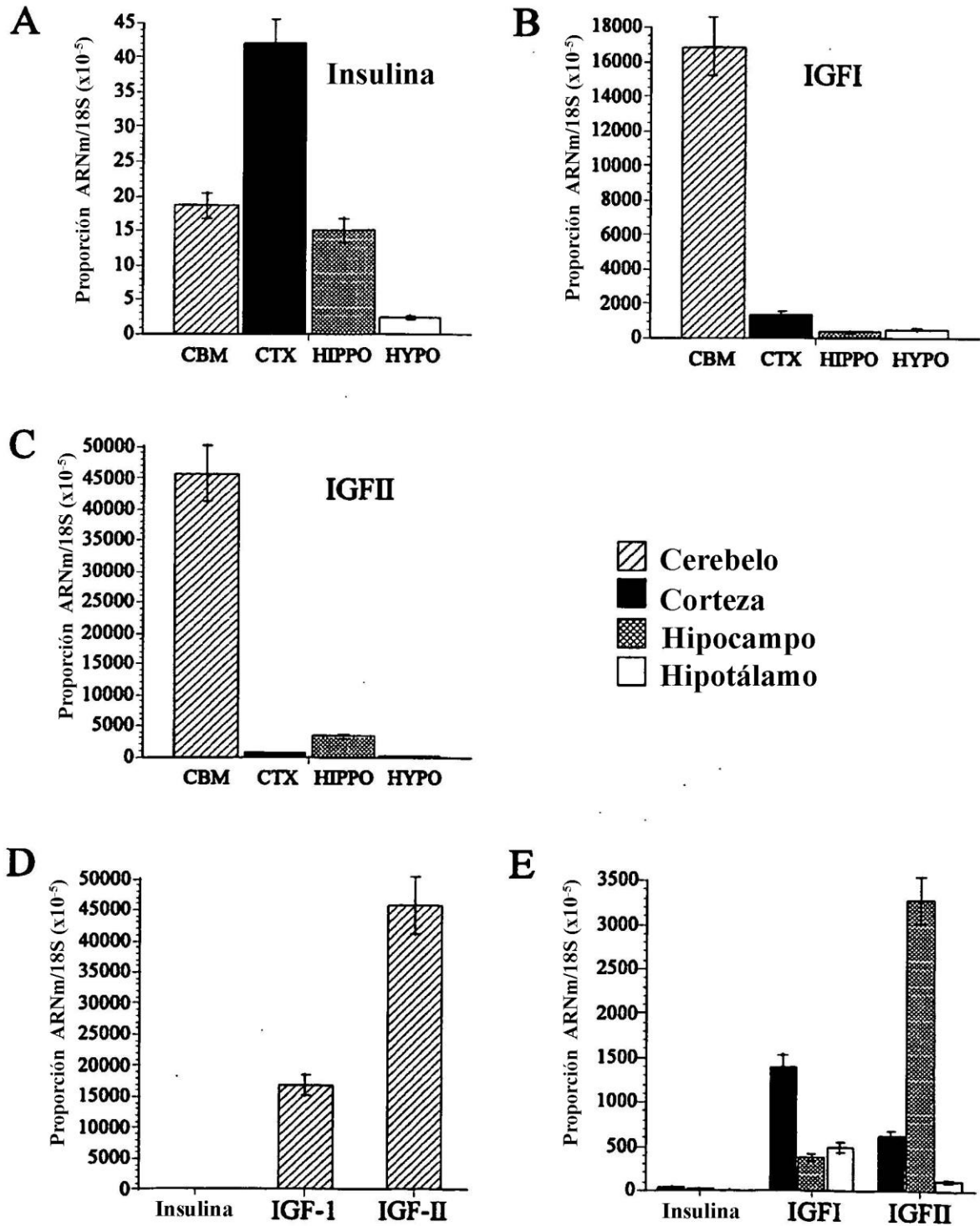
FIGS 2A-2D



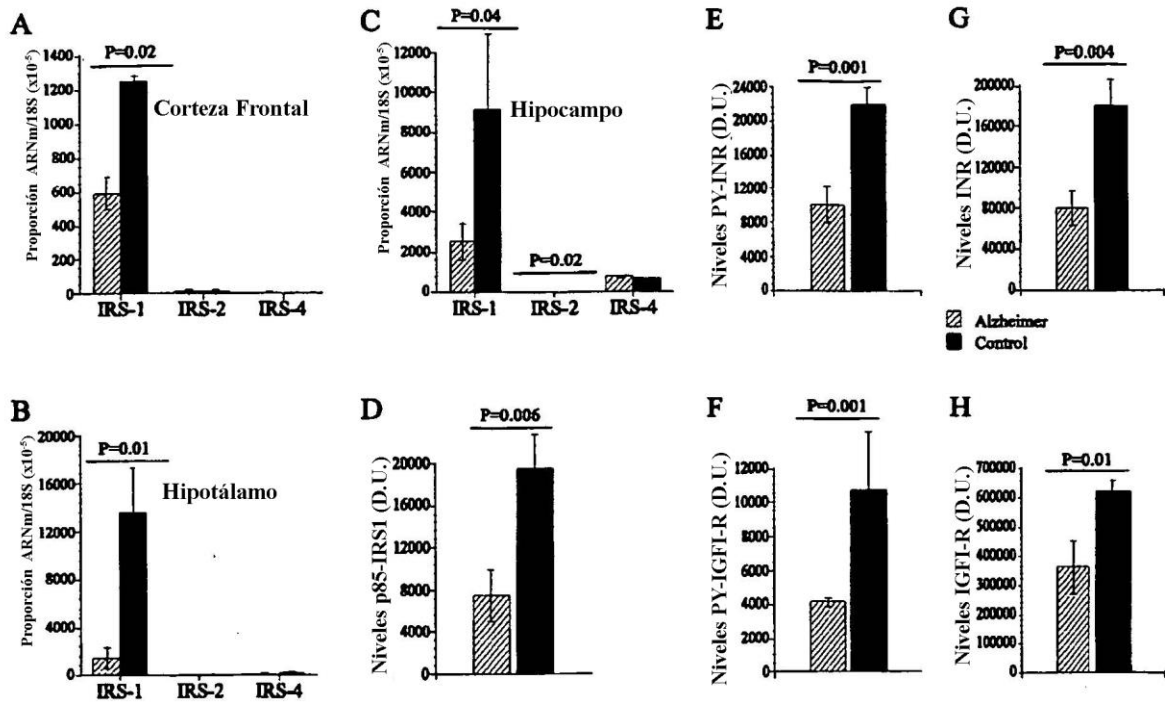
FIGS. 3A-3H



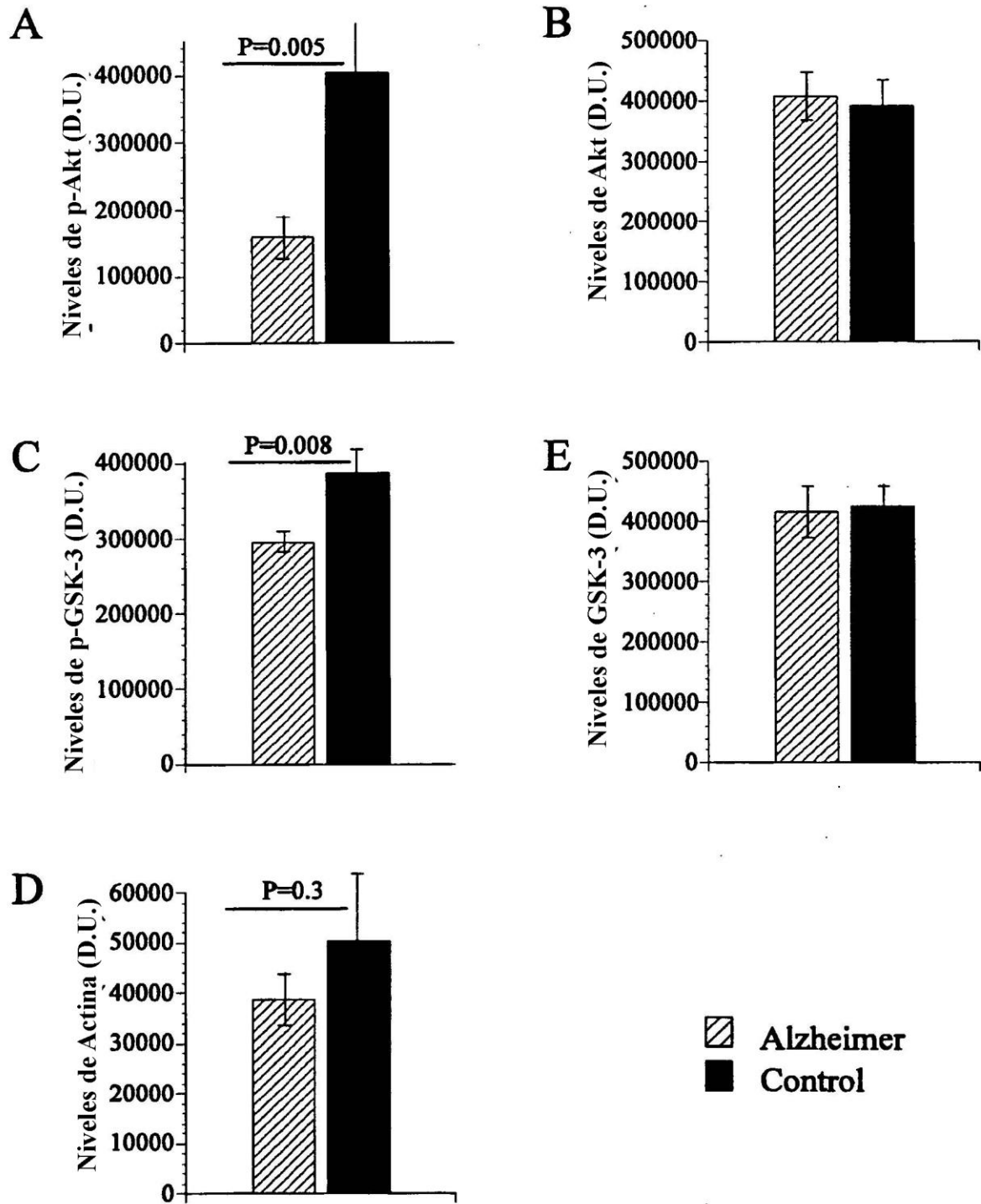
FIGS. 4A-4E



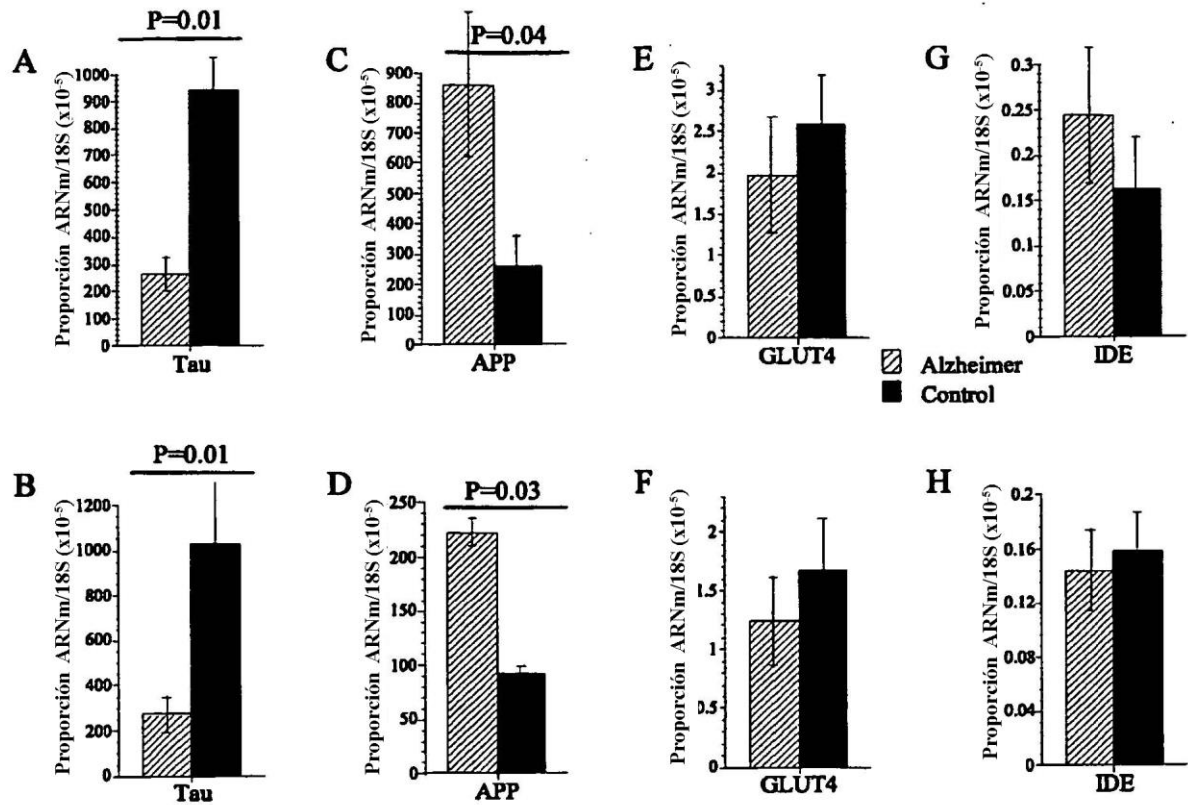
FIGS. 5A-5E



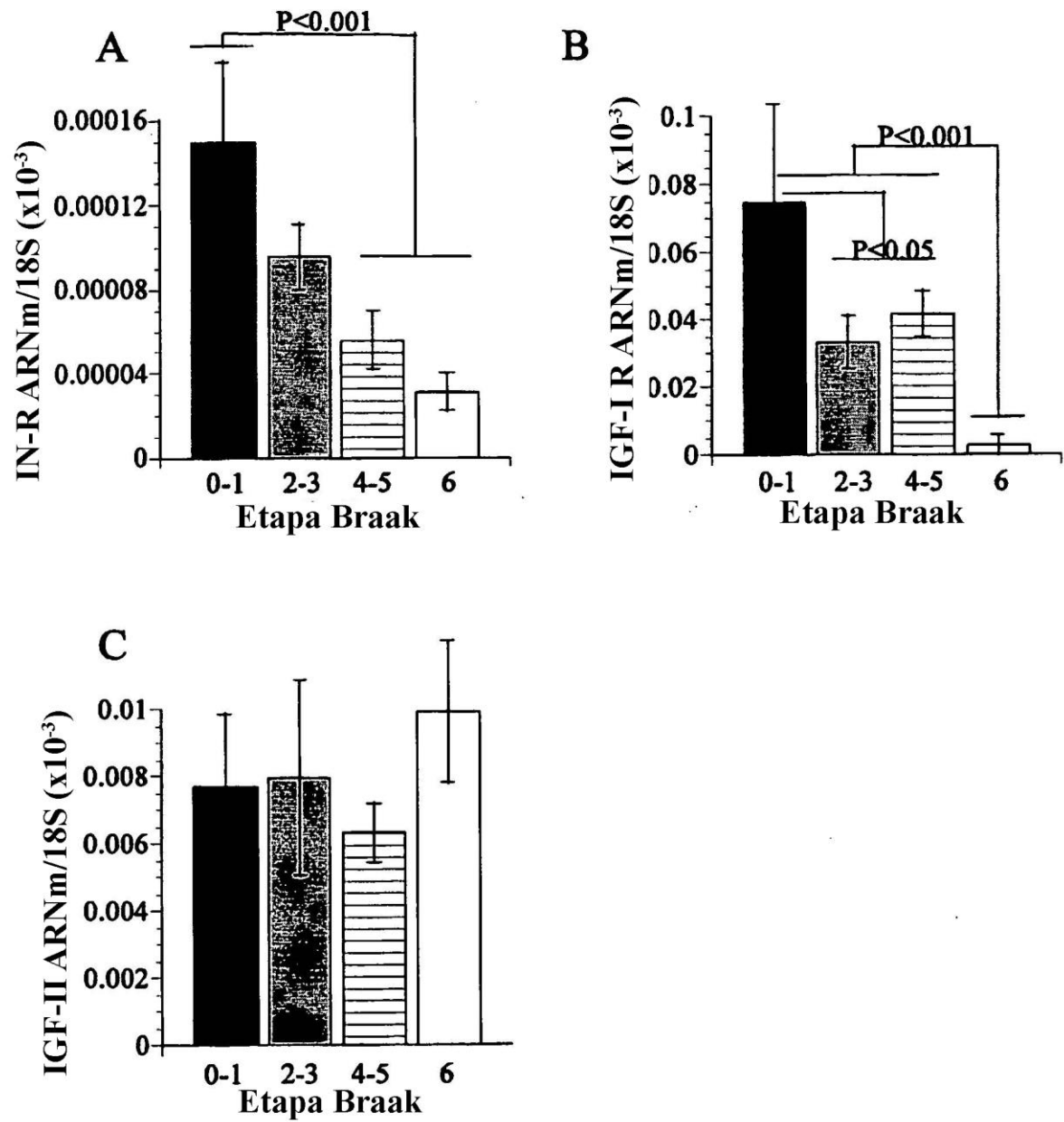
FIGS. 6A-6H



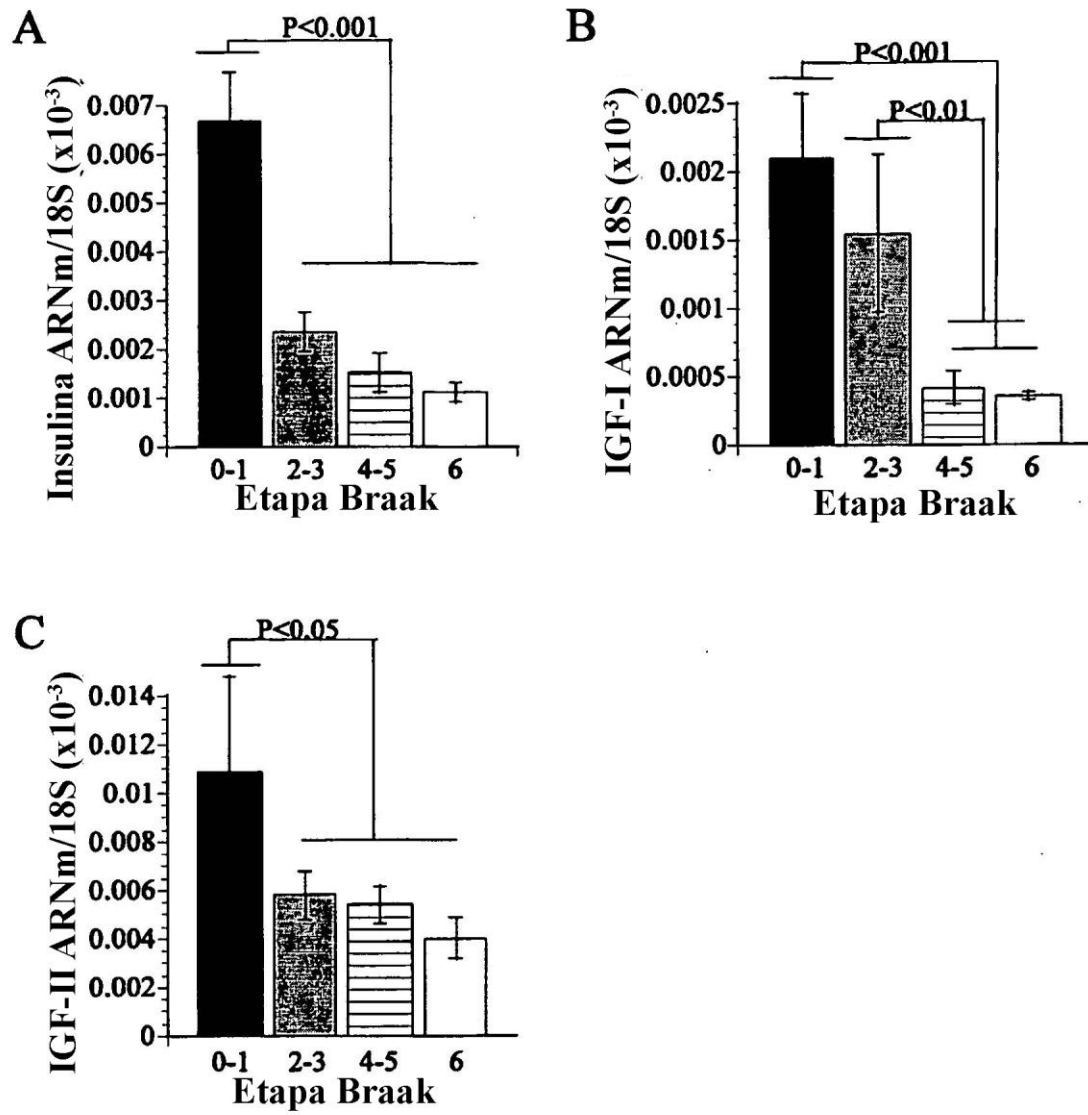
FIGS. 7A-7E



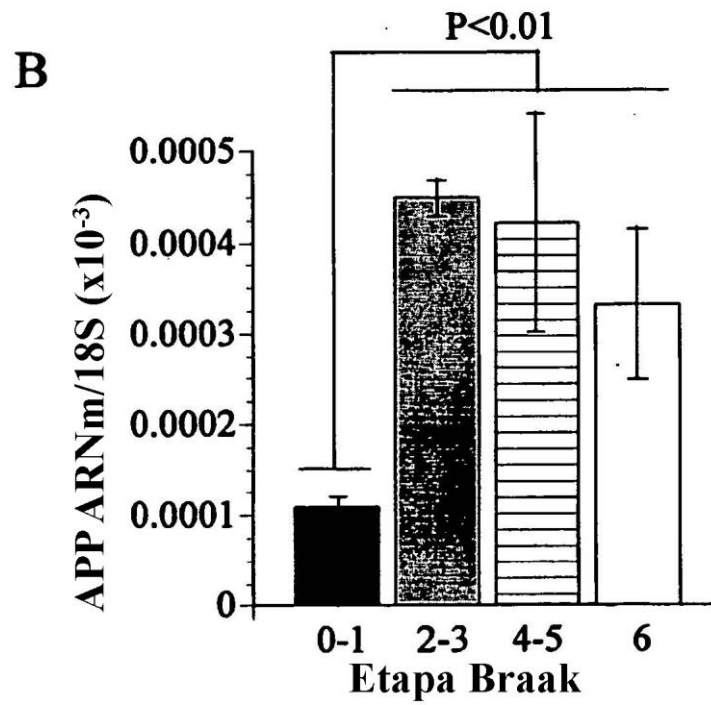
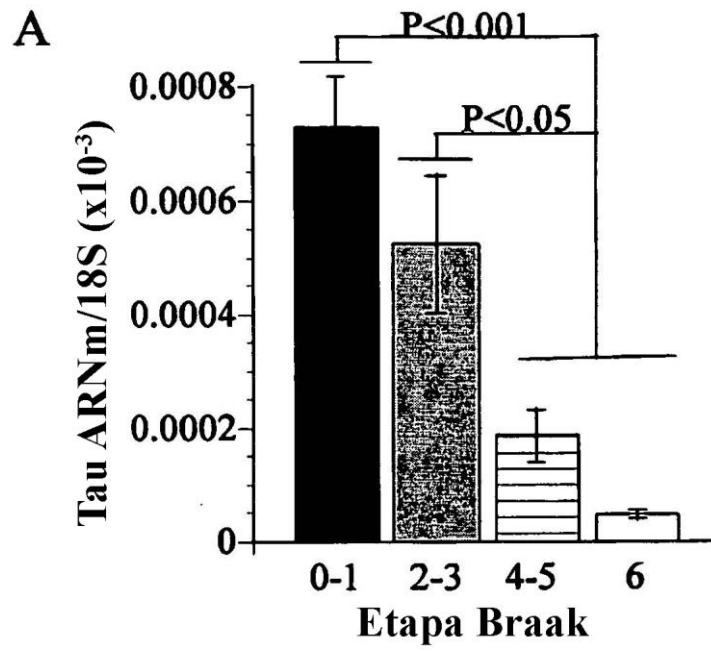
FIGS. 8A-8H



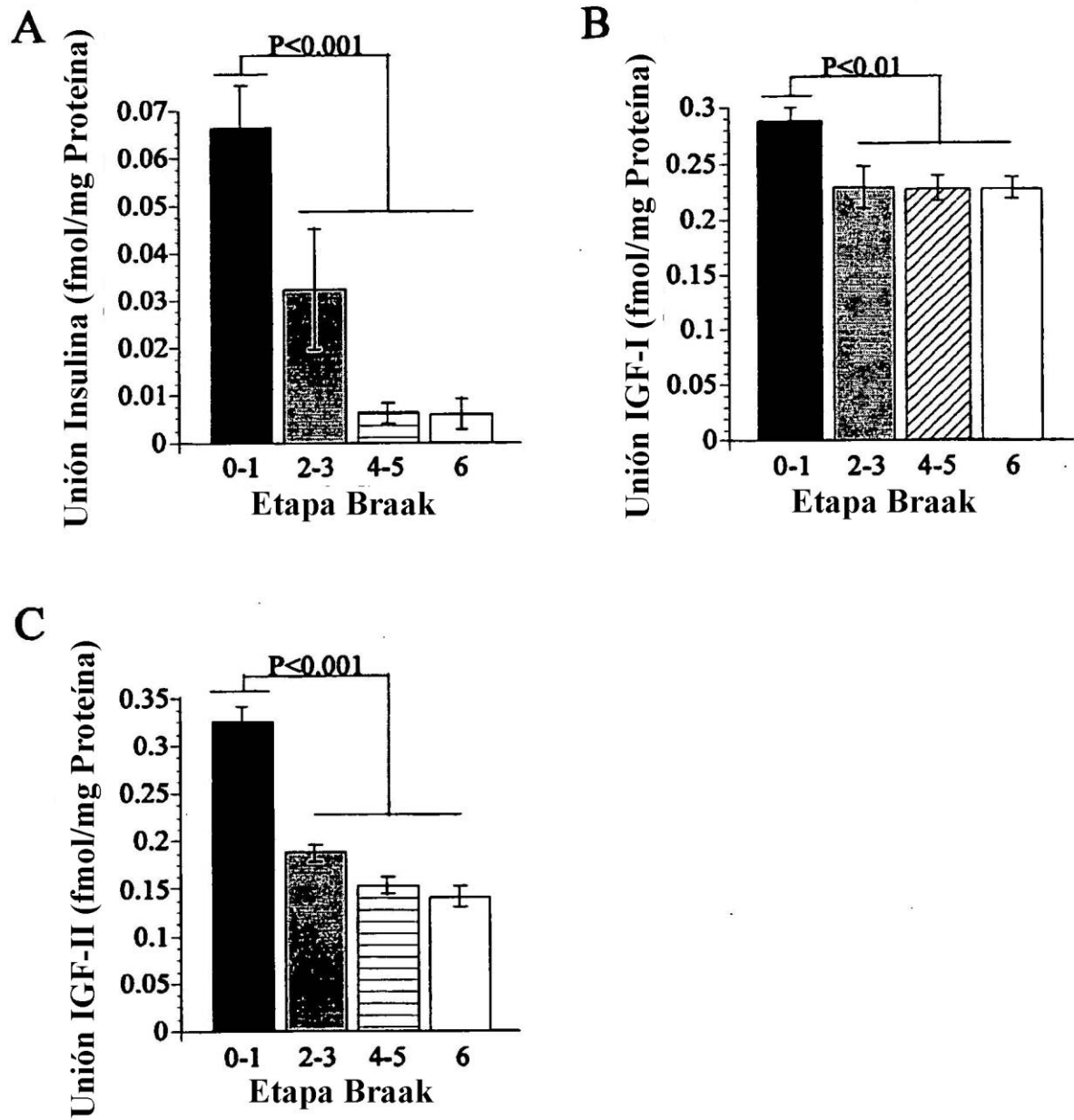
FIGS. 9A-9C



FIGS. 10A-10C



FIGS. 11A-11B



FIGS. 12A-12C

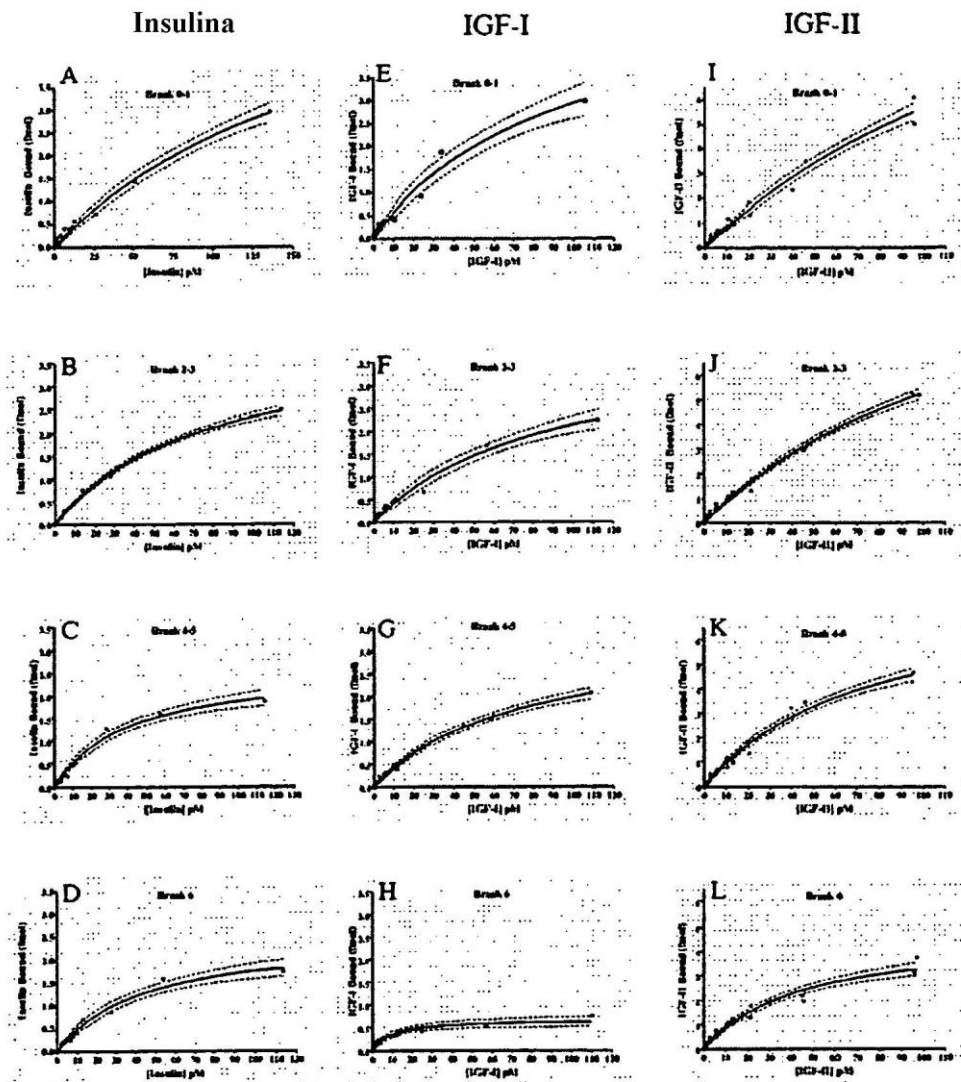


Figura 13

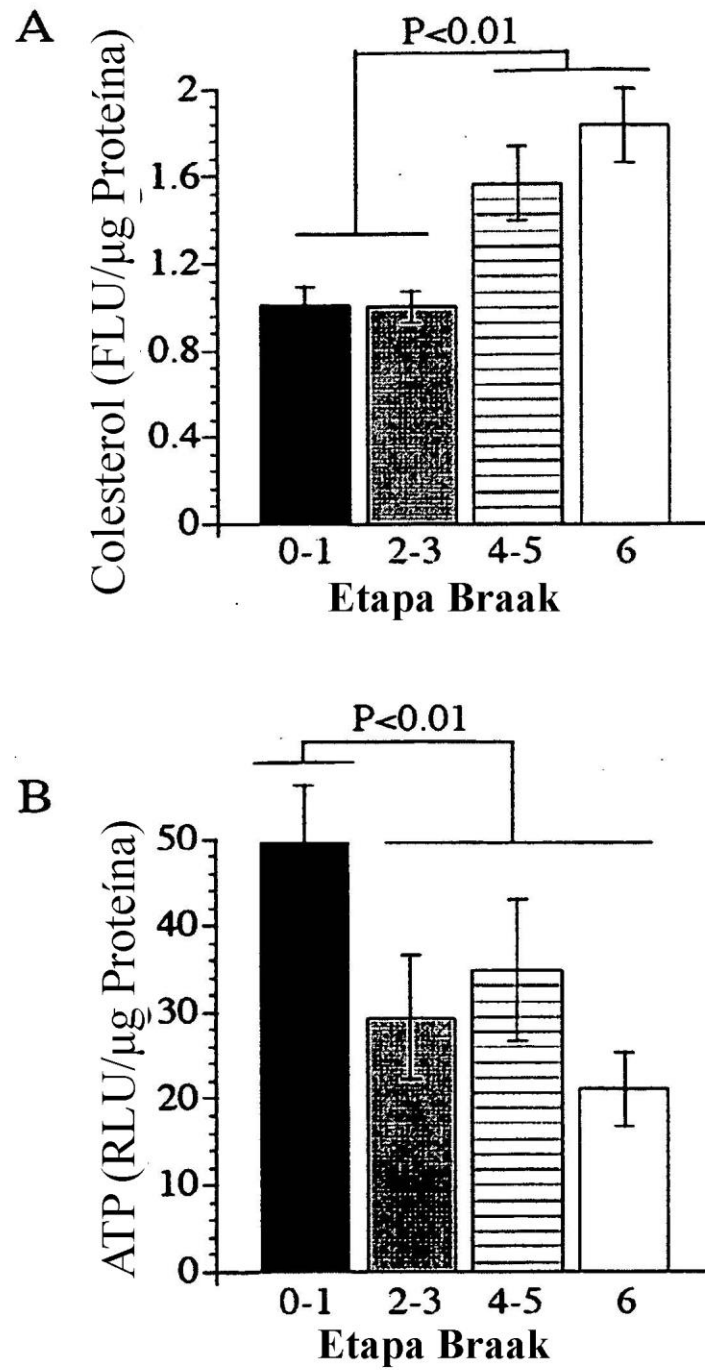


Figura 14

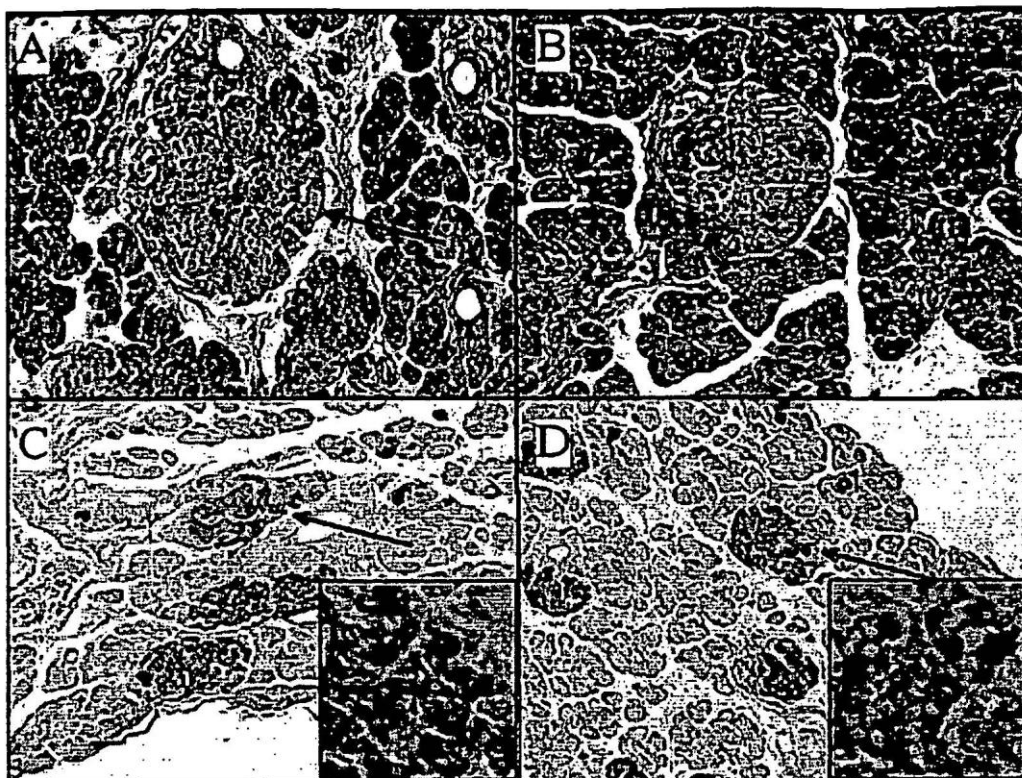


Figura 15

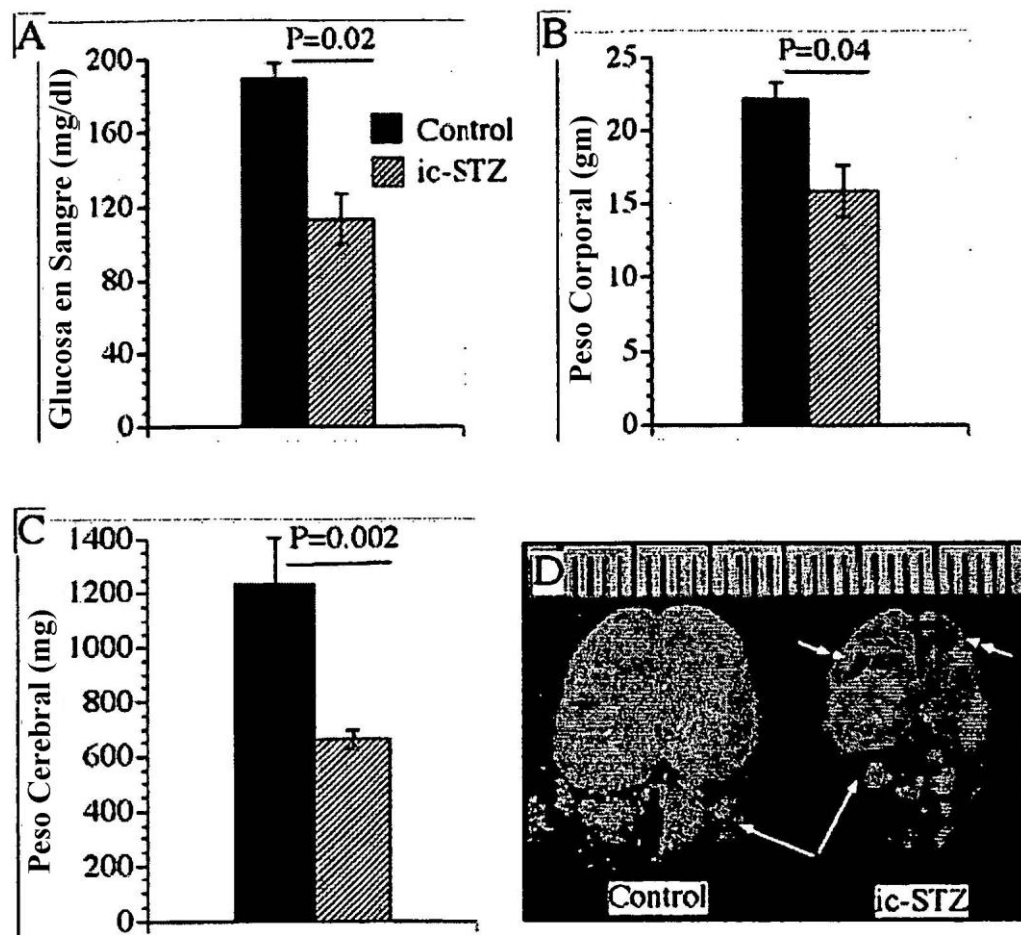


Figura 16

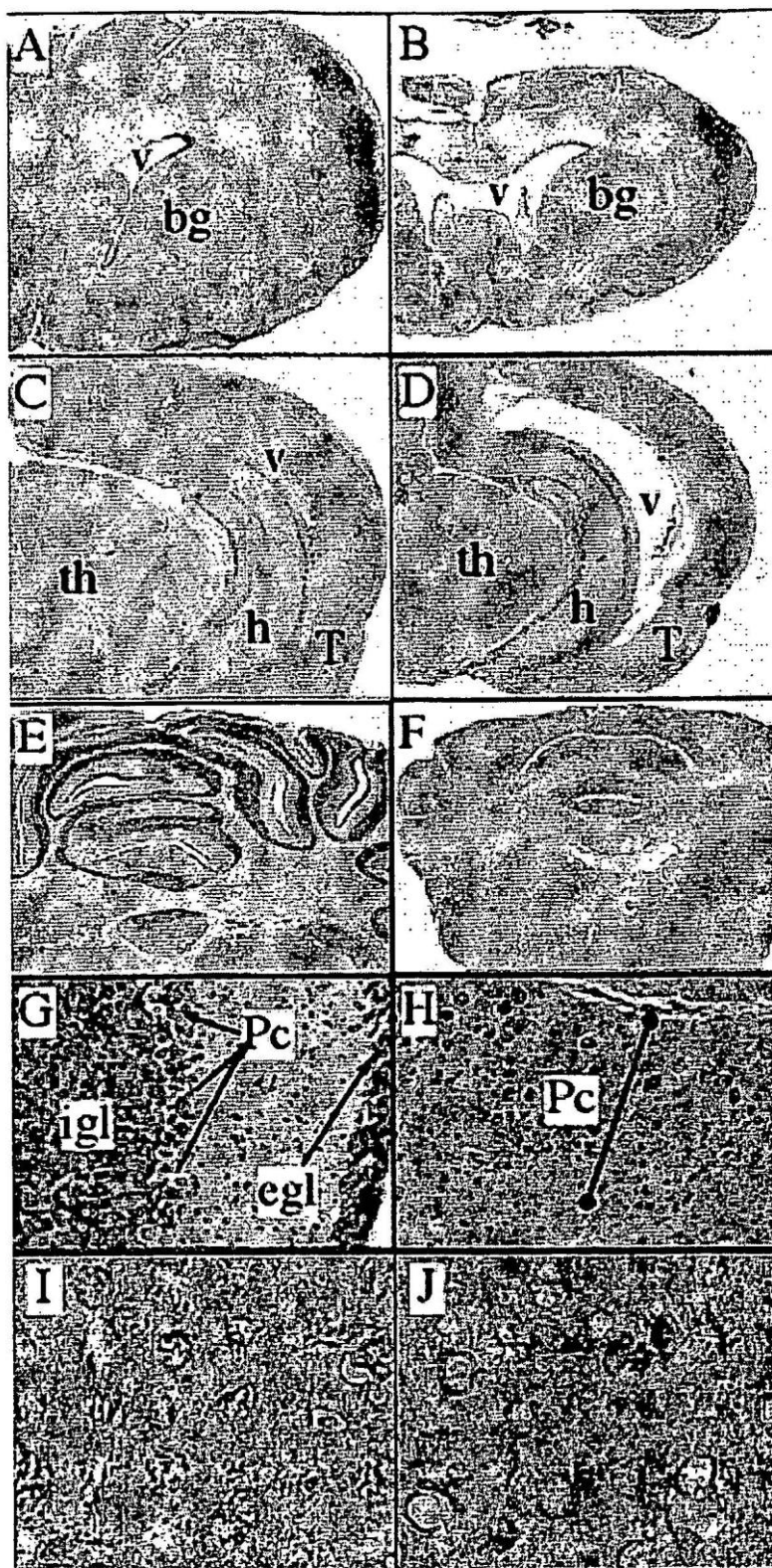


Figura 17

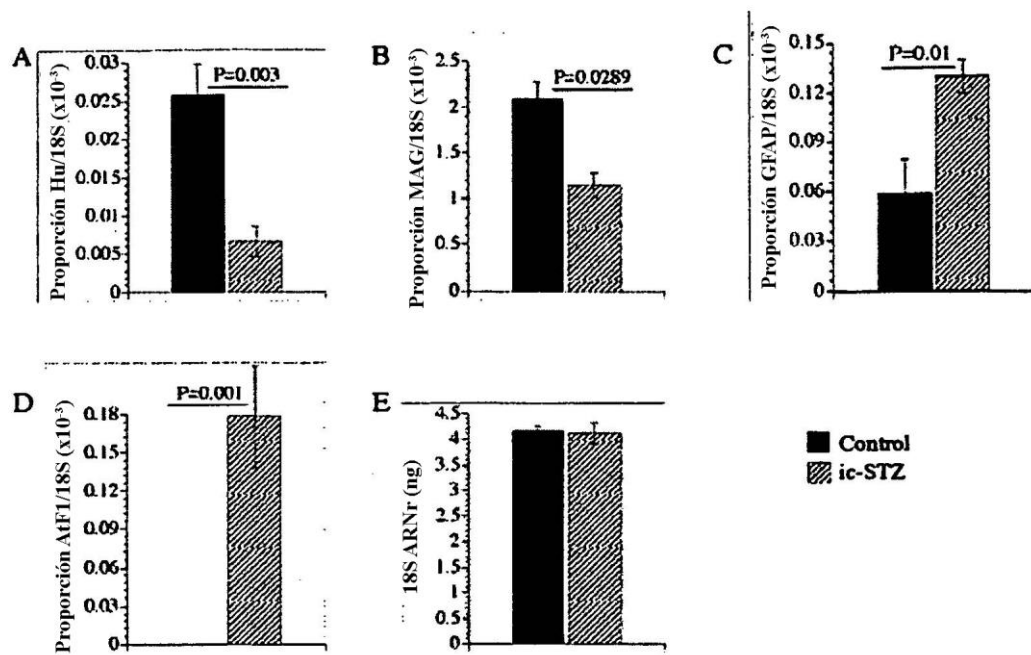


Figura 18

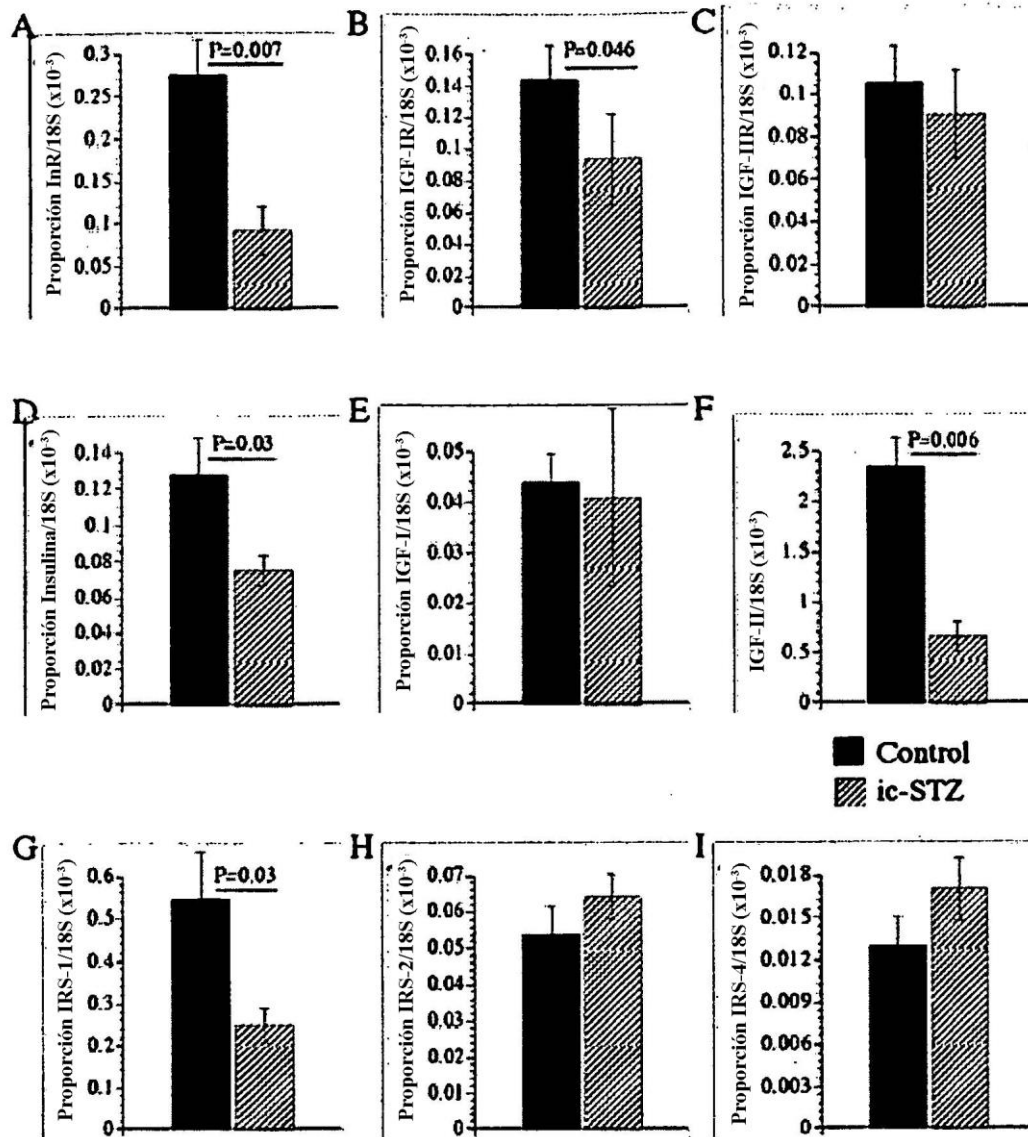


Figura 19

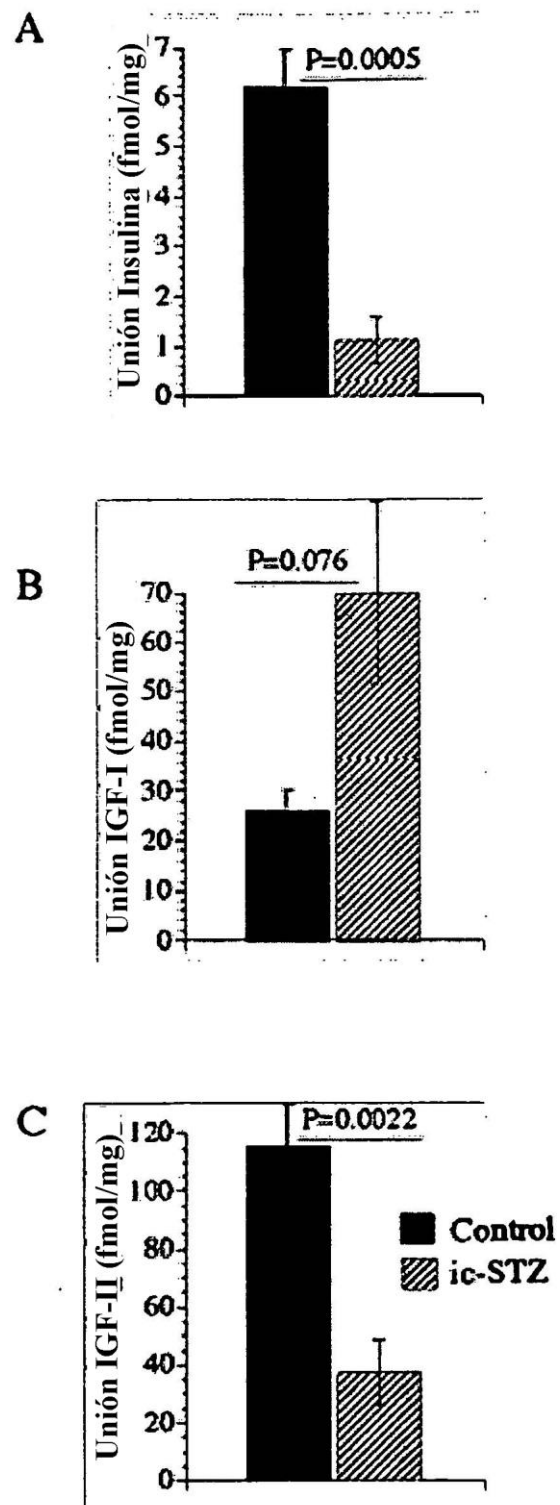


Figura 20

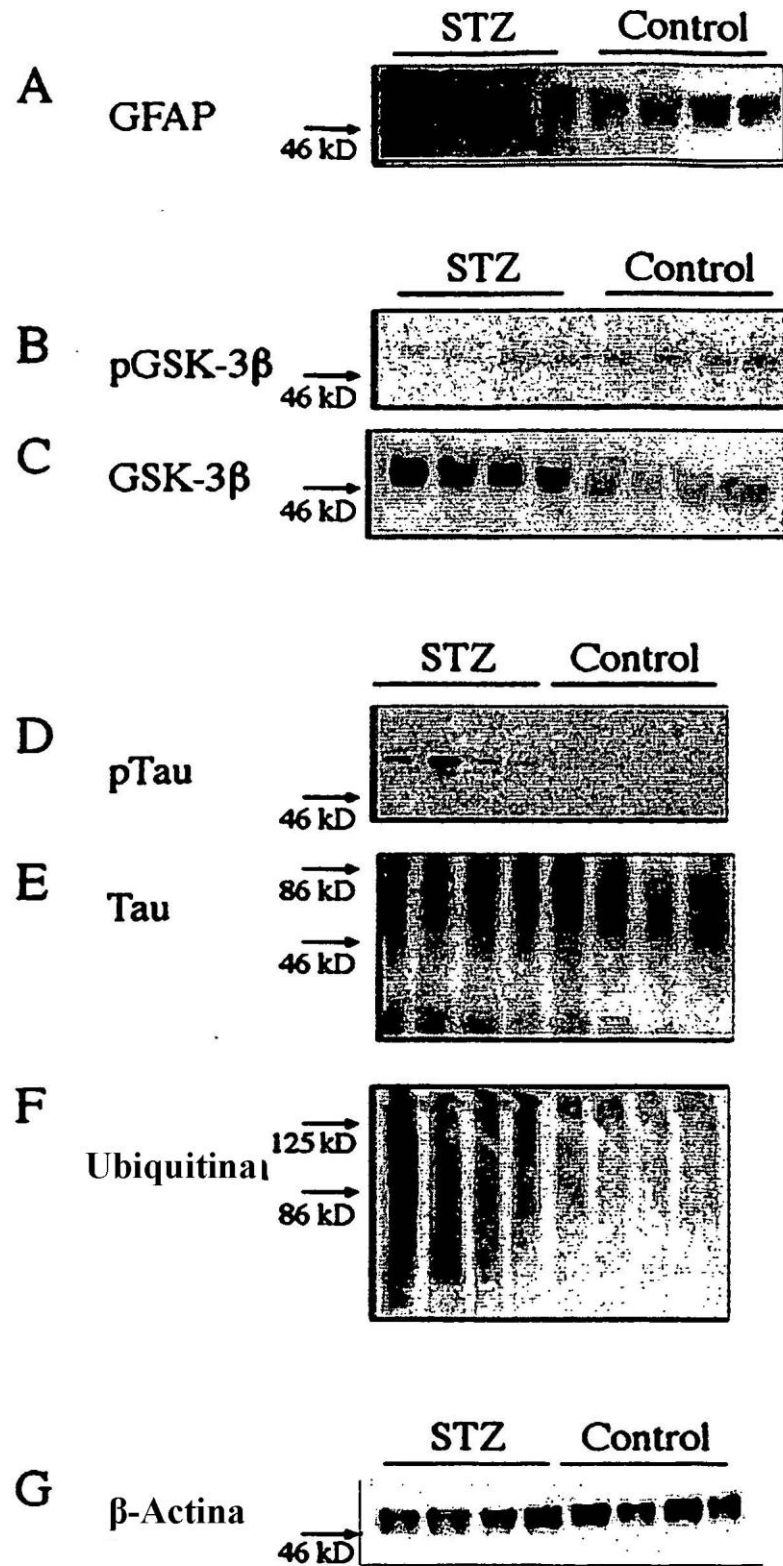


Figura 21

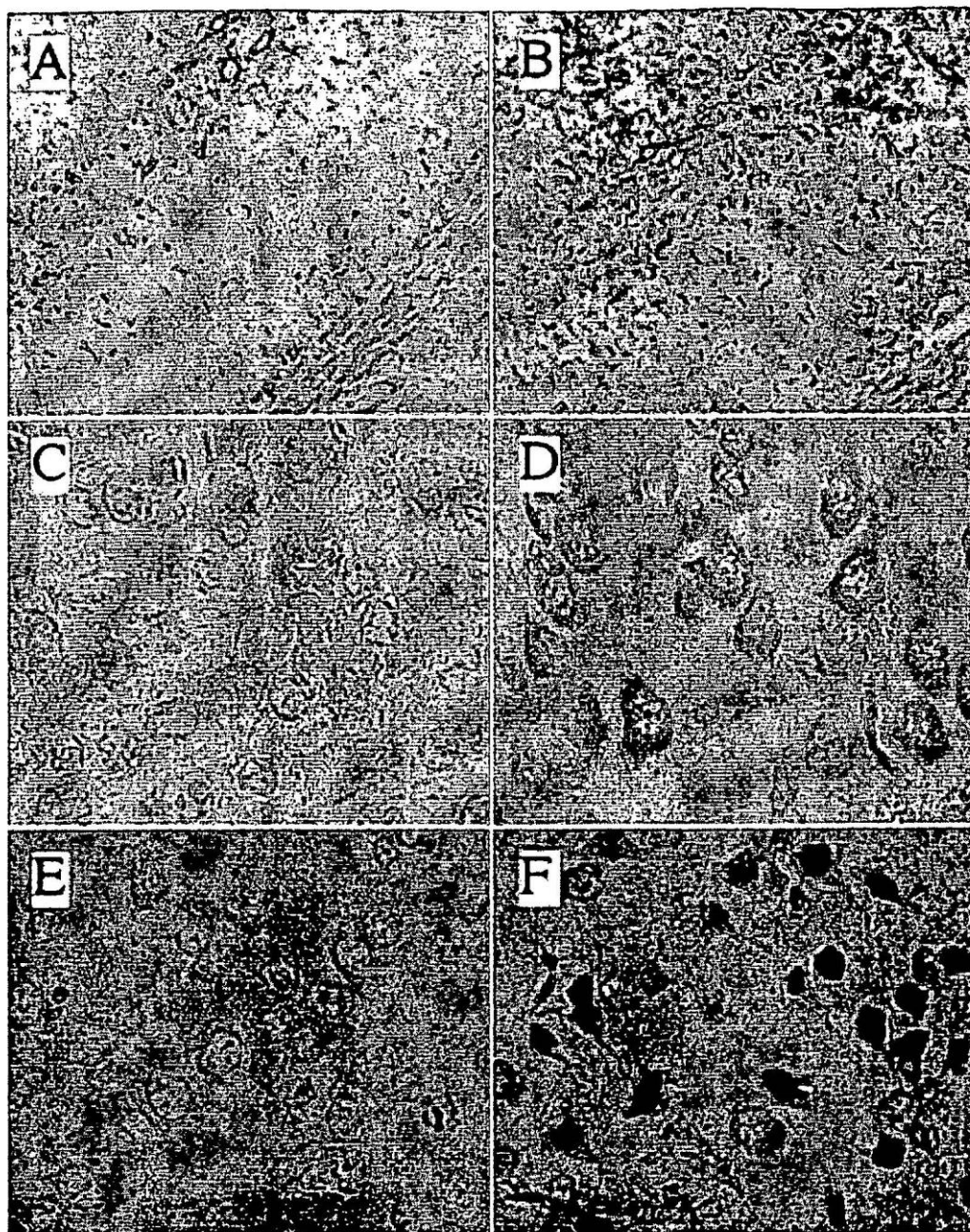


Figura 22

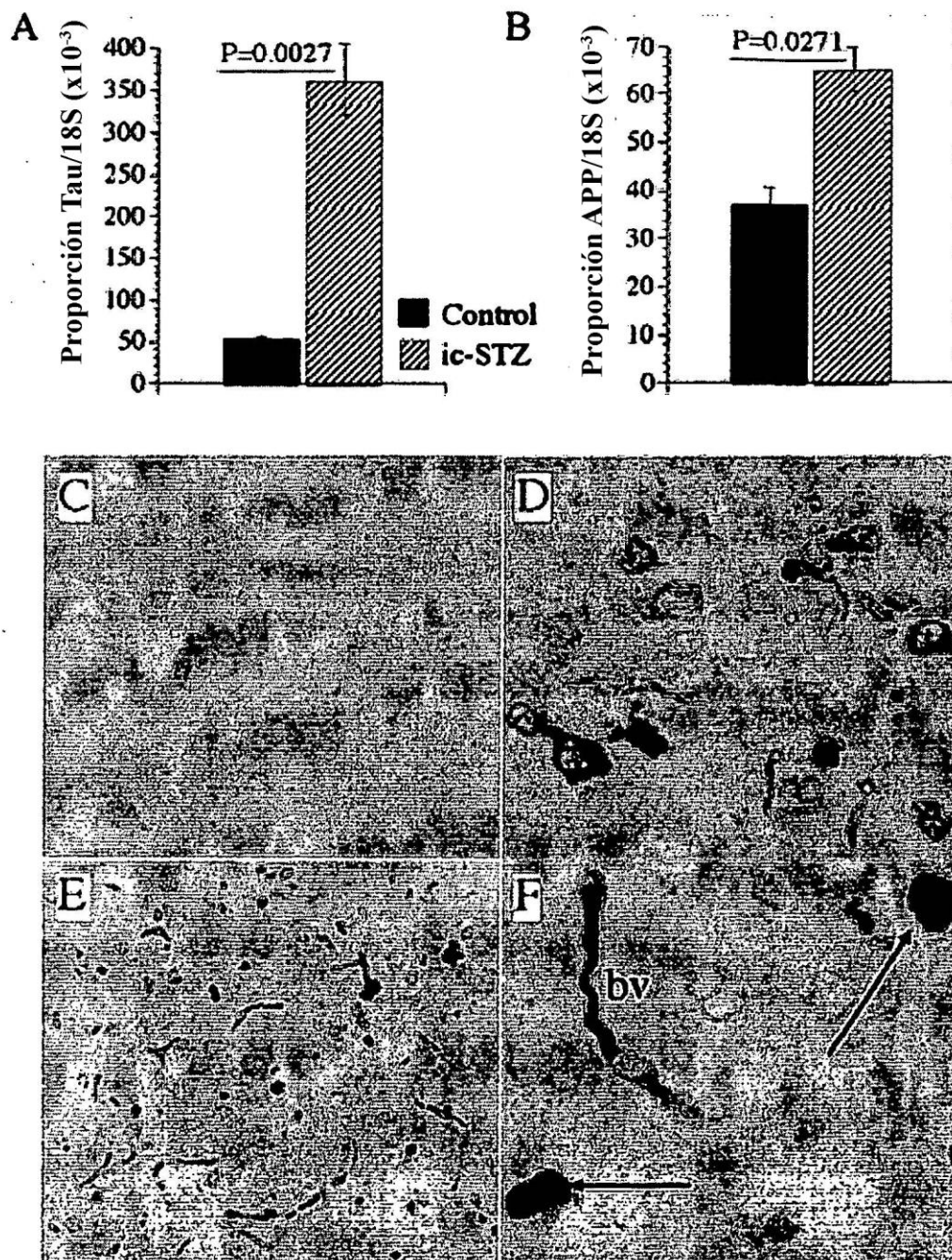


Figura 23

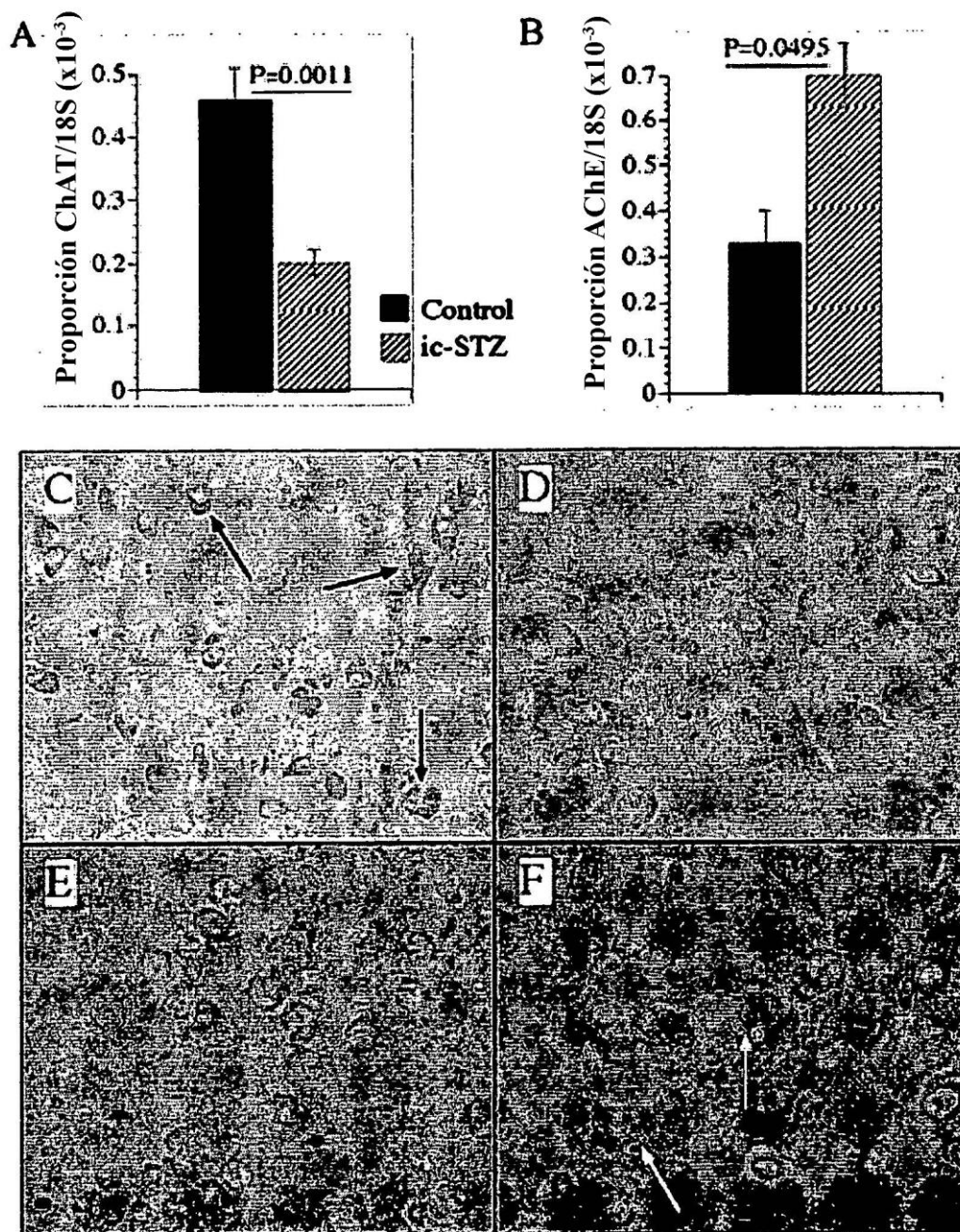


Figura 24