

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 178**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10739350 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2459742**

54 Título: **Nuevas herramientas de diagnóstico para enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**29.07.2009 US 229356 P**

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

**01.09.2016**

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)  
11 Rue des Peupliers  
92130 Issy les Moulineaux, FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
CHUMAKOV, ILYA;  
NABIROCHKIN, SERGUEI;  
GUERASSIMENKO, OXANA y  
GRAUDENS, ESTHER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 581 178 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevas herramientas de diagnóstico para enfermedad de Alzheimer

**Campo de la invención**

5 La presente descripción se refiere a desarrollo, validación y aplicación de nuevos conjuntos de biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD) y trastornos relacionados, incluyendo el diagnóstico precoz del MCI y pródromo precoz de la AD, identificación de subtipos de la enfermedad, predicción de su respuesta a los procedimientos de gestión de la enfermedad, fármacos y sus combinaciones y para contra la respuesta a estos tratamientos, incluyendo validación de biomarcadores para ensayos clínicos. En particular, la presente descripción se refiere al campo de la detección y del control del tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad prodrómica de la enfermedad de Alzheimer o deterioro cognitivo leve (MCI). De forma más específica, la presente descripción se refiere a biomarcadores proteicos, lipídicos, glucídicos y metabolitos que se pueden medir en fluidos biológicos, que se pueden usar para ayudar en la detección, subclasificación, predicción del tratamiento farmacológico y seguimiento de este tratamiento de trastornos neurodegenerativos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, su pródromo y deterioro cognitivo leve. La invención proporciona un método para detectar la presencia o riesgo de AD, y el uso de un kit.

**Antecedentes de la invención**

En la actualidad, la AD es la causa más común de demencia. Se caracteriza clínicamente por una disminución global de la función cognitiva que evoluciona lentamente y deja a los pacientes en fase terminal condenados a la cama, con incontinencia y dependientes de atención de custodia. La muerte se produce, como promedio, 9 años después del diagnóstico (Citron *et al.*, 2004). La tasa de incidencia de la AD aumenta de forma radical con la edad. Las predicciones de población de las Naciones Unidas calculan que el número de personas mayores de 80 años se aproximarán a los 370 millones en el año 2050. En la actualidad, se calcula que un 50 % de las personas mayores de 85 años están afectados con AD. Por lo tanto, más de 100 millones de personas en todo el mundo padecerán demencia en 50 años. El gran número de personas que requieren cuidados constantes y otros servicios afectará gravemente a los recursos médicos, económicos y humanos (Suh y Checler, 2002).

En la actualidad, el diagnóstico clínico de la AD se basa en entrevistas estructuradas (historias de pacientes), y exámenes neuropsicológicos acoplados con formación de imágenes o exploraciones neurofisiológicas (exploraciones con CT, MRI, PET y/o SPECT y EEG) para descartar otras explicaciones de la pérdida de memoria, incluyendo condiciones temporal (depresión o deficiencia de vitamina B12) o condiciones permanentes (apoplejía) y se basa en criterios del grupo de trabajo NINCDS-ADRDA (McKhann *et al.*, 1984) y el Manual de Diagnóstico y Estadístico de la Asociación Americana de Psiquiatría de Trastornos Mentales (4ª Ed. Washington D.C., Am Psychiatric Assoc, 1997).

Desafortunadamente, los métodos de diagnóstico clínico no son infalibles. La revisión basada en las evidencias de la bibliografía actual muestra una precisión del diagnóstico clínico de un 65 a 90 %. Las tasas de precisión más elevadas están asociadas por lo general con centros especializados (clínicas de trastornos de memoria) que se centran en trastornos de memoria mientras que las tasas más bajas están asociadas probablemente con los médicos de atención primaria. Además, la precisión del diagnóstico clínico probablemente es menor durante las etapas iniciales de la enfermedad cuando los síntomas son difíciles de diferenciar de los del deterioro cognitivo asociado a la edad normal. Más recientemente, algunos estudios sugieren que una afección denominada deterioro cognitivo leve (MCI) representa a la AD prodrómica y si se diagnostica en un estadio temprano representa la mejor oportunidad para intervención farmacéutica. Los criterios clínicos usados para el diagnóstico de MCI son los de Petersen *et al.* (1999) e incluyen: 1) problemas de memoria corroborados por un informante, 2) deterioro de la memoria objetiva para edad y educación, 3) función normal cognitiva general, 4) actividades de la vida diaria intactas, y 5) el sujeto no satisface los criterios de demencia.

Una complicación adicional del diagnóstico y el tratamiento de la AD es la falta de un biomarcador fiable que identifique de forma específica a sujetos con AD, en particular en la fase inicial del estadio prodrómico de la enfermedad (MCI). En vista de la magnitud del problema de salud pública que plantea la AD, se han realizado esfuerzos de investigación considerables para elucidar la etiología de la AD, así como para identificar biomarcadores, proteínas características o metabolitos medidos de forma objetiva como un indicador de procesos patogénicos, que se puede usar para diagnosticar y/o predecir si es probable que una persona desarrolle la AD.

La mayoría de los estudios de biomarcadores de la AD se han centrado en la medición en el fluido cerebroespinal (CSF). Debido a su contacto íntimo con el cerebro, los cambios patogénicos en el cerebro que dan como resultado alteraciones en proteínas/péptidos se reflejarían probablemente en el CSF.

Una serie de patentes de Estados Unidos y solicitudes publicadas que se refieren a métodos para diagnosticar la AD, incluyen las Pat. de Estados Unidos n.ºs 4.728.605, 5.874.312, 6.027.896, 6.114.133, 6.130.048, 6.210.895, 6.358.681, 6.451.547, 6.461.831, 6.465.195, 6.475.161, 6.495.335, 2005/0244890, y 2005/0221348. Además, un número de informes en la bibliografía científica se refieren a ciertos marcadores bioquímicos y su correlación/asociación con la AD, que incluyen a Fahnestock *et al.*, 2002; Masliah *et al.*, 1995; Power *et al.*, 2001; y

Burbach *et al.*, 2004. Además, Li *et al.* (2002) y Sanna *et al.* (2003) han investigado la Leptina en relación con la memoria y la esclerosis múltiple, respectivamente. El documento de patente JP 2000/321274 también describe biomarcadores de AD.

5 Tres biomarcadores diferentes en CSF se han documentado particularmente bien: proteína de la cadena neuronal, tau (total, T-tau y diversas formas fosforiladas; P-tau) y derivados de la proteína precursora de amiloide (APP) que incluye a A $\beta$ <sub>40</sub> y se describe que la proteína de la cadena neuronal A $\beta$ <sub>42</sub> se sobreexpresa en las neuronas del cerebro en pacientes con AD. Se ha desarrollado un ensayo cuantitativo para medir los niveles de un tipo específico de proteína de la cadena neuronal (AD7c-NTP) en CSF y orina. Un buen número de estudios han evaluado CSF-tau como un marcador *ante mortem* para la AD usando principalmente ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) como el ensayo de medición. En estudios anteriores, se midió la tau total (T-tau) aunque hay un creciente cuerpo de bibliografía que también describe el análisis de variantes fosforiladas (P-tau) de la misma proteína que participan en la formación de ovillos neurofibrilares. También se han desarrollado ELISA que pueden distinguir entre la principal forma de A $\beta$  que termina en el aminoácido 40 (A $\beta$ <sub>40</sub>) y las especies formadoras de placas seniles que terminan en la posición 42 (A $\beta$ <sub>42</sub>) y se han evaluado extensamente para el análisis del CSF. Estos tres ensayos, o bien usados de forma individual, o en el caso de tau en A $\beta$ <sub>42</sub>, en combinación, no han demostrado los valores de sensibilidad y especificidad requeridos para el uso clínico de rutina, en particular para el diagnóstico precoz y discriminación entre AD y otras demencias que no son AD. Además, los intentos para medir tau y A $\beta$ <sub>42</sub> en sangre se han cumplido con éxito limitado, lo que restringe aún más su adopción generalizada en la práctica clínica.

20 Se ha informado de un amplio espectro de otras anomalías, distintas de NTP, Tau y A $\beta$ , en CSF de pacientes con AD. Se ha mostrado que muchos de los marcadores de CSF identificados (secuencia de proteínas confirmada) informados en la presente memoria aumentan o disminuyen en pacientes con AD en comparación con individuos normales. Por ejemplo, se sabe que la proteína Ubiquitina forma complejos con Tau hiperfosforilada durante la maduración de los NFT en los cerebros de pacientes de AD (Iqbal *et al.*, 1998). Se ha mostrado que los niveles de ubiquitina en CSF de AD y los grupos de control neurológicos son significativamente más elevados que los de los controles de edad no neurológica (Wang *et al.*, 1991; Kudo *et al.*, 1994).

30 La proteína de fase aguda/inflamatoria, alfa(1)-antiquimotripsina (ACT) se produce en exceso en el cerebro con AD. La ACT también puede estimular la formación de, y está asociado con, depósitos amiloides neurotóxicos (Potter *et al.*, 2001). Los niveles de ACT tanto en suero como en el de CSF son significativamente más elevados y, de forma significativa y específica más elevados en pacientes con demencia de tipo Alzheimer que en los sujetos de control (Matsubara *et al.*, 1990). Hay una asociación particularmente estrecha de los aumentos en CSF-ACT con la aparición tardía (Harigaya *et al.*, 1995).

35 La cromogranina A (CrA) es la principal proteína de grandes vesículas sinápticas de núcleo denso y puede ser valiosa como un marcador bioquímico para la función sináptica en AD. Un informe describió que no había ninguna diferencia entre grupos de control de AD, demencia vascular, y grupos emparejados por edades, excepto cuando se compara con un subtipo familiar (AD de Tipo I) con controles en los que había un aumento estadísticamente significativo de CrA de CSF en los individuos enfermos (Blennow *et al.*, 1995).

40 La beta-2-microglobulina ( $\beta$ 2M) es un iniciador de respuestas inflamatorias modulado por interferones y ciertas citoquinas (Hoekman *et al.*, 1985). Un análisis del proteoma de CSF por electroforesis en dos dimensiones (gel de 2D) ha mostrado un aumento significativo de  $\beta$ 2M en pacientes con AD (Davidsson *et al.*, 2002), y más recientemente estos resultados se confirmaron mediante análisis SELDI (Carrette *et al.*, 2003).

45 Se ha demostrado que la transtiretina (TTR) interactúa con A $\beta$ , evitando posiblemente la formación de amiloide en fluidos biológicos y en el cerebro. (Tsuzuki *et al.*, 2000). Se demostró que una isoforma de TTR identificada aumenta en AD-CSF usando análisis con gel 2D de un pequeño número de pacientes con AD y de control (Davidsson, mencionado anteriormente.) Sin embargo, este resultado entra en conflicto con otros informes que muestran una clara disminución de TTR en CSF de pacientes con AD en comparación con los controles (Serot *et al.*, 1997.; Riisoe *et al.*, 1998). Esta disminución también se correlaciona de forma negativa con la abundancia de placas seniles (SP) (Merched *et al.*, 1998).

50 La cistatina C, un inhibidor de cisteína proteasa, se ha implicado en los procesos neurodegenerativos y de reparación del sistema nervioso, y la deposición de la misma proteína junto con el péptido beta amiloide se encontró en forma de angiopatía amiloide cerebral (CAA) en diferentes tipos de demencias (Levy *et al.*, 2001). La cistatina C de longitud completa se encontró como un marcador de CSF para AD en un estudio anterior de formación de perfiles de SELDI (Carrette, mencionado anteriormente.). Una disfunción relativa de la barrera hematoencefálica (BBB) está asociada con AD entre las personas de edad muy avanzada. La proporción de CSF/albúmina de suero se puede usar como una medida de la función de la BBB. Se ha informado que la proporción media de CSF/albúmina de suero es más elevada en todas las demencias estudiadas, incluida la AD, que en individuos sin demencia (Skoog *et al.*, 1998).

La transferrina (TF) desempeña un papel en la defensa antioxidante en suero y también se produce en el cerebro en el que su papel en el estrés oxidativo no es claro. Un estudio en pacientes con síndrome de Down que padecen demencia progresiva mostró disminución de los niveles de TF cuando se comparaban con controles emparejados

por edad sin enfermedad neurológica (Elovaara, 1984).

La prostaglandina-D-Sintasa (PDS) funciona para convertir la prostaglandina H2 en prostaglandina D2 y se ha identificado en varios estudios de CSF (Harrington *et al.*, 1993; Hiraoka *et al.*, 1998); Hiraoka *et al.*, 2001; Kawashima *et al.*, 2001; Mase *et al.*, 1999 ; Mase *et al.*, 2003; Melegos *et al.*, 1997. Además, la PDS muestra isoformas alteradas en trastornos neurológicos que incluyen a la AD y la enfermedad de Parkinson.

Debido al aumento de la importancia de la AD en nuestras sociedades, existe una necesidad de nuevas herramientas de diagnóstico y biomarcadores de AD eficaces.

**Compendio de la invención**

La finalidad de la presente descripción es proporcionar nuevos métodos de diagnóstico o control de la AD y trastornos relacionados, así como predecir y/o evaluar la capacidad de respuesta de los sujetos o la eficacia de los tratamientos en sujetos que padecen AD o un trastorno relacionado.

Los inventores han identificado una ruta molecular que está implicada en la génesis de la AD y ofrece nuevas dianas para desarrollo de biomarcadores de AD.

Como se indica en la presente memoria, un ejemplo de la presente descripción proporciona un método para el diagnóstico de diagnosis of MCI, pródromo de AD, AD o métodos para ayudar en el diagnóstico y subclasificación de trastornos neurológicos, que incluyen AD, mediante cuantificación de la cantidad de un biomarcador basado en proteína, ARN, metabolito, lípido, glúcido en una muestra de fluido biológico del sujeto, tal como una muestra de fluido cerebroespinal, suero, saliva, orina, etc., y comparar la cantidad medida con un valor de referencia para el biomarcador. La información obtenida de este modo se puede usar para ayudar en el diagnóstico, o para diagnosticar la enfermedad, respuesta potencial al fármaco o indicaciones tempranas de respuesta favorable al fármaco en el individuo. Los biomarcadores están presentes de forma diferencial en sujetos que tienen una enfermedad neurológica, que incluye la AD, con respecto a los sujetos libres de la enfermedad, o sujetos que tienen una forma diferente de demencia.

Se proporciona un método para diagnosticar o evaluar la probabilidad de que un paciente esté afectado con una enfermedad neurológica, que incluye la AD, método que comprende medir un nivel de un biomarcador de complejo de proteína de la presente descripción.

También se proporciona un método que comprende controlar la evolución de una enfermedad neurodegenerativa, que incluye la AD, que comprende medir un nivel de conjuntos de biomarcadores de la presente invención.

Otro ejemplo comprende controlar la eficacia de un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, que incluye la AD, que comprende medir un nivel de un biomarcador de complejo de proteína de la presente descripción.

Otro ejemplo comprende calificar y subclasificar una enfermedad neurodegenerativa, que incluye la AD, en un sujeto, que comprende medir un conjunto de biomarcadores complejos de la presente invención.

Por lo general, los biomarcadores se seleccionan entre SNP asociado con enfermedad, proteínas, ARN, metabolitos, lípidos o glúcidos implicados en biología de sinapsis, angiogénesis o respuesta al estrés celular.

En una realización, el conjunto de biomarcadores de la invención comprende el conjunto de proteínas o ARN codificados por los genes seleccionados del grupo que consiste en: APBA1, ATG7, BECN1, CD44, CDH2, COL18A1, ERBB4, F3, FLNA, FYN, GRIN2B, IL20, ITPR1, LRP8, MTOR, NPPC, NRP1, PDGFC, ROBO1, SEMA3E, TGFB1, THBS1, VEGFR1 y WWOX.

En otro ejemplo, el conjunto de biomarcadores comprende adicionalmente al menos un biomarcador adicional seleccionado de SNP asociados con enfermedad, proteínas, ARN, metabolitos, lípidos o glúcidos, que se detallan a continuación.

En los ejemplos mencionados anteriormente y en otros ejemplos, el nivel medido del biomarcador se correlaciona con la enfermedad neurológica. En algunas realizaciones con esto se puede conseguir por comparación de la cantidad medida con un valor de referencia para el biomarcador. El valor de referencia se puede obtener midiendo una cantidad del biomarcador en sujetos de control emparejados por edades que no se ven afectados por la enfermedad, o que están libres de la enfermedad.

Otro ejemplo comprende controlar la eficacia de un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, que incluye la AD, que comprende medir un nivel de conjunto de biomarcadores complejo. La eficacia del tratamiento se mide controlando los niveles del biomarcador en el sujeto en comparación con una referencia, y/o comparados con otros ensayos previos del sujeto o con un estadio inicial del tratamiento/enfermedad en el sujeto.

En otros aspectos, el método mencionado anteriormente comprende adicionalmente la etapa de gestionar el tratamiento del individuo basándose en el estado. Por ejemplo, si la medición del conjunto de biomarcadores se

correlaciona con la presencia de enfermedad de subtipo de Alzheimer, entonces la gestión del tratamiento comprende administrar un fármaco o combinación de fármacos emparejados para ralentizar o revestir la progresión de la enfermedad. Algunas mediciones adicionales se pueden comparar con las mediciones previas, o el patrón para controlar la progresión de la enfermedad.

- 5 En un aspecto más, el método comprende adicionalmente medir el biomarcador después de que haya comenzado el tratamiento, para controlar la progresión de la enfermedad.

Además con el otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit que comprende un soporte sólido que comprende al menos un agente de captura unido al mismo, en donde el agente de captura une un componente del complejo de proteína biomarcadora de la presente descripción.

## 10 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos de diagnóstico y herramientas para AD y trastornos relacionados.

- 15 La expresión "trastorno relacionado con la AD" se refiere a enfermedad de Alzheimer (AD), demencia senil de tipo AD (SDAT), enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewis, demencia vascular, deterioro cognitivo leve (MCI), afeción prodrómica de AD, AD en el estadio preclínico, alteración de memoria asociada con la edad (AAMI) y problemas asociados con el envejecimiento, Parkinson post-encefalicó, ALS y síndrome de Down.

El descubrimiento racional de biomarcadores potenciales para la enfermedad de Alzheimer (AD) es una demanda urgente, sin satisfacer de la medicina experimental moderna centrada en el desarrollo de fármacos relevantes para la AD.

- 20 Algunos biomarcadores de AD valiosos, que permiten un control detallado del inicio y la progresión de la enfermedad, ayudan a calcular de manera objetiva los efectos funcionales de los fármacos sometidos a ensayo, para asegurar un diagnóstico precoz de la AD y aumenta la eficacia de la línea de desarrollo de fármacos, especialmente el desarrollo de fármacos diseñados como una terapia preventiva. La principal dificultad, la disminución satisfactoria de las tasas en la descripción de biomarcadores relevantes para la AD, consiste en la enorme complejidad de esta enfermedad neurodegenerativa, que afecta a numerosos procesos celulares en diferentes tejidos y provoca un profundo declive en multitud de parámetros fisiológicos.

- 25 Muy recientemente, la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/0124756 (basada en Ray *et al.*, 2007) describió el uso de un conjunto de 16 biomarcadores proteicos para ayudar en el diagnóstico de la AD. Este conjunto se identificó a partir de análisis estadístico de niveles de proteínas de señalización (citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento) obtenido con chips de proteínas disponibles en el mercado que se dedican a estudiar el nivel de citoquinas en circulación.

- 30 La presente invención se basa en un estudio de búsqueda y procesamiento de datos y se ha realizado centrándose en el análisis de rutas que los inventores identificaron como estrechamente implicadas en asociaciones genéticas que estudian la AD y siguiendo experimentos de formación de perfiles de expresión pangenómicos. Los resultados son útiles para identificarnos solamente proteínas, sino también metabolitos o ácidos nucleicos (ARN o SNP) que se podrían usar como biomarcadores.

- 35 Los inventores proponen usar un enfoque combinatorio de búsqueda y procesamiento de datos a la selección de biomarcadores de AD potenciales y su priorización para estudios de validaciones, basándose en búsqueda y procesamiento de rutas de datos experimentales disponibles que cubren resultados de estudios funcionales de biología celular, experimentos de formación de perfiles de expresión pangenómicos y estudios de asociación genética (Herz y Beffert, 2000; Mattson, 2004; Ballatore *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Este enfoque incluye una serie de etapas consecutivas:

- 40 - en primer lugar, los genes asociados de manera funcional o genética con AD, se agrupan en unidades funcionales descritas anteriormente, relevantemente pequeñas, que representan módulos mínimos de transducción de la señalización,
- 45 - estos módulos de transducción de la señalización se combinan adicionalmente y se extienden de forma máxima, basándose en el análisis de estudios funcionales disponibles al público, para construir rutas relevantes para la AD,
- 50 - se definen grandes redes funcionales de interacción de rutas de señalización relevantes para AD, y
- se da prioridad a biomarcadores individuales o combinaciones racionales de biomarcadores que representan diferentes redes funcionales para anotación funcional.

Por lo tanto, se selecciona un biomarcador potencial, - ya sea una proteína por sí misma o un producto de cualquier reacción bioquímica catalizada por esta proteína, - y se le da prioridad para estudios de validación, si se ajusta a los siguientes criterios:

- 55 - participación en la ruta de señalización asociada con el inicio y desarrollo de la AD,

- participación en la red funcional representa de manera convincente por rutas asociadas con la AD,
- facilidad de detección en muestras de paciente.

Selección de biomarcadores relevantes para la AD

5 La ruta del análisis de búsqueda y procesamiento de datos reveló que 3 grandes grupos funcionales de genes, que representan varias rutas de señalización que interactúan estrechamente, están asociados con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer:

- el grupo de genes implicados en biología de sinapsis que incluye genes que participan en la organización de la zona de densidad post-sináptica (PSD), lo que asegura la liberación del neurotransmisor y el control del crecimiento y guía del axón,
- 10 - el segundo grupo combina genes implicados en el control de la angiogénesis y comparte algunos receptores de señalización y sus ligandos con rutas que controlan el crecimiento y guía del axón,
- el tercer grupo está formado por los genes que subyacen a la respuesta al estrés celular.

A continuación, los inventores describen brevemente algunas redes funcionales a modo de ejemplo que regulan el crecimiento y angiogénesis del axón, descrito por el estudio de los inventores.

15 Red funcional que controla el crecimiento y guía del axón

Las proteínas que participan en la regulación del crecimiento y guía del axón permiten que las células precursoras neuronales y axones miren hacia destinos adecuados para asegurar una ubicación y conectividad correctas y están implicadas en el desarrollo de la maduración de sinapsis recién establecidas y por lo tanto, en la ejecución de funciones cognitivas.

20 Las etapas consecutivas del crecimiento y guía del axón están estrechamente controladas por acciones combinadas de una familia bastante limitada de ligandos de Netrinas, Semaforinas, Efrinas, y Slits y sus receptores funcionales similares extracelulares o unidos a la membrana. Los resultados funcionales de la activación de la mayoría de receptores del crecimiento de axones están estrechamente conectados con su capacidad para modular de manera diferencial de la actividad de GTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 pequeñas, con la GTPasa RhoA siendo principalmente responsable de la retracción de las neuritas y con laso de los conos en crecimiento en la mayoría, aunque no en todos, los entornos celulares (Leeuwen *et al.*, 1997).

25 Es necesario destacar que la mayoría de estos ligandos y receptores tienen un papel igualmente importante fuera del establecimiento de la conectividad neuronal - en particular, en la angiogénesis mediante la vía del crecimiento de vasos sanguíneos recién generados.

30 Los ligandos de netrinas son proteínas secretadas que se descubrieron como reguladores de la extensión axonal y la migración celular durante el desarrollo neuronal. Son proteínas bifuncionales y son capaces de actuar como atrayentes para algunos tipos de células y como repelentes para otras; los efectos opuestos de los ligandos de netrinas en la guía del axón están mediados por dos clases de receptores - DCC y UNC5C, ambos de los cuales se identificaron mediante análisis de búsqueda y procesamiento de datos. El receptor de netrina que guía el DCC puede estar implicado tanto en la atracción como en la repulsión de neuronas y del mismo modo, ya que, como se describió recientemente, participa en la regulación de la angiogénesis mediante la activación del módulo de señalización deERK1/2-eNOS (Nguyen y Cai, 2006). El receptor de netrina, UNC5C, más bien posee actividad de reposición de neuronas (Guan y Rao, 2003).

35 A continuación, los inventores también identificaron dos ligandos de semaforina, SEMA3E y SEMA3C, y neuropilinas correceptoras de semaforina, NRP1 y NRP2 y la plexina A2 (PLXNA2), que forman complejos de receptores heteroméricos funcionales en la membrana celular. De forma análoga a las netrinas, se reconocen ligandos de semaforina de clase 3 no solamente como moduladores (inhibidores) del crecimiento del axón, sino también como potentes modificadores de la formación de patrones vasculares y, en el caso de SEMA3E, interfieren de forma selectiva con la angiogénesis inducida por VEGF; otras semaforinas de clase 3 pueden controlar la morfogénesis vascular más bien a través de la inhibición de la señalización de intergrina (Moriya *et al.*, 2007; Acevedo *et al.*, 2008).

40 Además, los inventores también detectaron varios miembros de las vías señalización de efrina, - por ejemplo, el receptor de efrina, EPHA3, y proteínas auxiliares implicadas en la señalización de efrina, quinasa KALJRJN de NGEF y RhoGEF, - que median el colapso de los conos en crecimiento y la repulsión en el sistema nervioso durante el desarrollo y desempeñan un papel importante en la plasticidad sináptica en el SNC adulto (Winning *et al.*, 2002; Noren y Pasquale, 2004).

45 Además, los inventores identificaron un módulo funcional compacto que representa la ruta de señalización de Slit/Robo, que participa de forma simultánea en la repulsión de los axones y la ramificación del receptor de guía del axón ROBO2 de circunvalación, su ligando SLIT1 y su diana cadena abajo de la proteína 3 de activación de Slit/Robo Rho GTPasa (Brose y Tessier-Lavigne, 2000).

55

La regulación del crecimiento y guía del axón por netrinas, slits, semaforinas y proteínas efrinas se ejecuta a través de interacciones combinatorias, complejas de sus receptores afines que integran la información de diferentes familias de las señales de orientación. Por ejemplo, los ligandos de Slit inducen la unión directa de los receptores Robo a DCC, y por lo tanto silencian la respuesta de la orientación de DCC a netrinas (Stein y Tessier-Lavigne, 2001). Se demostró que el ensamblaje combinatorio de los receptores de semaforina modifica su especificidad y afinidad a ligandos disponibles. Por otra parte, la acción combinatoria de los receptores de guía de los axones en complejos de señalización puede incluso cambiar la polaridad de una respuesta de guía de atracción a repulsión, tal como se demostró en el caso de la señalización de netrina, en la que la dimerización del receptor de DCC con el receptor UNC5C convierte en repulsión la atracción del cono de crecimiento inducido por netrina mediada por DCC (Hong *et al.*, 1999).

Estos ejemplos demuestran claramente que las rutas de señalización reveladas por la búsqueda y enfoque de procesamiento de datos de los inventores no están simplemente combinadas de forma mecánica en el mismo grupo funcional, sino que en realidad forman una red funcional integrada, en la que los módulos de señalización dirigen de manera cooperativa el crecimiento y la guía del proceso del axón.

### 15 Red funcional que controla la angiogénesis

La angiogénesis desempeña un papel fundamental asegurando la homeostasis tisular y en respuestas de adaptación al entorno y estimulaciones fisiológicas tales como hipoxia o curación de heridas; su disfunción contribuye a la patogénesis de patologías numerosas y heterogéneas que varían de complicaciones cardiovasculares a crecimiento y metástasis tumoral.

Aunque tradicionalmente la enfermedad de Alzheimer se considera como una afección neurodegenerativa acompañada de patología vascular colateral, los datos de los inventores permiten volver a evaluar el impacto patogénico de la desregulación vascular y atribuir un papel importante, probablemente causal para las rutas angiogénicas en la etiología de la enfermedad de Alzheimer, comparable con el papel desempeñado por la disfunción de la señalización neuronal. Los inventores encontraron que algunos genes que regulan la angiogénesis están extremadamente enriquecidos en redes de señalización implicadas en la enfermedad de Alzheimer: esta conclusión exige no solamente una revisión de los enfoques tradicionales para prevención y curación de la enfermedad de Alzheimer, sino que también proporciona nuevas directrices para selección de biomarcadores relevantes para el control detallado del inicio y la progresión de este trastorno neurodegenerativo complejo.

Por ejemplo, los inventores identificaron el gen CD44 que codifica un receptor para el ácido hialurónico (HA), cuyos productos de degradación estimulan la angiogénesis (West *et al.*, 1985). Este receptor estaba implicado en la organización y/o estabilización de la formación de endotelios o vasos recién formados (Cao *et al.*, 2006). El receptor de CD44 también se une y regula la actividad de proteínas tales como osteopontina, colágenos, y metaloproteinasas de la matriz (MMP) implicadas en la dinámica de la matriz extracelular, que por último acompaña a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Sottile, 2004).

Otros receptores de membrana, implicados en el control del angiogénesis e identificados mediante enfoque de búsqueda y procesamiento de datos, incluyen IL20R $\alpha$ , receptor LEPTR de leptina, receptor EDNRA de endotelina y receptor de VEGFR1/FLT1, así como un ligando funcional para el receptor Tie-2 (proteína ANGPT2) que influye en la remodelación vascular (Fiedler *et al.*, 2003). El gen IL20R $\alpha$  codifica un receptor para IL20, una citoquina pleiotrópica implicada en la formación de tubos vasculares (Hsieh *et al.*, 2006). La leptina, una hormona endocrina y ligando para LEPTR, estimula la angiogénesis de manera sinérgica con el factor de crecimiento de fibroblastos, FGF-2, y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los dos factores angiogénicos más potentes y expresados en todas partes. Además, está implicado en el aumento de la permeabilidad vascular (Cao *et al.*, 2001). La endotelina-1, un ligando para el receptor EDNRA, desempeña un papel principal en la proliferación y la angiogénesis tumoral de diversos tipos de cáncer. NRP1 y NRP2 son correceptores transmembrana no solamente para las semaforinas, sino también para factores de crecimiento de VEGF y modulan la activación de la señalización de VEGFR-2, que asegura el desarrollo del angiogénesis (Ferrara *et al.*, 2003). La angiopoyetina-1 (ANGPTA) y la angiopoyetina-2 (ANGPT2) se han identificado como reguladores maestros con diferentes funciones efectuadas en el ensamblaje vascular. Se sabe que todas estas rutas de señalización están estrechamente integradas en la red funcional global que regula diferentes aspectos de la biología de células endoteliales.

Además, los inventores también seleccionaron un grupo de genes (THBS2, LAMA1, COL4A2, ADAMTS12 y ADAM10) implicados en la organización y la remodelación de la matriz extracelular, una etapa obligatoria en la remodelación de la formación de patrones vasculares, o en el procesamiento funcional (TLL2) de moduladores angiogénicos bien conocidos tales como prolactina, hormona de crecimiento, y lactógeno placentario (Sottile, 2004; Ge *et al.*, 2007).

Por último, los inventores también identificaron un gran número de genes, implicados en el metabolismo de LPA/S1P o modulados por la señalización de LPA/S1P (MTR, MAT2B, CUBN, ATP10A, THEM2, PITPNC1, ENPPG, SGPP2, AGPAT, DGKH, DGKB, MGST2, PLD2, y DRD2). El ácido fosfatídico (PA), ácido lisofosfatídico (LPA), y esfingosina 1-fosfato (S1P) son fosfolípidos naturales que poseen propiedades de señalización potentes. En particular, estos factores de crecimiento de fosfolípido presentan efectos divergentes en el potencial angiogénico de las células

endoteliales y podría - de manera combinada, complementaria - inducir de forma eficaz la neovascularización. Por ejemplo, la SIP está implicada principalmente en el ascenso de la migración quimiotáctica de células endoteliales, aunque el LPA está más implicado en la estabilización de la función de la barrera monocapa endotelial en estadios tardíos de la angiogénesis (English *et al.*, 1999). El LPA podría influir en la angiogénesis ya sea mediante la modulación de la actividad de la RhoA GTPasa o mediante el aumento de la expresión de varios factores angiogénicos - VEGF, PDGFB e IL-8 (Park *et al.*, 2007). Además de esta estrecha implicación en la angiogénesis, el LPA también se reconoce como un lípido extracelular de señalización que provoca el colapso del cono de crecimiento de neuritas e influye en la migración de neuronas postmitóticas tempranas durante el desarrollo (Fukushima *et al.*, 2002).

Una vez más, al igual que en el caso de la señalización del crecimiento/guía de axones, estos factores individuales pro- o anti-angiogénicos, revelados por la ruta de búsqueda y procesamiento de datos, se integran en una única red de rutas funcionales que gobierna de forma cooperativa el desarrollo del sistema vascular.

#### Clases biomarcadores de AD relevantes

Los ejemplos dados demuestran claramente que la descripción de las redes funcionales, asociadas con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, proporciona claras directrices para una selección racional y priorización de biomarcadores individuales o sus combinaciones para estudios de validación experimentales. Por ejemplo, como se pone en evidencia con los datos de los inventores, algunos receptores del crecimiento de axón o algunos receptores que controlan diferentes estadios de la angiogénesis, o sus ligandos, o que albergan dominios extracelulares de estos receptores generados por metaloproteinasas o a través de proteólisis intramembranosa regulada, o metabolitos de rutas bioquímicas de LPA/SIP representan biomarcadores funcionarios relevantes que permiten un control preciso y objetivo de estadios consecutivos del inicio y desarrollo de la AD.

Los inventores presentan 3 listados de biomarcadores relevantes para AD preferentes. La 1ª clase de biomarcadores comprende genes, organizados en rutas titulares que están asociados con el inicio o la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Las parejas funcionales de estos genes se revelaron mediante la búsqueda manual de datos experimentales disponibles y mediante formación de perfiles de expresión pangenómica o estudios de interacción de proteínas y constituyen la 2ª clase de biomarcadores. Por último, la 3ª clase de marcadores relevantes para AD contiene parejas de genes potenciales de la 1ª clase, descritos formación de perfiles de expresión pangenómica o estudios de interacción de proteínas y seleccionados adicionalmente por su capacidad para ser detectados en células sanguíneas y otros biofluidos.

#### Clase 1 - Genes asociados con el inicio o la progresión de AD (tabla 1):

ABAT (EG:18), ABCA1 (EG:19), ABCC4 (EG:10257), ABCC9 (EG:10060), ACADSB (EG:36), ACC2 / ACACB (EG:32), ACCN1 (EG:40), ACCN2 (EG:41), ACOT11 (EG:26027), ACOT7 (EG:11332), ACOXL (EG:55289), ACYP2 (EG:98), ADAM12 (EG:8038), ADAMTS12 (EG:81792), ADARB2 (EG:105), ADCY2 (EG:108), ADH5 (EG:128), ADRA1A (EG:148), AGPAT5 (EG:55326), AGPAT7 (EG:254531), AKAP11 (EG:11215), AKAP13 (EG:11214), AKAP2 (EG:11217), ALCAM (EG:214), ALK (EG:238), ALX4 (EG:60529), ANG2 / ANGPT2 (EG:285), ANK1 (EG:286), ANKS1A (EG:23294), ANXA1 (EG:301), ANXA3 (EG:306), APBA1 (EG:320), APBA2BP / NECAB3 (EG:63941), APBA3 (EG:9546), APBB1 (EG:322), APPBP2 (EG:10513), ARHGAP10 (EG:79658), ARHGAP17 (EG:55U4), ARHGAP18 (EG:93663), ARHGAP22 (EG:58504), ARHGAP26 (EG:23092), ARNT2 (EG:9915), ASAH1 (EG:427), ATF3 (EG:467), ATF7 (EG:11016), ATG10 (EG:83734), ATG5 (EG:9474), ATG7 (EG:10533), ATIC (EG:471), ATP10A (EG:57194), ATP10B (EG:23120), ATP10D (EG:57205), ATP2A3 (EG:489), ATP2B1 (EG:490), ATP2B2 -EG:491), ATP6V1C1 (EG:528), ATP7B (EG:540), ATR (EG:545), ATXN1 (EG:6310), AUH (EG:549), B3GNTL1 (EG:146712), BAB (EG:577), BAP1 (EG:8314), BCL2 (EG:596), BCL2L14 (EG:79370), BCL3 (EG:602), BDH2 (EG:56898), BDNF (EG:627), BIN1 (EG:274), BMP3A (EG:651), BRE (EG:9577), BR13BP (EG:140707), BR1P1 (EG:83990), CA10 (EG:56934), CACNA1C (EG:775), CACNA1D (EG:776), CACNA1E (EG:777), CACNA2D1 (EG:781), CACNA2D3 (EG:55799), CACNA2D4 (EG:93589), CACNB2 (EG:783), CADPS2 (EG:93664), CALCB (EG:797), CALCR (EG:799), CALN1 (EG:83698), CAMK1D (EG:57118), CAMK2D (EG:817), CAMK4 (EG:814), CAMKK2 (EG:10645), CAST1 (EG:26059), CD44 (EG:960), CDC42EP3 (EG:10602), CDH10 (EG:1008), CDH12 (EG:1010), CDH13 (EG:1012), CDH18 (EG:1016), CDH22 (EG:64405), CDH4 (EG:1002), CDH5 (EG:1003), CDH8 (EG:1006), CDH9 (EG:1007), CDK5RAP2 (EG:55755), CDK6 (EG:1021), CDKAL1 (EG:54901), CDON (EG:50937), CHL1 (EG:10752), CHMP5 (EG:51510), CHRM2 (EG:1129), CITRON (EG:11113), CLTC (EG:1213), CNGB3 (EG:54714), CNTFR (EG:1271), CNTN4 (EG:152330), COL3A1 (EG:1281), COL4A2 (EG:1284), COL4A3BP (EG:10087), COLEC12 (EG:81035), COMMD1 (EG:150684), COMMD10 (EG:51397), COPS7A (EG:50813), COPS7B (EG:64708), CS (EG:1431), CSH1 (EG:1442), CSMD1 (EG:64478), CST5 (EG:1473), CTNNA2 (EG:1496), CTNND2 (EG:1501), CUBN (EG:8029), CUGBP2 (EG:10659), CYP11A1 (EG:1583), CYP19A1 (EG:1588), CYP1B1 (EG:1545), CYP7B1 (EG:9420), DAAM1 (EG:23002), DAB1 (EG:1600), DAPK1 (EG:1612), DAPK2 (EG:23604), DBC1 (EG:1620), DBT (EG:1629), DCC (EG:1630), DEPDC2 (EG:80243), DGKB (EG:1607), DGKE (EG:8526), DGKG (EG:1608), DGKH (EG:160851), DHCR7 (EG:1717), DISC1 (EG:27185), DLD (EG:1738), DLG2 (EG:1740), DLGAP1 (EG:9229), DNAJB11 (EG:51726), DNER (EG:92737), DNM3 (EG:26052), DOCK2 (EG:1794), DOCK4 (EG:9732), DOCK9 (EG:23348), DPP6 (EG:1804), DRD2 (EG:1813), EDNRA (EG:1909), EFNA5 (EG:1946), EGFR (EG:1956), EHHADH (EG:1962), ELAVL2 (EG:1993), EML1 (EG:2009), ENAH (EG:55740), ENPP2/ autotaxina (EG:5168), ENPP6 (EG:133121), ENPP7 (EG:339221), EPB41L2 (EG:2037), EPHA10 (EG:284656), EPHA3

(EG:2042), EPHA6 (EG:285220), ERBB4 (EG:2066), ETFA (EG:2108), EYA2 (EG:2139), F13A1 (EG:2162), FABP5 (EG:2171), FBLN2 (EG:2199), FBXW8 (EG:26259), FER1L3 (EG:26509), FGF12 (EG:2257), FGF14 (EG:2259), FGF5 (EG:2250), FHIT (EG:2272), FLNB (EG:2317), FMN1 (EG:342184), FOXO3A (EG:2309), FREQ (EG:23413), FRS2 (EG:10818), FSTL5 (EG:56884), FTO (EG:79068), FZD3 (EG:7976), GAB2 (EG:9846), GABBR2 (EG:9568),  
5 GABRA2 (EG:2555), GABRB2 (EG:2561), GABRB3 (EG:2562), GABRG3 (EG:2567), GATA3 (EG:2625), GDF10 (EG:2662), GDF2 (EG:2658), G1PC2 (EG:54810), GL12 (EG:2736), GLRA1 (EG:2741), GLRX (EG:2745), GLUD1 (EG:2746), GNG12 (EG:55970), GNPTAB (EG:79158), GPC5 (EG:2262), GPC6 (EG:10082), GRIA4 (EG:2893), GRID1 (EG:2894), GRID2 (EG:2895), GRIK1 (EG:2897), GRIK2 (EG:2898), GRIK3 (EG:2899), GRIK4 (EG:2900), GRIN2B (EG:2904), GRM7 (EG:2917), GRM8 (EG:2918), GUCY1B2 (EG:2974), GULP1 (EG:51454), HAPLN1  
10 (EG:1404), HAS2 (EG:3037), HBG2 (EG:3048), HCRTR2 (EG:3062), HECW1 (EG:23072), HEY2 (EG:23493), HIF1A (EG:3091), HIPK1 (EG:204851), HIPK2 (EG:28996), HIVEP2 (EG:3097), HK2 (EG:3099), HMBBOX1 (EG:79618), HMOX1 (EG:3162), HPSE2 (EG:60495), HRG (EG:3273), HSD17B12 (EG:5U44), HTR1A (EG:3350), IDE (EG:3416), IGF1R (EG:3480), IGF2BP1 (EG:10642), IL18R1 (EG:8809), IL20RA (EG:53832), IL20RB (EG:53833), INPP4A (EG:3NG12), 1INPP4B (EG:8821), INSR (EG:3643), IPPK (EG:64768), IQGAP2 (EG:10788), ITGA1 (EG:3672), ITGA11 (EG:22801), ITGA9 (EG:3680), ITPR1 (EG:3708), ITPR2 (EG:3709), JAK1 (EG:3716), JARID1B  
15 (EG:10765), KALIRIN / KALRN (EG:8997), KCND2 (EG:3751), KCNJ6 (EG:3763), KCNMA1 (EG:3778), KREMEN1 (EG:83999), KTN1 (EG:3895), KYNU (EG:8942), LAMA1 (EG:284217), LAMA3 (EG:3909), LEPR (EG:3953), LETMD1 (EG:25875), LIPL3 / LIPM (EG:340654), LPHN2 (EG:23266), LRP1 (EG:4035), LTBP1 (EG:4052), LTBP2 (EG:4053), MAD1L1 (EG:8379), MAML3 (EG:55534), MAP2 (EG:4133), MAT2B (EG:27430), MBNL2 (EG:10150), MCC1 (EG:4163), MCPH1 (EG:79648), MDM1 (EG:56890), ME1 (EG:4199), ME2 (EG:4200), MGLL (EG:11343), MGST2 (EG:4258), MMP10 (EG:4319), MMP7 (EG:4316), MSR1 (EG:4481), MTOR (EG:2475), MTR (EG:4548), MTRR (EG:4552), MYO10 (EG:4651), NAALAD2 (EG:10003), NAV1 (EG:89796), NBEA (EG:26960), NCK1 (EG:4690), NCK2 (EG:8440), NCOA1 (EG:8648), NEDD4 (EG:4734), NEDD9 (EG:4739), NFATC2 (EG:4773), NFKB1 (EG:4790), NFYB (EG:4801), NGEF (EG:25791), NISCH (EG:11188), NLGN1 (EG:22871), NOG (EG:9241),  
25 NOS1AP (EG:9722), NOX3 (EG:50508), NPCC (EG:4880), NR3C2 (EG:4306), NRCAM (EG:4897), NRG1 (EG:3084), NRG3 (EG:10718), NRG4 (EG:145957), NRIP1 (EG:8204), NRP1 (EG:8829), NRP2 (EG:8828), NRXN1 (EG:9378), NRXN3 (EG:9369), NUDT1 (EG:4521), NUDT13 (EG:25961), NUDT3 (EG:11165), ODZ2 (EG:57451), OGDH (EG:4967), OPCML (EG:4978), OPRM1 (EG:4988), OSBPL10 (EG:114884), OSBPL3 (EG:26031), OSTN (EG:344901), P2RX4 (EG:5025), P2RY12 (EG:64805), PAFAH2 (EG:5051), PAK6 (EG:56924), PAK7 (EG:57144),  
30 PALLD (EG:23022), PARK2 (EG:5071), PARVA (EG:55742), PC (EG:5091), PCDH9 (EG:5101), PCLO (EG:27445), PCSK5 (EG:5125), PDE11A (EG:50940), PDE1A (EG:5136), PDE3A (EG:5139), PDE4D (EG:5144), PDE6D (EG:5147), PDGFC (EG:56034), PFKP (EG:5214), PICALM (EG:830), PIK3C2G (EG:5288), PIK3C3 (EG:5289), PIP5K2A (EG:5305), PISD (EG:23761), PITPNC1 (EG:26207), PLA2R1 (EG:22925), PLCB1 (EG:23236), PLCL1 (EG:5334), PLD2 (EG:5338), PLEKHA6 (EG:22874), PLXDC2 (EG:84898), PLXNA2 (EG:5362), PML (EG:5371), PPF1A2 (EG:8499), PPFIBP1 (EG:8496), PPFIBP2 (EG:8495), PPM1D (EG:8493), PPM1E (EG:22843), PPP1R12A (EG:4659), PRIMA1 (EG:145270), PRKD3 (EG:23683), PRKG1 (EG:5592), PRLR (EG:5618), PRNP (EG:5621), PSAP (EG:5660), PSD3 (EG:23362), PTK2 (EG:5747), PTN (EG:5764), PTPRG (EG:5793), PTPRM (EG:5797), PVRL1 (EG:5818), RAB3B (EG:5865), RALA (EG:5898), RALBP1 (EG:10928), RASGRF2 (EG:5924), RBBP8 (EG:5932), RGS8 (EG:85397), RIMS1 (EG:22999), RIMS2 (EG:9699), ROBO1 (EG:6091), ROBO2 (EG:6092),  
40 ROR1 (EG:4919), ROR2 (EG:4920), RPH3AL (EG:9501), RPS6KA2 (EG:6196), RPS6KA5 (EG:9252), RPS6KB1 (EG:6198), RPSA (EG:3921), RTN1 (EG:6252), RUNX2 (EG:860), RYR2 (EG:6262), SCAP2 (EG:8935), SCARF2 (EG:91179), SCGB1A1 (EG:7356), SCHIP1 (EG:29970), SCN11A (EG:11280), SCN9A (EG:6335), SDHA (EG:6389), SDK1 (EG:221935), SEC24D (EG:9871), SEMA3A (EG:10371), SEMA3C (EG:10512), SEMA3E (EG:9723), SEMA5A (EG:9037), SEMA7A (EG:8482), SERPINA6 (EG:866), SERPINC1 (EG:462), SFRP4 (EG:6424), SGMS1 (EG:259230), SGPP2 (EG:130367), SH3BP5 (EG:9467), SHMT1 (EG:6470), SIL1 (EG:64374), SLC12A6 (EG:9990), SLC1A1 (EG:6505), SLC1A2 (EG:6506), SLC1A3 (EG:6507), SLC1A4 (EG:6509), SLC22A4 (EG:6583), SLC24A3 (EG:57419), SLC25A21 (EG:89874), SLC6A1 (EG:6529), SLC6A18 (EG:348932), SLC6A20 (EG:54716), SLC6A7 (EG:6534), SLC8A1 (EG:6546), SLIT 1 (EG:6585), SMAD4 (EG:4089), SMYD3 (EG:64754), SNCA (EG:6622), SNCAIP (EG:9627), SND1 (EG:27044), SNPH (EG:9751), SNX9 (EG:51429), SOCS1 (EG:8651),  
50 SORBS1 (EG:10580), SORBS2 (EG:8470), SORCS1 (EG:114815), SORCS2 (EG:57537), SOX5 (EG:6660), SOX9 (EG:6662), SPOCK1 (EG:6695), SPOCK3 (EG:50859), SQSTM1 (EG:8878), SRD5A1 (EG:6715), SRGAP3 (EG:9901), ST14 (EG:6768), STAB2 (EG:55576), STAT3 (EG:6774), STX2 (EG:2054), STXBP6 (EG:29091), SV2B (EG:9899), SV2C (EG:22987), SYN3 (EG:8224), SYT12 (EG:91683), SYT2 (EG:127833), TBXAS1 (EG:6916), TFCP2 (EG:7024), TGFBAP1 (EG:9392), THBS2 (EG:7058), THEM2 (EG:55856), TLL2 (EG:7093), TNFAIP3 (EG:7128), TNFRSF11B (EG:4982), TRIO (EG:7204), TRKB / NTRK2 (EG:4915), TRPM3 (EG:80036), TRPS1 (EG:7227), UBE3A (EG:7337), ULK4 (EG:54986), UNC13C (EG:440279), UNC5C (EG:8633), VAMP5 (EG:10791), VANGL2 (EG:57216), VAV3 (EG:10451), VDAC2 (EG:7417), VEGFR1 / FLT1 (EG:2321), VEGFR2 (EG:3791), VIL2 (EG:7430), VPS13B (EG:157680), WASPIP / WIPF1 (EG:7456), WIF1 (EG:11197), WWOX (EG:51741), YES1 (EG:7525), ZFH1B (EG:9839).

60 Clase 2 - Genes funcionales asociados (tabla 2):

ABL1 (EG:25), A2M (EG:2), AB11 (EG:10006), ACAT1 (EG:38), ACHE (EG:43), ACTN1 (EG:87), ACTN2 (EG:88), ACTN3 (EG:89), ACTN4 (EG:81), ADAM10 (EG:102), ADAM17 (EG:6868), ADAM9 (EG:8754), AD1POQ (EG:9370), ADIPOR1 (EG:51094), ADIPOR2 (EG:79602), ADORA2B (EG:136), ADRB2 (EG:154), ADRBK1 (EG:156), AKR1C2 (EG:1646), AKT1 (EG:207), ALDH2 (EG:217), ALOX12 (EG:239), ANKRA2 (EG:57763), APH1A (EG:51107), APH1B

(EG:83464), APOA1 (EG:335), APOE (EG:348), APP (EG:351), ARHGEF11 (EG:9826), ARHGEF12 (EG:23365), ATG12 (EG:9140), ATM (EG:472), ATP1A1 (EG:476), BACE1 (EG:23621), BACE2 (EG:25825), BAD (EG:572), BAK (EG:578), BAX (EG:581), BCAR1 (EG:9564), BECN1 (EG:8678), BGLAP (EG:632), BMP2 (EG:650), BRCA1 (EG:672), BSN (EG:8927), CALM1 (EG:801), CASK (EG:8573), CASP3 (EG:836), CASP8 (EG:841), CASR (EG:846), CBL (EG:867), CCNE1 (EG:898), CD36 (EG:948), CDC2 (EG:983), CDC42 (EG:998), CDC42BPB (EG:9578), CDH1 (EG:999), CDH2 (EG:1000), CDK5 (EG:1020), CDKN1A (EG:1026), CHAT (EG:1103), CHEK1 (EG:1111), CHRM1 (EG:1128), CHRM3 (EG:1131), CHRM4 (EG:1132), CHRM5 (EG:1133), CLTA (EG:12U), CLTB (EG:1212), COL18A1 (EG:80781), CPT1A (EG:1374), CPT1B (EG:1375), CREB1 (EG:1385), CRMP1 (EG:1400), CSF1 (EG:1435), CSNK1A1 (EG:1452), CTNN (EG:2017), CTNNB1 (EG:1499), CTTN (EG:2017), CUL1 (EG:8454), CYSLTR1 (EG:10800), CYSLTR2 (EG:57105), DGKZ (EG:8525), DHFR (EG:1719), DLG3 (EG:1741), DLG4 (EG:1742), DLGAP2 (EG:9228), DLGAP3 (EG:58512), DLGAP4 (EG:22839), DNAJB9 (EG:4189), DNM1 (EG:1759), DOCK3 (EG:1795), DRD5 (EG:1816), DVL1 (EG:1855), EDG1 (EG:1901), EDG2 (EG:1902), EDG3 (EG:1903), EDG4 (EG:1910), EDG5 (EG:1929), EDG6 (EG:8698), EDG7 (EG:23566), EDG8 (EG:53637), EDN1 (EG:1906), EDNRB (EG:1910), EFNA1 (EG:1942), EFNA2 (EG:1943), EFNA3 (EG:1944), EFNA4 (EG:1945), EFNB1 (EG:1947), EFNB2 (EG:1948), EFNB3 (EG:1949), EGF (EG:1950), EIF4E (EG:1977), EIF4EBP1 (EG:1978), EPHA1 (EG:2041), EPHA2 (EG:1969), EPHA4 (EG:2043), EPHA5 (EG:2044), EPHA7 (EG:2045), EPHA8 (EG:2046), EPHB1 (EG:2047), EPHB2 (EG:2048), EPHB3 (EG:2049), EPHB4 (EG:2050), EPHB6 (EG:2051), ERC1 (EG:23085), ERC2 (EG:26059), ESRRG (EG:2104), EZR (EG:7430), F2 (EG:2147), F2R (EG:2149), F3 (EG:2152), FAS (EG:355), FDPS (EG:2224), FES (EG:2242), FGF2 (EG:2247), FGF4 (EG:2249), FGFR1 (EG:2260), FKBP1A (EG:2280), FKBP1B (EG:2281), FLNA (EG:2316), FOXO1 (EG:2308), FRAP1 (EG:2475), fusión de IL16 (EG:3603) con dominio PDZ, FYN (EG:2534), FZD2 (EG:2535), GADD45A (EG:1647), GADD45B (EG:4616), GADD45G (EG:10912), GDNF (EG:2668), GFRA1 (EG:2674), GFRA2 (EG:2675), GFRA3 (EG:2676), GFRA4 (EG:64096), GH1 (EG:2688), GNA12 (EG:2768), GNA13 (EG:10672), GNA11 (EG:2770), GNA12 (EG:2771), GNA13 (EG:2773), GNB2L1 (EG:10399), GOPC (EG:57120), GPR37 (EG:2861), GRIA2 (EG:2891), GRIA3 (EG:2892), GR1N3A (EG:116443), GRIP1 (EG:23426), GRIP2 (EG:80852), GRK4 (EG:2868), GRK5 (EG:2869), GRM3 (EG:2913), GRM5 (EG:2915), GRM6 (EG:2916), GSK3B (EG:2932), GUCY2C (EG:2984), GUCY2D (EG:3000), GUCY2E (EG:390226), GUCY2F (EG:2986), GUCY2G (EG:390003), HGF (EG:3082), HOMER1 (EG:9456), HOXD13 (EG:3239), HSD11B1 (EG:3290), HSP90B1 (EG:7184), HSPA4L (EG:22824), HSPA5 (EG:3309), HTR1B (EG:3351), HTR1D (EG:3352), HYAL1 (EG:3373), HYAL2 (EG:8692), HYAL3 (EG:8372), HYAL4 (EG:23553), HYOU1 (EG:10525), IGF2 (EG:3481), IL16 (EG:3603), IL20 (EG:50604), IL6ST (EG:3572), IL8 (EG:3576), IMPDH1 (EG:3614), IMPDH2 (EG:3615), INS (EG:3630), IQGAP1 (EG:8826), IQUB (EG:154865), IRF1 (EG:3659), ITCH (EG:83737), ITGA6 (EG:3655), ITGB1 (EG:3688), KCNA2 (EG:3737), KCNIP1 (EG:30820), KCNIP2 (EG:30819), KCNJ11 (EG:3767), KCNJ12 (EG:3768), KCNJ8 (EG:3764), KCNMB1 (EG:3779), LDLR (EG:3949), LEP (EG:3952), LIFR (EG:3977), LIN7A (EG:8825), LIN7B (EG:64130), LIN7C (EG:55327), LPIN1 (EG:23175), LPIN2 (EG:9663), LPIN3 (EG:64900), LRP2 (EG:4036), LRP6 (EG:4040), LRP8 (EG:7804), LYN (EG:4067), MAOA (EG:4128), MAOB (EG:4129), MAPK1 (EG:5594), MAPK12 (EG:6300), MAPK3 (EG:5595), MAPK8 (EG:5599), MAPT (EG:4137), MET (EG:4233), MLH1 (EG:4292), MLLT4 (EG:4301), MME (EG:4311), MMP2 (EG:4313), MMP3 (EG:4314), MMP9 (EG:4318), MSN (EG:4478), MUC1 (EG:4582), MYCBP2 (EG:23077), MYL1 (EG:4632), NCAM1 (EG:4684), NCF2 (EG:4688), NCSTN (EG:23385), NF2 (EG:4771), NGF (EG:4803), NGFR (EG:4804), NOS1 (EG:4842), NOS3 (EG:4846), NOTCH1 (EG:4851), NOTCH2 (EG:4853), NOTCH3 (EG:4854), NOVA1 (EG:4857), NOX1 (EG:27035), NOX4 (EG:50507), NPPA (EG:4878), NPPB (EG:4879), NR1I2 (EG:8856), NR3C1 (EG:2908), NRAS (EG:4893), NTF3 (EG:4908), NTN1 (EG:9423), NTN2L (EG:4917), NTN3 (EG:4917), OPRK1 (EG:4986), OPRS1 (EG:10280), P2RY1 (EG:5028), PAK1 (EG:5058), PCAF (EG:8850), PCTP (EG:58488), PDE5A (EG:8654), PDGFA (EG:5154), PDGFB (EG:5155), PDGFRA (EG:5156), PDGFRB (EG:5159), PIAS1 (EG:8554), PICK1 (EG:9463), PIK3CA (EG:5290), PIK3CB (EG:5291), PIK3R1 (EG:5295), PIK3R4 (EG:30849), PIP5K1A (EG:8394), PIP5K1B (EG:8395), PLA2G1B (EG:5319), PLA2G2A (EG:5320), PLA2G4A (EG:5321), PLA2G5 (EG:5322), PLA2G6 (EG:8398), PLAT (EG:5327), PLAU (EG:5328), PLD1 (EG:5337), PLG (EG:5340), PLN (EG:5350), PPAP2A (EG:8611), PPAP2B (EG:8613), PPAP2C (EG:8612), PPARA (EG:5465), PPARG (EG:5468), PPARGC1B (EG:133522), PPP1CA (EG:5499), PPP3CA (EG:5530), PPP3CB (EG:5532), PPP3CC (EG:5533), PRKAA1 (EG:5562), PRKAA2 (EG:5563), PRKAB1 (EG:5564), PRKAB2 (EG:5565), PRKACA (EG:5566), PRKACB (EG:5567), PRKAG1 (EG:5571), PRKCA (EG:5578), PRKCD (EG:5580), PRL (EG:5617), PSEN1 (EG:5663), PSEN2 (EG:5664), PSENE1 (EG:55851), PTGS2 (EG:5743), PTK2B (EG:2185), PTPN11 (EG:5781), PTPRF (EG:5792), PXN (EG:5829), RAC1 (EG:5879), RAP1A (EG:5906), RAP1B (EG:5908), RBPJ (EG:3516), RDX (EG:5962), RELN (EG:5649), RET (EG:5979), RGNEF (EG:64283), RHEB (EG:6009), RHOA (EG:387), RHOG (EG:391), ROCK1 (EG:6093), ROCK2 (EG:9475), RPH3A (EG:22895), RPS6KA1 (EG:6195), RPS6KB2 (EG:6199), RPTOR (EG:57521), RYR3 (EG:6263), SCARB1 (EG:949), SCN1A (EG:6323), SCN1B (EG:6324), SEMA3F (EG:6405), SEMA4A (EG:64218), SEMA4B (EG:10509), SEMA4C (EG:54910), SEMA5B (EG:54437), SEMA6B (EG:10501), SEMA6C (EG:10500), SERPINA5 (EG:5104), SERPINB2 (EG:5055), SERPIND1 (EG:3053), SERPINE1 (EG:5054), SERPINE2 (EG:5270), SH3GL2 (EG:6456), SHH (EG:6469), S1AH1 (EG:6477), SLC8A2 (EG:6543), SLC9A1 (EG:6548), SLC9A3R1 (EG:9368), SLC9A3R2 (EG:9351), SLN (EG:6588), SMAD3 (EG:4088), SMAD5 (EG:4090), SNAP25 (EG:6616), SOX6 (EG:55553), SPP1 (EG:6696), SRC (EG:6714), SREBF1 (EG:6720), SREBF2 (EG:6721), STAR (EG:6770), STAT5A (EG:6776), STAT5B (EG:6777), STK11 (EG:6794), STX1A (EG:6804), STXBP1 (EG:6812), SUMO1 (EG:7341), SYNJ1 (EG:8867), SYNJ2 (EG:8871), SYTL4 (EG:94121), TBR1 (EG:10716), TGFB1 (EG:7040), TGFB1 (EG:7046), TGFB2 (EG:7048), TGFB3 (EG:7049), THBS1 (EG:7057), THRA (EG:7067), THRB (EG:7068), TIAM1 (EG:7074), TIMP2 (EG:7077), TNF (EG:7124), TNFRSF11A (EG:8792), TNFRSF21 (EG:27242), TNFSF11 (EG:8600), TP53 (EG:7157), TP63 (EG:8626), TRAF6 (EG:7189), TRPC3 (EG:7222), TRPC4 (EG:7223), TRPC5 (EG:7224), TSC1

(EG:7248), TSC2 (EG:7249), TSPO (EG:706), UBE2A (EG:7319), UNC13B (EG:10497), VAMP2 (EG:6844), VCL (EG:7414), VDR (EG:7421), VEGFA (EG:7422), VEGFB (EG:7423), VEGFC (EG:7424), VEZF1 (EG:7716), WASF1 (EG:8936), WNT1 (EG:7471), WNT5A (EG:7474), XDH (EG:7498), YAP1 (EG:10413).

Clase 3 - Parejas potenciales de genes de la clase 1 (tabla 3):

5 A4GALT (EG:53947), ABCB1 (EG:5243), ACACA (EG:31), ACADM (EG:34), ACAT2 (EG:39), ACTB (EG:60), ACTG1 (EG:71), ADAM15 (EG:8751), ADCY1 (EG:107), ADCY5 (EG:111), ADORA1 (EG:134), ADORA2A (EG:135), AGA (EG:175), AHCY (EG:191), AHSG (EG:197), AK2 (EG:204), AKAP3 (EG:10566), AKR1B1 (EG:231), ALB (EG:213), ALDOA (EG:226), ALDOC (EG:230), AMBP (EG:259), AMPD3 (EG:272), AMPH (EG:273), ANGPT1 (EG:284), ANTXR2 (EG:118429), ANXA2 (EG:302), AP1B1 (EG:162), AP1MI (EG:8907), AP2A1 (EG:160), APC (EG:324), APEH (EG:327), APEX1 (EG:328), APLP2 (EG:334), APOA2 (EG:336), APOA4 (EG:337), APOC1 (EG:341), APOC2 (EG:344), APOC3 (EG:345), APOD (EG:347), APRT (EG:353), AQP3 (EG:360), AR (EG:367), ARF1 (EG:375), ARF2 (EG:376), ARF3 (EG:377), ARHGEF1 (EG:9138), ARL3 (EG:403), ARRB1 (EG:408), ARRB2 (EG:409), ARSA (EG:410), ASCC3L1 (EG:23020), ATF4 (EG:468), ATP2A2 (EG:488), ATP2B4 (EG:493), ATP5B (EG:506), ATP5D (EG:513), ATP6V1E1 (EG:529), BAG2 (EG:9532), BAT1 (EG:7919), BBC3 (EG:27113), BCAR3 (EG:8412), BCL2L1 (EG:598), BGN (EG:633), BLMH (EG:642), BTK (EG:695), BTRC (EG:8945), C1QBP (EG:708), C4A (EG:720), CACNA1H (EG:8912), CALM2 (EG:805), CALM3 (EG:808), CAMK1 (EG:8536), CAPZA1 (EG:829), CAPZB (EG:832), CASP7 (EG:840), CASP9 (EG:842), CAV1 (EG:857), CBLB (EG:868), CBR1 (EG:873), CCDC59 (EG:29080), CCNA1 (EG:8900), CCNB1 (EG:891), CCS (EG:9973), CD200 (EG:4345), CD22 (EG:933), CD2AP (EG:23607), CD3E (EG:916), CD4 (EG:920), CD46 (EG:4179), CD47 (EG:961), CD48 (EG:962), CD5 (EG:921), CD59 (EG:966), CD74 (EG:972), CD9 (EG:928), CD93 (EG:22918), CDH11 (EG:1009), CDH15 (EG:1013), CDH3 (EG:1001), CDH6 (EG:1004), CDK4 (EG:1019), CDKN2A (EG:1029), CEBPB (EG:1051), CFB (EG:629), CFD (EG:1675), CFH (EG:3075), CFTR (EG:1080), CHRNA7 (EG:1139), CHUK (EG:1147), CITED1 (EG:4435), CKB (EG:1152), CLIC1 (EG:1192), CL1C4 (EG:25932), CL1C6 (EG:54102), CLU (EG:1191), CNTNAP3 (EG:79937), CNTNAP4 (EG:85445), COL1A1 (EG:1277), COL1A2 (EG:1278), COL4A1 (EG:1282), COMT (EG:1312), COPA (EG:1314), COPB2 (EG:9276), COPE (EG:11316), COPG (EG:22820), CREBBP (EG:1387), CRK (EG:1398), CRKL (EG:1399), CRYZ (EG:1429), CSE1L (EG:1434), CSF1R (EG:1436), CSK (EG:1445), CSNK1D (EG:1453), CSNK1E (EG:1454), CST3 (EG:1471), CTAGE5 (EG:4253), CTGF (EG:1490), CTNNA1 (EG:1495), CUTA (EG:51596), CYCS (EG:54205), DAB2 (EG:1601), DAG1 (EG:1605), DAXX (EG:1616), DCD (EG:117159), DCTN1 (EG:1639), DCUN1D1 (EG:54165), DDEF1 (EG:50807), DDEF2 (EG:8853), DDOST (EG:1650), DDR1 (EG:780), DDX21 (EG:9188), DFFA (EG:1676), DGKD (EG:8527), DLG1 (EG:1739), DMD (EG:1756), DMP1 (EG:1758), DNAJA1 (EG:3301), DNAJA3 (EG:9093), DNAJB2 (EG:3300), DNMT2 (EG:1785), DOCK1 (EG:1793), DOK1 (EG:1796), DPYSL2 (EG:1808), DSP (EG:1832), DUSP3 (EG:1845), DYNLL1 (EG:8655), E2F1 (EG:1869), EEF1A2 (EG:1917), EEF1D (EG:1936), EEF1G (EG:1937), EIF2A (EG:83939), EIF4G1 (EG:1981), ELF1 (EG:1997), ELF3 (EG:1999), EP300 (EG:2033), EPB41 (EG:2035), EPRS (EG:2058), EPS8 (EG:2059), ERBB2 (EG:2064), ERBB21P (EG:55914), ERP29 (EG:10961), ESD (EG:2098), ESR1 (EG:2099), ETS1 (EG:2113), F7 (EG:2155), FADD (EG:8772), FGA (EG:2243), FHL1 (EG:2273), FHL2 (EG:2274), FHOD1 (EG:29109), FLNC (EG:2318), FLOT1 (EG:10211), FLOT2 (EG:2319), FN1 (EG:2335), FOS (EG:2353), FOXM1 (EG:2305), FPR1 (EG:2357), FUBP1 (EG:8880), GAB1 (EG:2549), GABARAPL2 (EG:11345), GANAB (EG:23193), GAPDH (EG:2597), GATA1 (EG:2623), GC (EG:2638), GCLM (EG:2730), GCN1L1 (EG:10985), GD12 (EG:2665), GFI1B (EG:8328), GJB1 (EG:2705), GM2A (EG:2760), GNA11 (EG:2767), GNAQ (EG:2776), GNAS (EG:2778), GNAZ (EG:2781), GNB1 (EG:2782), GNPDA1 (EG:10007), GOLGA4 (EG:2803), GP6 (EG:51206), GPC1 (EG:2817), GPRASP1 (EG:9737), GRAP2 (EG:9402), GRB2 (EG:2885), GRIN1 (EG:2902), GRIN2A (EG:2903), GRM1 (EG:2911), GSN (EG:2934), GSTM3 (EG:2947), GTF21 (EG:2969), HABP2 (EG:3026), HBEGF (EG:1839), HCK (EG:3055), HCLS1 (EG:3059), HDAC1 (EG:3065), HDAC2 (EG:3066), HIST1H1E (EG:3008), HLA-A (EG:3105), HMGA1 (EG:3159), HMGB1 (EG:3146), HMMR (EG:3161), HMOX2 (EG:3163), HNF4A (EG:3172), HNRPF (EG:3185), HNRPH1 (EG:3187), HTSRPM (EG:4670), HPR1 (EG:3251), HPX (EG:3263), HRAS (EG:3265), HSP90AA1 (EG:3320), HSP90AB1 (EG:3326), HSPA1A (EG:3303), HSPA1L (EG:3305), HSPA6 (EG:3310), HSPA8 (EG:3312), HSPB1 (EG:3315), HSPD1 (EG:3329), HSPE1 (EG:3336), HSPG2 (EG:3339), HTR2C (EG:3358), ID2 (EG:3398), IFIH1 (EG:64135), IFNG (EG:3458), IGF1 (EG:3479), IGFBP3 (EG:3486), IGHG1 (EG:3500), IKBKB (EG:3551), IKBKE (EG:9641), 1KBKG (EG:8517), 1L2RA (EG:3559), ILK (EG:3611), INADL (EG:10207), IRF2 (EG:3660), IRS1 (EG:3667), ITGA2 (EG:3673), ITGA3 (EG:3675), ITGA4 (EG:3676), ITGAV (EG:3685), ITGB3 (EG:3690), IT1H1 (EG:3697), ITPR3 (EG:3710), JAK2 (EG:3717), JUP (EG:3728), KCNJ2 (EG:3759), KCTD12 (EG:115207), KIAA0152 (EG:9761), KIAA1217 (EG:56243), KIF13B (EG:23303), KIF17 (EG:57576), KIF5C (EG:3800), KLF3 (EG:51274), KPNA1 (EG:3836), KPNA2 (EG:3838), KPNA3 (EG:3839), KPNA4 (EG:3840), KPNB1 (EG:3837), KRTI (EG:3848), KRT10 (EG:3858), KRT13 (EG:3860), KRT16 (EG:3868), KRT17 (EG:3872), KRT18 (EG:3875), KRT5 (EG:3852), KRT6A (EG:3853), KRT6B (EG:3854), KRT8 (EG:3856), KRT9 (EG:3857), LICAM (EG:3897), LAMA5 (EG:3911), LAT (EG:27040), LCK (EG:3932), LETM1 (EG:3954), LGALS8 (EG:3964), LIMS1 (EG:3987), LOC643751 (EG:643751), LRRFIP2 (EG:9209), LTA4H (EG:4048), LYL1 (EG:4066), LYZ (EG:4069), MADCAM1 (EG:8174), MAML1 (EG:9794), MAP1A (EG:4130), MAP2K2 (EG:5605), MAP3K1 (EG:4214), MAP3K14 (EG:9020), MAP3K3 (EG:4215), MAP3K71P2 (EG:23118), MAP3K8 (EG:1326), MAP4K3 (EG:8491), MAPK10 (EG:5602), MAPK9 (EG:5601), MAPRE1 (EG:22919), MARK2 (EG:2011), MATR3 (EG:9782), MAX (EG:4149), MCF2 (EG:4168), MCM4 (EG:4173), MCM6 (EG:4175), MCM7 (EG:4176), MDH2 (EG:4191), MDM2 (EG:4193), MEP1A (EG:4224), M1CAL1 (EG:64780), MIF (EG:4282), MMP14 (EG:4323), MPG (EG:4350), MRCL3 (EG:10627), MSH2 (EG:4436), MSH6 (EG:2956), MTHFD1 (EG:4522), MTPN (EG:136319), MUC2 (EG:4583), MYB (EG:4602), MYH10 (EG:4628), MYH4 (EG:4622),

MYH9 (EG:4627), MYL4 (EG:4635), MYL6 (EG:4637), NARG1 (EG:80155), NBPF3 (EG:84224), NCF1 (EG:4687),  
 NCKIPSD (EG:51517), NCOA3 (EG:8202), NCOR1 (EG:9611), NCOR2 (EG:9612), NEDD8 (EG:4738), NFKB2  
 (EG:4791), NFKB1A (EG:4792), NFKBIB (EG:4793), NFKBIE (EG:4794), NIDI (EG:4811), NKX3-1 (EG:4824),  
 5 NOTCH4 (EG:4855), NP (EG:4860), NPEPPS (EG:9520), NPR1 (EG:4881), NSF (EG:4905), NTRK3 (EG:4916),  
 NUDC (EG:10726), NUDT5 (EG:11164), OSM (EG:5008), P4HB (EG:5034), PACSIN3 (EG:29763), PAFAH1B1  
 (EG:5048), PAFAH1B2 (EG:5049), PAICS (EG:10606), PAK2 (EG:5062), PAM (EG:5066), PARD3 (EG:56288),  
 PARD6A (EG:50855), PARP1 (EG:142), PAWR (EG:5074), PCBD1 (EG:5092), PCDH1 (EG:5097), PCMT1  
 (EG:5110), PCNA (EG:5111), PDCD10 (EG:11235), PDCD5 (EG:9141), PDCD6IP (EG:10015), PDLIM7 (EG:9260),  
 10 PEA15 (EG:8682), PECAM1 (EG:5175), PEX19 (EG:5824), PF4V1 (EG:5197), PFAS (EG:5198), PFDN2 (EG:5202),  
 PFKM (EG:5213), PGF (EG:5228), PGRMC1 (EG:10857), PHC3 (EG:80012), P1GR (EG:5284), PIK3CD (EG:5293),  
 PIK3CG (EG:5294), PIK3R2 (EG:5296), PIN1 (EG:5300), PKD1 (EG:5310), PKN1 (EG:5585), PKN2 (EG:5586),  
 PLCG1 (EG:5335), PLCG2 (EG:5336), PLTP (EG:5360), PP1B (EG:5479), PPM1B (EG:5495), PPP1R12C  
 (EG:54776), PPP2CB (EG:5516), PPP2R1A (EG:5518), PPP4C (EG:5531), PRKAR2A (EG:5576), PRKAR2B  
 (EG:5577), PRKCB1 (EG:5579), PRKCE (EG:5581), PRKDC (EG:5591), PRSS1 (EG:5644), PRSS3 (EG:5646),  
 15 PSMA1 (EG:5682), PSMA2 (EG:5683), PSMA3 (EG:5684), PSMA6 (EG:5687), PSMA7 (EG:5688), PSMB3  
 (EG:5691), PSMD13 (EG:5719), PSMD14 (EG:10213), PSMD2 (EG:5708), PSMD8 (EG:5714), PTGES3  
 (EG:10728), PTPN1 (EG:5770), PTPN12 (EG:5782), PTPN3 (EG:5774), PTPRA (EG:5786), PTPRC (EG:5788),  
 PTPRD (EG:5789), PTPRS (EG:5802), PUS7 (EG:54517), RAB10 (EG:10890), RAB13 (EG:5872), RAB1B  
 (EG:81876), RAB37 (EG:326624), RAB3A (EG:5864), RAB3C (EG:115827), RAB3D (EG:9545), RAB8A (EG:4218),  
 20 RAD23A (EG:5886), RAF1 (EG:5894), RANBP2 (EG:5903), RANBP9 (EG:10048), RAP2B (EG:5912), RAPGEF1  
 (EG:2889), RARG (EG:5916), RASA1 (EG:5921), RASA2 (EG:5922), RASAL2 (EG:9462), RBBP4 (EG:5928), RELA  
 (EG:5970), RELB (EG:5971), REXO2 (EG:25996), RGS12 (EG:6002), RGS16 (EG:6004), RGS2 (EG:5997), RGS4  
 (EG:5999), RHAG (EG:6005), RHOB (EG:388), RHOC (EG:389), RHOQ (EG:23433), RHPN2 (EG:85415), RIN2  
 (EG:54453), RP4691N24.1 (EG:22981), RPGR (EG:6103), RPL35 (EG:11224), RPS14 (EG:6208), RPS27A  
 25 (EG:6233), RPS3A (EG:6189), RRM1 (EG:6240), RUNX1 (EG:861), RUNX3 (EG:864), RUVBL1 (EG:8607), RUVBL2  
 (EG:10856), RXRA (EG:6256), SAA1 (EG:6288), SACS (EG:26278), SCN5A (EG:6331), SCYE1 (EG:9255), SDC1  
 (EG:6382), SDCBP (EG:6386), SDHB (EG:6390), SEC23B (EG:10483), SEC63 (EG:11231), SELE (EG:6401), SELL  
 (EG:6402), SEPT2 (EG:4735), SEPT5 (EG:5413), SF3B14 (EG:51639), SFN (EG:2810), SFPQ (EG:6421), SGOL2  
 (EG:151246), SH2D1A (EG:4068), SH3BGRL2 (EG:83699), SH3GL3 (EG:6457), SH3GLB1 (EG:51100), SHC1  
 30 (EG:6464), SHC2 (EG:25759), SHC3 (EG:53358), S1N3B (EG:23309), SLA2 (EG:84174), SLC1A5 (EG:6510),  
 SLC3A2 (EG:6520), SLC4A1 (EG:6521), SMAD1 (EG:4086), SMAD2 (EG:4087), SMARCA4 (EG:6597), SMARCB1  
 (EG:6598), SMARCC1 (EG:6599), SMARCD2 (EG:6603), SNAP23 (EG:8773), SNX2 (EG:6643), SNX3 (EG:8724),  
 SNX4 (EG:8723), SOCS3 (EG:9021), SORBS3 (EG:10174), SORL1 (EG:6653), SOS1 (EG:6654), SP1 (EG:6667),  
 SP3 (EG:6670), SPAG9 (EG:9043), SPAST (EG:6683), SP11 (EG:6688), SPTAN1 (EG:6709), SPTBN1 (EG:6711),  
 35 SRI (EG:6717), SSTR5 (EG:6755), ST13 (EG:6767), STARD13 (EG:90627), STAT6 (EG:6778), STAT6 (EG:6778), STK24 (EG:8428),  
 STOML2 (EG:30968), STX12 (EG:23673), STX18 (EG:53407), SVIL (EG:6840), SYK (EG:6850), SYMPK (EG:8189),  
 TACSTD1 (EG:4072), TAGLN2 (EG:8407), TARS (EG:6897), TAT (EG:6898), TBCA (EG:6902), TBXA2R (EG:6915),  
 TCF3 (EG:6929), TEC (EG:7006), TEK (EG:7010), TFRC (EG:7037), TGFB1 (EG:7045), TGM2 (EG:7052), THBS3  
 (EG:7059), TIMP1 (EG:7076), TJAP1 (EG:93643), TJP1 (EG:7082), TKT (EG:7086), TLN2 (EG:83660), TMED2  
 40 (EG:10959), TMOD3 (EG:29766), TN1P2 (EG:79155), TNK2 (EG:10188), TP73 (EG:7161), TPM2 (EG:7169), TPP2  
 (EG:7174), TPR (EG:7175), TRADD (EG:8717), TRAF2 (EG:7186), TRIM29 (EG:23650), TRIP4 (EG:9325), TRIP6  
 (EG:7205), TSC22D1 (EG:8848), TSC22D3 (EG:1831), TSHR (EG:7253), TSN (EG:7247), TTN (EG:7273), TTR  
 (EG:7276), TUBA8 (EG:51807), TUBB (EG:203068), TUBB6 (EG:84617), TUFM (EG:7284), TXN (EG:7295),  
 TXNDC4 (EG:23071), TYRO3 (EG:7301), UBA2 (EG:10054), UBB (EG:7314), UBE2G2 (EG:7327), UBE2I  
 45 (EG:7329), UBE2L3 (EG:7332), UBE2L6 (EG:9246), UCHL1 (EG:7345), UGCGL1 (EG:56886), UMPS (EG:7372),  
 UNC119 (EG:9094), UNC5CL (EG:222643), UTRN (EG:7402), VASP (EG:7408), VAV2 (EG:7410), VCP (EG:7415),  
 VDAC1 (EG:7416), VIM (EG:7431), VLDLR (EG:7436), WAS (EG:7454), YWHAB (EG:7529), YWHAE (EG:7531),  
 YWHAG (EG:7532), YWHAH (EG:7533), YWHAQ (EG:1097.1), YWHAZ (EG:7534), ZAP70 (EG:7535), ZYX  
 (EG:7791).

50 Los grupos de genes mencionados anteriormente (o los correspondientes ARN, proteínas, ligandos, SNP asociados  
 o metabolitos asociados con la actividad de proteínas codificadas por estos genes) representan biomarcadores  
 valiosos que se pueden usar, solos o en diversas combinaciones, para diagnosticar AD o trastornos relacionados.

Un conjunto de biomarcadores comprende al menos dos biomarcadores. En otros ejemplos, el conjunto de  
 biomarcadores comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7 o más biomarcadores.

55 En una realización, el conjunto de biomarcadores según la invención comprende proteínas o ARN codificados por  
 cada uno de los genes seleccionados del grupo que consiste en: APBA1, ATG7, BECN1, CD44, CDH2, COL18A1,  
 ERBB4, F3, FLNA, FYN, GRIN2B, IL20, ITPR1, LRP8, MTOR, NPPC, NRP1, PDGFC, ROBO1, SEMA3E, TGFB1,  
 THBS1, VEGFR1 y WWOX.

60 Un conjunto de biomarcadores diana también puede comprender uno o más biomarcadores como se ha enumerado  
 anteriormente en combinación con al menos un biomarcador adicional. Por lo general, tales biomarcadores  
 adicionales se seleccionan de SNP asociados a enfermedad, proteínas, ARN, metabolitos, lípidos o glúcidos.

En una realización preferida, uno o más biomarcadores adicionales se seleccionan entre proteínas o ARN codificados por los genes seleccionados entre: A2M, ACHE, ALDH2, ANXA1, APOA1, ATP2A3, CASK, CASP8, CDH1, CDH5, CDKN1A, CHAT, CTNND2, DOCK3, EDN1, F13A1, FGF2, FLNB, GABRB2, ITGA1, LAMA1, LAMA3, LEPR, LRP1, MAP2, MMP9, NFATC2, NOS3, NOTCH3, NPPB, PDGFA, PDGFB, PIK3CB, PLAU, PLXDC2, PLXNA2, PRKG1, PRNP, PTK2, RYR2, SEMA5A, SERPINA6, SERPINB2, SERPIND1, STAT3, THBS2, TNF, TP53, TRPC4, TSC1 y VEGFA.

En otra realización preferida, uno o más biomarcadores adicionales se seleccionan entre proteínas o ARN codificados por los genes seleccionados entre: ABCC4, ACC2, ACTN1, ADAM12, ADRA1A, AKAP13, ALCAM, ANXA3, ARHGEF11, ARHGEF12, ATF3, ATM, ATP6V1C1, ATR, BAP1, BGLAP, BIN1, BRIP1, BSN, CACNA1D, CALCB, CDC42BPB, CDH12, CDH13, CHEK1, CHL1, CLTC, COL3A1, COPS7B, CSF1, CSH1, CSNK1A1, CTNNA2, CUL1, CYP11A1, DAAM1, DGKZ, DLG3, DOCK2, EGF, EGFR, EPB41L2, ERC1, F2, FAS, FER1L3, FES, FKBP1A, FSTL5, GFRA3, GFRA4, GHI, GRIP1, GUCY2D, HGF, HIPK1, HMBOX1, HRG, HSP90B1, HSPA5, HYOU1, 1GF2, IL16, IL6ST, IL8, INS, IPPK, IQGAP1, IQGAP2, ITGA9, JAK1, LEP, LETMD1, L1FR, LRP2, LRP6, LTBP1, MAD1L1, MAML3, MMP2, MMP3, MSR1, MUC1, MYO10, NCAM1, NCK1, NGF, NISCH, NOS1, NOTCH2, NPPA, NRIP1, NTF3, OPRM1, PCAF, PCLO, PDE3A, PDE5A, PFKP, PIK3CA, PLA2G2A, PLAT, PLG, PRL, PRLR, PSAP, PSD3, PTGS2, PTK2B, PTPRF, PTPRG, PTPRM, RELN, RET, RIMS2, ROCK1, RPS6KA1, RPS6KA2, RPS6KB1, SCN9A, SERPINA5, SERPINC1, SERPINE1, SERPINE2, SNAP25, SPP1, SREBF2, STAT5B, SV2B, T1MP2, TNFSF11, TRIO, TSC2, UBE3A, VCL, V1L2, WASP1P, XDH y ZFHX1B.

En un ejemplo, el biomarcador(s) adicional se selecciona/n entre metabolitos de:

- 20 - ruta metabólica del colesterol, que incluye preferiblemente colesterol, éster de colesterol, pregnenolona, alopregnanolona, colest-5-eno-3 $\beta$ ,26-diol, deshidroepiandrosterona y sulfato de deshidroepiandrosterona, o combinación de los mismos; y/o
- ruta metabólica del folato, que incluye preferiblemente 5-metiltetrahidrofolato, ácido fólico, s-adenosil metionina, homocisteína y tetrahidrofolato, o combinación de los; y/o
- 25 - ruta metabólica del ácido fosfatídico, que incluye preferiblemente ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilglicerofosfato, o combinación de los mismos, y/o
- ruta metabólica de la esfingosina, que incluye preferiblemente esfingosina-1-fosfato, esfingosina y C2-ceramida, o combinación de los mismos; y/o
- 30 - ruta metabólica de terpenoides, que incluye preferiblemente mevalonato, difosfato de geranilo, difosfato de geranilgeranilo y difosfato de farnesilo.

En un ejemplo de particular, el biomarcador(es) es/son un SNP o una combinación de SNP para los genes enumerados anteriormente, o para otros genes implicados:

- en biología de sinapsis, por ejemplo: ADARB2, AKAP11, ATG5, BDNF, CAMK2D, CDH18, CDH22, CDH8, CDH9, CITRON, CNGB3, DLG2, DLGAP1, DOCK4, DOCK9, DPP6, EML1, FMN1, GRIA4, GRID1, GRID2, GRIK1, GRIK2, GRIK3, GRIK4, GRM7, GRM8, KCND2, LPHN2, MMP7, NAALAD2, NLGN1, NRCAM, NRG1, NRG3, NRG4, NRXN1, NRXN3, NTRK2, OPCML, P2RX4, PARK2, PVRL1, RASGRF2, SCAP2, SLC1A4, SLC6A20, SLC6A7, SNCA, SORBS2, YES1, ABL1, ADAM17, AKT1, CALM1, CBL, CDC42, CREB1, CTNNA1, DLG4, DLGAP2, DLGAP3, DLGAP4, GOPC, GRIA2, GRIA3, GRIN3A, GRIP2, GRM3, GRM5, GRM6, HOMER1, KCNIP1, KCNIP2, LYN, MAPK1, MAPK3, NGFR, NRAS, PIAS1, PICK1, PIK3R1, PIK3R4, PPP1CA, PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, PRKACA, PRKACB, PRKCA, RAP1A, RAP1B, RHOA, ROCK2, SRC, SUMO1, TBR1, UBE2A, YAP1, ABAT, APBA3, APBB1, B3GNTL1, CACNA1C, CACNA1E, CACNA2D1, CACNA2D3, CACNA2D4, CACNB2, CADPS2, CALN1, CAMK4, CAST1, CDKAL1, CNTN4, CSMD1, CUGBP2, DAPKI, DAPK2, DBC1, DISC1, DNER, DRD2, FGF12, 35
- FREQ, GABBR2, GABRA2, GABRB3, GABRG3, GLRA1, GLUD1, GUCY1B2, KCNJ6, KCNMA1, KYNU, NFKB1, NOS1AP, ODZ2, PDEUA, PDE4D, PICALM, PRKD3, RAB3B, RGS8, PJMSI, RPH3AL, SCN11A, SEC24D, SLC12A6, SLC1A1, SLC1A2, SLC1A3, SLC6A1, SLC6A8, SNPH, SNX9, STX2, STXBP6, SV2C, SYN3, SYT12, SYT2, UNC13C, VAMP5, ANKRA2, BACE1, CDC2, CDK5, CHRM1, CHRM3, CHRM4, CHRM5, CTNN, DNM1, ERC2, GUCY2C, GUCY2E, GUCY2F, GUCY2G, KCNMB1, LIN7A, LIN7B, LIN7C, NOVA1, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKAG1, RPH3A, SCN1A, SCN1B, SH3GL2, SLC9A1, STX1A, STXBP1, SYNJ1, SYNJ2, SYTL4, UNC13B, VAMP2, WASF1, ALK, ANKS1A, ARHGAP18, ARHGAP26, CDC42EP3, CDH10, CDH4, DAB1, 50
- DCC, DEPDC2, DNM3, EFNA5, EPHA10, EPHA3, EPHA6, EPHB6, G1PC2, HEY2, KALRN, KTN1, NAV1, NBEA, NCK2, NGEF, NRP2, PAK6, PAK7, PCDH9, PLD2, PPFIA2, PPFIBP1, PPFIBP2, PPP1R12A, PTN, ROBO2, ROR1, ROR2, SDK1, SEMA3A, SEMA3C, SEMA7A, SLIT1, SORBS1, SRGAP3, ULK4, UNC5C, AB11, ADORA2B, CASR, CRMP1, GDNF, GFRA1, GFRA2, GNA12, HTR1B, HTR1D, IQUB, MYL1, NOTCH1, NTN1, NTN3, PIP5K1A, PIP5K1B, RAC1, RBPJ, RGNEF, RHOG, SEMA4C, SIAH1; y/o
- 55 - en angiogénesis, por ejemplo: ADAMTS12, ADIPOQ, ANGPT2, ANK1, ARHGAP10, ARHGAP17, ARHGAP22, ARNT2, BAB, BMP3A, CA10, CALGR, COL4A2, COL4A3BP, COMMD1, COMMD10, DBT, DRD2, EDNRA, EFNA5, EPHA3, FABP5, FBLN2, FOXO3A, G1PC2, GPC6, GULP1, HAPLN1, HAS2, HIF1A, HPSE2, IL18R1, IL20RA, IL20RB, ITGA11, LTBP2, MMP10, MMP7, NCK2, NEDD4, NEDD9, NFKB1, NR3C2, NRG1, NRP2, P2RY12, PAK6, 60
- PALLD, PARVA, PCSK5, PDE11A, PDE1A, PDE4D, PDGFRA, PPMIE, PTN, RPSA, SCHIP1, SEMA3A, SEMA3C, SEMA7A, SMAD4, SMYD3, SND1, SORBS2, SPOCK1, SPOCK3, STAB2, TGFBRAP1, TLL2, VAV3, VEGFR2, YES1, BCAR1, CD36, CDC42, CTNH F2R, FOXO1, GUCY2C, GUCY2E, GUCY2F, GUCY2G, HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, ITCH, ITGA6, ITGB1, MAPK1, MAPK3, MET, MME, NF2, P2RY1, PAK1, PDGFRB, PIK3R1,

PIK3R4, PPARA, PXN, RAC1, RDX, RHOA, SMAD3, STAT5A, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIAM1, VEGFB, VEGFC, VEZF1, ABCA1, ACADSB, ACOT11, ACOT7, ACOXL, AKAP2, ATP7B, AUH, BDH2, CAMK1D, CAMKK2, CNTFR, COLEC12, CS, CUBN, CYP19A1, CYPIB1, CYP7B1, DHCR7, DLD, EHHADH, ETFA, FTO, GABBR2, GLRX, HCRTR2, HSD17B12, LIPL3, ME1, ME2, MGLL, NCOA1, NFYB, OGDH, OSBPL10, OSBPL3, PC, RPS6KA5, SCARF2, SDHA, SLC22A4, SLC25A21, SOCS1, SRD5A1, TBXAS1, ACAT1, ADIPOR1, ADIPOR2, ADRB2, AKR1C2, CPT1A, CPT1B, CPT1C, EIF4E, EIF4EBP1, ESRRG, FDPS, HSD11B1, LDLR, NR1H2, NRAS, OPRS1, PPARG, PPARGC1B, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKACA, PRKACB, PRKAG1, PTPN11, RHEB, RPS6KB2, RPTOR, SCARB1, SREBF1, STAR, STK11, THRA, THRB, TSPO, ADCY2, ADH5, AGPAT5, AGPAT7, ASAH1, ATIC, ATP10A, ATP10B, ATP10D, CDH8, CDH9, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, ENPP2, ENPP6, ENPP7, GATA3, GDF2, GNG12, MAT2B, MGST2, MTR, MTRR, PAFAH2, PIP5K2A, PISD, PITPNC1, PLA2R1, PLCB1, PLCL1, PLD2, PRIMA1, RALA, RALBP1, SCGB1A1, SGMS1, SGPP2, SHMT1, SNGA, ST14, THEM2, TRPS1, ADRBK1, CYSLTR1, CYSLTR2, DHFR, DRD5, EDG1, EDG2, EDG3, EDG4, EDG5, EDG6, EDG7, EDG8, GNA12, GNA13, GNAI1, GNAI2, GNAI3, GRK5, GRM5, LPIN1, LPIN2, LPIN3, MYCBP2, PCTP, PLA2G1B, PLA2G4A, PLA2G5, PLA2G6, PLD1, PPAP2A, PPAP2B, PPAP2C, PRKCD, ALX4, CDON, GST5, GDF10, HIVEP2, NOG, OSTN, ROR2, RUNX2, SOX5, SOX9, TNFRSF1B, BMP2, FGF4, FZD2, HOXD13, MAPK8, SHH, SMAD5, SOX6, TNFRSF11A, VDR, WNT5A; y/o

- en respuesta al estrés celular, por ejemplo: ACYP2, ATP2B1, ATP2B2, ATXN1, DGKB, DGKE, DGKG, DGKH, ITPR2, PDE11A, PDE4D, PLCB1, PLEKHA6, SIL1, SLC8A1, TRPM3, ATP1A1, CHRM1, CHRM3, CHRM4, CHRM5, DNAJB9, FKBP1B, GUCY2C, GUCY2E, GUCY2F, GUCY2G, IMPDH1, IMPDH2, IRF1, MSN, PLN, PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, PRKCA, RDX, RYR3, SCN1A, SCN1B, SLC8A2, SLC9A3R1, SLC9A3R2, SLN, TRPC3, TRPC5, AKAP11, APBA2BP, APBB1, APPBP2, BCL2, CDK5RAP2, CDKAL1, CHMP5, CHRM2, DAB1, DNAJB11, DRD2, ELAVL2, ENAH, FGF14, FGF5, FMN1, FRS2, FZD3, GAB2, GL12, GPC5, INSR, HAS2, HECW1, HTR1A, IDE, IGFIR, IGF2BP1, INPP4A, INPP4B, KREMEN1, NEDD4, NOG, NOS1AP, PARK2, PDE6D, PIK3C2G, PVRL1, ROR2, SFRP4, SNCA, SNCAIP, SORCS1, SORCS2, TFCP2, VANGL2, VPS13B, WIF1, ADRB2, ADRBK1, AKT1, BACE1, BAX, GCNE1, CDK5, CTNBN1, DVL1, FGFR1, FZD2, GNB2L1, GPR37, GRK5, GSK3B, ITGB1, MAOA, MAOB, MAPK1, MAPK3, MAPK8, MLLT4, MME, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB1, PRKAB2, PRKACA, PRKACB, PRKAG1, RAC1, SRC, WNT1, WNT5A, ABCC9, ACCN1, ACCN2, ATF7, ATG10, ATG5, BCL2L14, BCL3, BRE, BR13BP, CDK6, COMMD1, COMMD10, COPS7A, DAPK1, DAPK2, DCC, EYA2, FBXW8, FH1T, FOXO3A, GNPTAB, HBG2, HIPK2, HK2, HMOX1, JAR1D1B, MBNL2, MCC1, MCPH1, MDM1, NEDD9, NFKB1, NOX3, NRP2, NUDTI, NUDT13, NUDT3, PIK3C3, PML, PPM1D, RBBP8, RTN1, SEMA3C, SH3BP5, SLC24A3, SORBS2, SQSTM1, TNFAIP3, UNC5C, VDAC2, YES1, ALOX12, ATG12, BAD, BAK1, BCARI, CD36, GADD45A, GADD45B, GADD45G, HSPA4L, KCNJ11, KCNJ8, MAPK12, MLH1, NCF2, NOX1, NOX4, NTN1, PAK1, PIK3R4, SEMA4C, TNFRSF1A, TP63, TRAF6, CASP3.

Un objeto de la presente invención es un método para detectar la presencia de riesgo de AD o un trastorno relacionado en un mamífero, o para ayudar en el diagnóstico y subclasificación de AD y trastornos relacionados, método que comprende la determinación de la cantidad (relativa) con la presencia, ausencia o alteración de un biomarcador diana en una muestra del sujeto, en donde dicha cantidad o alteración es indicativo de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de dicha enfermedad, y en donde dicho biomarcador se selecciona entre una proteína, ARN, metabolito, lípido o glúcido implicado en biología de sinapsis, angiogénesis o respuesta al estrés celular.

Por lo tanto, un objeto de la invención reside en un método para detectar (*in vitro* o *ex vivo*) la presencia o riesgo de desarrollo de AD o un trastorno relacionado en un mamífero, que comprende la determinación de la presencia, en una muestra biológica del mamífero de una alteración en cada uno de los genes como se reivindica, o un ARN o proteína correspondientes, siendo la presencia de una alteración de este tipo indicativa de la presencia o riesgo de desarrollar AD en dicho mamífero.

Otro objeto de la presente invención es un método para predecir y/o evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento frente a la AD y trastornos relacionados con la eficacia de un tratamiento de este tipo en un sujeto, método que comprende determinar la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de cada uno de los biomarcadores diana en una muestra del sujeto, en donde dicha cantidad o alteración es indicativa de la capacidad de respuesta de dicho sujeto o de la eficacia del tratamiento, y en donde dicho biomarcador se selecciona entre una proteína o ARN reivindicados implicados en biología de sinapsis, angiogénesis o respuesta al estrés celular.

Otro objeto se refiere a un método para evaluar o seguir la respuesta a un tratamiento para AD en un sujeto, método que comprende una etapa de medir la expresión de uno o más genes como se enumera en uno de los grupos 1-3 mencionados anteriormente, o un ARN o proteína correspondientes, antes y/o durante el tratamiento, y una comparación de la expresión medida de este modo con la medida en un primer estadio del tratamiento o antes del tratamiento.

Otro objeto se refiere a una mejora de los aumentos para el tratamiento de AD o trastornos relacionados, mejora que consiste en medir la expresión de uno o, preferiblemente, varios genes como se enumera en uno de los grupos 1-3 mencionados anteriormente, o un ARN o proteína correspondientes, antes y/o durante el tratamiento. La medición de la expresión hace posible adaptar el tratamiento de acuerdo con la evolución de la patología y/o eficacia del tratamiento.

El método comprende la determinación de la presencia (o de la ausencia o de la cantidad (relativa)), en una muestra biológica del mamífero, de al menos 5 moléculas diana distintas seleccionadas entre las mencionadas anteriormente, preferiblemente de al menos 10.

5 Una alteración en un gen o ARN o proteína indica, dentro del significado de la invención, cualquier alteración o desregulación de la expresión de dicho gen, ARN o proteína, al nivel de la transcripción y/o traducción, así como cualquier alteración en la estructura de la proteína(s) codificada (aparición o desaparición de variantes tales como variantes truncadas, mutadas o de corte y empalme).

10 La detección de la alteración en una expresión o estructura genética o de ARN se puede realizar usando una diversidad de técnicas conocidas *per se* en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, transferencia de Northern, hibridación selectiva usando por ejemplo, matrices de ácido nucleico, amplificación de ácido nucleico usando por ejemplo, RT-PCR, o PCR cuantitativa, Amplificación Mediada por la Transcripción (TMA), Amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), Amplificación usando Oligonucleótido específico de Alelo (ASO), transferencia de Southern, análisis conformacional SSCA, hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), etc. Si fuera apropiado, la cantidad/naturaleza de ácido nucleico detectada se puede comparar con un valor de referencia, por ejemplo un valor 15 medio o promedio observado entre pacientes de control (por ejemplo, no afectados con la AD), o con un valor medido en paralelo en una muestra de control.

El método comprende la detección de la presencia o ausencia o cantidad (relativa) de una secuencia de ácido nucleico de un gen de un grupo de genes como se ha enumerado anteriormente mediante hibridación selectiva o amplificación selectiva.

20 Por lo general, la hibridación selectiva se consigue usando sondas de ácido nucleico, inmovilizadas preferiblemente en un soporte, tal como en forma de un soporte sólido o semisólido que tenga al menos una superficie que permita la inmovilización de sondas de ácidos nucleico. Por ejemplo, algunos soportes de este tipo son portaobjetos de vidrio, membranas, filtros, columnas, etc., que se pueden preparar con cualquier material compatible, como vidrio, sílice, plástico, fibra, metal, polímero, etc. Algunas sondas de ácidos nucleicos se pueden preparar con cualquier ácido 25 nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, PNA, etc), preferiblemente de una sola hebra. Por lo general, las sondas comprenden de 5 a 400 bases, preferiblemente de 8 a 200, más preferiblemente menos de 100. Las sondas son específicas para y complementarias con al menos una parte de una secuencia genética o de ARN como se ha enumerado anteriormente, permitiendo de este modo una detección específica de la misma a través de hibridación.

30 La hibridación se puede realizar en condiciones convencionales de rigurosidad (por ejemplo, baja, media o elevada), conocidas por el experto en la técnica, como se describe por ejemplo, en Sambrook, Fritsch, Maniatis (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Near.

35 Por lo tanto, un objeto particular reside en un método para detectar la presencia o el riesgo de desarrollar AD o un trastorno relacionado en un mamífero, o para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto o la eficacia de un tratamiento frente a AD, método que comprende poner en contacto, en condiciones que permitan una hibridación entre secuencias complementarias, ácidos nucleicos de una muestra del mamífero y un conjunto de sondas 40 específicas como se ha definido anteriormente, para obtener un perfil de inmigración, perfil de hibridación que es característico de la presencia o el riesgo de desarrollar AD en este mamífero, o de la capacidad de respuesta o eficacia del tratamiento. El perfil de hibridación se puede comparar con uno o más perfiles de referencia, en particular un perfil de referencia característico de sujetos sanos y/o sujetos afectados con AD, comparación que permite determinar la probabilidad por el riesgo para que el paciente tenga o desarrolle AD.

45 La amplificación selectiva se realiza preferiblemente usando un cebador o un par de cebadores que permitan la amplificación de todo o parte de un gen o ARN como se ha descrito anteriormente en una muestra del sujeto. Por lo general, el cebador es específico para y complementario con una parte de la secuencia de un gen o ARN diana como se ha definido anteriormente, y por lo general es un ácido nucleico de una sola hebra con una longitud entre 5 y 50 bases, preferiblemente entre 5 y 30.

50 Por lo tanto, otro objeto en particular reside en un método para detectar la presencia o el riesgo de desarrollar AD en un mamífero, que comprende poner en contacto, en condiciones que permitan que se produzca la amplificación, ácidos nucleicos a partir de una muestra del mamífero y un cebador o conjunto de cebadores como se ha definido anteriormente para obtener un perfil de amplificación, siendo dicho perfil característico de la presencia o riesgo de desarrollar AD en dicho mamífero.

55 El método comprende la determinación de la presencia o cantidad (relativa) de un polipéptido codificado por un gen o ARN como se ha definido anteriormente. Una determinación de este tipo se puede realizar mediante diversas técnicas conocidas *per se* en la técnica, tal como por medio de un ligando específico, por ejemplo un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo (por ejemplo, Fab, Fab', CDR, ScFv, etc). Por lo general, el ligando se inmoviliza en un soporte, tal como se ha descrito anteriormente. Algunas técnicas para detectar la formación de un complejo inmune incluyen ELISA, RIA, etc. Si fuera apropiado, la cantidad de polipéptido detectada se puede comparar con un valor de referencia, por ejemplo un valor medio o promedio observado entre pacientes de control, o con un valor medido en paralelo en una muestra de control.

El método se puede aplicar a cualquier muestra biológica del mamífero a someter a ensayo, en particular cualquier muestra que comprenda ácidos nucleicos o polipéptidos. Algunos ejemplos de muestras de este tipo incluyen sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal, saliva, orina, heces, extractos celulares, biopsia del tejido, etc. La muestra se puede tener con cualquier técnica conocida *per se* en la técnica, por ejemplo mediante recogidas usando por ejemplo, técnicas ni masivas, o a partir de colecciones o bancos de muestras, etc. Además, la muestra se puede tratar previamente para facilitar la accesibilidad de las moléculas diana, por ejemplo mediante lisis (mecánica, química, enzimática, etc), purificación, centrifugación, separación, etc.

La invención se puede aplicar a cualquier mamífero, preferiblemente a seres humanos.

#### Métodos de identificación de Nuevos Marcadores y Cuantificación de biomarcadores

10 La presente invención permite la detección de biomarcadores de lesión cerebral en fluidos biológicos. Los ensayos de detección se describirán a continuación.

Esos ensayos incluirán sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos de fluorescencia y similares. Los ensayos de este tipo son de rutina y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, .1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad). A continuación se describen brevemente algunos inmunoensayos a modo de ejemplo (pero no se pretenden como modo de limitación).

20 La inmuno precipitación consiste en el lisado de células con tampón RIPA (Ensayo de RadiolInmunoPrecipitación) que proporciona un fondo bajo (Tris HCl 50 mM a pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, SDS al 0,1 %). En cuanto se produce la lisis, comienza la proteólisis, desfosforilación y desnaturalización. Estos sucesos se pueden ralentizar en gran medida si las muestras se mantienen en hielo o a 4 °C en todas las ocasiones y los inhibidores apropiados añaden recién preparados al tampón de lisis. Dos de los inhibidores de proteasa usados más habitualmente para IP son PMSF (50 ug/ml), y aprotinina (1 ug/ml). La muestra se incuba a continuación con el anticuerpo durante 1 hora hasta toda una noche a 4 °C, preferiblemente con agitación. Mientras tanto, se preparan las perlas de Sepharose. Si se usa un anticuerpo monoclonal, se eligen perlas de Sepharose acopladas a proteína G, si se usa un anticuerpo policlonal, normalmente son adecuadas las perlas de Sepharose acopladas a proteína A. Se añaden 70-100 µl de las perlas a cada muestra, siempre manteniendo en hielo. La mezcla de lisado-perlas se incuba a continuación a 4 °C con agitación giratoria durante 4 horas. Cuando el tiempo de incubación se termina, los tubos se centrifugan, el sobrenadante se retira y las perlas se daban en tampón de lisis tres veces (centrifugando cada vez a 4 °C y retirando el sobrenadante). Por último, el sobrenadante final se retira y se añaden 25-50 µl de tampón de carga 2x. A continuación, la mezcla se lleva a ebullición a 95-100 °C durante 5 minutos para desnaturalizar la proteína y separarla de las perlas de proteína-A/G, se centrifugó y el sobrenadante contiene la proteína. Las muestras se pueden desarrollar en una Transferencia de Western para análisis adicional.

El análisis de Transferencia de Western consiste en determinar cantidades relativas de la proteína de interés presente en diferentes muestras. Las proteínas se separan mediante electroforesis en gel, normalmente en gel de SDS-poliacrilamida (también conocido como SDS-PAGE). Los péptidos se transfieren a una lámina de papel de transferencia especial denominado papel de nitrocelulosa: Colocar una membrana de nitrocelulosa en el gel y, usando electroforesis, conducir las bandas de proteína (polipéptido) a las membranas de nitrocelulosa membrane. Esto proporciona una membrana de nitrocelulosa que está marcada con las mismas bandas de proteína que el gel. Las proteínas recién en el mismo patrón de separación que tenían en el gel. La transferencia se incuba con una proteína genérica (tal como proteínas de leche) para unirse a cualquier sitio de adherencia restante en la nitrocelulosa. A continuación, se añade un anticuerpo a la solución que es capaz de unirse a su proteína específica. El anticuerpo primario se incuba con la membrana de nitrocelulosa, para formar un complejo de anticuerpo-proteína con la proteína de interés. El anticuerpo secundario se incuba a continuación con la membrana de nitrocelulosa. Este anticuerpo es un conjugado de anticuerpo-enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante) dirigidos frente al anticuerpo primario. La ubicación del anticuerpo se revela mediante su vinculación con un sustrato incoloro que la enzima añadida convierte en un producto coloreado que se puede observar y fotografiar.

50 Los ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) consiste en medir la cantidad de antígeno entre dos capas de anticuerpos. Los antígenos a medir deben contener al menos dos sitios antigénicos, capaces de unirse a dos anticuerpos que actúan en el sándwich. Por lo tanto, los ensayos de sándwich se limitan a la cuantificación de antígenos multivalentes tales como proteínas o polisacáridos. El principio de la técnica de ELISA es la inmovilización del anticuerpo de captura, seguido de unión del antígeno al anticuerpo inmovilizado, unión del segundo anticuerpo, ligado a una enzima, al antígeno unido (formación del complejo inmune) y por último detección del complejo inmune usando sustrato enzimático apropiado. Aunque para detección se han usado muchos tipos de enzimas diferentes, la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (ALP) son las dos enzimas más ampliamente usadas en ensayos de ELISA. Es importante considerar el hecho de que algunos materiales biológicos tienen niveles elevados de actividad enzimática endógena (tal como ALP elevada en células alveolares, peroxidasa elevada en glóbulos rojos) y esto puede dar como resultado una señal no específica. Cuando sea necesario, se realiza un tratamiento del

bloqueo adicional con levamisol (para ALP) o con solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % en metanol (para peroxidasa).

#### Identificación y análisis cuantitativo de biomarcadores

5 Las muestras biológicas se toman de voluntarios sanos (controles), con edades, género, condición física similares con respecto a pacientes con lesión cerebral. Las comparaciones de estas muestras biológicas permiten identificar biomarcadores específicos de lesión cerebral (como se ha definido anteriormente).

10 Las muestras biológicas se tienen que procesar para análisis, tal como cromatografía (exclusión por tamaño, intercambio iónico, afinidad por heparina, extracción secuencial, electroforesis en gel). Hay muchas formas de reducir la complejidad de una muestra basándose en las propiedades de unión de las proteínas en la muestra, o las características de las proteínas en la muestra. La separación y clasificación de las muestras entonces favorecerá la detección adecuada de biomarcadores.

15 La cromatografía por exclusión se podría usar para dividir una muestra de acuerdo con el tamaño de las proteínas. Para muestras biológicas pequeñas, se usa preferiblemente una columna de centrifugación de selección por tamaño. En general, la primera fracción que se eluye de la columna ("fracción 1") tiene el porcentaje más elevado de proteínas de alto peso molecular; la fracción 2 tiene el menor porcentaje de proteínas de peso molecular elevado; la fracción 3 tiene un porcentaje incluso menor de proteínas de alto peso molecular; la fracción 4 tiene la cantidad menor de proteínas grandes, y así sucesivamente. Cada fracción se puede analizar a continuación mediante inmunoensayos, espectrometría de iones en fase gaseosa, y similares, para la detección de marcadores.

20 Una muestra se puede dividir mediante cromatografía de intercambio iónico que permite la separación de las proteínas de acuerdo con sus características de carga. Por ejemplo, una muestra biológica se puede procesar en una resina de intercambio de aniones Q (por ejemplo, Q HyperD F, Biosepra) que producirá de forma secuencial eluyentes en serie que tengan un pH diferente. La cromatografía de intercambio iónico permite la separación de los biomarcadores cargados con mayor carga negativa: es probable que el eluyente que tenga un pH básico esté cargado con carga débilmente negativa, mientras que una fracción que tenga un pH bajo está cargada con una carga fuertemente negativa.

25 Una muestra también se puede dividir mediante cromatografía con heparina sobre la base de interacción por afinidad con heparina y características de carga. La heparina, un mucopolisacárido sulfatado, unir a algunos marcadores con restos cargados con carga positiva. Por lo tanto, una muestra se puede incluir de forma secuencial, con cada eluyente teniendo diferentes pH o concentraciones de sal: es probable que el eluyente que tenga un pH ácido esté cargado con carga débilmente positiva mientras que una fracción que tenga un pH elevado está cargado con carga fuertemente positiva.

30 Una muestra se puede dividir mediante el aislamiento de proteínas que tengan una característica específica, por ejemplo, están glicosiladas. Por ejemplo, una muestra de CSF se puede dividir pasando la muestra sobre una columna de cromatografía con lectina (que tiene una afinidad elevada hacia los azúcares). Las proteínas glicosiladas se unirán a la columna con lectina y las proteínas no glicosiladas pasarán a través del flujo continuo. A continuación, las proteínas glicosiladas se eluyen de la columna con lectina con un eluyente que contenga un azúcar, por ejemplo, N-acetil-glucosamina y están disponibles para análisis adicional.

35 Otra manera para determinar la composición de la muestra biológica es eluirla a través de columnas en serie que contengan adsorbentes dirigidos con respecto a las proteínas diana. Cualquier material y método adecuados se pueden usar para realizar una extracción secuencial de una muestra. Por ejemplo, los inventores pueden usar una serie de columnas de centrifugación que contiene diferentes adsorbentes, una placa de múltiples pocillos revestida con diferentes adsorbentes, una sonda que contiene adsorbentes específicos adaptados para uso en un espectrómetro de iones en fase gaseosa (la sonda se cambia entre las dos medidas). La ventaja de realizar extracción secuencial en una sonda con espectrómetro de iones en fase gaseosa es que los marcadores que se unen a diversos adsorbentes en cada etapa de la extracción se pueden identificar y analizar directamente.

40 Los biomarcadores en una muestra también se pueden separar mediante electroforesis en gel de alta resolución. Esta técnica es particularmente potente cuando se comparan muestras relacionadas, tales como muestras de tejido sano con respecto a tejido enfermo (es decir, lesión cerebral). Por ejemplo, las proteínas que son más abundantes en la muestra enferma podrían representar nuevas dianas o biomarcadores farmacológicos. La 2D-PAGE comparativa la que se puede usar para buscar proteínas cuya expresión varía del mismo modo en el mismo conjunto de condiciones (éstas pueden tener funciones relacionadas) y para identificar proteínas producidas como respuesta a la terapia con fármacos (éstas pueden ser responsables de los efectos secundarios relacionados con los fármacos).

45 La primera etapa es cargar las proteínas en el gel, que tiene un gradiente de pH de la parte superior a la inferior. El gel de poliacrilamida proporciona una matriz de soporte a través de la que pueden migrar las proteínas. Este gel tiene un gradiente de pH de la parte superior a la inferior – la parte superior es más ácida de la parte inferior. Una mezcla compleja de proteínas se carga en la parte media del lado izquierdo, en donde el pH neutro, y se aplica un voltaje a través del gel. Las proteínas migran a continuación a través del Vergel hasta que alcanzan su punto isoelectrónico (punto en el que su carga es la misma que el pH circundante). Esta técnica se denomina enfoque

- 5 isoelectrónico. El gel se empapa a continuación en una solución de desnaturalización (que hace que las proteínas se desplieguen) que contiene el detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Esta molécula tiene una carga muy negativa y se une a todas las proteínas, haciendo de manera eficaz que todas tengan la misma carga. A continuación se aplica un voltaje a través del gel de lado a lado con el ánodo (terminal positivo) a la derecha. Todas las proteínas se mueven hacia el ánodo, pero las proteínas más pequeñas se mueven más rápido a través del gel que las más grandes, separando de este modo las proteínas de acuerdo con su tamaño. Los biomarcadores en la matriz de dos dimensiones se pueden detectar usando aquel método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, los biomarcadores en un gel se pueden etiquetar o teñir (por ejemplo, tinción con Azul de Coomassie o con plata).
- 10 Si la electroforesis en un gel genera aplicaciones puntuales que corresponden al peso molecular de uno o más marcadores de la invención, la aplicación puntual se puede analizar adicionalmente mediante análisis de densitometría o espectrometría de iones en fase gaseosa usando cualquier técnica adecuada, tal como MALDI o SELDI.
- 15 Los biomarcadores se pueden someter a proteólisis antes del análisis. Los fragmentos resultantes de esta digestión reflejan la identidad de los biomarcadores, permitiendo de este modo su análisis. Esto es particularmente útil para distinguir diferentes marcadores con masas moleculares similares. La proteólisis también es útil para marcadores con peso molecular elevado que se resuelven menos fácilmente con espectrometría de masas que los marcadores más pequeños. Las proteasas, tales como tripsina, que escinden los marcadores en un número de fragmentos separados son particularmente útiles.
- 20 Los biomarcadores también se deben modificar para aumentar la resolución de la detección. Por ejemplo, se puede usar neuraminidasa para retirar restos de ácido siálico terminal de las glicoproteínas, aumentando este modo la unión a un adsorbente aniónico y aumentando la resolución de la detección.
- 25 Por ejemplo, los biomarcadores se pueden modificar mediante la unión de una etiqueta de peso molecular específico. Esta etiqueta se unirá a un marcador molecular específico, permitiendo la separación adicional. Opcionalmente, la identidad de los biomarcadores modificados se puede determinar mediante emparejamiento de sus características físicas y químicas en una base de datos de proteínas (por ejemplo, SwissProt).
- 30 La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se puede usar para separar una mezcla de biomarcadores en una muestra basándose en sus diferentes propiedades físicas, tales como polaridad, carga y tamaño. Por lo general, los instrumentos de HPLC consisten en un depósito de fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector. Los biomarcadores en una muestra se separan por inyección de una alícuota de la muestra en la columna. La mezcla se eluye a través de la columna a diferentes tasas debido a diferencias en el comportamiento de reparto entre el líquido móvil y las fases estacionarias. A continuación se recoge una fracción que corresponde al peso molecular y/o propiedades físicas de uno o más biomarcadores. La fracción se analiza mediante espectrometría de iones en fase gaseosa para detectar biomarcadores.
- 35 El uso de Biochip de proteína es de interés en particular para determinar la identidad y el nivel de expresión de biomarcadores presentes en la muestra biológica. Normalmente, "biochip de proteína" se refiere a la micromatriz de proteína, que se encuentra en una disposición ordenada de muchas proteínas diferentes, tales como anticuerpos, cuyas coordenadas en el chip se conocen. Esas proteínas sirven como agentes de captura para proteínas seleccionadas en una muestra. Las proteínas facturadas se hacen detectables o bien etiquetando las directamente con un fluoróforo o, en el caso de chips de anticuerpo, añadiendo una capa de anticuerpos etiquetados para hacer un sándwich. La posición en la que la proteína se une revela el tipo de cuerpo al que se une y por lo tanto su identidad. La fuerza de la señal desde una posición indica el nivel de expresión de proteína. Las micromatrices de anticuerpo tienen la ventaja de tener un alto rendimiento. Los biochips de proteína los pueden proporcionar las Compañías Packard BioScience (Meriden Conn.), Zyomyx (Hayward, Calif.) y Phyllos (Lexington, Mass.).
- 40 Para confirmar la identidad de la proteína unida en una aplicación puntual en particular en los Biochips, es necesario realizar un análisis adicional.
- 45 Las proteínas capturadas en la superficie de un biochip de proteína se pueden detectar mediante espectrometría de masas, fluorescencia, resonancia de plasmones superficiales, elipsometría o microscopía de fuerza atómica. La espectrometría de masas es un método útil para detección de los biomarcadores de la presente invención.
- 50 En la espectrometría de masas de desorción por láser, un sustrato o una sonda que contiene marcadores se introduce en un sistema de entrada. Los marcadores se desorben y se ionizan en la fase gaseosa mediante láser a partir de la fuente de ionización. Los iones generados se recogen con un ensamblaje de óptica iónica, y a continuación en un analizador de masas de tiempo de vuelo, los iones se aceleran a través de un campo corto de voltaje elevado tensión de alto y se deja que se deriven en una cámara de alto vacío. En el otro extremo de la cámara de alto vacío, los iones acelerados golpean una superficie detectora sensible en un momento diferente.
- 55 Dado que el tiempo de vuelo es una función de la masa de los iones, el tiempo transcurrido entre la formación de iones y el impacto en el detector de iones se puede usar para identificar la presencia o ausencia de marcadores de relación específica de masa con respecto a carga.

La espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz, o MALDI-MS, es un método de espectrometría de masas que implica el uso de una molécula que absorbe energía, con frecuencia denominada matriz, para desorber proteínas intactas desde una superficie de sonda. La MALDI se describe, por ejemplo, en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.118.937 (Hillenkamp *et al.*) y en el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.045.694 (Beavis y Chait). En la MALDI-MS, por lo general la muestra se mezcla con un material de matriz y se coloca en la superficie de una sonda inerte. Algunas moléculas de absorción de energía a modo de ejemplo incluyen derivados de ácido cinnámico ("SPA"), ácido sinapínico ("CHCA") y ácido dihidroxibenzoico. Otras moléculas que absorben energía adecuadas son conocidas por los expertos en esta materia. La matriz se seca, formando cristales que encapsulan las moléculas de analito. A continuación, las moléculas de analitos se detectan con espectrometría de masas de desorción/ionización por láser. La MALDI-MS es útil para detectar los biomarcadores de la presente invención si la complejidad de una muestra se ha reducido sustancialmente usando los métodos de preparación descritos anteriormente.

La espectrometría de masas de desorción/ionización por láser de aumento de superficie, o SELDI-MS representa una mejora con respecto a la MALDI para el fraccionamiento y detección de biomoléculas, tales como proteínas, en mezclas complejas. SELDI es un método de espectrometría de masas en donde las biomoléculas, tales como proteínas, se capturan en la superficie de un biochip de proteína usando reactivos de captura que se unen en el mismo. Por lo general, las moléculas no unidas se lavan de la superficie de la sonda antes de interrogación. SELDI se describe, por ejemplo, en: documento de patente de Estados Unidos n.º 5.719.060 (Hutchens e Yip, 1998,) documento de patente de Estados Unidos n.º 6.225.047 (Hutchens e Yip, 2001) y Weinberger *et al.*, "Time-of-flight mass spectrometry," en *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers, ed., pp 11915-11918 John Wiley & Sons Chichester, 2000.

Los marcadores en la superficie del sustrato se pueden desorber e ionizar usando espectrometría de iones en fase gaseosa. En un espectrómetro de masas habitual, un sustrato o una sonda que comprende marcadores en su superficie se introduce en un sistema de entrada. A continuación, los marcadores se desorben con una fuente de desorción tal como un láser, bombardeo atómico rápido, plasma de alta energía, ionización por electronebulización, ionización por termopulverización, MS líquida de iones secundarios, desorción de campo, etc. Las especies generadas volatilizadas, desorbidas, constan de iones o agentes neutros formados previamente que se ionizan como una consecuencia directa del sucesor de desorción. Los iones generados se recogen con un ensamblaje de óptica iónica, y a continuación el analizador de masas dispersa y analiza los iones que pasan. Los iones que salen del analizador de masas se detectan y a continuación la información se traduce en proporciones de masa con respecto a carga. La detección de la presencia de marcadores u otras sustancias por lo general implicará la detección de la intensidad de la señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y carácter de marcadores unidos al sustrato.

#### Inmunoensayos

Los biomarcadores también se pueden detectar e identificar a partir de fluidos biológicos mediante inmunoensayo, usando sus propiedades para actuar como un antígeno. El inmunoensayo implica: (a) usar anticuerpos que se unen de forma específica a los marcadores; (b) mezclar una muestra con el anticuerpo y (c) detectar la presencia de complejo de anticuerpo-marcador en la muestra.

Usando los marcadores purificados, se pueden preparar anticuerpos que se unen de forma específica a un marcador usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975). Las técnicas de este tipo incluyen, pero no se limitan a, preparación de anticuerpo por selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales mediante inmunización de conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, 1989; Ward *et al.*, 1989).

Los anticuerpos primarios específicos permiten cuantificar biomarcadores en fluidos biológicos usando un ensayo inmunoenzimático (EIA) tal como ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de transferencia de Western, o un ensayo de transferencia por ranuras (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos n.ºs 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Estos métodos también se describen en, por ejemplo, *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr, eds., 7ª ed. 1991). La detección y cuantificación de biomarcadores se describe con detalle en los Ejemplos que siguen a continuación.

Por lo general, el anticuerpo que se une de forma específica al marcador se añade a la muestra tomada de un paciente. Opcionalmente, el anticuerpo se puede fijar a un sólido que facilitará el lavado y posterior aislamiento del complejo de anticuerpo-proteína. Algunos ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microtitulación, una barra, una perla, o una microperla. Algunos anticuerpos también se pueden unir a un sustrato de sonda o "matrices de ProteinChip.RTM". Una muestra se puede diluir en un vehículo adecuado antes de su incubación con anticuerpo primario. La mezcla se lava y el complejo de anticuerpo-marcador se puede detectar con un reactivo específico tal como un anticuerpo secundario etiquetado con perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS.TM.), colorantes fluorescentes, radioetiquetas, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de

rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas normalmente en un ELISA), y etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas.

5 Como alternativa, el marcador en la muestra se puede detectar mediante un ensayo de competición o inhibición en donde, por ejemplo, dos anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epítomos distintos se incuban de forma simultánea con la mezcla.

10 En los ensayos, pueden ser necesarias etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, identidad del biomarcador, volumen de solución, concentraciones, ... Normalmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque se pueden realizar en un intervalo de temperaturas, tal como de 4 °C a 37 °C.

Los inmunoensayos son útiles para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores en una muestra de ensayo. Este nivel de expresión se determina representando los valores absolutos con respecto a una curva patrón (realizada a partir de una proteína conocida por estar presente en una muestra).

15 El análisis de la detección y la cuantificación de biomarcadores de muestras sometidas a ensayo, genera datos que se presentan en diversos formatos: 1) una "vista del espectro o mapa retenido" en donde una vista de espectro patrón representa la cantidad de biomarcador que alcanza el detector en cada peso molecular en particular 2) un "mapa de pico" en donde se visualizan la altura del pico y la información de la masa, proporcionando una imagen más clara y permitiendo que los marcadores con pesos moleculares casi idénticos se puedan observar más fácilmente 3) una "visión del gel" en donde cada masa de la vista del pico se puede convertir en una imagen en escala de grises basándose en la altura de cada pico, dando como resultado un aspecto similar a bandas en geles de electroforesis 4) una "superposición en 3-D" en donde varios espectros se pueden superponer para estudiar cambios sutiles en alturas relativas de picos 5) una "vista de mapa de diferencia" en donde dos o más espectros se pueden comparar, de forma conveniente resaltando marcadores únicos y marcadores que están regulados de forma positiva o negativa entre muestras 6) un "Diagrama de Dispersión Spotfire" en donde los biomarcadores se detectan y se representan como un punto, un eje de la representación representa la masa molecular aparente de los marcadores detectados y otro eje representa la intensidad de la señal de los marcadores detectados.

20 Los métodos expuestos en esta patente tienen como objetivo detectar biomarcadores en fluidos biológicos de pacientes que padecen lesiones cerebrales. Este proceso conducirá a muchas aplicaciones. A continuación, la cuantificación de biomarcadores se puede usar para precisar el diagnóstico de lesiones cerebrales de cualquier forma y/o para controlar la respuesta del paciente a un tratamiento, y/o para identificar compuestos que modulan la expresión de estos biomarcadores *in vivo* o *in vitro*.

Algunos aspectos y ventajas adicionales se describirán en la siguiente sección experimental, que solamente se considerarán como ilustrativos.

## 35 Ejemplos

### A) Proceso de búsqueda y procesamiento de datos a la selección racional de biomarcadores relevantes para la AD

40 Un enfoque combinatorio se usa para la selección de biomarcadores de AD potenciales y su priorización para estudios de validaciones, basándose en búsqueda y procesamiento de rutas de datos experimentales disponibles que cubren resultados de estudios funcionales de biología celular, experimentos de formación de perfiles de expresión pangenómicos y estudios de asociación genética (Herz y Beffert, 2000; Mattson, 2004; Ballatore *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Este enfoque incluye una serie de etapas consecutivas:

- 45 - en primer lugar, los genes asociados de manera funcional o genética con AD, se agrupan en unidades funcionales descritas anteriormente, relevantemente pequeñas, que representan módulos mínimos de transducción de la señalización,
- estos módulos de transducción de la señalización se combinan adicionalmente y se extienden de forma máxima, basándose en el análisis de estudios funcionales disponibles al público, para construir rutas relevantes para la AD,
- 50 - se definen grandes redes funcionales de interacción de rutas de señalización relevantes para AD, y
- se da prioridad a biomarcadores individuales o combinaciones racionales de biomarcadores que representan diferentes redes funcionales para anotación funcional .

Por lo tanto, se selecciona un biomarcador potencial, - ya sea una proteína por sí misma o un producto de cualquier reacción bioquímica catalizada por esta proteína, - y se le da prioridad para estudios de validación, si se ajusta a los siguientes criterios:

- 55 - participación en la ruta de señalización asociada con el inicio y desarrollo de AD,
- participación en la red funcional representa de manera convincente por rutas asociadas con AD,

- facilidad de detección en muestras de paciente.

Después del proceso de búsqueda y procesamiento de datos, se seleccionaron 214 genes como biomarcadores de la AD.

### **B) Identificación de biomarcadores de la invención**

5 Los genes, que identificados a través de los análisis de datos de los inventores están asociados con la enfermedad Alzheimer, constituyen biomarcadores valiosos para la caracterización de la afección del paciente y para permitir la identificación o subclasificación de la enfermedad.

Un análisis de ELISA de varias muestras de plasma humano se usa para caracterizar biomarcadores de la invención.

#### **10 Muestra de plasma**

La sangre se extrae, con métodos convencionales, de personas no enfermas, personas con riesgo de desarrollar AD, y pacientes con AD que se están sometiendo uno a un tratamiento. Las muestras se diluyen en un volumen igual de EDTA (conc) como un anticoagulante y a continuación se centrifugan (4 °C, 1300 RCF). Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y se congelan en nitrógeno líquido. A continuación, las muestras se almacenan a -80 °C.

#### **15 Análisis de muestras con ELISA**

El ELISA de sándwich convencional en microplaca de 96 pocillos se realiza para cuantificar el nivel medio de biomarcadores de la invención en conjuntos de muestras de plasma de pacientes enfermos (control) o no enfermos. Este análisis de alto rendimiento se realiza usando una estación de trabajo automatizada de ELISA.

20 Básicamente, el procedimiento es casi el mismo que para el ELISA de sándwich convencional: las placas de PVC se revisten primero con anticuerpos de captura diluidos en PBS (1 µg por pocillo, una noche a 4 °C), después de una etapa de lavado (en PBS), a continuación, las placas se bloquean con un tampón de PBS que contiene BSA al 3 % durante una noche a 4 °C.

A continuación, las placas se incuban con una solución de plasma/PBS valorada durante una noche a 4 °C.

25 Después de una etapa de lavado, los anticuerpos de detección de ratón monoclonal se diluyen en tampón de bloqueo y se incuban en los pocillos de la placa durante 2 horas.

Después de otra etapa de lavado, se realiza una última etapa de bloqueo en solución de metanol con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % (para evitar la contaminación residual de la muestra con peroxidasa). Después de una etapa de lavado con PBS, las placas se incuban con anticuerpos de detección anti ratón policlonal, acoplados a HRP durante dos horas.

30 Después de una etapa de lavado, se aplican 0,5 mg/ml de solución de OPD en tampón de citrato y fosfato y se complementa con una milésima parte de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % durante 10-15 min. Se añade un volumen igual de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M) y a continuación se mide la DO<sub>490</sub> en cada pocillo.

#### **Análisis de datos a partir de análisis proteómico.**

35 El análisis proteómico (ELISA, mencionado anteriormente) de varias muestras de plasma humano permite a los inventores clasificar los 214 genes que codifican los biomarcadores en circulación identificados a partir del análisis de búsqueda y procesamiento de datos de los inventores, y opcionalmente determinar qué proteína o conjunto de proteínas pueden constituir una firma específica para la AD: En primer lugar, se aplicó un análisis de gen a gen en un conjunto de muestras de entrenamiento; este análisis se basa en el Bosque Aleatorio (Díaz-Uriarte & Álvarez de Andrés, 2006) que clasifica genes a partir de los más discriminantes (gen<sub>1</sub>) entre casos y controles con respecto al último al menor (gen<sub>214</sub>).

40 A partir de este análisis, se identificó un conjunto de 24 genes como los mejores biomarcadores: La variación del nivel de proteína correspondiente permite el diagnóstico de la enfermedad con una precisión de un 60 %. Los genes restantes se agrupan en otros dos listados: se encuentra una variación significativa en el nivel de proteína de 51 genes en un 50 a un 60 % de sueros de pacientes enfermos mientras que entre un 40 % y un 50 % de los sueros muestran una variación significativa para los 139 genes restantes (Tabla 4).

gen	conj.	gen	conj.	gen	conj.	gen	conj.
AIM	++	DAAM1	+	LETMD1	+	PSD3	+
ABCC4	+	DGKZ	+	LIFR	+	PTGSI	+
AOC2	+	DLG3	+	LRP1	++	PTK2	++
ACHE	++	DOCK1	+	LRP2	+	PTK2B	+
ACTN1	+	DOCK3	++	LRP6	+	PTPRF	+
ADAM12	+	EDN1	++	LRP8	+++	PTPRG	+
ADPA1A	+	EGF	+	LTBP1	+	PTPRM	+
AKAP13	+	EGFR	+	MADH1	+	RELN	+
ALCAM	+	EPB41L1	+	MAME3	+	RET	+
ALDH2	++	ERBB4	+++	MAP1	++	RIN1B1	+
ANXA1	++	ERC1	+	NMMP1	+	ROBO1	+++
ANXA3	+	F13A1	++	NMMP3	+	ROCK1	+
APBA1	+++	F2	+	NMMP9	++	RPS6KA1	+
APCA1	++	F3	+++	NSR1	+	RPS6KA2	+
ARHGEF11	+	FAS	+	MTOR	+++	RPS6KB1	+
ARHGEF12	+	FER1L3	+	NUC1	+	RYR2	++
ATF3	+	FES	+	NYO10	+	SCN9A	+
ATG7	+++	FGF2	++	NCAM1	+	SEMA3E	+++
ATM	+	FKEP1A	+	NCK1	+	SEMA5A	++
AIP1A3	++	FLNA	+++	NFATC2	++	SERPINA5	+
AIPNV1C1	+	FLNB	++	NGF	+	SERPINA6	++
ATR	+	FSTL5	+	NISCH	+	SERPENB2	++
BAP1	+	FYN	+++	NOS1	+	SERPINC1	+
BECN1	+++	GABRB2	++	NOS3	++	SERPIND1	++
BGLAP	+	GFR3	+	NOTCH2	+	SERPINE1	+
BN1	+	GFR4	+	NOTCH3	++	SERPINE2	+
BRP1	+	GRI1	+	NPPA	+	SNAP25	+
BSN	+	GRIN2B	+++	NPPB	++	SPP1	+
CACNA1D	+	GRIP1	+	NPPC	+++	SREBF2	+
CALCB	+	GUCY2D	+	KRFP1	+	STAT3	++
CASK	++	HGF	+	KRP1	+++	STAT6	+
CASP8	++	HIPK1	+	NTF5	+	SVTB	+
CD4	+++	HMBX1	+	OPRM1	+	TGFB1	+++
CD42BFB	+	HRG	+	PCAF	+	THBS1	+++
CDH1	++	HSP90B1	+	PCLO	+	THBS2	++
CDH12	+	HSPA5	+	PDE3A	+	TIMP1	+
CDH13	+	HYOU1	+	PDE3A	+	TNF	++
CDH2	+++	IGF2	+	PDGFA	++	TNFSF11	+
CDH5	++	IL16	+	PDGFB	++	TP53	++
CDKN1A	++	IL20	+++	PDGFC	+++	TRIO	+
CHAT	++	IL6T	+	PRKP	+	TRPC4	++
CHEK1	+	IL3	+	PIK3CA	+	TSC1	++
CHL1	+	IL5	+	PIK3CB	++	TSC2	+
CLTC	+	IPPK	+	PLAD3A	+	UBE3A	+
COL18A1	+++	IQGAP1	+	PLAT	+	VCL	+
COL1A3	+	IQGAP2	+	PLAU	++	VEGFA	++
COPSTB	+	ITGA1	++	PLG	+	VEGFR1	+++
CSF1	+	ITGA9	+	PLNDC2	++	VIL2	+
CSH1	+	ITPR1	+++	PLNNA2	++	WASPIP	+
CSNK1A3	+	ITK1	+	PRKG1	++	WVWVX	+++
CYNN2	+	LAMA1	++	PRL	+	NDH	+
CYNN2	++	LAMA3	++	PRLR	+	ZFNK1B	+
CUL1	+	LEP	+	PRNP	++		
CYP11A1	+	LEPR	++	PSAP	+		

Tabla 4: Clasificación de biomarcadores en circulación

+++ : conjunto preferido de 24 biomarcadores comprendido en un conjunto para diagnóstico de AD;

++ : grupo de 51 biomarcadores, una variación significativa del mismo se encuentra en un 50 % a un 60 % de las muestras de pacientes enfermos;

5 + : grupo de 139 biomarcadores, una variación significativa del mismo se encuentra en un 40 % a un 50 % de muestras de pacientes enfermos.

### C) Otros métodos de identificación y cuantificación, a partir de muestras biológicas, de biomarcadores de la presente invención.

10 Los métodos que se exponen a continuación tienen como objetivo la detección de biomarcadores identificados en la presente invención en fluidos biológicos de pacientes que padecen lesiones cerebrales. La cuantificación de biomarcadores se puede usar a continuación para precisar el diagnóstico de lesiones cerebrales de cualquier tipo y/o para controlar la respuesta del paciente a un tratamiento, y/o para identificar los compuestos que modulan la expresión de estos biomarcadores *in vivo* o *in vitro*.

15 Las muestras biológicas se toman de voluntarios sanos (controles), con edades, género, condición física similares y de pacientes con lesión cerebral. Las comparaciones de estas muestras biológicas permiten detectar grupos de biomarcadores que caracterizan la condición del paciente y permiten identificar o subclasificar la enfermedad.

La detección y cuantificación adecuada de biomarcadores se necesita para reducir la complejidad de las muestras biológicas antes de realizar el análisis de los biomarcadores.

#### I) Procesamiento de muestras

20 En primer lugar, se usaron columnas de cromatografía de agotamiento disponibles en el mercado para eliminar o reducir marcadores de la muestra no relevantes o sobre representados. A continuación, se pueden usar técnicas de rutina para fraccionar muestras en fracciones que contengan biomarcadores con propiedades de unión similares u otras características fisicoquímicas. Como un ejemplo, en la técnica se conocen bien algunas técnicas de cromatografía líquida (ción por tamaño, intercambio iónico, afinidad por heparina, ...). En la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), se aplica una alta presión en la columna de separación una vez que la muestra se carga. La HPLC normalmente proporciona una mejor separación de los biomarcadores que la cromatografía líquida común.

##### a) Técnicas de cromatografía

##### Cromatografía por exclusión

30 La cromatografía por exclusión se podría usar para dividir una muestra de acuerdo con el tamaño de las partículas/moléculas. Las proteínas de alto peso molecular se eluyen en las primeras fracciones de elución, con las últimas conteniendo un porcentaje más elevado de moléculas pequeñas (las columnas de exclusión por tamaños disponibles en el mercado pueden ser Columnas de Filtración en BIO Gel Discovery<sup>®</sup> o Columnas de Filtración en Gel TSK-GEL, Sigma Aldrich)

##### Cromatografía de intercambio iónico

35 Una muestra se divide mediante cromatografía de intercambio iónico que permite la separación de moléculas de acuerdo con sus características de carga. Las resinas de intercambio iónico están disponibles en el mercado y permiten el fraccionamiento de una muestra en fracciones de elución clasificadas de acuerdo con su pH. Las columnas de intercambio aniónico se usa para separar proteínas con carga negativa, péptidos así como polinucleótidos; las columnas de intercambio catiónico se usa para separar proteínas que tienen una carga globalmente positiva, (por ejemplo, Columnas de intercambio catiónico o aniónico TSK-GEL de TosoH Corp., Sigma Aldrich)

##### Cromatografía de Bioafinidad

Las propiedades de interacción de los biomarcadores, con proteínas, metabolitos, etc., se pueden usar para separarlos.

45 Como un ejemplo, se usa cromatografía con heparina sobre la base de interacción de afinidad con heparina y características de carga. La heparina, un mucopolisacárido sulfatado, se unirá a marcadores con restos cargados con carga positiva. Por lo tanto, una muestra se eluye de manera secuencial, con cada eluyente teniendo diferente pH o concentraciones de sal: es probable que el eluyente que tiene un pH ácido esté cargado con carga débilmente positiva mientras que una fracción que tiene un pH elevado está cargada con carga fuertemente positiva.

50 Una muestra se puede separar mediante aislamiento de proteínas que tengan una característica específica, por ejemplo modificación después de la traducción tal como glicosilación. Por ejemplo, una muestra de fluido cerebroespinal se carga sobre una columna de cromatografía con lectina (que tiene una afinidad elevada hacia los azúcares): las proteínas glicosilada se unirán a la columna de lectina y las proteínas no glicosiladas pasarán a través del flujo continuo. Las proteínas glicosilada se eluyen a continuación de la columna de lectina con un eluyente que

contiene un azúcar, por ejemplo, N-acetil-glucosamina y están disponibles para análisis adicional.

Cromatografía en serie

5 Una forma eficaz para dividir una muestra es avanzar a estas acciones secuenciales realizando etapas sucesivas de cromatografía que se basan en diferentes técnicas de separación. En cada etapa, se pueden analizar los marcadores retenidos o eluidos.

b) Técnicas de electroforesis en gel

Los biomarcadores en una muestra se separan de acuerdo con su masa molecular realizando una Electroforesis en Gel de SDS PoliAcrilamida (conocida como SDS-PAGE). La electroforesis en gel de dos dimensiones (2D-PAGE) es un electroforesis de dos etapas que se puede usar para analizar mezclas de proteínas.

10 La primera etapa es el enfoque isoeléctrico. Las proteínas se cargan en un gel que tiene un gradiente de pH de la parte superior a la inferior. Las proteínas migran a continuación a través del gel hasta que alcanzan su punto isoeléctrico. La segunda etapa es una SDS PAGE convencional: las proteínas separan a continuación de acuerdo con su Masa Molecular. Los biomarcadores separados de este modo en el gel de dos dimensiones se pueden detectar usando cualquier método conocido que se conozca bien en la técnica. Por ejemplo, los biomarcadores en un gel se pueden etiquetar o teñir (por ejemplo, tinción con Azul de Coomassie o con plata).

15 La comparación de un gel de 2D de referencia con un gen de 2D correspondiente con una muestra de un paciente enfermo permite la identificación de biomarcadores presentes o ausentes y además la determinación de la proporción de expresión relativa de biomarcadores de interés. Las aplicaciones puntuales de los biomarcador ex se pueden analizar adicionalmente mediante análisis de densitometría o espectrometría de iones en fase gaseosa usando cualquier técnica adecuada, tal como MALDI (véase II).

**II) Identificación y análisis cuantitativo de biomarcadores**

a) Biochips

Micromatrices de proteína

25 El uso de Biochip de proteína es de interés en particular para determinar la identidad y la expresión de un conjunto de biomarcadores presentes en una muestra biológica.

30 Los biomarcadores una muestra biológica se capturan primero con agentes de captura representados en la superficie de la micromatriz. Los agentes de captura pueden ser no específicos: éstos usan el mismo principio que las técnicas de cromatografía basándose en el uso de propiedades fisicoquímicas de moléculas (pH, carga, hidrofobia, etc.). A continuación, se usa espectrometría para identificar biomarcadores que se han retenido con agentes de captura. Esta técnica, denominada SELDI MS, es útil para análisis de alto rendimiento de una muestra compleja, que proporciona niveles de expresión de un gran conjunto de biomarcadores e identifica el biomarcador(s) relevante en una mezcla de moléculas.

35 Los agentes de captura también pueden ser específicos de biomarcadores desconocidos. Los anticuerpos, proteínas presa, aptámeros, ..., se podrían usar para generar "biochip de proteína" dedicado a la detección y/o cuantificación de biomarcadores que se están buscando.

40 La tecnología de micromatrices de anticuerpos se deriva de los inmunoensayos de captura o de captura competitiva, de tipo sándwich, (véase a continuación). Los anticuerpos se unen en orden a una superficie de la micromatriz. La muestra acondicionada opcionalmente o parcialmente purificada (véase I), se incuba con la micromatriz. A continuación, la mezcla se lava y el complejo de anticuerpo-biomarcador se detecta con un reactivo específico tal como un anticuerpo secundario etiquetado con perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS.TM.), colorantes fluorescentes, radioetiquetas, enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas normalmente en un ELISA), y etiquetas colorimétricas tales como perlas de oro coloidal o vidrio coloreado o de plástico.

45 Los biochips de proteína están disponibles en el mercado para búsqueda de familias de proteínas o rutas celulares específicas (por ejemplo, BioRay (Norcross, Georgia); Sigma Aldrich's micromatrices de panorama) o se pueden diseñar a demanda (por ejemplo, Primorigen biosciences (Madison, Wisconsin); Arrayit Corporation (Sunnyvale, California); MicroBioChips Sas (París, Francia)).

Chips de ADN

Los chips de ADN se usan para dos aplicaciones.

50 En primer lugar, permiten una cuantificación de la expresión genética del nivel de ARN, también denominada formación de perfiles de expresión genética. La formación de perfiles de expresión genética consiste en medir los niveles de expresión del ADNc de miles de genes. Los genes cuya expresión se ve influida por una patología o un

tratamiento se pueden identificar de este modo y usar como biomarcadores (King y Sinha, 2001, Ghanem *et al.*, 1992). Los chips de ADN se pueden usar como un enfoque complementario para detectar la variabilidad en la expresión de biomarcadores potenciales.

5 Los chips de ADN también se pueden usar para detectar polimorfismos, por ejemplo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) o microdeleciones, permitiendo la identificación de marcadores genéticos asociados con la enfermedad.

El genoma se puede identificar sistemáticamente de este modo para la presencia de polimorfismos asociados con una enfermedad o una respuesta al tratamiento, convirtiéndose en biomarcadores útiles. (Anderson *et al.*, 2006, Shi, 2001; Chial, 2008).

#### 10 b) Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) se puede usar a identificar un biomarcador o biomarcadores purificados presentes en una fracción de muestra obtenida durante el procesamiento de la muestra. Los biomarcadores de proteína se pueden someter a proteólisis antes del análisis. Los fragmentos resultantes de esta digestión reflejan la identidad de los biomarcadores, permitiendo de este modo su análisis. Esto es particularmente útil para distinguir diferentes marcadores con masas moleculares similares (purificados a partir de un SDS PAGE por ejemplo) o presentes en una misma fracción de elución. La proteólisis amén es útil para marcadores con peso molecular elevado que se pueden resolver menos fácilmente mediante espectrometría de masas que los marcadores más pequeños. Algunas proteasas, tales como tripsina, que escinden los marcadores en un número de fragmentos separados están disponibles en el mercado.

20 Puede ser necesario modificar los biomarcadores de proteínas modificados después de la traducción para aumentar la resolución de la detección. Por ejemplo, se puede usar neuraminidasa para retirar restos de ácido siálico terminales de glicoproteínas, aumentando de este modo la unión a un adsorbente aniónico y aumentando la resolución de la detección.

25 Varias mejoras en técnicas de espectrometría de masas se pueden usar para identificar biomarcadores presentes en una muestra: espectrometría de masas en tándem (MS-MS), ionización por electronebulización, espectrometría de masas de desorción por láser, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-MS), MALDI-TOF-MS.

Estas técnicas son útiles para detectar los biomarcadores de la presente invención una vez que la complejidad de una muestra se ha reducido sustancialmente usando los métodos de preparación descritos anteriormente.

30 La espectrometría de masas de desorción por láser de aumento de superficie (SELDI-MS) representa una mejora con respecto a MALDI para el fraccionamiento y detección de biomoléculas presentes en una cantidad de vivir en mezclas complejas. En la técnica de SELDI-MS, las biomoléculas, tales como proteínas, se capturan en la superficie de un biochip de proteína usando reactivos de captura que se unen en el biochip. Al igual que en las técnicas de cromatografía mencionadas anteriormente, los reactivos de captura se usan para reducir la complejidad de una muestra biológica, usando propiedades fisicoquímicas de las biomoléculas (revisado en De Bock M, 2010; documento de Patente de Estados Unidos n.º 6528320 (Hutchens e Yip)).

#### 35 c) Inmunoensayos

Algunos biomarcadores también se pueden detectar, identificar y cuantificar a partir de fluidos biológicos con inmunoensayos, usando sus propiedades para actuar como un antígeno. Algunos anticuerpos específicos para los biomarcadores de interés se pueden producir usando métodos que se usan en la actualidad están disponibles en el mercado (Véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988)). El nivel de expresión de los biomarcadores se determina mediante la representación de valores absolutos con respecto a una curva patrón (realizada a partir de una proteína de la que se sabe que está presente en una muestra). Algunos inmunes a los de este tipo pueden ser, por ejemplo: radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos de fluorescencia y similares. Los ensayos de este tipo son de rutina y se conocen bien en la técnica (Véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988)).

50 La MS es útil para detectar y cuantificar cualquier tipo de biomarcador, proteína, y además carbohidratos, lípidos o biomolécula de cualquier tipo: la MS se puede usar para realizar análisis metabólicos (Boccard J. *et al.*, 2010). Los resultados con los estudios metabólicos o proteómicos realizados usando, por ejemplo, MS o chips de proteínas se pueden mejorar usando biomarcadores identificados a partir de datos genómicos obtenidos con matrices de ADN (así como nivel de expresión de ARN, o datos de polimorfismo).

55 Resultados: Identificación de conjuntos de biomarcadores de AD.

Los inventores han identificado numerosas combinaciones de biomarcadores de AD usando técnicas de cromatografía y micromatrices de proteínas como se ha descrito anteriormente. Los conjuntos de biomarcadores de AD más preferentes contienen biomarcadores enumerados en la Tabla 4.

5 **D) Métodos de detección de la presencia por riesgos de AD en una muestra de plasma humano usando biomarcadores de la invención.**

**I) Diagnóstico de la AD usando ensayo de ELISA**

10 Las muestras de sangre se recogen con métodos convencionales de personas que desean evaluar el riesgo de AD o la presencia de AD. La muestra de control se prepara a partir de la mezcla de varias muestras de sangre de voluntarios sanos. Las muestras se diluyen en un volumen igual de EDTA (conc) como un anticoagulante, y a continuación se centrifugan (4 °C, 1300 RCF). Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y se congelan en nitrógeno líquido. A continuación, las muestras se almacenan a -80 °C.

15 El protocolo de ELISA se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en la parte B). En primer lugar, las placas de PVC se revisten con anticuerpos para cada uno de los 24 biomarcadores preferidos enumerados en la Tabla 4. Estos anticuerpos se diluyen en PBS (1 µg por pocillo, una noche a 4 °C), después de una etapa de lavado (en PBS), a continuación, las placas se bloquean con un tampón de PBS que contiene BSA al 3 % durante una noche a 4 °C.

20 El ELISA de tipo sándwich se realiza en micro placas de 96 potrillos convencionales para cuantificar el nivel de biomarcadores de la invención en muestras de plasma de pacientes sometidos a ensayo. Este análisis de alto rendimiento se realiza usando una estación de trabajo de ELISA automatizada. Las placas se incubaron a continuación con una solución de plasma/PBS valorada durante una noche a 4 °C.

25 Después de una etapa de lavado, los anticuerpos de detección de ratón monoclonal se diluyen en tampón de bloqueo y se incuban en los pocillos de la placa durante 2 horas. Después de otra etapa de lavado, se realiza una última etapa de bloqueo en solución de metanol con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % (para evitar la contaminación residual de la muestra con peroxidasa). Después de una etapa de lavado con PBS, las placas se incuban con anticuerpos de detección anti ratón policlonal, acoplados a HRP durante dos horas.

Después de una etapa de lavado, se aplican 0,5 mg/ml de solución de OPD en tampón de citrato y fosfato y se complementa con una milésima parte de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % durante 10-15 min. Se añade un volumen igual de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M) y la unión de anticuerpo/proteínas se evalúa con la medida de la DO<sub>490</sub> en cada pocillo para cada una de las 24 proteínas biomarcadoras.

30 Por último, el riesgo de AD o la presencia de AD se determina mediante evaluación del perfil de unión de proteínas biomarcadoras para capturar anticuerpos (es decir, número e identidad de biomarcadores para los que se observa una diferencia significativa en el nivel de proteína entre muestras de ensayo y de control) determinando si la variación del nivel de proteína correspondiente está de acuerdo con las variaciones del nivel que se han observado durante la etapa de identificación de los biomarcadores.

35 **II) Diagnóstico de AD usando micromatrices de ADN**

El protocolo clásico se usa para detección de secuencias de ADN con micromatriz de ADN. Las muestras de sangre de pacientes que desean su diagnóstico para el riesgo de AD por la presencia de AD se recogen en tubos de ARN en sangre PAXgene (Qiagen). Las muestras de sangre extraídas de pacientes sanos se recogen, se mezclan para constituir la muestra de referencia que se trata como la muestra de sangre a diagnosticar.

40 El ARN total se extrae de estas muestras usando el Kit de ARN en sangre PAXgene (Qiagen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

El ARN total se cuantifica, y de 5 µg a 10 µg de ARN se transcriben de forma inversa. El ADNc de ds se sintetiza. A continuación se realiza la transcripción *in vitro* usando aa dUTP, y los ARNa se etiquetan indirectamente con ésteres de Cy-colorantes.

45 Los chips de ADN que contienen sondas de ADN complementarias con la secuencia de nucleótidos que codifica cada uno de los 24 biomarcadores se usaron para detección de la presencia o el riesgo de la AD. Cada portaobjetos se hibrida con los ARNa etiquetados de la muestra a diagnosticar con respecto a los ARNa etiquetados de la muestra de referencia. Se realizan indicaciones de intercambio de colorante. La hibridación de la sonda-diana se detecta y se cuantifica y de la formación de perfiles de expresión genética se evalúa. La presencia o el riesgo de la AD se calcula como una función del número de biomarcadores, cuya expresión se altera en comparación con su expresión en pacientes sanos.

**Referencias**

Acevedo LM, Barillas S, Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood* 2008; 111 (5): 2674-2680.

- Anderson JE, Hansen LL, Mooren FC, Post M, Hug H, Zuse A, Los M. Methods and biomarkers for the diagnosis and prognosis of cancer and other diseases: towards personalized medicine. *Drug Resist Updat.* 2006; 9 (4-5): 198-210.
- 5 Ausubel eds 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad.
- Ballatore C, Lee VM *et al.* Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neurosci* 2007; 8: 663-672.
- Ballatore C, Lee V.M., *et al.* (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8 (9): 663-72.
- 10 Blenow K, Davidsson P, Wallin A, Ekman R. Chromogranin A in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for synaptic degeneration in Alzheimer's disease? *Dementia.* 1995; 6 (6): 306-11.
- Boccard J, Veuthey JL, Rudaz S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. *J Sep Sci.* 2010; 33 (3): 290-304.
- 15 Brose K, Tessier-Lavigne M. Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; 10 (1): 95-102.
- Burbach GJ, Hellweg R, Haas CA, Del Turco D, Deicke U, Abramowski D, Jucker M, Staufenbiel M, Deller T. Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *J Neurosci.* 2004; 24 (10): 2421-30.
- 20 Cao G, Savani RC *et al.* Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis. *Am J Pathol.* 2006; 169 (1): 325-336.
- Cao R, Brakenhielm E *et al.* Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98 (11): 6390-6395.
- Chial, H. (2008) Rare genetic disorders: Learning about genetic disease through gene mapping, SNPs, and microarray data. *Nature Education* 1 (1).
- 25 Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5 (9): 677-85.
- Davidsson P, Westman-Brinkmalm A, Nilsson CL, Lindbjerg M, Paulson L, Andreasen N, Sjogren M, Blenow K. Proteome analysis of cerebrospinal fluid proteins in Alzheimer patients. *Neuroreport.* 2002 16; 13 (5): 611-5.
- De Bock M, de Seny D, Meuwis MA, Chapelle JP, Louis E, Malaise M, Merville MP, Fillet M. Challenges for biomarker discovery in body fluids usando SELDI-TOF-MS. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010.
- 30 Diaz-Uriarte R. y Alvarez de Andrés S. *BMC Bioinformatics.* 2006; 7: 3.
- Elovaara I. Proteins in serum and cerebrospinal fluid in demented patients with Down's syndrome. *Acta Neurol Scand.* 1984; 69 (5): 302-5.
- 35 English D, Kovala AT *et al.* Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res.* 1999; 8 (6): 627-634.
- Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RM, Michalski B. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl.* 2002; (62): 241-52.
- Ferrara N, Gerber H *et al.* The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9 (6): 669-676.
- 40 Fiedler U, Krissl T *et al.* Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem.* 2003; 278 (3): 1721-1727.
- Fukushima N, Weiner JA *et al.* Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 20 (2): 271-282.
- 45 Ge G, Fernandez CA *et al.* Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor". *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104 (24): 10010-10015.
- Guan KL, Rao Y. Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4 (12): 941-956.

- Ghanem N, Fanen P, Martin J, Contevelle P, Vahia-Cherif Z, Vidaud M, Goossens M. Exhaustive screening of exon 10 CFTR gene mutations and polymorphisms by denaturing gradient gel electrophoresis: applications to genetic counselling in cystic fibrosis. *Mol Cell Probes*. 1992; 6 (1): 27-31.
- 5 Harigaya Y, Shoji M, Nakamura T, Matsubara E, Hosoda K, Hirai S. Alpha 1-antichymotrypsin level in cerebrospinal fluid is closely associated with late onset Alzheimer's disease. *Intern Med*. 1995; 34 (6): 481-4.
- Harrington MG, Aebersold R, Martin BM, Merrill CR, Hood L. Identification of a brain-specific human cerebrospinal fluid glycoprotein, beta-trace protein. *Appl Theor Electrophor*. 1993; 3 (5): 229-34.
- Herz J, Beffert U. Apolipoprotein e receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neurosci* 2000; 1: 51 - 58.
- 10 Hiraoka A, Arato T, Tominaga I, Eguchi N, Oda H, Urade Y. Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic analysis of molecular mass microheterogeneity of beta-trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J Chromatogr A*. 1998; 802 (1): 143-8.
- Hiraoka A, Seiki K, Oda H, Eguchi N, Urade Y, Tominaga I, Baba K. Charge microheterogeneity of the beta-trace proteins (lipocalin-type prostaglandin D synthase) in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders analyzed by capillary isoelectrofocusing. *Electrophoresis*. 2001; 22 (16): 3433-7.
- 15 Hoekman K, Van Nieuwkoop JA, Willemze R. The significance of beta-2 microglobulin in clinical medicine. *Neth J Med*. 1985; 28 (12): 551-7.
- Hong K, Hinck L *et al*. A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 1999; 97: 927-941.
- 20 Hsieh MY, Chen WY *et al*. Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner. *Genes Immun*. 2006; 7 (3): 234-242.
- Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lerner RA. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*. 1989; 246 (4935): 1275-81.
- 25 Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *J Neural Transm Suppl*. 1998; 53: 169-80.
- Kawashima M, Suzuki SO, Yamashima T, Fukui M, Iwaki T. Prostaglandin D synthase (beta-trace) in meningeal hemangiopericytoma. *Mod Pathol*. 2001; 14 (3): 197-201.
- 30 King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls. *JAMA*. 2001; 286 (18): 2280-8.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 7; 256 (5517): 495-7.
- Kudo T, Iqbal K, Ravid R, Swaab DF, Grundke-Iqbal I. Alzheimer disease: correlation of cerebro-spinal fluid and brain ubiquitin levels. *Brain Res*. 1994; 639 (1): 1-7.
- 35 Leeuwen FN, Kain HE *et al*. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol*. 1997; 139 (3): 797-807.
- Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F. Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer disease patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60 (1): 94-104.
- 40 Li H, Wetten S *et al*. Candidate Single-Nucleotide Polymorphisms From a Genomewide Association Study of Alzheimer Disease. *Arch Neurol*. 2008; 65 (1): 45-53.
- Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 2002; 113 (3): 607-15.
- Mase M, Yamada K, Iwata A, Matsumoto T, Seiki K, Oda H, Urade Y. Acute and transient increase of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) level in cerebrospinal fluid of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett*. 1999; 270 (3): 188-90.
- 45 Mase M, Yamada K, Shirnazu N, Seiki K, Oda H, Nakau H, Inui T, Li W, Eguchi N, Urade Y. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in cerebrospinal fluid: a useful marker for the diagnosis of normal pressure hydrocephalus. *Neurosci Res*. 2003; 47 (4): 455-9.
- Maslah E, Mallory M, Alford M, Deteresa R, Saitoh T. PDGF is associated with neuronal and glial alterations of

- Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1995; 16 (4): 549-56.
- Matsubara E, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K. Alpha 1-antichymotrypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type dementia. *Ann Neurol*. 1990; 28 (4): 561-7.
- 5 Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004; 430: 631-639.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan MS, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984; 34 (7): 939-44.
- 10 Melegos DN, Freedman MS, Diamandis EP. Prostaglandin D synthase concentration in cerebrospinal fluid and sero of patients with neurological disorders. *Prostaglandins*. 1997; 54 (1): 463-74.
- Merched A, Serot JM, Visvikis S, Aguillon D, Faure G, Siest G. Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry. *FEBS Lett*. 1998; 425 (2): 225-8.
- 15 Moriya J, Minamino T *et al*. Semaphorin 3E/Plexin D1 as a Novel Target for Therapeutic Angiogenesis. *Circulation* 2007; 116 (11): 231.
- Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism. *PNAS USA* 2006; 103 (17): 6530-6535.
- Noren NK, Pasquale EB. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell Signal*. 2004; 16 (6): 655-666.
- 20 Park SY, Jeong KJ *et al*. Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 alfa and VEGF expression: their inhibition by resveratrol". *Cancer Lett*. 2007; 258 (1): 63-69.
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol*. 1999; 56 (3): 303-8. Erratum in: *Arch Neurol* 1999; 56 (6): 760.
- 25 Potter H, Wefes IM, Nilsson LN. The inflammation-induced pathological chaperones ACT and apo-E are necessary catalysts of Alzheimer amyloid formation. *Neurobiol Aging*. 2001; 22 (6): 923-30.
- Power DA, Noel J, Collins R, O'Neill D. Circulating Leptin Levels and Weight Loss in Alzheimer's Disease Patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001; 12: 167-170.
- Riisøen H. Reduced prealbumin (transthyretin) in CSF of severely demented patients con Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 1988; 78 (6): 455-9.
- 30 Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, Matarese G. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest*. 2003; 111 (2): 183-5.
- Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997; 63 (4): 506-8.
- 35 Shi M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin Chem*. 2001; 47 (2): 164-72.
- Skoog I, Wallin A, Fredman P, Hesse C, Aevarsson O, Karlsson I, Gottfries CG, Blennow K. A population study on blood-brain barrier function in 85-year-olds: relation to Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurology*. 1998; 50 (4): 966-71.
- 40 Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1654 (1): 13-22.
- Stein E, Tessier-Lavigne M. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* 2001; 291: 1928-1938.
- Suh Y.H. y Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alfa-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*. 54 (3): 469-525.
- 45 Tsuzuki K, Fukatsu R, Yamaguchi H, Tateno M, Imai K, Fujii N, Yamauchi T. Transthyretin binds amyloid beta peptides, Abeta1-42 and Abeta 1-40 to form complex in the autopsied human kidney - possible role of transthyretin for abeta sequestration. *Neurosci Lett*. 2000; 281 (2-3): 171-4.
- Wang GP, Iqbal K, Bucht G, Winblad B, Wisniewski HM, Grundke-Iqbal I. Alzheimer's disease: paired helical

filament immunoreactivity in cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol.* 1991; 82 (1): 6-12.

Ward ES, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature.* 1989; 341 (6242): 544-6. West DC, Hampson IN *et al.* Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 1985; 228 (4705): 1324-1326.

- 5 Winning RS, Ward EK *et al.* EphA4 catalytic activity causes inhibition of RhoA GTPase in *Xenopus laevis* embryos. *Differentiation* 2002; 70 (1): 46-55.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de riesgo de enfermedad de Alzheimer (AD) en un mamífero vivo, o para ayudar en el diagnóstico y subclasificación de AD, método que comprende determinar la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de un conjunto de biomarcadores diana en una muestra de fluido biológico de dicho mamífero y comparar el nivel medido del biomarcador(es) con un valor de referencia, en donde una desviación de dicho valor de referencia es indicativo de la presencia, riesgo, progresión o gravedad de AD, y en donde dicho conjunto de biomarcadores comprende una proteína o ácido ribonucleico (ARN) codificado por cada uno de los siguientes genes: APBA1, ATG7, BECN1, CD44, CDH2, COL18A1, ERBB4, F3, FLNA, FYN, GRIN2B, IL20, ITPR1, LRP8, MTOR, NPPC, NRP1, PDGFC, ROBO1, SEMA3E, TGFB1, THBS1, VEGFR1 y WWOX.
2. Un método para predecir y/o evaluar la respuesta de un mamífero a un tratamiento frente a AD o la eficacia de un tratamiento de este tipo en un sujeto, método que comprende determinar la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de un conjunto de biomarcadores diana en una muestra del mamífero y comparar el nivel medido del biomarcador(es) con un valor de referencia, en donde una desviación de dicho valor de referencia es indicativo de la respuesta de dicho sujeto o de la eficacia del tratamiento, y en donde dicho conjunto de biomarcadores comprende una proteína o ARN codificado por cada uno de los siguientes genes: APBA1, ATG7, BECN1, CD44, CDH2, COL18A1, ERBB4, F3, FLNA, FYN, GRIN2B, IL20, ITPR1, LRP8, MTOR, NPPC, NRP1, PDGFC, ROBO1, SEMA3E, TGFB1, THBS1, VEGFR1 y WWOX.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el conjunto de biomarcadores comprende adicionalmente al menos una proteína o ARN codificado por un gen seleccionado de: A2M, ACHE, ALDH2, ANXA1, APOA1, ATP2A3, CASK, CASP8, CDH1, CDH5, CDKN1A, CHAT, CTNND2, DOCK3, EDN1, F13A1, FGF2, FLNB, GABRB2, ITGA1, LAMA1, LAMA3, LEPR, LRP1, MAP2, MMP9, NFATC2, NOS3, NOTCH3, NPPB, PDGFA, PDGFB, PIK3CB, PLAU, PLXDC2, PLXNA2, PRKG1, PRNP, PTK2, RYR2, SEMA5A, SERPINA6, SERPINB2, SERPIND1, STAT3, THBS2, TNF, TP53, TRPC4, TSC1 y VEGFA.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, en donde el conjunto de biomarcadores comprende adicionalmente al menos una proteína o ARN codificado por un gen seleccionado de: ABCC4, ACC2, ACTN1, ADAM12, ADRA1A, AKAP13, ALCAM, ANXA3, ARHGEF11, ARHGEF12, ATF3, ATM, ATP6V1C1, ATR, BAP1, BGLAP, BIN1, BRIP1, BSN, CACNA1D, CALCB, CDC42BPB, CDH12, CDH13, CHEK1, CHL1, CLTC, COL3A1, COPS7B, CSF1, CSH1, CSNK1A1, CTNNA2, CUL1, CYP11A1, DAAM1, DGKZ, DLG3, DOCK2, EGF, EGFR, EPB41L2, ERC1, F2, FAS, FER1L3, FES, FKBP1A, FSTL5, GFRA3, GFRA4, GH1, GRIP1, GUCY2D, HGF, HIPK1, HMBOX1, HRG, HSP90B1, HSPA5, HYOU1, IGF2, IL16, IL6ST, IL8, INS, IPPK, IQGAP1, IQGAP2, ITGA9, JAK1, LEP, LETMD1, LIFR, LRP2, LRP6, LTBP1, MAD1L1, MAML3, MMP2, MMP3, MSR1, MUC1, MYO10, NCAM1, NCK1, NGF, NISCH, NOS1, NOTCH2, NPPA, NRIP1, NTF3, OPRM1, PCAF, PCLO, PDE3A, PDE5A, PFKP, PIK3CA, PLA2G2A, PLAT, PLG, PRL, PRLR, PSAP, PSD3, PTGS2, PTK2B, PTPRF, PTPRG, PTPRM, RELN, RET, RIMS2, ROCK1, RPS6KA1, RPS6KA2, RPS6KB1, SCN9A, SERPINA5, SERPINC1, SERPINE1, SERPINE2, SNAP25, SPP1, SREBF2, STAT5B, SV2B, TIMP2, TNFSF11, TRIO, TSC2, UBE3A, VCL, VIL2, WASPIP, XDH y ZFHX1B.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la determinación de la cantidad (relativa) o la presencia, ausencia o alteración de dichos biomarcadores es simultánea o secuencial.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la muestra se selecciona entre fluido cerebroespinal, suero, plasma, saliva y orina.
7. Uso de un kit en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende un soporte sólido que comprende agentes de captura unidos al mismo, en donde cada uno de dichos agentes de captura se une a un biomarcador del conjunto de biomarcadores como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.