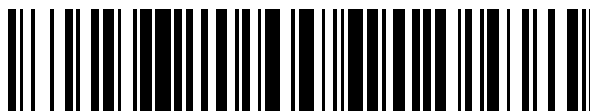


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 881**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2006 E 10011289 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2322934**

54 Título: **Kit para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

11.10.2005 US 246524
11.10.2005 WO PCT/US2005/036014
07.06.2006 WO PCT/US2006/022156

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KHAN, TAPAN KUMAR y
ALKON, DANIEL

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 596 881 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

Kit para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer

5 **SECTOR DE LA PRESENTE INVENCION**

La presente invención se refiere a procedimientos de diagnóstico de la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto utilizando un kit. La presente invención también se refiere a la utilización de dicho kit que implica la detección de alteraciones en la relación de proteínas MAP quinasas fosforiladas específicas en células después de la estimulación con un activador de la proteína quinasa C. Los Biomarcadores Moleculares Específicos de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB) dados a conocer en el presente documento son útiles para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

15 **ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION**

La perturbación de la homeostasis del calcio intracelular, el aumento de los niveles de estrés oxidativo y los mecanismos inflamatorios que resultan en toxicidad excitatoria y muerte neuronal se ha sugerido que contribuyen a la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (AD) (Ito y otros, 1994; Putney, 2000; Yoo y otros, 2000; Sheehan y otros, 1997; De Luigi y otros, 2001; Anderson y otros, 2001; Remarque y otros, 2001). Una serie de anomalías asociadas con AD en los niveles de Ca^{2+} intracelulares y otros procesos celulares se han derivado de los estudios que utilizan la bradiquinina como estímulo. Como potente mediador de la inflamación, la bradiquinina (BK) es producida por las células del cerebro y periféricas en condiciones fisiopatológicas tales como traumatismo, accidente cerebrovascular, isquemia dolorosa y asma (Regoli y otros, 1993; Bockmann y Paegelow, 2000; Ellis y otros, 1989; Kamiya y otros, 1993). Al actuar sobre el receptor de bradiquinina B2 (BK2bR), un receptor acoplado a la proteína G, BK desencadena la conversión de fosfatidilinositol (PI) mediante la actividad de la fosfolipasa C (PLC), que a su vez produce 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3) que aumenta la liberación de Ca^{2+} intracelular de los almacenes sensibles a IP3 (Noda y otros, 1996; Venema y otros, 1998; Wassdal y otros, 1999; Cruzblanca y otros, 1998; Ricupero y otros, 1997; Pascale y otros, 1999). A través de la misma vía, BK también desencadena la producción de otras citoquinas proinflamatorias mediante la activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAP) (Hayashi y otros, 2000; Schwaninger y otros, 1999; Phagoo y otros, 2001). Se ha encontrado un aumento mejorado de los niveles de Ca^{2+} intracelulares en cerebros con AD, así como en células periféricas de AD en respuesta a la estimulación de bradiquinina y la inactivación de canales de K^+ (Etcheberrigaray y otros, 1993, 1998; Hirashima y otros, 1996; Gibson y otros, 1996 (a)).

La estimulación de PLC posterior a la activación de BK2bR también conduce a la producción de diacilglicerol que, junto con el aumento de Ca^{2+} intracelular, activa isoformas de la proteína quinasa C (PKC). La cascada PLC/fosfolípidos- Ca^{2+} /PKC activada por BK interactúa con la vía de señalización Ras/Raf, que activa las quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (Erk 1 y Erk2, a las que se hace referencia en conjunto como "Erk1/2"), un subtipo de la familia de quinasas MAP (Berridge, 1984; Bassa y otros, 1999; Hayashi y otros, 2000; Blaukat y otros, 2000; Zhao y otros. *Neurobiology of Disease* 11, 166-183, 2002). Erk1/2 recibe señales de múltiples vías de transducción de señales y conduce a la proliferación celular y a la diferenciación por la regulación de la expresión génica a través varios factores transcripcionales, incluyendo AP-1, NF- κ B, y de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclica (CREB). Al actuar como una de las quinasas principales, Erk2 fosforila tau en múltiples sitios serina/treonina incluyendo Ser-262 y Ser-356 (Reynolds y otros, 1993; Lu y otros, 1993). Además, la quinasa MAP activada por PKC y las vías asociadas a receptores BK se ha demostrado que regulan la formación y secreción de la forma soluble de la proteína precursora de amiloide (sAPP) por diferentes laboratorios (Desdouts-Magnen y otros, 1998; Gasparini y otros, 2001; Nitsch y otros, 1994, 1995, 1996, 1998). Estos descubrimientos han sugerido la posibilidad de que el procesamiento de sAPP asociado a BK puede estar vinculado a la vía de la quinasa MAP-PKC. Por otro lado, estados patológicos, tales como infecciones virales, aumento de estrés oxidativo, expresión aberrante de APP y exposición a $A\beta$, provocan la activación de la quinasa MAP (Rodems y Spector, 1998; McDonald y otros, 1998; Ekinci y otros, 1999; Grant y otros, 1999) y mejoran la fosforilación tau (Greenberg y otros, 1994; Ekinci y Shea, 1999; Knowles y otros, 1999). Estos efectos implican el desarreglo de una vía o vías de señalización de quinasa MAP en la patogénesis de la AD.

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (tales como Erk1 y Erk2) regulan la fosforilación de la proteína tau asociada a microtúbulos y el procesamiento de la proteína β amiloide, siendo ambos eventos críticos para la patofisiología de la Enfermedad de Alzheimer. La fosforilación de Erk1/2 mejorada y prolongada en respuesta a la bradiquinina se ha detectado en fibroblastos de la Enfermedad de Alzheimer tanto familiar como esporádica, pero no en controles de la misma edad (Zhao y otros. *Neurobiology of Disease* 11, 166-183, 2002). La fosforilación de Erk1/2 sostenida inducida por bradiquinina ha sido encontrada previamente en fibroblastos de la Enfermedad de Alzheimer y es el objeto de la solicitud de Patente internacional WO 02/067764.

El documento WO 03/102016 A2 se refiere a enzimas que inactivan el péptido amiloide para tratar la Enfermedad de Alzheimer. Específicamente, el documento da a conocer la utilización de insulinsina para hidrolizar los péptidos alfa beta que representan una estrategia terapéutica alternativa al tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer. También se describe la utilización de determinados agentes, por ejemplo péptidos de bradiquinina para aumentar la actividad

de la enzima insulinasina y la utilización de un procedimiento de cribado para evaluar el efecto de un compuesto sobre la actividad de una enzima que inactiva el péptido amiloide.

El documento WO 02/067764 A2 da a conocer un procedimiento de diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer en un paciente que comprende determinar si el nivel de fosforilación de una proteína indicadora en células de pacientes después de un estímulo con un compuesto activador es anormalmente elevada en comparación con un nivel de fosforilación basal, siendo la proteína indicadora, por ejemplo, Erk1/2 y siendo el compuesto activador, por ejemplo, bradiquinina.

W. Q Zhao y otros informan en los Resúmenes del Congreso Anual de la Sociedad de Neurociencia, vol. 27, no.1, pág. 924, sobre la disfunción de la señalización de MAP quinasa la Enfermedad de Alzheimer. Se detectó fosforilación de Erk1/2 anormalmente prolongada en los fibroblastos de la Enfermedad de Alzheimer (AD) en respuesta a la estimulación mediante bradiquinina en comparación con los controles de la misma edad.

W. Q Zhao y otros informan en Neurobiology of Disease, Vol.11, no. 1, pág. 166-183 sobre la disfunción de la cascada de señalización de MAP quinasa específica de la Enfermedad de Alzheimer en fibroblastos. La elevación de la fosforilación de Erk 1/2 se produjo inmediatamente después de la estimulación de bradiquinina y requirió una liberación de Ca²⁺ sensible a IP-3, así como activación de la proteína quinasa C y c-src como acontecimientos anteriores.

Existe la necesidad de disponer de ensayos muy específicos y muy sensibles para diagnosticar la presencia o ausencia de Enfermedad de Alzheimer. Los presentes inventores han identificado, por primera vez, biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer únicos útiles para el diagnóstico de la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer de una manera muy sensible y muy específica en comparación con los ensayos de diagnóstico conocidos anteriormente. Por lo tanto, los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer únicos descritos en el presente documento sirven como base para procedimientos de diagnóstico que tienen un alto grado de sensibilidad y especificidad para la detección y el diagnóstico de la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer.

CARACTERÍSTICAS DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se dirige a la utilización de un kit para diagnosticar la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto, comprendiendo el kit:

- a) un agente que es un activador de la proteína quinasa C seleccionado entre bradiquinina; modulador de α -APP; briostatina; briólogos; bombesina; colecistoquinina; trombina; prostaglandina F₂ α ; vasopresina; 6-[N-decilamino]-4-hidroxi metilinol (DHI); 1,2-dioctanoil-sn-glicerol; farnesiltiotriazol (FTT); gnidimacrina, *Stellera chamaejasme* L.; (-)-indolactam V; lipoxina A₄; linbiatoxina A, *Micromonospora* sp.; ácido oleico; 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol; 4 α -forbol-12,13-didecanoato; L- α -fosfatidilinositol-3,4-bifosfato, sal de dipalmitoil-pentaamonio; L- α -fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, sal de dipalmitoil-hexaamonio; 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol; timeleatoxina, *Thymelea hirsuta* L.; insulina; lisofosfatidilcolina; lipopolisacárido; daunorrubicina; y sulfato de vanadilo;
- b) un anticuerpo específico de una primera proteína MAP quinasa fosforilada, en la que la primera proteína MAP quinasa es Erk1;
- c) un anticuerpo específico de una segunda proteína MAP quinasa fosforilada, en la que la segunda proteína MAP quinasa es Erk2;

en el que la utilización comprende:

- i) poner en contacto las células de dicho sujeto con dicho agente que es un activador de la proteína quinasa C;
- ii) medir la relación de dicha primera proteína MAP quinasa fosforilada y dicha segunda proteína MAP quinasa fosforilada, en la que dichas primera y segunda proteínas MAP quinasa fosforiladas se obtienen de dichas células después de dicha etapa de contacto;
- iii) medir la relación de dicha primera proteína MAP quinasa fosforilada y dicha segunda proteína MAP quinasa fosforilada en las células de dicho sujeto que no han entrado en contacto con el agente de la etapa (i);
- iv) restar la relación obtenida en la etapa (iii) de la relación obtenida en la etapa (ii); y
- v) diagnosticar la presencia de Enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto sobre la base de la diferencia calculada en la etapa (iv).

En ciertas realizaciones de la presente invención, las células que se utilizan en los ensayos de diagnóstico son células periféricas. En realizaciones preferentes, las células pueden ser células de la piel, células de fibroblastos de la piel, células sanguíneas o células de la mucosa bucal. En ciertas realizaciones, las células no son aisladas del líquido cerebroespinal. En otras realizaciones preferentes, las células no comprenden fluido cerebroespinal. En aún otras realizaciones preferentes, las células no se obtienen mediante una punción espinal o punción lumbar.

En ciertas realizaciones de los procedimientos de diagnóstico se pone en contacto un activador de la proteína quinasa C con células en un medio que comprende suero. En otras realizaciones preferentes de la presente invención, se pone en contacto un activador de la proteína quinasa C con dichas células en un medio libre de suero.

5 En ciertas realizaciones de la utilización diagnóstica de la presente invención, las proteínas MAP quinasas fosforiladas se detectan mediante inmunoensayo. En realizaciones preferentes de la presente invención, el inmunoensayo puede ser un radioinmunoensayo, un ensayo de transferencia Western, un ensayo de inmunofluorescencia, un inmunoensayo enzimático, un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoelectroforesis, un ensayo de
10 transferencia de puntos o un ensayo de transferencia de ranuras. En otras realizaciones preferentes de la utilización diagnóstica de la presente invención, se pueden emplear matrices de proteínas o matrices de péptidos o micromatrices de proteínas en los procedimientos de diagnóstico.

15 En realizaciones preferentes de la utilización diagnóstica de la presente invención, la diferencia en las relaciones calculadas en la etapa (iv) de la reivindicación 1 es diagnóstica de la Enfermedad de Alzheimer en el sujeto si la diferencia es un valor positivo.

20 En otras realizaciones preferentes de la utilización diagnóstica de la presente invención, dicha diferencia es diagnóstica de la ausencia de Enfermedad de Alzheimer en el sujeto si la diferencia es un valor negativo o cero.

25 En ciertas realizaciones de la presente invención, los kits para diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto pueden contener uno o más activadores de la proteína quinasa C seleccionados del grupo que consiste en bradiquinina, briostatina, bombesina, colecistoquinina, trombina, prostaglandina F2α y vasopresina, En realizaciones preferentes, los kits pueden contener cualquier combinación de los anteriores.

30 En la presente invención, los kits para diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto contienen anticuerpos específicos de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada. En realizaciones preferentes de la presente invención, el kit puede contener anticuerpo anti-fosfo-Erk1. En realizaciones preferentes adicionales de la presente invención, el kit puede contener un anticuerpo anti-fosfo-Erk2. En realizaciones preferentes, los kits pueden contener cualquier combinación de los anteriores.

35 En ciertas realizaciones de la presente invención, los kits para diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer pueden comprender adicionalmente un péptido beta amiloide. En ciertas realizaciones preferentes, el péptido beta amiloide puede ser Aβ (1-42).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 La figura 1 muestra los resultados de las determinaciones de los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB) en células de fibroblastos de piel depositadas obtenidas del Banco de Células Coriell y en muestras de biopsia de piel con sacabocados que se colocaron inmediatamente en cultivos de tejidos y que se obtuvieron de individuos confirmados por autopsia. AD se refiere a células con la Enfermedad de Alzheimer; AD/PD/LBD mixtas se refiere a células extraídas de pacientes con patologías mixtas de Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson y/o Enfermedad de cuerpos de Lewi; AC se refiere a células de control de la misma edad sin demencia; no ADD se refiere a células extraídas de individuos diagnosticados con demencia que no es la
45 Enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, Enfermedad de Huntington o Enfermedad de Parkinson o Esquizofrenia Clínica). Los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad del Alzheimer en células de AD ensayadas eran valores positivos comprendidos entre mayor que aproximadamente 0,02 y menor que aproximadamente 0,4. El biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer en AD/PD/LBD mixtas se agrupó en valores positivos muy pequeños, es decir, menos de aproximadamente 0,02 o de aproximadamente 0,03. Los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad del Alzheimer en células de control de igual edad sin demencia eran valores positivos o negativos muy pequeños, es decir, menos de aproximadamente 0,01. Los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad del Alzheimer en las células no ADD eran valores negativos. Los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer se midieron determinando la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que habían sido estimuladas con bradiquinina menos la
50 relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que fueron estimuladas con medio sin bradiquinina. Esto se expresa como lo siguiente: biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer = $\frac{\{(pErk1/pErk2)_{bradiquinina}\}}{\{(pErk1/pErk2)_{vehículo}\}}$. Los ADSMB (indicados como "factor diferenciador" (D.F.) en la figura) se trazaron para cuatro categorías diferentes de pacientes: Enfermedad de Alzheimer (AD), AD/PD/DLV mixtas (diagnóstico mixto de la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de cuerpos Lewi confirmadas por autopsia) control de la misma edad (AC) y demencia no AD (Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Huntington) para las líneas celulares del Banco de Células Coriell y confirmadas por autopsia.

55 La figura 2 muestra un análisis de regresión lineal de los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer en función de los años de la demencia. La regresión lineal muestra una pendiente negativa aproximadamente de -0,01, lo que indica una correlación inversa entre los años de demencia y la magnitud positiva del biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer. Como los años de demencia aumentan (es
65

decir, como la Enfermedad de Alzheimer progresa) el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer se convierte en un valor numérico menos positivo. La medición del biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer permite un diagnóstico precoz de la Enfermedad de Alzheimer, porque un valor positivo más elevado es indicativo de las primeras etapas de la enfermedad. Los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer se midieron determinando la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que habían sido estimuladas con bradiquinina menos la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que fueron estimuladas con medio sin bradiquinina. Esto se expresa como lo siguiente: biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer = $\frac{\{p\text{Erk1}/p\text{Erk2}\}_{\text{bradiquinina}}}{\{p\text{Erk1}/p\text{Erk2}\}_{\text{vehículo}}}$. El análisis de regresión lineal del biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB) en función de la duración de la enfermedad en casos confirmados por autopsia. El biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer es más eficaz en los primeros años de la enfermedad. Esto demuestra que el procedimiento de la presente invención es más eficaz en el diagnóstico precoz de la Enfermedad de Alzheimer.

La figura 3 muestra los datos de transferencia Western de p-Erk1/2 (Erk1 y Erk2 fosforilados) después del tratamiento con bradiquinina (BK+) y vehículo (DMSO, sin bradiquinina, BK-) para las líneas celulares de AD y de control. Para el tratamiento con bradiquinina (BK+), se trataron células libre de suero (24 horas) con 10 nM de bradiquinina durante 10 min a 37°C. El tratamiento correspondiente con el vehículo (BK-), se trataron las células libre de suero (24 horas) con la misma cantidad de DMSO (sin BK) durante 10 min a 37°C. Después de 10 min, las bandas de p-Erk1/2 eran más oscuras para el tratamiento BK+ que para el tratamiento BK- para la línea celular de AD, pero es lo contrario para las líneas celulares de control. Esto demuestra que la activación inducida por BK de Erk fue mayor para las líneas celulares de AD.

Las figuras 4A y 4B muestran el Biomarcador Molecular Específico de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB) (indicado como "factor diferenciador" (DF) en la figura), calculado tal como se explica en el presente documento. El ADSMB se trazó para líneas celulares de AD (Enfermedad de Alzheimer), AC (control de la misma edad) y no ADD (demencia que no era la Enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de cuerpos de Lewy) del Banco de Células Coriell (A) (Instituto Coriell de Investigación Médica, Camden, New Jersey) y líneas celulares proporcionadas por Neurologic Inc. (confirmadas por autopsia) (B). Los resultados muestran que el ADSMB para los casos de AD fue consistentemente superior a los de AC y los casos no ADD.

Las figuras 5A y 5B muestran que Aβ soluble induce y el tratamiento con briostatina invierte el fenotipo de Alzheimer de los fibroblastos humanos. Se midió (A) Biomarcador Molecular Específico de la Enfermedad de Alzheimer (indicado como "factor diferenciador" (DF) en la figura) para líneas celulares de control (no AD) (AG07723, AG11363, AG09977, AG09555 y AG09878) tal como se describe en el presente documento y se encontró que eran valores pequeños y negativos. Después del tratamiento con 1,0 μM de Aβ-42 se midió (ADSMB) de nuevo tal como se describió anteriormente y se encontró que eran mayores y positivos. Esto demuestra que la relación Erk1/Erk2 activada inducida por bradiquinina aumentó después del tratamiento con 1,0 μM de Aβ (1-42). Las líneas celulares de AC se comportaron como fenotipo AD después del tratamiento con Aβ (1-42). Se midió (B) ADSMB ("factor diferenciador" (DF)) después del tratamiento con 1,0 μM de Aβ (1-42) durante 24 horas para las líneas celulares de AC. Los valores de ADSMB eran mayores y positivos que los encontrados anteriormente. Las mismas líneas celulares se trataron en primer lugar con 1,0 μM de Aβ (1-42) durante 24 horas y seguido de tratamiento con briostatina 0,1 nM durante 20 min. Los valores de ADSMB (DF) se midieron de nuevo y se encontró que eran pequeños y negativos. Esto demuestra que los cambios inducidos por Aβ soluble se pueden revertir mediante tratamiento con briostatina.

Las figuras 6A y 6B muestran un análisis de matriz de decisión del ADSMB. La sensibilidad y especificidad del biomarcador se trazaron para mostrar la eficacia para detectar la enfermedad para células del Banco de Células Coriell (A) y confirmadas por autopsia (B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere, en ciertos aspectos, a la utilización de un kit capaz de diagnosticar la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer en células humanas obtenidas de sujetos que se han identificado para análisis y diagnóstico. El diagnóstico se basa en el descubrimiento de biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer únicos. En ciertos aspectos, la presente invención se dirige a procedimientos para determinar o confirmar la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto o en muestras tomadas de un sujeto.

Los presentes inventores han descubierto un biomarcador molecular único para la Enfermedad de Alzheimer utilizando tejido periférico (no CNS) que es útil en ensayos de diagnóstico que son muy sensibles y muy específicos para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer. Una gran ventaja de la presente invención es que el tejido utilizado en los ensayos y procedimientos descritos en el presente documento puede obtenerse de individuos utilizando procedimientos mínimamente invasivos, es decir, sin la utilización de una punción lumbar. Por tanto, un aspecto de la presente invención se dirige a un ensayo o prueba para la detección precoz de la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto en el que se mide una relación controlada internamente entre la fosforilación de Erk1 y la fosforilación de Erk2, inducida por un activador de la proteína quinasa C (tal como bradiquinina), con anticuerpos

específicos utilizando una respuesta de normalización basal al medio de crecimiento en células humanas, tales como fibroblastos de la piel y otras células periféricas tales como células sanguíneas.

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

Las células pueden ser frescas o pueden ser cultivadas (véase la Patente de EE.UU. Núm. 6.107.050). En una realización específica, una de biopsia de piel con sacabocado se puede utilizar para obtener fibroblastos de piel de un individuo. Estos fibroblastos se analizan directamente utilizando las técnicas descritas en el presente documento o se introducen en condiciones de cultivo celular. Los fibroblastos cultivados resultantes se analizan, a continuación, tal como se describe en los ejemplos y en toda la memoria descriptiva. Pueden ser necesarias otras etapas para preparar otros tipos de células que se podrían utilizar para el análisis, tales como células de la mucosa bucal, células nerviosas, tales como células olfativas, células sanguíneas, tales como eritrocitos y linfocitos, etc. Por ejemplo, las células sanguíneas se pueden obtener fácilmente por extracción de sangre de venas periféricas. A continuación, las células se pueden separar mediante procedimientos estándar (por ejemplo, utilizando un clasificador celular, centrifugación, etc.) y se analizan posteriormente.

Por tanto, la presente invención se refiere, en ciertos aspectos, a procedimientos de diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto. En ciertas realizaciones, los procedimientos de diagnóstico de la presente invención se basan en la medición de la relación de dos proteínas MAP quinasa específicas y fosforiladas distintas en células obtenidas de un sujeto que se ha estimulado con un agente que es un activador de la proteína quinasa C. La presente invención también se dirige, en ciertas realizaciones, a la utilización de kits que contienen reactivos útiles para la detección o el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer.

I. Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sensibilidad" en el contexto del cribado y diagnóstico médico, se refiere a la proporción de personas afectadas que dan un resultado positivo para la enfermedad que la prueba está destinada a revelar, es decir, los verdaderos resultados positivos divididos por el total de resultados verdaderos positivos y falsos negativos, habitualmente expresada como porcentaje.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "especificidad" en el contexto del cribado y diagnóstico médico, se refiere a la proporción de individuos con resultados de ensayo negativos para la enfermedad que la prueba está destinada a revelar, es decir, los verdaderos resultados negativos como proporción del total de resultados negativos verdaderos y falsos positivos, habitualmente expresada como porcentaje.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muy sensible" se refiere a un procedimiento de diagnóstico en el que la sensibilidad es mayor o aproximadamente igual a un 50%, o aproximadamente de un 55% de sensibilidad, o aproximadamente de un 60% de sensibilidad, o aproximadamente de un 65% de sensibilidad, o aproximadamente de un 70 % de sensibilidad, o aproximadamente de un 75% de sensibilidad, o aproximadamente de un 80% de sensibilidad, o aproximadamente de un 85% de sensibilidad, o aproximadamente de un 90% de sensibilidad, o aproximadamente de un 95% de sensibilidad, o aproximadamente de un 96% de sensibilidad, o aproximadamente de un 97% de sensibilidad, o aproximadamente de un 98% de sensibilidad, o aproximadamente de un 99% de sensibilidad o aproximadamente de un 100% de sensibilidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muy específico" se refiere a un procedimiento de diagnóstico en el que la especificidad es mayor o aproximadamente igual a un 50% de especificidad, o aproximadamente de un 55% de especificidad, o aproximadamente de un 60% de especificidad, o aproximadamente de un 65% de especificidad, o aproximadamente de un 70 % de especificidad, o aproximadamente de un 75% de especificidad, o aproximadamente de un 80% de especificidad, o aproximadamente de un 85% de especificidad, o aproximadamente de un 90% de especificidad, o aproximadamente de un 95% de especificidad, o aproximadamente de un 96% de especificidad, o aproximadamente de un 97% de especificidad, o aproximadamente de un 98% de especificidad, o aproximadamente de un 99% de especificidad o aproximadamente de un 100% de especificidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, "variantes de la secuencia" son proteínas que están relacionadas entre sí tanto estructural como funcionalmente. En ciertas realizaciones, las variantes de secuencia son proteínas que comparten similitud estructural a nivel de secuencia de aminoácidos y comparten atributos funcionales a nivel de actividad enzimática. En ciertas realizaciones, las variantes de secuencia son proteínas MAP quinasas que catalizan la fosforilación de otras proteínas.

Tal como se utiliza en el presente documento, la "ausencia de la Enfermedad de Alzheimer" se refiere a que un

sujeto o células extraídas de un sujeto no presentan un fenotipo de la Enfermedad de Alzheimer medible o detectable.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, un "fenotipo de la Enfermedad de Alzheimer" en un sujeto o una muestra celular incluye, sin constituir limitación, un biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer que tiene un valor positivo mayor que cero.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, un "Péptido Beta Amiloide" es cualquier fragmento del Péptido Beta Amiloide o un Péptido Beta Amiloide de longitud completa.

10 II. Procedimientos de diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer

15 La presente invención se refiere, en ciertas realizaciones, a procedimientos de diagnóstico de la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer. En ciertas realizaciones, los ensayos de diagnóstico dados a conocer en el presente documento se pueden realizar *in vitro* o *in vivo*. En una realización específica, el activador de la proteína quinasa C es bradiquinina. La relación de las proteínas MAP quinasa fosforiladas específicas es la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada, que se calcula dividiendo la cantidad relativa o normalizada de Erk1 fosforilada por la cantidad relativa o normalizada de Erk2 fosforilada.

20 Biomarcadores Moleculares Específicos de la Enfermedad de Alzheimer

25 Los procedimientos de diagnóstico que se dan a conocer en el presente documento se basan en el descubrimiento por los presentes inventores de un biomarcador molecular único para la Enfermedad de Alzheimer. El valor numérico del biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer dependerá de ciertas variables, tales como por ejemplo, las células utilizadas en el ensayo, el activador de la proteína quinasa C utilizado en el ensayo y las proteínas específicas MAP quinasa que están dirigidas a la medición de las relaciones de fosforilación.

30 En una realización específica, el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer se puede medir determinando la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con un activador de la proteína quinasa C y restando de ésta la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con una solución de control (vehículo) que carece del activador de la proteína quinasa C. En ciertas realizaciones, si la diferencia es mayor que cero, es decir, un valor positivo, es diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer. En realizaciones preferentes adicionales, si la diferencia es menor o igual a cero, es indicativo de ausencia de Enfermedad de Alzheimer.

35 En otras realizaciones, los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer de la presente invención se miden mediante la determinación de la relación de dos proteínas MAP quinasa fosforiladas después de la estimulación de las células con un activador de la proteína quinasa C. El biomarcador molecular se puede medir mediante la determinación de la relación de una primera proteína MAP quinasa fosforilada con respecto a una
40 segunda proteína MAP quinasa fosforilada en células que han sido estimuladas por un activador de la proteína quinasa C y restando de esta la relación de una primera proteína MAP quinasa fosforilada con respecto a una segunda proteína MAP quinasa fosforilada en células que han sido estimuladas con una solución de control (vehículo) que carece del activador de la proteína quinasa C. En ciertas realizaciones preferentes, si la diferencia es superior a cero, es decir, un valor positivo, este es el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer. En realizaciones
45 preferentes adicionales, si la diferencia es inferior o igual a cero, esto es indicativo de la ausencia de Enfermedad de Alzheimer.

50 En ciertas realizaciones, el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer es un valor numérico positivo en las muestras celulares extraídas de pacientes con diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer (células AD). En ciertas realizaciones preferentes, cuando biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer se mide determinando las relaciones de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con bradiquinina, los valores numéricos positivos para el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer en las células de AD pueden variar de aproximadamente cero a aproximadamente 0,5.

55 En ciertas realizaciones, el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer es un valor numérico negativo cuando se mide en células extraídas de individuos diagnosticados con demencia que no es la Enfermedad de Alzheimer (células no ADD), tales como por ejemplo, Enfermedad de Parkinson o Enfermedad de Huntington o Esquizofrenia Clínica. En ciertas realizaciones preferentes, cuando el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer se mide determinando las relaciones entre Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células
60 no ADD que han sido estimuladas con bradiquinina, los valores numéricos negativos pueden variar en el intervalo de aproximadamente 0 a aproximadamente -0,2 o aproximadamente -0,3.

65 En ciertas realizaciones, el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer es un valor numérico negativo, cero o un valor numérico positivo muy pequeño en muestras celulares de células de control de edad similar (células AC) extraídas de pacientes que no tienen la Enfermedad de Alzheimer. Cuando el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer se mide mediante la determinación de

las relaciones de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células AC que han sido estimuladas con bradiquinina, el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer en células AC puede variar de menos de aproximadamente 0,05 a aproximadamente -0,2.

5 En ciertas realizaciones de la presente invención, los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer se pueden medir mediante el cálculo de la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que se han estimulado con bradiquinina menos la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con una solución sin bradiquinina. Esto se expresa como sigue: biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer = $\{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{bradiquinina}}\} - \{(p\text{Erk1}/p\text{Erk2})_{\text{vehículo}}\}$.

10

Activadores de la proteína quinasa C

Los activadores de la proteína quinasa C que se contemplan específicamente para su utilización en los procedimientos de cribado para identificar compuestos de la presente invención incluyen, sin constituir limitación: 15 bradiquinina; modulador de α -APP; briostatina 1; briostatina 2; DHI; 1,2-dioctanoilo-*sn*-glicerol; FTT; gnidimacrin, *Stellera chamaejasme* L.; (-)-indolactama V; lipoxina A₄; lingbiatoxina A, *Micromonospora* sp.; ácido oleico; 1-oleoil-2-acetil-*sn*-glicerol; 4 α -forbol; forbol-12,13-dibutirato; forbol-12,13-didecanoato; 4 α -forbol-12,13-didecanoato; forbol-12-miristato-13-acetato; L- α -fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato, dipalmitoil-, sal de pentaamonio; L- α -fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, dipalmitoil-, sal de pentaamonio; L- α -fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, dipalmitoil-, sal heptaamonio; 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicerol; thimeleatoxina, *Thymelea hirsuta* L.; insulina, ésteres de forbol, lisofosfatidilcolina, lipopolisacárido, antraciclina dannorubicina y sulfato de vanadilo. También se incluyen compuestos conocidos como "briologos". Los briologos se describen, por ejemplo, en Wender y otros. Organic Letters (Estados Unidos) 12 de mayo 2005, 7 (10) p1995-8; Wender y otros. Organic Letters (Estados Unidos) 17 de marzo 2005, 7 (6) p1177-80; Wender y otros. Journal of Medicinal Chemistry (Estados Unidos) 16 de diciembre 2004, 47 (26) p6638-44. Un activador de proteína quinasa C se puede utilizar solo o en combinación con cualquier otro activador de proteína quinasa C en los procedimientos de diagnóstico, kits y procedimientos de cribado de compuestos descritos en el presente documento.

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

Medición o detección de los niveles de proteínas fosforiladas

Los procedimientos de diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer dados a conocer en el presente documento dependen de la medición de los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer como se utiliza en la presente invención.

En una realización preferente, el nivel de proteína fosforilada presente en las células se detecta mediante transferencia Western. Los niveles de proteína Erk1 fosforilada o Erk2 fosforilada se pueden medir en fibroblastos utilizando anticuerpos anti-Erk1, anti-Erk2, anti-fosfo-Erk1 y anti-fosfo-Erk2 (Cell Signaling Technology). Los niveles de una proteína diferente también se pueden medir en la misma muestra como una proteína de referencia para la normalización. Entre los ejemplos de posibles proteínas de referencia se incluyen, sin constituir limitación, anexina-II o actina.

En una realización, se llevó a cabo un ELISA según los siguientes procedimientos: 1) Añadir lisados celulares de fibroblastos después del tratamiento por duplicado o triplicado a una microplaca de 96 pocillos que se recubre previamente con un anticuerpo anti-Erk. 2) Incubar las muestras en los pocillos de la microplaca a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. 3) Aspirar las muestras y lavar los pocillos con un tampón de lavado basado en solución tamponada con fosfato (PBS). 4) Añadir la dilución de trabajo de un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2, o un anticuerpo anti-Erk1/2 a cada pocillo, y se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. 5) Aspirar y lavar bien con tampón de lavado. 6) Añadir una dilución de trabajo de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pocillo e incubar bien a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. 7) Aspirar y lavar bien con tampón de lavado. 8) Añadir Cromógeno estabilizado, tales como diaminobencidina (DAB) e incubar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. 9) Añadir solución de parada y medir la absorbancia a 450 nm. La fosforilación de Erk1/2 se evalúa después de la normalización: $NR = A_P/A_R$, en la que NR = relación normalizada; A_P son los valores de absorbancia para fosfo-Erk1/2; y A_R es la absorbancia para el Erk1/2 total (normal).

En una realización preferente, la fosforilación de Erk1/2 se ensaya en transferencias Western utilizando un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2. Los niveles de las señales inmunorreactivas para Erk1/2 fosforilada se cuantifican mediante exploración densitométrica. La densidad media de las señales de fosfo-Erk1/2 se normaliza con la densidad media de las señales de Erk1/2 totales que son detectadas a partir de las mismas muestras de lisado de células con un anticuerpo anti-Erk1/2 normal en una transferencia Western por separado. La fórmula para la normalización es: $NR = D_P/D_R$, en la que NR (relación normalizada) representa la medida de fosforilación de Erk1/2; D_P es la densidad promedio para fosfo-Erk1/2, y D_R es la densidad media de la cantidad total de Erk1/2 detectado en una transferencia Western de la misma muestra.

Los inmunoensayos utilizados de la presente invención para la detección de proteínas pueden ser ensayos inmunofluorescentes, radioinmunoensayos, ensayos de transferencia Western, inmunoensayo enzimático, inmunoprecipitación, ensayo quimioluminiscente, ensayo inmunohistoquímico, ensayo de transferencia de puntos o de ranuras y similares. (En "Principios y Práctica de Inmunoensayos" (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds), Stockton Press, New York, New York, Ausubel y otros. (Eds.) (1987) en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, New York, New York). La detección puede ser mediante procedimientos colorimétricos o radioactivos o cualquier otro procedimiento convencional conocido por los expertos en la materia. Las técnicas estándar conocidas en la técnica para ELISA se describen en Procedimientos en Inmunodiagnóstico, 2ª edición, Rose y Bigazzi, eds., John Wiley and Sons, Nueva York 1980 y Campbell y otros, Procedimientos de Inmunología, WA Benjamin, Inc., 1964, ambos se incorporan en el presente documento como referencia. Dichos ensayos pueden ser inmunoensayos directos, indirectos, competitivos o no competitivos, tal como se describe en la técnica (En "Principios y Práctica de Inmunoensayos" (1991) Christopher P. Price y David J. Neoman (eds), Stockton Press, Nueva York, NY; Oellirich, M. 1984. J Clin. Chem. Clin. Biochem. 22: 895-904 Ausubel y otros. (Eds) 1987 en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, New York).

Tipos de células, aislamiento de proteínas y anticuerpos

Tal como se ha indicado anteriormente, las células utilizadas en la presente invención pueden ser cualquier célula. Ejemplos de células que se pueden utilizar incluyen, sin constituir limitación, células de la piel, fibroblastos de piel, células de la mucosa bucal, células sanguíneas, tales como eritrocitos, linfocitos y células linfoblastoides, y células nerviosas y cualquier otra célula que exprese la proteína Erk1/2. También se pueden utilizar muestras de necropsia y muestras de patología. Los tejidos que comprenden estas células también se pueden utilizar, incluyendo el tejido cerebral o células del cerebro. Las células pueden ser frescas, cultivadas o congeladas. Las muestras de proteínas aisladas de las células o tejidos se pueden utilizar de inmediato en el ensayo de diagnóstico o los procedimientos de cribado de compuestos o se congelan para su utilización posterior. En una realización preferente se utilizan células de fibroblastos. Las células de fibroblastos se pueden obtener mediante una biopsia de piel con sacabocados.

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

En la utilización de la presente invención, los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos descritos pueden ser de origen monoclonales o policlonales. La proteína Erk1/2 fosforilada y no fosforilada o partes de las mismas utilizadas para generar los anticuerpos pueden ser de fuentes naturales o recombinantes o generados por síntesis química. Las proteínas Erk1/2 naturales se pueden aislar de muestras biológicas mediante procedimientos convencionales. Los ejemplos de muestras biológicas que se pueden utilizar para aislar la proteína Erk1/2 incluyen, sin constituir limitación, células de la piel, tales como por ejemplo, fibroblastos, líneas celulares de fibroblastos, tales como líneas celulares de fibroblastos de la Enfermedad de Alzheimer y líneas celulares de fibroblastos de control que están comercialmente disponibles del Banco de Células Coriell (Camden, Nueva Jersey), y que figuran en el Catálogo de Líneas Celulares de 1991 del Instituto Nacional de Envejecimiento, Catálogo de líneas celulares de 1992/1993 del Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales [(Publicación NIH 92-2011 (1992)].

III. Kits para el diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer

La presente invención se refiere la utilización de kits que se pueden utilizar en la realización de cualquier prueba diagnóstica descrita anteriormente. Los kits comprenden anticuerpos que reconocen Erk1/2 normal (Erk1 no fosforilada o Erk2 no fosforilada) o Erk 1/2 fosforilada (Erk1 fosforilada o Erk2 fosforilada). Los kits también contienen uno o más de los activadores de proteína C quinasa dados a conocer en el presente documento (tales como, por ejemplo, bradiquinina o briostatina). Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los kits pueden contener instrumentos, tampones y recipientes de almacenamiento necesarios para realizar una o más biopsias, tales como biopsias de piel con sacabocados. Los kits también pueden contener instrucciones relacionadas con la determinación de las relaciones utilizadas para identificar los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer utilizados en la presente invención, así como la utilización de los anticuerpos u otros componentes en las pruebas diagnósticas. Las instrucciones también pueden describir los procedimientos para realizar una biopsia, tal como biopsia de piel con sacabocados. Los kits también pueden contener otros reactivos para realizar las pruebas diagnósticas, tales como anticuerpos para la detección de proteínas de referencia utilizadas para la normalización. Entre los ejemplos de anticuerpos que reconocen posibles proteínas de referencia se incluyen, pero no se limitan a los mismos, anticuerpos que reconocen anexina-II o actina. Los kits también pueden incluir tampones, anticuerpos secundarios, células de control.

Los biomarcadores moleculares específicos de la Enfermedad de Alzheimer, en ciertas realizaciones, se miden determinando la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con bradiquinina menos la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada en células que han sido estimuladas con medio sin bradiquinina. Esto se expresa de la siguiente manera: biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer = $\{(pErk1/pErk2)_{bradiquinina}\} - \{(pErk1/pErk2)_{vehículo}\}$.

VI. Péptido beta amiloide

Los términos "péptido beta amiloide", "proteína beta amiloide", "péptido beta amiloide", "beta amiloide", "A. beta" y "péptido A. beta" se utilizan indistintamente en el presente documento. En algunas formas, un péptido beta amiloide (por ejemplo, A. beta 39, A. beta 40, A. beta 41, A. beta 42 y A. beta 43) es un fragmento interno de 4 kDa de 39-43 aminoácidos de la glicoproteína de transmembrana más grande denominada Proteína Precursora de Amiloide (APP). Existen múltiples isoformas de APP, por ejemplo APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ y APP⁷⁷⁰. Ejemplos de isotipos específicos de APP que se conoce actualmente que existen en los seres humanos son el polipéptido de 695 aminoácidos descrito por Kang y otros (1987) Nature 325:733-736, que se designa como el APP "normal"; el polipéptido de 751 aminoácidos descrito por Ponte y otros. (1988) Nature 331:525-527 (1988) y Tanzi y otros. (1988) Nature 331:528-530; y el polipéptido de 770 aminoácidos descrito por Kitaguchi y otros. (1988) Nature 331:530-532. Como resultado del procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas secretasas *in vivo* o *in situ*, A. beta se encuentra tanto en una "forma corta", de 40 aminoácidos de longitud, y una "forma larga", que va desde 42 hasta 43 aminoácidos de longitud. Parte del dominio hidrofóbico de APP se encuentra en el extremo carboxi del A. beta, y puede explicar la capacidad del A. beta para agregarse, particularmente en el caso de la forma larga. El péptido A. beta se puede encontrar, o se purifica, de los fluidos corporales de los seres humanos y otros mamíferos, por ejemplo, fluido cerebroespinal, incluyendo tanto a individuos normales como a individuos que sufren de trastornos amiloidogénicos.

Los términos "péptido beta amiloide", "proteína beta amiloide", "péptido beta amiloide", "beta amiloide", "A. beta" y "péptido A. beta" se refieren a péptidos resultantes de la escisión de secretasa de APP y péptidos sintéticos que tienen la misma, o esencialmente la misma, secuencia que los productos de escisión. Los péptidos A. beta de la presente invención se pueden derivar de una variedad de fuentes, por ejemplo, tejidos, líneas celulares, o fluidos corporales (por ejemplo suero o líquido cerebroespinal). Por ejemplo, un A. beta se puede derivar de células que expresan APP, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) tal como se describe, por ejemplo, en Walsh y otros, (2002), Nature, 416, pág. 535-539. Una preparación de A. beta se puede derivar de fuentes de tejido utilizando procedimientos previamente descritos (véase, por ejemplo, Johnson-Wood y otros, (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94:1550). De forma alternativa, los péptidos A. beta se pueden sintetizar utilizando procedimientos que son muy conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Fields y otros, Péptidos sintéticos: Guía del usuario, ed. Grant, WH Freeman & Co., Nueva York, Nueva York, 1992, p 77). Por lo tanto, los péptidos pueden sintetizarse utilizando las técnicas Merrifield automatizadas de síntesis en fase sólida con el grupo a-amino protegido tanto por química t-Boc o F-moc utilizando aminoácidos protegidos en su cadena lateral, por ejemplo, es un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems Modelo 430A o 431. Antígenos de péptido más grandes se pueden sintetizar utilizando técnicas de ADN recombinante muy conocidas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido o péptido de fusión se puede sintetizar o clonar molecularmente e insertar en un vector de expresión adecuado para la transfección y expresión heteróloga por una célula huésped adecuada. El péptido A. beta también se refiere a las secuencias de A. beta relacionadas que resultan de mutaciones en la región A. beta del gen normal.

La anormalidad inducida por A. beta del índice de Erk 1/2 (biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer) se puede utilizar como ensayo de confirmación de la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer. Es decir, una respuesta negativa del índice de Amiloide Beta indica la presencia de la enfermedad, mientras que una respuesta positiva indica la ausencia de la enfermedad. Es decir, si se induce un fenotipo de la Enfermedad de Alzheimer en las células después de la incubación o el contacto con un Péptido Beta Amiloide, esto

es indicativo de la ausencia de la enfermedad en las células de ensayo o el individuo que está siendo ensayado. Por el contrario, si se induce poco o ningún cambio en el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer en las células después de la incubación o el contacto con un Péptido Beta Amiloide, esto es indicativo de la presencia de la Enfermedad de Alzheimer en las células de ensayo o el individuo que está siendo ensayado.

Mientras que el beta amiloide (1-42) (es decir, A β (1-42)) es el estímulo inductor preferente, cualquier otro fragmento de beta amiloide tales como (1-39), (1-40), (1-41), (1-43), (25 - 35), (16-22), (16-35), (10-35), (8-25), (28-38), (15-39), (15-40), (15-41), (15-42), (15-43) o cualquier otro fragmento de beta amiloide también se puede utilizar en cualquiera de los procedimientos o kits descritos en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración para describir adicionalmente ciertas realizaciones preferentes de la presente invención, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Los ejemplos de referencia son útiles para entender la presente invención, pero están fuera de su alcance.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1: Biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB)

Se descubrió que la bradiquinina (10 nM, 10 min a 37°C) provoca una mayor fosforilación de Erk1/2 en fibroblastos de Alzheimer (AD) frente a fibroblastos de control sin demencia y sin AD. Mientras que este aumento de la fosforilación de Erk1/2 para fibroblastos de AD se podía observar en este caso con líneas celulares de Coriell adicionales, la variabilidad inherente encontrada en estas mediciones indicaba la necesidad de una mejor cuantificación, fiabilidad y reproducibilidad. En este caso, por lo tanto, para controlar las diferencias intrínsecas en las tasas de crecimiento de las líneas celulares de fibroblastos, así como las diferencias en las cantidades exactas de extractos de proteína aplicados a los geles, se introdujo una nueva medida de la fosforilación, una que compara la fosforilación de Erk1 y Erk2 en cada muestra de pacientes utilizando una relación de Erk1/2 antes y después de la estimulación BK+. Esta medida de la relación de fosforilación de Erk1/Erk2, el biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB), distinguió completamente todos los fibroblastos de control no dementes de todos los fibroblastos de AD (Figuras 1 y 4A). El aparente nivel más elevado de p-Erk1 para los casos de control (BK-) (figura 3) no era consistente para todos los pacientes. Unos pocos casos de demencia no AD no se distinguieron, aunque esto puede ser debido a la falta de confirmación por autopsia de los diagnósticos clínicos. Esta interpretación se apoya en los resultados de la medición de ADSMB obtenidos con fibroblastos de pacientes con diagnósticos confirmados por autopsia (figuras 1 y 4B), en las que el ADSMB distinguió con precisión todos los casos de AD de todos los tipos de demencia no AD e incluso los casos de demencia "mixta" debido tanto a AD y otras etiologías no AD, tal como la Enfermedad de Parkinson. Esta alta precisión para distinguir AD de la demencia no AD y de pacientes de control sin demencia se refleja en la notable sensibilidad y especificidad del ADSMB (figura 6) teniendo en cuenta tanto las muestras de células de Coriell y las muestras confirmadas por autopsia. Cuando se consideraron sólo los diagnósticos confirmados autopsias, la sensibilidad y la especificidad están en niveles del 100%.

El biomarcador molecular específico de la Enfermedad de Alzheimer (ADSMB) varía con la duración de la enfermedad

En una muestra de pacientes de los que se disponía la duración de la enfermedad (es decir, tiempo de la medición de ADSMB desde el momento de la aparición del síntoma o síntomas), se analizó la relación de amplitudes de ADSMB y la duración de la enfermedad. Tal como se muestra (figura 2), hubo una correlación inversa significativa (con análisis de regresión lineal) de la magnitud de ADSMB con la duración de la enfermedad. Estos resultados sugieren que la fosforilación por quinasa MAP de ADSMB es más marcada al inicio del curso de la enfermedad en el que se mide.

Inducción del fenotipo de Alzheimer por A β (1-42)

Debido a que los niveles de A β (1-42) son más propensos a estar involucrados críticamente en AD temprana, y debido a que el ADSMB observado se demostró por los datos que tiene poder de diagnóstico de AD temprana, se examinó la posibilidad de que un A β (1-42) elevado podría inducir anomalías de MAP quinasa de líneas celulares de fibroblastos de pacientes de control normales, por lo tanto, se expusieron durante 24 horas a 1,0 μ M de A β (1-42). Tal como se muestra en la figura 5A, la preincubación con A β (1-42), tal como se predijo, convirtió el fenotipo de ADSMB normal (negativo) en el fenotipo de ADSMB valorado positivamente anormal, que se había observado para todos los fenotipos de AD. Estos resultados sugieren que este fenotipo de ADSMB en pacientes con AD en realidad surgió de los niveles elevados de A β (1-42).

Reversión del fenotipo de Alzheimer por el activador de PKC, Briostatina

Tal como se discutió anteriormente, la fosforilación de MAP quinasa (medida mediante el ADSMB) está regulada por la activación de PKC que, a su vez, mostró vulnerabilidad para niveles elevados de A β . Por otra parte, se encontró

que el potente activador de PKC, la macrolactona Briostatina, mejora la activación de PKC en fibroblastos humanos, así como reduce los niveles de A β (1-42) en el cerebro de ratones transgénicos con genes de AD humanos. En base a estos resultados, por lo tanto, se ha ensayado los efectos de la Briostatina (0,1 nM) en fibroblastos humanos tratados con A β (1-42). Tal como se ilustra (figura 5B y tabla 1), la Briostatina invierte completamente el cambio de fosforilación de MAP quinasa inducido en fibroblastos normales por A β (1-42). La Briostatina cambió los valores anormales positivos de los fibroblastos tratados con A β en valores negativamente normales de ADSMB, previamente observados para los fibroblastos sin AD. Esta eficacia "terapéutica" de la Briostatina es consistente con el gran aumento de la supervivencia de los ratones transgénicos con AD que fueron expuestos a tratamiento crónico con Briostatina.

Tabla 1

Líneas celulares	ADSMB ^a		
	Control*	A β * [#]	A β + BY [#]
AG06959	-	0,13	0,0
AG07732	-0,11	0,12	-0,13
AG11363	0,0	0,16	0,09
AG09977	-0,15	0,13	0,01
Promedio \pm DE	-0,09 \pm 0,05	0,13 \pm 0,01	-0,01 \pm 0,05

*P < 0,001, [#]P < 0,01
^a El ADSMB se calculó según el procedimiento utilizado por el presente estudio.
* Se llevó a cabo la prueba T entre las células de control y tratadas con A β .
[#] Se llevó a cabo la prueba T entre las células tratadas con A β y las células tratadas con A β más briostatina.

La elevada sensibilidad y especificidad de la medición del ADSMB de la fosforilación de MAP quinasa para diagnosticar AD sugieren un potencial importante como prueba de laboratorio para AD para ayudar en la valoración clínica de la demencia. Hasta la fecha, la confirmación por autopsia de la demencia clínicamente diagnosticada suele estar disponible sólo para pacientes con enfermedad de larga evolución. Teniendo en cuenta que la AD puede durar de 8-15 años, se ha encontrado un diagnóstico clínico para AD de duración breve que muestra alta imprecisión cuando se compara con el diagnóstico clínico posterior en la progresión de la enfermedad y, a continuación, sometidos a validación por autopsia. Por tanto, un biomarcador periférico, en este caso una relación de fosforilación de MAP quinasa para fibroblastos humanos, tiene utilidad real para llegar a estrategias terapéuticas para la demencia.

Aunque no se desea estar ligado a ninguna teoría, también es de interés considerar por qué la relación de fosforilación de Erk1 y Erk2 podría ser sensible a anomalías debidas a diferencias específicas de AD del metabolismo de A β . Una implicación de este y anteriores estudios de biomarcadores periféricos para AD es que la patofisiología de AD no sólo implica el cerebro, sino también una variedad de otros sistemas de órganos. Este punto de vista fisiopatológico sistémico de AD es consistente con las observaciones que el amiloide y vías metabólicas tau son omnipresentes en el cuerpo humano y se manifiestan en sangre, saliva, piel y tejidos extra cerebrales.

La estrecha correlación que se muestra en el presente documento de la relación de Erk1/Erk2 con AD también centra la atención en estos sustratos como una "lectura" de la señalización de AD. Por ejemplo, las isoenzimas PKC regulan varias dianas moleculares que convergen en la MAP quinasa. PKC activa: (1) aumento de α -secretasa de s-APP y, por lo tanto, indirectamente, la reducción de β -amiloide; (2) β -amiloide activa la glucógeno sintasa quinasa-3 β (GSK- 3 β) que aumenta la fosforilación de MAP quinasa; (3) PKC inhibe GSK-3 β ; (4) el propio PKC fosforila GSK-3 β , y (5) PKC activa señales inflamatorias de citoquinas que pueden responder a BK y otros eventos iniciados por AD, (6) los metabolitos tóxicos de colesterol (por ejemplo, 17-OH colesterol) inhiben PKC α que, en conjunto reduce A β , y reduce la tau fosforilada.

La evidencia de que la disfunción de las isoenzimas PKC de por sí puede contribuir a la iniciación temprana del proceso de AD, por lo tanto, se refleja, a través de todos los sucesos de señalización anteriores, en la anomalía de la relación de fosforilación de Erk1/2.

Por último, también es un misterio en cuanto a cómo la especificidad de la anomalía de fosforilación de AD se puede mantener a través de los pases sucesivos de las líneas celulares de fibroblastos humanos. Este fenómeno podría ser explicado a través de una interacción de los niveles de PKC/MAP quinasa con el genoma de fibroblastos. Se conoce que PKC y MAP quinasa regulan la expresión génica. Puede ser posible, por lo tanto, que un ciclo continuo de estimulación con PKC/MAP quinasa de su propia síntesis podría perpetuar las anomalías de los niveles de PKC y fosforilación por MAP quinasa de una generación de fibroblastos humanos a la siguiente.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2: Tratamiento con A β

Preparación de solución de A β (1-42): Inicialmente, se disolvió 1 mg de A β (1-42) en hexa-fluoroisopropanol (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 3 mM y se separó en alícuotas en tubos de microcentrifuga estériles. Se eliminó el hexa-fluoroisopropanol al vacío y se liofilizó. Las películas de A β (1-42) se almacenaron a -20°C en seco hasta su utilización. Se preparó una solución madre de A β (1-42) 5 mM a partir del A β (1-42) en DMSO almacenado justo antes del experimento. Se preparó una solución madre 1 μ M en medio DMEM (suplementado con 10% de suero y penicilina/estreptomocina) mediante la disolución de A β (1-42) a partir de una solución madre de DMSO. Se añadió medio DMEM que contenía 1,0 μ M de A β (1-42) a las células de control sin AD (AC) a 90-100% de la etapa de confluencia en un matraz de cultivo de 25 ml y se mantuvo en incubadora de cultivo celular (a 37°C con 5% de CO₂) durante 24 horas. Las células se cultivaron en medio libre de suero (DMEM) durante 16 horas. Se preparó una solución 10 nM de bradiquinina (en DMSO) en medio DMEM con 10% de suero. Se añadieron 7 ml de solución 10 nM de BK al matraz de cultivo de 25 ml y se incubó a 37°C durante 10 min. Para los controles, se añadió la misma cantidad de DMSO en medio DMEM con 10% de suero. Se añadieron 7 ml de este medio con DMSO (<0,01%) al matraz de 25 ml cultivadas y se incubó a 37°C durante 10 min. Después de lavar cuatro veces con PBS 1X frío (4°C), los matraces se mantuvieron en una mezcla de hielo seco/etanol durante 15 min. Los matraces se extrajeron de la mezcla de hielo seco/etanol y, a continuación, se añadieron a cada matraz 100 μ l de tampón de lisis (10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 0,5% de NP-40, 1% de Triton X-100, 1% de cóctel inhibidor de proteasas, 1% de cóctel inhibidor de fosfatasa ser/thr/tirosina). Los matraces se mantuvieron en un agitador extremo a extremo en una habitación fría (4°C) durante 30 min y se recogieron las células de cada matraz con un raspador para recoger células. Las células se sometieron a ultrasonido y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de transferencia Western después del ensayo de proteínas totales. Erk1 y Erk2 totales y las formas fosforiladas de Erk1 y Erk2 (p-Erk1, p-Erk2) se determinaron utilizando anticuerpos específicos: anti-Erk1/2 normal y anti-fosfo-Erk1/2. Como mínimo, tres matraces tratados con bradiquinina (BK+) y, correspondientemente, tres matraces de control (BK-) se incluyeron para cada línea celular para minimizar errores en la medición.

Tratamiento con Briostatina

Se preparó una solución 0,1 nM de briostatina en medio DMEM normal (complementado con 10% de suero y penicilina/estreptomocina) a partir de la solución madre de DMSO. Después del tratamiento con A β (1-42), las células se lavaron cuatro veces con medio de cultivo normal (complementado con 10% de suero y penicilina/estreptomocina). Se añadió 0,1 nM de briostatina a las células y los matraces de cultivo se mantuvieron en incubadora de cultivo celular (a 37°C con 5% de CO₂) durante 20 min. Después de lavar cinco veces con medio sin suero, los matraces se mantuvieron en una incubadora (a 37°C con 5% de CO₂) en condiciones sin suero durante 16 horas. El ensayo de MAPK inducido por bradiquinina se realizó tal como se describió anteriormente.

Análisis de los datos

Las señales de las bandas de proteínas de la transferencia Western fueron escaneadas con un escáner Fuji LAS-1000 Plus. La intensidad de Erk1, Erk2, p-Erk1 y p-Erk2 se midieron a partir de bandas de proteínas escaneadas mediante un programa especialmente diseñado desarrollado por el Dr. Nelson en nuestro Instituto (Blanchette Rockefeller Neurosciences Institute, Rockville, MD). La intensidad se midió por densitometría de bandas. Las bandas de proteínas fueron seleccionadas por tiras y cada densidad de píxeles se calculó después de la sustracción del fondo por el programa. Se calcularon las relaciones de p-Erk1/p-Erk2 de la muestra (BK+) y el control (BK-), respectivamente. La siguiente fórmula se utilizó para distinguir entre los casos entre AA y no AD:

$$ADSMB = [p\text{-Erk1}/p\text{-Erk2}]^{BK+} - [p\text{-Erk1}/p\text{-Erk2}]^{BK-}$$

ADSMB = Biomarcador Molecular Específico de la Enfermedad de Alzheimer

EJEMPLO 3: Ensayo *in vitro* de fibroblastos de la piel para determinar la relación de Erk1 fosforilada y Erk2 fosforilada

Células de fibroblastos de piel depositadas (Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia no AD (non-ADD) (por ejemplo, Enfermedad de Huntington y Enfermedad de Parkinson y Esquizofrenia Clínica) y células de control de la misma edad (AC), del Instituto Coriell de Investigación Médica se cultivaron hasta un 90-100% de confluencia. Las células fueron cultivadas en un medio libre de suero (DMEM) durante 16 horas. Se añadieron 10 nM de bradiquinina (BK) en DMSO en el medio habitual a 37°C de 0 a 10 min. Para los controles, se añadió la misma cantidad de DMSO.

Después de lavar cuatro veces con PBS 1X frío (4°C), los matraces se mantuvieron en mezcla de hielo seco/etanol durante 15 min. Los matraces se extrajeron de la mezcla de hielo seco/etanol y, a continuación, se añadieron 80 μ l de tampón de lisis (10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 0,5% de NP-40, 1%

de Triton X-100, 1% de cóctel inhibidor de proteasas, 1% de cóctel inhibidor de fosfatasa ser/thr/tirosina) en cada matraz.

5 Los matraces se mantuvieron en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría (4°C) durante 30 min y se recogieron las células de cada matraz con un raspador para recoger células. Las células se sometieron a ultrasonido y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de transferencia Western después del ensayo de proteínas totales.

10 Erk1 y Erk2 totales y las formas fosforiladas de Erk1 y Erk2 (p-Erk1, p-Erk2) se determinaron utilizando anticuerpos específicos: anti-Erk1/2 normal y anti-fosfo-Erk1/2.

EJEMPLO 4: Fibroblastos de la piel

15 Los fibroblastos de piel depositados de pacientes con AD y controles de la misma edad se obtuvieron del Instituto Coriell de Investigación Médica. Los fibroblastos de piel confirmados por autopsia se obtuvieron por separado. Los pacientes pueden estar clínicamente afectados con demencia severa, pérdida de memoria progresiva y otras funciones cognitivas deterioradas. Los cerebros de estos pacientes muestran EEG anormales y diferentes grados de atrofia cerebral por TAC o TC. Se utilizaron como controles células de individuos normales con edad próxima.

20 Fibroblastos de piel extraídos en fresco. La recolección y el cultivo de los fibroblastos de tejido de la piel recién obtenidos se llevó a cabo de la siguiente manera: se obtuvieron tejidos de piel por biopsia con sacabocados de pacientes sin FAD (nFAD) y controles de la misma por edad por personal cualificado. Todos los pacientes (o sus representantes) firmaron formularios de consentimiento informado.

25 Fibroblastos depositados de la Enfermedad de Huntington. Estos fibroblastos son de pacientes con la Enfermedad de Huntington (HD), con demencia que acompaña a los síntomas típicos de la Enfermedad de Huntington. Se utilizaron como controles fibroblastos de individuos normales de la misma edad y género.

EJEMPLO 5: Materiales

30 El DMEM se adquirió de Gibco BRL. El suero fetal bovino se adquirió de Bio Fluids. La bradiquinina, ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (2ABP), cócteles de inhibidores de proteasas y fosfatasa se adquirieron de Sigma; bisindolilmaleimida-1 y LY294002 se adquirieron de Alexis; PD98059 se adquirió de Cell Signaling Technology. Los anticuerpos anti-fosfo-Erk1/2 se adquirieron de Cell Signaling Technology. Anti-Erk1/2 normal se adquirió de Upstate Biotechnology. Los minigeles de SDS (4-20%) se adquirieron de InvertoGene-Novex. Las membranas de nitrocelulosa se adquirieron de Schleicher & Schuell (Keene, NH). Todos los reactivos de electroforesis con SDS se adquirieron de Bio-Rad. El kit de sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal se adquirió de Pierce.

40 Alternativamente, la bradiquinina (P.M. 1060,2) se adquirió de Calbiochem (San Diego, CA). Anti fosfo-p44/p42 MAPK de conejo se adquirió de Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Anti-Erk1/2 normal se adquirió de Upstate Biotechnology, (Charlottesville, VA), el anticuerpo secundario anti-conejo se adquirió de Jackson Lab (Bar Harbor, ME). El beta amiloide (1-42) (P.M. 4514,1) se adquirió de American Peptide (Sunnyvale, CA). La Briostatina se adquirió de Biomol (Plymouth Meeting, PA).

EJEMPLO 6: Cultivo de células de fibroblastos de AC y AD

50 Los fibroblastos depositados de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer, incluyendo tanto el tipo FAD y nFAD, y de controles de la misma edad (AC), se mantuvieron y se cultivaron en frascos T25/T75 con DMEM que contenía un 10% de suero bovino fetal (FBS). Las células se utilizaron en los pases 6 a 17.

EJEMPLO 7: Procesado y cultivo de fibroblastos de tejido de biopsia fresco o muestras depositadas

60 Las muestras se colocaron en PBS 1X y se transportaron en medio de transferencia al laboratorio para la propagación. Después que se retiró el medio de transferencia, los tejidos de la piel se lavaron con PBS y se cortaron finamente explantes de 1 mm de tamaño. Los explantes se transfirieron uno por uno sobre la superficie de cultivo de matraces T25 ventilados con 3 ml de medio de biopsia que contiene 45% de FBS y 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina (Pen/Strep). Los tejidos se cultivaron a 37°C durante 24 h antes de la adición de 2 ml de medio de biopsia que contiene 10% de FBS. El medio se sustituyó después de 48 h con 5 ml de medio de cultivo normal que contenía FBS al 10% y 100 U/ml de penicilina/estreptomina. A continuación, las células se subcultivaron y se mantuvieron según un procedimiento normal mencionado anteriormente.

65 Los sistemas de cultivo de células de fibroblastos de piel humana también se han utilizado para estos estudios. Se cultivaron células de fibroblastos de piel depositadas con la Enfermedad de Alzheimer (AD), demencia sin AD (por ejemplo, Enfermedad de Huntington y Enfermedad de Parkinson y Esquizofrenia Clínica) y de controles de la misma edad, (AC) del Instituto Coriell de Investigación Médica (Camden, Nueva Jersey) (suplementado con 10% de suero y penicilina/estreptomina, 37°C con 5% de CO₂) a un 90-100% de la etapa de confluencia en un matraz de 25 ml de

cultivo de células. Las células se cultivaron en medio libre de suero (DMEM) durante 16 horas. Se añadieron 10 nM de solución de bradiquinina (en DMSO) en medio DMEM con 10% de suero. Se añadieron 7 ml de solución BK 10 nM al matraz de cultivo de 25 ml y se incubaron a 37°C durante 10 min. Para los controles, se añadió la misma cantidad de DMSO en medio DMEM con 10% de suero. Se añadieron 7 ml de este medio con DMSO (<0,01%) al matraz de cultivo de 25 ml y se incubaron a 37°C durante 10 min. Después de lavar cuatro veces con PBS 1X frío (4°C), los matraces se mantuvieron en mezcla de hielo seco/etanol durante 15 min. Los matraces se extrajeron del hielo seco/mezcla de etanol y, a continuación, se añadieron 100 µl de tampón de lisis (10 mM de Tris, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 0,5% de NP-40, 1% de Triton X-100, 1% de cóctel inhibidor de proteasas, 1% de cóctel inhibidor de fosfatasa ser/thr/tirosina) en cada matraz. Los matraces se mantuvieron en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría (4°C) durante 30 min y se recogieron las células de cada matraz con un raspador para recoger células. Las células se sometieron a ultrasonido y, a continuación, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se utilizó para el ensayo de transferencia Western después del ensayo de proteínas totales.

15 **EJEMPLO 8: Tratamiento de células de fibroblastos con diferentes activadores de proteína quinasa C**

Se utilizaron bradiquinina o diferentes activadores de proteína quinasa C específicos para el tratamiento de los fibroblastos. Se cultivaron fibroblastos de piel de AC y AD depositados hasta 80-100% de confluencia antes de su cultivo en DMEM libre de suero durante la noche. Las células se trataron con 10 nM de activador de proteína quinasa C a 37°C durante diferentes períodos de tiempo para establecer un curso de tiempo para los efectos inducidos por el activador de proteína quinasa C. El momento en el que las reacciones se terminan inmediatamente después de la aplicación del activador de la proteína quinasa C se define como "0 min" post-tratamiento con activador de proteína quinasa C. Se añade a un matraz de control de células para cada línea celular en cada punto de tiempo de tratamiento se añade con un volumen idéntico de PBS. La reacción se termina retirando el medio de cultivo, enjuagando las células rápidamente con PBS preenfriado, pH 7,4, y se transfiere el matraz sobre hielo seco/etanol. Para las células obtenidas y cultivadas a partir de tejidos de biopsias frescas, se puede utilizar una concentración de 0,1 nM de activador de proteína quinasa C. El tiempo de tratamiento es aproximadamente de 10 min a 37°C.

Para preparar lisados celulares de las células tratadas, los matraces se mueven de hielo seco/etanol a agua helada. Se añade a cada matraz 1 ml de tampón de lisis que contiene 10 mM de Tris, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, pH 8, 0,5% de NP-40, 1% de Triton X-100, 1% de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma), 1% de cóctel inhibidor de fosfatasa Ser/Thr y tirosina (Sigma). Después de agitar en un agitador de extremo a extremo en una habitación fría durante 30 minutos, las células se recogieron de cada matraz con un raspador para recoger células. Las células se sometieron a ultrasonido y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante se utilizó para la transferencia Western.

EJEMPLO 9: Transferencia Western

Protocolo 1: Los lisados celulares se trataron con un volumen igual de tampón de muestra-SDS 2X y se llevaron a ebullición durante 10 min. Las proteínas de cada muestra se resolvieron en un minigel de gradiente de 4-20% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se detectó Erk1/2 con un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 utilizando el kit de detección SuperSignal ECL. Con el fin de normalizar la cantidad de Erk1/2 fosforilada contra la cantidad total de Erk1/2, después de haber transferido con un anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2, la misma membrana se extrae con un tampón de extracción que contiene 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,7, SDS al 2%, y 100 mM de 2-mercaptoetanol a 60°C durante 45 min y, a continuación, se realizó la transferencia con un anticuerpo anti-Erk1/2 normal. Alternativamente, las muestras por duplicado se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se transfirieron respectivamente con anticuerpos anti-fosfo- y anti-Erk normal. Después de lavar con 10 mM de PBS, pH 7,4, que contiene 0,01% de Tween 20 (tres veces durante 10 min), la membrana se transfirió con un anticuerpo anti-Erk1/2 normal, a partir del cual se midió la cantidad total de Erk1/2 cargada en el gel de SDS.

Protocolo 2: Se añadieron volúmenes iguales de tampón de muestra SDS 2X a cada lisado celular, y se llevaron hasta ebullición durante 10 minutos en baño de agua hirviendo. La electroforesis se llevó a cabo en un minigel de gradiente de 8-16% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Se determinaron Erk1, Erk2 totales y las formas fosforiladas de Erk1 y Erk2 (p-Erk1, p-Erk2) se determinaron utilizando anticuerpos específicos.

EJEMPLO 10: Análisis de los Datos

Las señales tanto para las formas fosforiladas como normales de Erk1/2 se escanearon con un escáner Fujifilm LAS-1000 Plus. La densidad óptica promedio de cada banda de proteína se midió utilizando el programa NIH Image. Los valores de las señales de fosfo-Erk1/2 se normalizaron, respectivamente, contra las señales de Erk1/2 totales. Después de la normalización, los datos de cada línea celular tratada se convirtieron en un porcentaje del control basal y se sometieron a análisis estadístico.

EJEMPLO 11: Inmunocitoquímica

5 Las células de fibroblastos se cultivaron sobre la superficie de cubreobjetos de vidrio de 2,5 cm de diámetro recubiertos con 0,02 mg de polilisina. Tras el tratamiento con bradiquinina u otro activador de proteína quinasa C tal como se ha descrito anteriormente, las células se lavaron rápidamente con PBS frío, pH 7,4, y se fijaron con formaldehído al 4% en PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 15 min. Después de lavar con PBS, pH 7,4, tres veces, con una duración de 5 min, las células son penetradas con 0,1% de Triton X-100 en PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 30 min. Después de la incubación con 10% de suero de caballo normal en PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente durante 30 min, las células se incubaron con anticuerpo anti-fosfo-Erk1/2 (1:200) a 4°C durante toda la noche. Las células sobre los cubreobjetos se lavaron con PBS, pH 7,4, tres veces y, a continuación, se añadió una IgG anti-ratón marcada con fluoresceína (Vector Laboratories) (1:200) y se incubó con las células a temperatura ambiente durante 60 min. Después de tres lavados con PBS, y sellado con Vectashield (Vector Laboratories), se observaron las señales de inmunotinción con un microscopio de fluorescencia Nikon. La intensidad de las señales de inmunocitoquímica en las imágenes celulares se midió con el programa Bio-Rad Quantity One (BioRad) y Trimage. Para la localización de BK o receptores del activador de la proteína quinasa C en los fibroblastos de piel, se aplicó un anticuerpo B2 anti-BK monoclonal, o anticuerpo anti activador de la proteína quinasa C a los fibroblastos normales, seguido por incubación con IgG anti-ratón conjugado con Cy5. Las señales inmunorreactivas resultantes se observaron con un microscopio de fluorescencia.

20

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un kit para diagnosticar la presencia o ausencia de la Enfermedad de Alzheimer en un sujeto, comprendiendo el kit:

- 5
- a) un agente que es un activador de la proteína quinasa C seleccionado entre bradiquinina; modulador de α -APP; briostatina; briólogos; bombesina; colecistoquinina; trombina; prostaglandina F2 α ; vasopresina; 6-[N-decilamino]-4-hidroximetilinol (DHI); 1,2-dioctanoil-sn-glicerol; farnesiltiotriazol (FTT); gnidimacrina, *Stellera chamaejasme* L.; (-)-indolactam V; lipoxina A₄; linbiatoxina A, *Micromonospora* sp.; ácido oleico; 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol; 4 α -forbol-12,13-didecanoato; L- α -fosfatidilinositol-3,4-bifosfato, sal de dipalmitoil-pentaamonio; L- α -fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, sal de dipalmitoil-hexaamonio; 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol; timeleatoxina, *Thymelea hirsuta* L.; insulina; lisofosfatidilcolina; lipopolisacárido; daunorrubicina; y sulfato de vanadilo;
- 10
- b) un anticuerpo específico de una primera proteína MAP quinasa fosforilada, en la que la primera proteína MAP quinasa es Erk1;
- 15
- c) un anticuerpo específico de una segunda proteína MAP quinasa fosforilada, en la que la segunda proteína MAP quinasa es Erk2;

en el que la utilización comprende:

- 20
- i) poner en contacto las células de dicho sujeto con dicho agente que es un activador de la proteína quinasa C;
- ii) medir la relación de dicha primera proteína MAP quinasa fosforilada y dicha segunda proteína MAP quinasa fosforilada, en la que dichas primera y segunda proteínas MAP quinasa fosforiladas se obtienen de dichas células después de dicha etapa de contacto;
- 25
- iii) medir la relación de dicha primera proteína MAP quinasa fosforilada y dicha segunda proteína MAP quinasa fosforilada en las células de dicho sujeto que no han entrado en contacto con el agente de la etapa (i);
- iv) restar la relación obtenida en la etapa (iii) de la relación obtenida en la etapa (ii); y
- v) diagnosticar la presencia de Enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto sobre la base de la diferencia calculada en la etapa (iv).
- 30

2. Utilización, según la reivindicación 1, en el que dicho activador de la proteína quinasa C se selecciona del grupo que consiste en bradiquinina, briostatina, bombesina, colecistoquinina, trombina, prostaglandina F2 α y vasopresina.

3. Utilización, según la reivindicación 1, en el que el kit comprende adicionalmente un péptido beta amiloide.

4. Utilización, según la reivindicación 3, en el que dicho péptido beta amiloide es A β (1-42).

35

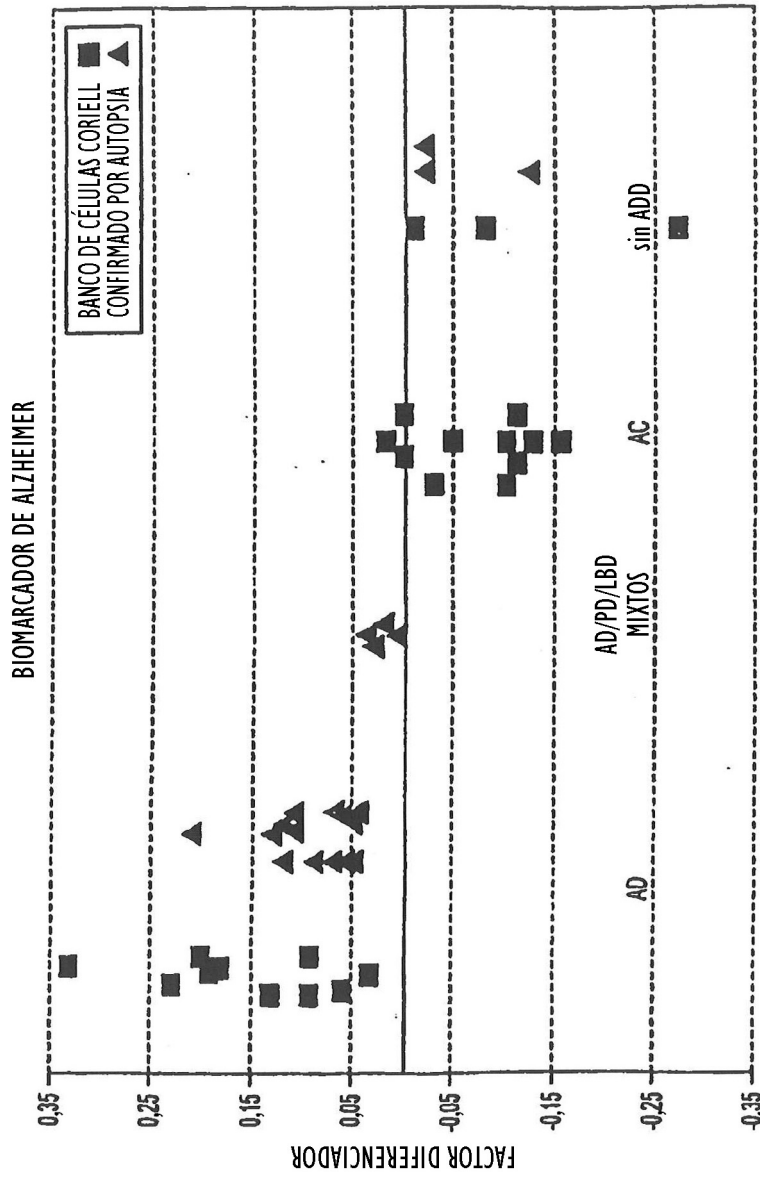


FIG. 1

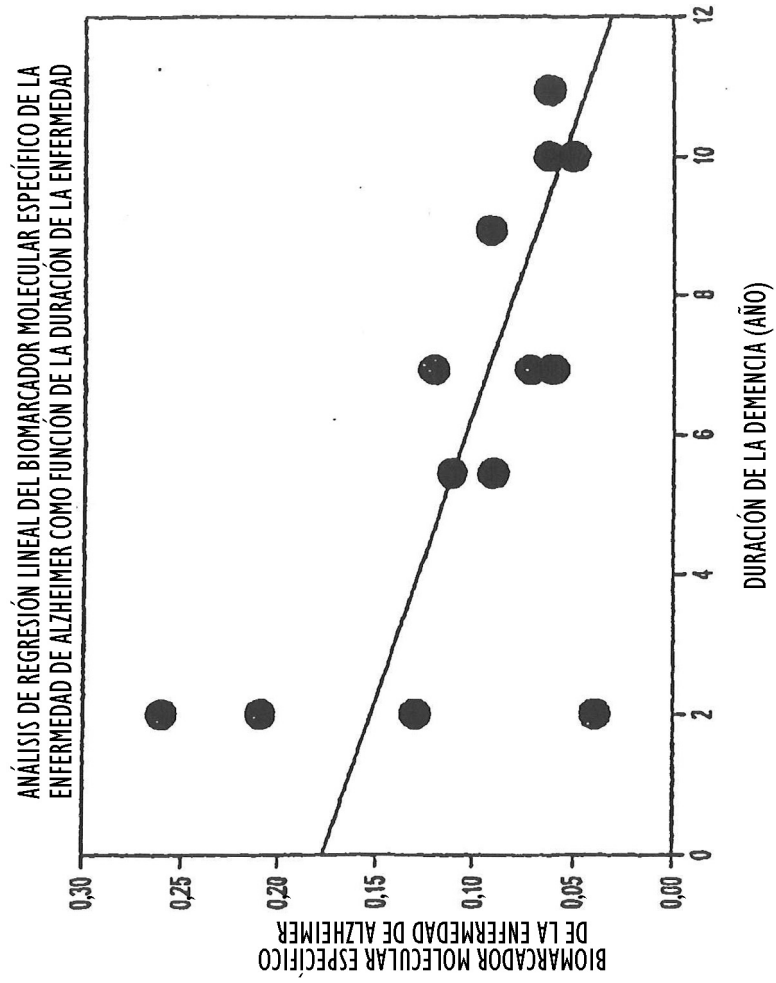


FIG. 2

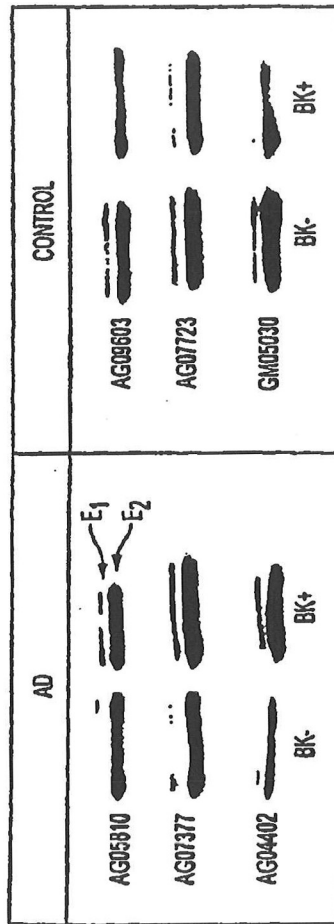


FIG. 3

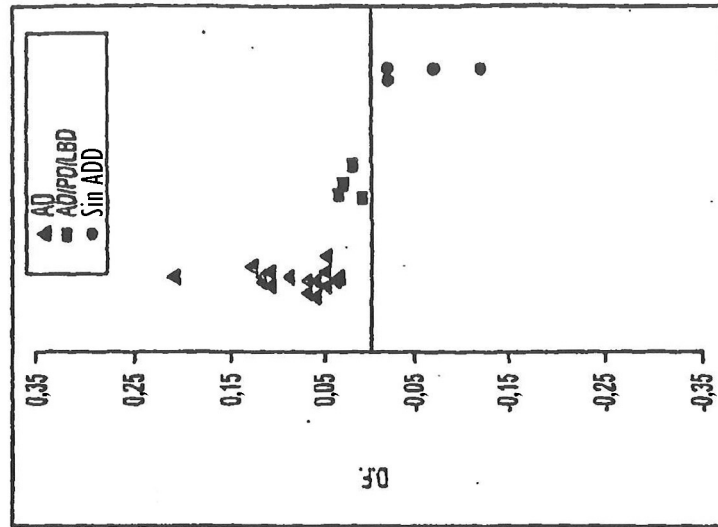


FIG. 4B

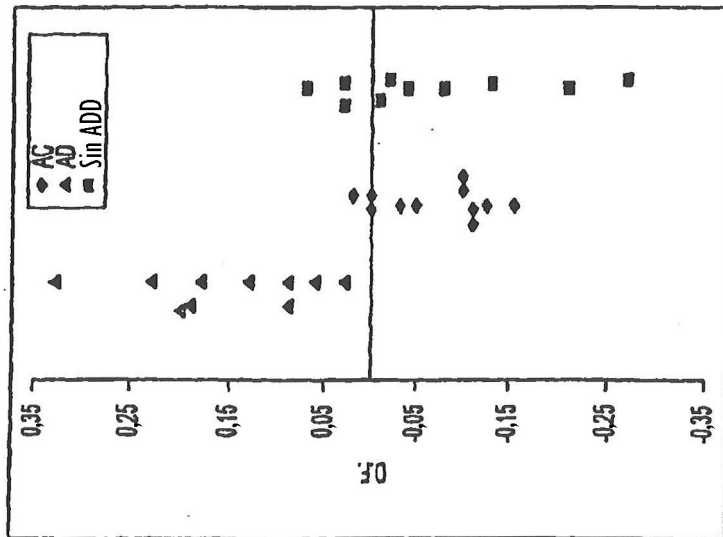
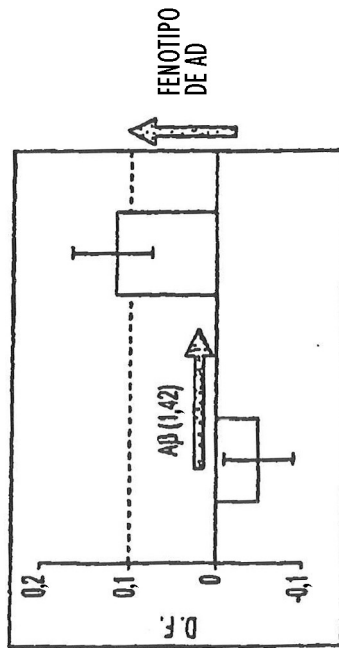
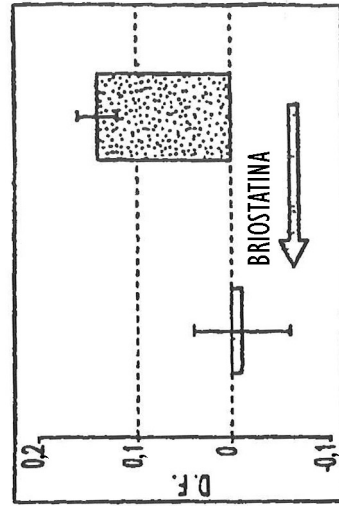


FIG. 4A



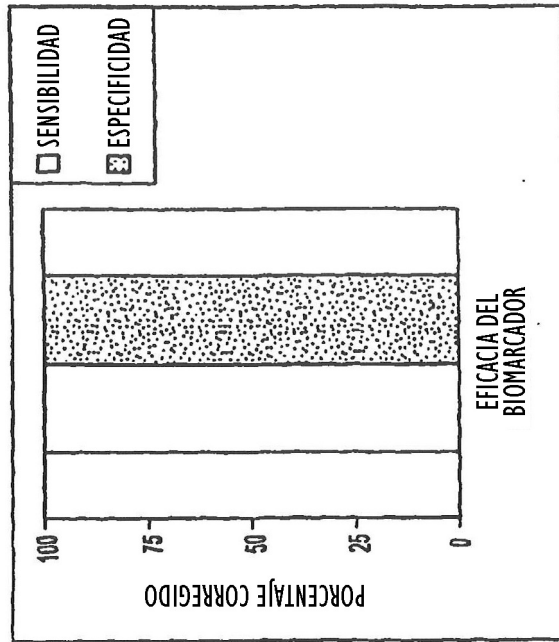


FIG. 6B

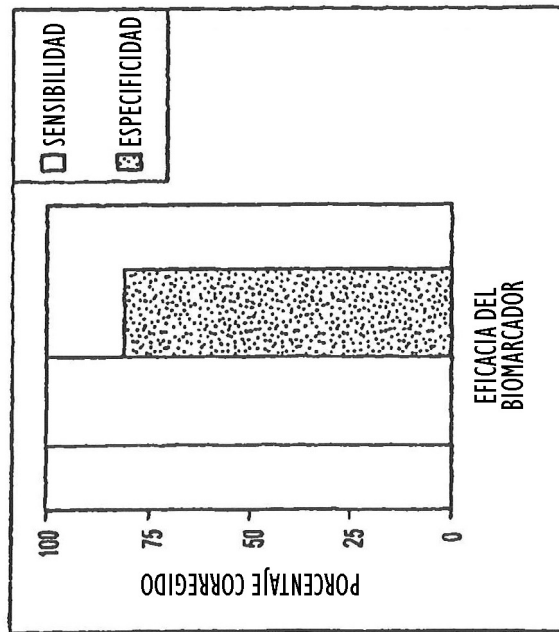


FIG. 6A