

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 897**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2008** **PCT/EP2008/008595**
87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2009** **WO09047002**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008** **E 08838209 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016** **EP 2220251**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de patologías caracterizadas por los depósitos anómalos de amiloide en órganos y tejidos mediante la detección de una mutación en la posición 673 en APP770, y vector y péptido para su uso en el tratamiento de dichas patologías**

30 Prioridad:

12.10.2007 IT MI20071975

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2017

73 Titular/es:

**FONDAZIONE I.R.C.C.S. ISTITUTO
NEUROLOGICO 'CARLO BESTA' (100.0%)
Via Celoria 11
20133 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**DI FEDE, GIUSEPPE;
MORBIN, MICHELA;
TAGLIAVINI, FABRIZIO y
MARTINI, ALFREDO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 607 897 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

Procedimiento para el diagnóstico de patologías caracterizadas por los depósitos anómalos de amiloide en órganos y tejidos mediante la detección de una mutación en la posición 673 en APP770, y vector y péptido para su uso en el tratamiento de dichas patologías

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en las personas ancianas. Es una enfermedad degenerativa caracterizada clínicamente por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas y caracterizada neuropatológicamente por la acumulación de agregados insolubles de amiloide β ($A\beta$) y proteína tau en la corteza cerebral y en la sustancia gris subcortical. El $A\beta$ se deposita en forma de amiloide extracelular en el neurópilo (placa senil) y en los vasos cerebrales (angiopatía congófila), mientras que la forma tau de la proteína forma filamentos intraneuronales anómalos (degeneraciones neurofibrilares) (Love S. *Neuropathological investigation of dementia: a guide for neurologists*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 76, Suppl 5:v8-14, 2005) (figura 1).

En un 95 % de los casos, la enfermedad de Alzheimer es esporádica, mientras que en aproximadamente un 5 % de los casos tiene un carácter familiar y se asocia con las mutaciones de 3 genes: presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14, presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1 y el precursor del amiloide β (APP) en el cromosoma 21. En estos casos, la enfermedad a menudo tiene un inicio más temprano que la forma esporádica y se transmite con un mecanismo de tipo autosómico dominante con penetración alta. La etiopatogenia de la EA todavía no se comprende completamente, pero en la última década se ha confirmado cada vez más la hipótesis de la "cascada amiloide" (Wilquet et al. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:582-8, 2004; Lee et al. Perspectives on the amyloid-beta cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis* 6:137-45, 2004) que atribuye un papel central al $A\beta$ tanto en las formas familiar (EAF) como esporádica.

El $A\beta$ deriva de su precursor β APP a través de una vía catabólica llamada "vía amiloidogénica" (figura 2). Esta vía proporciona la escisión de la molécula en dirección 5' y en dirección 3' de la proteína β por dos proteasas, la beta-secretasa y la gamma-secretasa. El corte de la beta-secretasa (BACE) genera un largo fragmento soluble terminal del extremo N ($sAPP\beta$) y un péptido terminal del extremo C de 99 aminoácidos (C99). Este se corta adicionalmente por la gamma-secretasa en dos fragmentos que corresponden con el $A\beta$ y un pequeño péptido terminal del extremo C (AICD) (Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest* 110:1375-81, 2002). En realidad, la gamma-secretasa tiene dos sitios de escisión principales que dan lugar a la formación de una forma "corta" y una "larga" del $A\beta$ ($A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42), que, en condiciones normales, tienen una proporción de 10:1. De manera análoga, la BACE puede actuar en diferentes puntos del péptido, generando formas truncadas en la región terminal del extremo N (por ejemplo, $A\beta$ 11-40, $A\beta$ 11-42 y $A\beta$ 3-42), que a menudo dan como resultado una EA incrementada (Liu et al. Characterization of $A\beta$ 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 112:163-74, 2006). La β APP puede encontrar una vía catabólica alternativa llamada "no amiloidogénica", puesto que la proteína se corta por otra proteasa (alfa-secretasa) en los residuos 16-17 del $A\beta$. De esta manera, la acción de la última enzima impide la formación del amiloide β .

La hipótesis de la cascada amiloide está respaldada por múltiples pruebas:

- las mutaciones del gen APP determinan las formas familiares de la EA (Rademakers et al, *Genetics of Early-Onset Alzheimer Dementia*. *ScientificWorldJournal* 16:497-519, 2003);
- la presencia de una copia adicional del gen APP, como se verifica en el síndrome de Down, es suficiente para determinar una descripción clínica-patológica de la EA;
- la mayor parte de las formas determinadas genéticamente de la EA se asocian con un incremento de la producción del $A\beta$, con un incremento de la proporción $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40 (Kahle et al. Attack on amyloid. *EMBO Rep* 4:747-51, 2003);
- el $A\beta$, particularmente en la forma "larga" de 42 residuos, muestra una fuerte tendencia a agregarse en oligómeros y a formar fibrillas de amiloide, que representan el principal constituyente de las placas seniles (Armstrong RA. Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 44:1-11, 2006);
- el $A\beta$, especialmente la forma de 42 aminoácidos, es neurotóxico (Butterfield et al. Amyloid beta-peptide (1-42) contributes the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. *Brain Pathol* 14:426-32, 2004);
- los ratones transgénicos, portadores del gen de APP asociado con la EA, acumulan amiloide β en el sistema nervioso central y muestran deficiencias en la esfera conductual-cognitiva que se acentúan como una función de la edad (Kurt et al. Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes *Exp Neurol* 171:59-71, 2001);
- la inmunización hacia el $A\beta$ de ratones transgénicos que expresan el APP humano reduce la formación de placas amiloides y mejora sus deficiencias neurológicas (Lemere et al. Amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse models and wildtype mice. *Neurochem Res* 28:1017-27, 2003).

En relación con las formas determinadas genéticamente, aproximadamente un 80 % de los casos de EA familiar se asocian con mutaciones en PSEN1 y PSEN2 (Rocchi et al. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1-24, 2003). Ambas presenilinas están implicadas en la generación del $A\beta$,

formando parte del complejo macromolecular de la gamma-secretasa, y sus mutaciones provocan un incremento de la producción del A β , sobre todo de A β 1-42, que tiene una alta tendencia a formar agregados neurotóxicos.

Aproximadamente un 5 % de las EAF están provocadas por mutaciones ubicadas en el gen de APP (*Rocchi et al. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. Brain Res Bull* 61:1-24, 2003) (figura 2). Algunas de estas mutaciones ejercen su efecto patógeno favoreciendo las conformaciones del A β ricas en estructura secundaria de lámina beta, con la consiguiente reducción de la solubilidad y tendencia hacia la agregación. Por otro lado, otras mutaciones interfieren con el procesamiento del APP debido a su ubicación en los sitios de la molécula donde actúan las secretasas (por ejemplo, la "mutación sueca" KM670/671NL). Aun así, otras, con un mecanismo completamente desconocido, provocan la acumulación por producción de formas largas e insolubles del A β (A β 1-42 y A β 1-43). En los casos de EA asociados con mutaciones del APP o de las presenilinas, se incrementa el A β 1-42 hasta que constituye un 15-40 % de los péptidos A β secretados, mientras que, en condiciones normales, representa únicamente un 5-10 % de los mismos (*Rocchi et al. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. Brain Res Bull* 61:1-24, 2003; *Lieò et al. Clinical, Pathological, and Biochemical Spectrum of Alzheimer Disease Associated with PS-1 Mutations. Am J Geriatr Psychiatry* 12:146-56. 2004).

La entrada en DATABASE EBI [en línea] EMBL; 26 de febrero de 2004 (26-02-2004), DIAS NETO E. ET AL: "RC0-HT0505-010200-012-h02 HT0505 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence", con número de acceso en la base de datos BG877527, divulga una secuencia que contiene un polimorfismo de C por T en una posición que se corresponde con el residuo 2212 del gen de APP770. El documento WO 2004/099376 divulga vectores de expresión con sitios de escisión de beta-secretasa con mutación en los que uno de los vectores contiene la secuencia NLDV, que únicamente difiere de la isoforma sueca de APP en la sustitución A673V.

La tarea técnica de la presente invención es la de proporcionar procedimientos para el diagnóstico de y productos para su uso en la prevención y/o cuidado de patologías animales y/o humanas caracterizadas por los depósitos anómalos de la sustancia amiloide β y/o sustancia similar a amiloide en tejidos y/u órganos animales y/o humanos, y un procedimiento de cribado para determinar el riesgo de dichas patologías.

La tarea técnica, así como otros objetivos de acuerdo con la presente invención, se logra por medio de lo revelado en las reivindicaciones independientes expuestas a continuación.

Se definen otras características de la invención por las reivindicaciones posteriores.

Las características y ventajas adicionales de la presente invención son más evidentes a partir de la siguiente descripción respaldada por las figuras adjuntas 1-19.

La presente invención se refiere al reciente descubrimiento de una nueva mutación puntiforme del gen de APP humano. La mutación se caracteriza por la sustitución de una citosina con una timidina en el codón 673 de la secuencia codificante del gen de APP humano (D8765), correspondiente con el nucleótido 2212 (transición c.2212>T) de la isoforma de APP770 humano (NM_000484.2) de acuerdo con la nomenclatura de la base de datos GenBank, accesible en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para los propósitos de esta patente, por sustancias similares a amiloide se pretenden agregados de proteínas del A β que no tengan las características tintóreas y/o ultraestructurales del propio amiloide. Dicha mutación, que, en la secuencia de proteínas, induce la sustitución de una alanina con una valina en la posición 673 (Ala673Val) de APP770, correspondiente con el residuo aminoacídico 2 del A β , se identificó en homocigosis de un paciente afectado con una forma grave de demencia con inicio presenil. El análisis del líquido cefalorraquídeo del paciente mostró una disminución considerable de la proteína tau total y tau fosforilada, como se observa en la enfermedad de Alzheimer. Por otro lado, se incrementan las concentraciones plasmáticas de A β 1-40 y A β 1-42 con respecto a los sujetos de control y también con respecto a los sujetos que tienen la misma mutación en heterocigosis. Además, los fibroblastos obtenidos a partir de biopsia de piel del paciente liberaron, en su medio de cultivo, cantidades más altas de A β 1-40 y A β 1-42 con respecto a los fibroblastos de control. En general, estos datos, cuyos detalles se exponen en varios de los ejemplos enumerados a continuación, indican que la mutación Ala673Val, en estado de homocigosis, se asocia con una demencia que se puede describir como enfermedad de Alzheimer y es análoga a otras mutaciones del gen de APP, influye en el procesamiento del APP incrementando la producción del A β .

El estudio genético de diferentes familiares demostró la presencia de otro portador familiar de la mutación Ala673Val en homocigosis. Este pariente, más joven que el paciente, se sometió a una evaluación neuropsicológica, que detectó signos iniciales de alteración de diferentes funciones cognitivas. Por otra parte, el análisis genético permitió identificar numerosos sujetos portadores de la misma mutación en heterocigosis que, de manera sorprendente, no habían desarrollado ningún desarrollo neurológico, incluso si algunos de ellos eran de edad avanzada (IX década de la vida) (figura 4). Los estudios de expresión génica llevados a cabo en el ARN transcrito partiendo del gen APP demostraron que en estos sujetos se transcriben ambos alelos (es decir, silvestre y mutado). Por lo tanto, la ausencia de enfermedad en los heterocigotos no se puede deber a un mecanismo de represión génica (inhibición de la transcripción del alelo "patológico"). Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis de que la mutación Ala673Val, a diferencia de lo descrito hasta ahora en el gen de APP, totalmente autosómica dominante con penetración completa, tenga una expresión de tipo autosómica recesiva. De esto se deduce que varias formas aparentemente esporádicas de la EA podrían estar provocadas genéticamente con transmisión autosómica recesiva.

A fin de investigar las bases moleculares de este fenómeno, se han sintetizado 2 péptidos A β 1-40, uno silvestre (DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGW), el otro que contiene una valina en lugar de la alanina en la posición 2 (DVEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV). Se sometieron los dos péptidos a análisis morfológico y químico-físico dirigido a evaluar su estructura secundaria, la cinética de agregación y la morfología y naturaleza de los agregados. Estas investigaciones mostraron que el péptido mutado tenía propensión a formar fibrillas de amiloide que eran mucho más grandes que en el silvestre. De manera bastante sorprendente, la mezcla compuesta de cantidades equimolares de los dos péptidos no solo se agrega menos que el péptido mutado, sino también menos que el péptido silvestre por sí solo. Este efecto "inhibidor" en la amiloidogénesis coincide con la observación clínica de que la enfermedad se manifiesta exclusivamente en los sujetos homocigotos para la mutación Ala673Val, mientras que los heterocigotos, que coexpresan ambos péptidos a nivel celular (silvestre y mutado), no caen enfermos. Basándose en estos datos, incluso se puede suponer que se puede proteger a las personas heterocigotas de la enfermedad de Alzheimer debido a la pequeña tendencia fibrilógena del péptido A β mutado en presencia de su correspondiente silvestre.

A fin de verificar la hipótesis de que la región terminal del extremo N del A β , que alberga la mutación, desempeña un papel importante en la agregación y que la mutación Ala673Val tiene un efecto inhibitorio, se sintetizaron dos péptidos correspondientes con los primeros seis aminoácidos del A β , uno con la secuencia silvestre (DAEFRH) y el otro que contiene una valina en lugar de la alanina en la posición 2 (DVEFRH). Entonces, se coinubaron los dos hexapéptidos con A β 1-40 silvestre y se examinaron en tiempos posteriores. El estudio demostró que ambos hexapéptidos inhiben la tendencia espontánea para la fibrilogenia del A β 1-40 y que el efecto del hexapéptido mutado es mayor que el del silvestre correspondiente.

Estos datos abren nuevas posibilidades en el alcance de estrategias terapéuticas para la EA, y, más en general, de las enfermedades caracterizadas por la acumulación de proteínas en forma de agregados insolubles y tóxicos en el sistema nervioso central o en otros tejidos.

Una primera aplicación de la divulgación consiste en la producción, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, de un vector que contenga el ADNc del APP humano con Ala673Val y el uso de dicho vector a fin de transfectar líneas celulares que se puedan usar para estudios de patogenia y tratamiento.

Una segunda aplicación consiste en el uso de la construcción, de acuerdo con la aplicación previa, como vector para la producción, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, de mamíferos no humanos transgénicos que puedan expresar APP humano con mutación Ala673Val, como forma única de APP (animales homocigotos) o en combinación con APP humano silvestre o que contenga otra mutación (transgénico doble). Se pueden usar dichos animales como modelos para el estudio de la patogenia, diagnóstico, prevención y cuidado de patologías animales y/o humanas, caracterizadas por la formación y depósitos anómalos de la sustancia similar a amiloide y/o amiloide β en órganos y tejidos. En el modo de realización actual, el animal preferente es el ratón, y, en particular, la cepa murina con genes suprimidos C57BL6 para el APP endógeno, y la patología preferente es la EA.

Considerando la capacidad potencial del péptido mutado para interferir con la agregación y la fibrilogenia del A β , otra posible aplicación de la invención está representada por la generación de una construcción que contenga APP con mutación Ala673Val en el tratamiento génico *in vivo* (el ADN se transfiere directamente en las células o tejidos del paciente) o tratamiento génico *ex vivo* (el ADN se transfiere en primer lugar en células aisladas a partir del organismo y cultivadas en el laboratorio, que, modificadas de esta manera, se pueden reintroducir en el paciente) de patologías caracterizadas por depósitos anómalos de la sustancia amiloide β en tejidos y órganos. Se puede lograr la transferencia de la construcción en las células diana por medio de vectores de tipo vírico, tales como, por ejemplo, (a) retrovirus, que tienen la capacidad de integrar su ADN dentro de los cromosomas de la célula de proliferación, (b) lentivirus, que también permiten la transferencia de material genético en células que no proliferan, (c) virus adenoasociados, que no integran su ADN en los cromosomas de la célula, pero se pueden usar únicamente para genes de pequeño tamaño, (d) adenovirus, que pueden transportar genes de gran tamaño, pero, no obstante, garantizan su expresión durante periodos de tiempo limitados o (e) virus del herpes simple, que únicamente infecta a varios tipos de células, en particular, las neuronas. De forma alternativa, es posible usar vectores no víricos, como los liposomas. La introducción de APP con la mutación Ala673Val en organismos afectados de patologías con acumulaciones anómalas del A β puede proporcionar una fuente de proteína β mutada que pueda inhibir la acumulación de sustancias amiloides β en los tejidos.

Otra aplicación posible se representa mediante el uso de ARNm de sentido negativo, que contiene la presente mutación, para inhibir la traducción del mensajero en sujetos homocigotos para la mutación Ala673Val, de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica (interferencia por ARN, iARN). La inhibición de la traducción tiene el objetivo de provocar un bloqueo de la producción de los péptidos mutados, que tienen la fuerte tendencia hacia la agregación. Los experimentos basados en la tecnología de iARN aplicados a la divulgación también pueden ser útiles en el estudio de la patogenia de enfermedades caracterizadas por la formación y depósitos anómalos de sustancias similares a amiloide y/o amiloide β en los tejidos y órganos. Otra aplicación de la divulgación proporciona el uso del APP humano con mutación Ala673Val y péptidos naturales o de síntesis que contengan la mutación por sí misma para el diagnóstico, prevención y cuidado de patologías animales y/o humanas caracterizadas por la formación y depósitos anómalos de sustancias similares a amiloide y/o amiloide β en los tejidos y órganos.

El modo de realización preferente proporciona el uso de péptidos de bajo peso molecular, como el hexapéptido DVEFRH, formulado adecuadamente para la administración oral y/o parenteral, incluyendo la administración intratecal. La patología preferente es la EA. El tratamiento proporciona la administración de péptidos únicos o la asociación de varios péptidos, usados como tratamiento único o en asociación con otros fármacos.

- 5 Una aplicación adicional de la divulgación proporciona la producción, por medio de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, de anticuerpos hacia las proteínas y/o péptidos de conformidad con la aplicación previa, que se van usar en el diagnóstico, prevención y/o cuidado de patologías animales y/o humanas caracterizadas por la formación y depósitos anómalos de sustancias similares a amiloide y/o amiloide β en los tejidos y órganos.

- 10 La divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal que pueda reconocer la mutación Ala673Val en el APP humano y en péptidos derivados del mismo y que contengan dicha mutación. Se puede usar dicho anticuerpo para propósitos de diagnóstico a fin de reconocer el APP con la mutación Ala673Val, o formular adecuadamente, para el tratamiento de la amiloidosis caracterizada por la presencia de este APP mutado. La amiloidosis preferente es la EA.

Las aplicaciones descritas anteriormente se exponen como un ejemplo y de ninguna manera son limitantes de los desarrollos de la invención que se define por las reivindicaciones.

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1: *Identificación de una nueva mutación del gen de APP y descripción del fenotipo clínico del paciente portador de dicha mutación.*

- 20 Se realizó la identificación de la mutación por medio de la extracción del ADN genómico a partir de linfocitos de pacientes, amplificación de los exones 16 y 17 del gen APP por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los cebadores 5'-GTTTTGGGTAGCCTTG-3' y 5'-GGCAAGACAAAACAGTAGTGG-3' y secuenciación del producto de amplificación (figura 5) de acuerdo con las técnicas ya descritas (*Wakutani et al.* Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probably familial Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1039-42, 2004).

- 25 Puesto que la mutación elimina un sitio de corte específico para la enzima de restricción HpYCH4V dentro del exón 16, también se muestra la presencia de Ala673Val por medio de amplificación del exón 16 a través de PCR (cebadores: 5'-GGCAAGACAAAACAGTAGTGG-3' y 5'-TACTTTAATTATGATGTAATA-3'), digestión del producto de PCR con HpYCH4V y separación de los fragmentos en gel de agarosa al 2,5 %. En el alelo silvestre, la digestión con HpYCH4V produce dos fragmentos de 91 y 78 pares de bases (pb), mientras que el alelo mutado genera un único fragmento de 169 pb (figura 6).

- 30 Se identificó la mutación Ala673Val en homocigosis en un paciente sin componente familiar para demencia, afectado de un síndrome psicoorgánico evolutivo con inicio a los 36 años, con deficiencias en la memoria con empeoramiento, dificultades de planificación y problemas conductuales (figura 4, III 18). La descripción clínica evolucionó hacia un importante declive cognitivo multisectorial, al que se asocian movimientos involuntarios de tipo mioclónico, parkinsonismo y tetraparesia espástica.

- 35 El estudio genético de la familia permitió identificar un segundo sujeto homocigoto para la mutación Ala673Val (figura 4, III 20) y diferentes sujetos heterocigotos (figura 4, II 10, III 1, III 2, III 8, III 12, IV 1). El homocigoto (es decir, la hermana del paciente, cinco años más joven) tiene actualmente signos iniciales de deterioro cognitivo compatibles con un inicio de la enfermedad; por otro lado, ninguno de los sujetos heterocigotos ha mostrado signos de patología neurológica, ni incluso en edad avanzada. Esta observación sugiere que la mutación Ala673Val es autosómica recesiva, dando como resultado que es la única de las descritas hasta ahora en asociación con la EA que expresa únicamente un fenotipo patológico cuando está presente en homocigosis.

- 40 Se debe señalar que el mismo codón del gen de APP alberga un polimorfismo Ala673Thr. Se encontró este polimorfismo en heterocigosis en un sujeto sin signos clínicos o alteraciones neuropatológicas indicativas de la EA (*Peacock et al.* Novel polymorphism in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1254-56, 1993).

La investigación instrumental y en el laboratorio llevada a cabo en el paciente mostró:

- atrofia cerebral generalizada, con afectación predominante de las regiones frontales, en la RM del encéfalo;
- incremento significativo de los péptidos A β 1-40 y A β 1-42 en el plasma (426 ± 93 pg/ml y 46 ± 7 pg/ml, respectivamente) en comparación con un grupo de control representado por sujetos no afectados de demencia (A β 1-40= 109 ± 12 pg/ml, $p=0,003$; A β 1-42= 20 ± 6 pg/ml, $p=0,004$) (figura 7);
- incremento del A β en el medio de cultivo de los fibroblastos extraídos del paciente por medio de biopsia de piel (A β 1-40= $87,3 \pm 9,5$ pg/ml; A β 1-42= $8,8 \pm 0,2$ pg/ml) con respecto a los controles negativos (A β 1-40= $34,4 \pm 3,8$ pg/ml; A β 1-42= $4,4 \pm 0,6$ pg/ml) (figura 8);
- disminución del A β 1-42 ± 43 pg/ml frente a 392 ± 115 pg/ml de un grupo de control, $p=0,0004$) (figura 9) e incremento de la proteína tau (420 pg/ml; intervalo de normalidad de 90-150 pg/ml) y tau fosforilada (63,3 pg/ml, concentración promedio en los controles: 19,1 pg/ml) (figura 10) en el líquido cefalorraquídeo.

Las alteraciones descritas son completamente similares a las observadas en la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 2: Análisis de las características químico-físicas de los péptidos A β que contienen la mutación Ala673Val.

A fin de averiguar los efectos de la mutación Ala673Val y verificar su papel en la patogenia de la EA, se sintetizaron 2 péptidos A β -40, uno con la secuencia silvestre (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV) y el otro que contenía alanina>valina en la posición 2 (DVEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV). Se produjeron los péptidos por medio de síntesis en fase sólida usando un sintetizador 433A (Applied Biosystems). Entonces, los péptidos unidos a la resina se derivatizaron en el lado terminal del extremo N con una sonda lipófila (carbonato de 4-dodecilaminocarbonilfluoreno-9-ilmetilsuccinimidilo) de acuerdo con el procedimiento descrito por Ball *et al.* (*Int J Pept Prot Res* 40:370-9, 1992) con las modificaciones introducidas por Bonetto *et al.* (*J Biol Chem* 277: 31327-34, 2002). Después de la separación de la resina, se purificaron los péptidos por medio de HPLC, usando una columna de fase inversa C4 (Waters), obteniendo una pureza > un 95 %. Se determinó la identidad de los péptidos por medio de espectrometría MALDI-TOF (Reflex III Brucker Model).

Para los estudios físico-químicos expuestos a continuación (a menos que se especifique de otro modo), los péptidos silvestres A β 1-40, mutados A β 1-40 y muestras que contenían mezclas equimolares de los dos se disolvieron en NaOH 10 mM y posteriormente se diluyeron en Tris HCl 50 mM, pH 7,0, a la concentración final de 0,25 y 0,125 mM. Entonces, se incubaron las muestras a 37 °C durante 1, 4, 8, 24 horas y 3, 5, 10, 15 y 20 días. Para cada tiempo, se analizaron alícuotas de las muestras a fin de determinar la estructura secundaria, la agregación, la ultraestructura y las propiedades ópticas-tintóreas del agregado.

Estructura secundaria

Se investigaron las variaciones inducidas por la mutación de la estructura secundaria del A β por medio de dicroísmo circular de acuerdo con la técnica descrita por Clippingdale *et al.* (*J Pept Sci* 5:227-49, 2001). Se diluyeron los péptidos en tampón fosfato 150 mM, pH 7,4, hasta la concentración final de 100 μ M y se realizaron las mediciones con un espectropolarímetro Jasco-810 a una temperatura constante de 37 °C. Se consiguieron los espectros usando un tubo de ensayo de 1 mm y una velocidad de barrido de 20 nm/min. Después de haber obtenido el espectro de la solución tampón, se redujo el ruido, cuando se requirió, usando el procedimiento de la media móvil.

El análisis demuestra que el péptido mutado tenía una fuerte tendencia a asumir una conformación secundaria abundante en láminas β . En todos los tiempos examinados, el contenido en láminas β fue mucho más alto, no solo con respecto al del péptido silvestre, sino también con respecto al de la mezcla equimolar constituida por péptidos silvestres y mutados (figura 11).

Esto indica que la mutación Ala673Val condiciona el plegamiento del A β , lo que provoca un incremento considerable de la estructura secundaria de lámina β .

Agregación

Se evaluó la agregación de A β 1-40 silvestre, A β 1-40 mutado y su mezcla equimolar determinando la cantidad de péptido que puede sedimentar con centrifugación. Se centrifugaron alícuotas de 30 μ l de las muestras a 15.000 g durante 15 minutos a 4 °C en los diferentes tiempos de incubación. Se solubilizó el sedimento en 25 μ l de ácido fórmico puro y se inyectó la solución en HPLC provista de columna PRLP-S 100Å, 4,6 x 150 mm (Labservice Analytica, Polymer Laboratories). Se realizó la elución usando como fase móvil un eluyente A compuesto de TFA al 0,1 % en agua y un eluyente B constituido por TFA al 0,08 % en acetonitrilo, a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min, aplicando un gradiente lineal de 15-60 % del eluyente B en 20 min. Se modificó el máximo correspondiente al péptido midiendo la absorbancia del eluato a 214 nm.

Se calculó la cantidad de péptido que se puede sedimentar como porcentaje de la cantidad total de péptido presente en la solución inicial.

Estos experimentos demostraron que el péptido mutado se agregó mucho más y mucho más rápidamente que el péptido silvestre y que, de manera sorprendente, la mezcla formada por los dos sedimentos de péptidos menos que el péptido mutado, así como el péptido silvestre (figura 12).

Ultraestructura y propiedades tintóreas de los agregados

Se estudiaron las características ultraestructurales y las propiedades ópticas-tintóreas de los agregados, respectivamente, por medio de microscopio electrónico y microscopio de luz polarizada después de la coloración con rojo Congo.

Para la investigación ultraestructural, se extrajeron 5 μ l de suspensión de A β 1-40 silvestre, A β 1-40 mutado y su mezcla equimolar en los tiempos de incubación en el intervalo de 1 hora-20 días, se depositaron sobre una pantalla de níquel cubierta con formvar-carbono durante 5 minutos, se colorearon negativamente con una solución sobresaturada de uranilo y se observaron bajo el microscopio electrónico (EM109 Zeiss). En el vigésimo día de incubación, se centrifugaron alícuotas de las muestras a 15.000 g durante 15 minutos. Los gránulos obtenidos de

esta manera se fijaron en glutaral al 2,5 % en tampón fosfato, pH 7,4, se posfijaron en tetróxido de osmio al 1 %, se deshidrataron en acetona y se incluyeron en resina epoxi (Spurr, Electron Microscopy Sciences). Se recogieron las secciones ultrafinas (500 Å) sobre pantallas de cobre, se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron bajo el microscopio electrónico.

- 5 A fin de verificar si, y en qué medida, los agregados estaban constituidos por amiloide, se recogieron 5 µl de solución de cada muestra, para los diferentes tiempos de incubación, sobre portaobjetos polilisados (Bio-Optical), se colorearon con rojo Congo y se examinaron con microscopio de luz polarizada (Nikon Eclipse E-800).

El análisis ultraestructural mostró que, en los primeros dos días de incubación, el péptido Aβ1-40 silvestre forma agregados amorfos, oligómeros y estructuras filamentosas infrecuentes. Después de 48 horas, aparece un material de fibrillas cortas, no ramificado, irregular (protofibrillas) y únicamente después de 72 horas de incubación se observan fibrillas rectilíneas largas, de diámetros de aproximadamente 8 nm, interpuestas con material amorfo y de protofibrillas. Posteriormente, se incrementa la densidad de las fibrillas y se incrementa proporcionalmente la cantidad de material amorfo y de protofibrillas. Únicamente después de 15 días de incubación, la mayor parte del material se compone de redes de fibrillas densas.

- 15 Por otro lado, la cinética de agregación del péptido mutado Aβ1-40 fue muy rápida. De hecho, a partir de las 24 horas de incubación, estaban presentes las fibrillas regulares largas que carecían de ramificaciones (figura 13) y, después de 5 días, la muestra estaba constituida por redes de fibrillas densas, sin material amorfo y de protofibrillas.

De manera sorprendente, la mezcla equimolar de los dos péptidos forma menos fibrillas, no solo con respecto al péptido mutado, sino también con respecto al silvestre, y, después de 20 días de incubación, la mayor parte de los agregados estaban compuestos de material amorfo (figura 14).

La observación en luz polarizada de las preparaciones coloreadas con rojo Congo mostró que el péptido mutado Aβ1-40 es mucho más amiloidógeno que el Aβ1-40 silvestre y que la mezcla de los dos péptidos tiene una baja tendencia a formar amiloide. De hecho, ya estaban presentes pequeños agregados de material birrefringente después de 24 horas de incubación (figura 13) en las muestras de Aβ1-40 mutado, después de 72 horas en las muestras de Aβ1-40 silvestre y, únicamente después de 5 días, en la mezcla de los dos péptidos. En un tiempo posterior, fue observable un incremento progresivo de material birrefringente en las muestras de Aβ1-40 mutado y Aβ1-40 silvestre, mientras que el incremento fue muy pequeño en la mezcla de los dos péptidos, incluso después de 20 días de incubación (figura 14).

Estos datos confirman los resultados de los estudios de agregación, lo que demuestra que (i) el péptido mutado Aβ1-40 es mucho más amiloidógeno que el silvestre y (ii) la mezcla de los dos péptidos tiene una baja tendencia a formar fibrillas de amiloide.

Ejemplo 3. *Inhibición de la amiloidogénesis por medio de péptidos sintéticos, homólogos de la región terminal del extremo N del Aβ que contiene la mutación Ala673Val.*

Puesto que el estudio físico-químico de la mezcla de los péptidos Aβ1-40 mutado y Aβ1-40 silvestre sugirió que la mutación Ala673Val podría tener un efecto inhibitor sobre la agregación del Aβ, se verificó esta hipótesis usando dos péptidos sintéticos correspondientes a los primeros seis aminoácidos del Aβ, uno con la secuencia silvestre (DAEFRH) y el otro que contenía una valina en lugar de la alanina en la posición 2 (DVEFRH). Se coincuraron los dos hexapéptidos con Aβ1-40 silvestre a una concentración equimolar o en exceso (hexapéptido:Aβ1-40 = 5:1). Se prepararon las mezclas para el estudio ultraestructural e histoquímico como se describe en el ejemplo 2. El estudio ha demostrado que ambos hexapéptidos (tanto el mutado como el silvestre) inhiben la fibrillogenia de Aβ1-40, lo que indica que la región terminal del extremo N del Aβ, el sitio de la mutación, desempeña un papel importante en la agregación (figura 15). No obstante, el hexapéptido mutado resultó ser más activo que el silvestre correspondiente, lo que señala la importancia de la mutación Ala673Val debido al efecto inhibitor sobre la fibrillogenia.

Ejemplo 4: *Transfección de líneas celulares con APP humano silvestre o que contiene la mutación Ala>Val en la posición 2 del Aβ.*

Se generaron dos vectores, por medio de procedimientos de ingeniería genética (Tesco et al. APP substitutions V715F and L720P alter PS1 conformation and differentially affect Aβ and AICD generation. *J Neurochem* 95: 446-56, 2005; Sudhir et al. Release of Amino-terminal Fragments from Amyloid Precursor Protein Reporter and Mutated Derivatives in Cultured Cell. *J Biol Chem* 267:25602-08, 1992), que contenían respectivamente el ADNc de APP751 humano silvestre y el ADNc de APP751 humano con la mutación Ala>Val en la posición 2 del Aβ. Con estos vectores, se transfectaron dos líneas celulares (COS7 y CHO), en las que se llevó a cabo la medición del Aβ en el medio con el procedimiento de ELISA.

Se insertó la mutación Ala>Val en la posición 2 del Aβ en el ADNc de APP751 humano por medio de mutagénesis específica de sitio (QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) usando los oligonucleótidos 5'-GATCTCTGAAGTGAAGATGGATGTAGAATTCC-3' y 5'-GTCATGTCTGGAATTCTACATCCATCTTCACTT-3'. Entonces, se amplifican tanto la forma silvestre como mutada de APP por medio de PCT, usando los cebadores 5'-CCCGGATATCGCCACCATGCTGCCCGTTTGGCAC-3' y 5'-ACCGAAGCTTTGTGGCGGGGTCTAGTTC-3' (el

primero que contenía un sitio reconocido por la enzima de restricción EcoRV, el segundo con el sitio para la enzima HindIII) y se clonaron en el vector pcDNA 3.1, en los sitios de restricción EcoRV y HindIII. Se amplificaron adicionalmente las construcciones producidas de esta manera por medio de transformación de células Top Ten One Shot (Invitrogen), se purificaron por medio del kit Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) y se usaron para transfectar células COS7 y CHO por medio de electroporación. Se evaluó la eficiencia de las transfecciones a través de la cuantificación de APP en lisados celulares por medio de inmunoelectrotransferencia, usando el anticuerpo 22C11 (Chemicon International Inc.) dirigido frente a la región terminal del extremo N de la proteína (residuos 61-88). Se usó el nivel de expresión de APP para comparar las concentraciones de producción del A β por las células transfectadas con dos construcciones. Entonces, en el medio de cultivo de las COS7 y las CHO que expresan APP humano silvestre y mutado, se llevó a cabo la medición de los péptidos A β 1-40, A β 1-42 y las formas truncadas en el lado terminal del extremo N con ELISA (Immuno-Biological Laboratories Gunma).

El estudio demostró:

- un fuerte incremento de A β 1-40 y A β 1-42 en el medio de las células COS7 transfectadas con APP mutado ($116,8 \pm 90,5$ pg/ml y $20 \pm 12,3$ pg/ml, respectivamente) con respecto a las células transfectadas con APP silvestre ($21,9 \pm 8,6$ pg/ml y $4 \pm 0,8$ pg/ml) (figura 16);
- un fuerte incremento de A β 1-40 y A β 1-42 en el medio de las CHO transfectadas con APP mutado ($84,6 \pm 9$ pg/ml y $9,6 \pm 3,4$ pg/ml, respectivamente) con respecto a las células transfectadas con APP silvestre ($49,8 \pm 11,8$ pg/ml y $4,2 \pm 0,8$ pg/ml) (figura 17);
- un incremento significativo de las formas truncadas en el lado terminal del extremo N del A β , en particular A β 3-42, en el medio de las células COS7 transfectadas con APP mutado ($2,5 \pm 0,3$ pg/ml) con respecto a las células transfectadas con APP silvestre ($1,1 \pm 0,3$ pg/ml).

Estos datos indican que la mutación Ala>Val en la posición 2 del A β modifica el procesamiento de APP, favoreciendo la vía amiloidogénica, con un incremento de la producción del A β 1-40, A β 1-42 y las formas truncadas en el lado terminal del extremo N.

Ejemplo 5: Generación de ratones transgénicos, portadores de la mutación Ala>Val en la posición 2 del A β .

Se hizo una construcción que portaba APP humano con mutación Ala>Val en la posición 2 del A β para la generación de ratones transgénicos en los que se realizaron pruebas conductuales, neurofisiológicas, neurorradiológicas, neuropatológicas, bioquímicas y moleculares a fin de definir las características fenotípicas de la enfermedad asociadas con este defecto genético y realizar estudios de patogenia y tratamiento.

Se clonó el ADNc de APP751 silvestre en el vector pTSC21, que contenía el promotor Thy 1.2 murino (sitios de restricción HindIII y EcoRV) (figura 18). Entonces, se sometió la construcción a mutagénesis específica de sitio con inserción de la mutación Ala>Val en la posición 2 del A β (Stratagene) por medio del mismo protocolo expuesto para las transfecciones celulares (véase el ejemplo 4) y se usó para generar ratones transgénicos partiendo de la cepa C57Bl/6.

Se obtuvieron 6 resultados (3 hombres y 3 mujeres) positivos para el transgén, que dio vida a tres líneas que sobreexpresan APP humano con mutación Ala>Val en la posición 2 del A β en el sistema nervioso central. Las dos mejores líneas se cruzan con una línea de ratones con genes suprimidos C57B1/6 para APP endógeno –línea ya disponible– a fin de obtener animales que expresan APP humano mutado en ausencia de APP murino (huAPP_{mut}/moAPP^{0/0}, figura 19). Por último, estos se cruzan con ratones transgénicos para APP humano silvestre a fin de obtener animales heterocigotos (huAPP_{mut}/huAPP_{wt}).

Los ratones que expresan APP humano con la mutación en 2 del A β en homocigosis y heterocigosis se usan para estudios de patogenia, diagnóstico, prevención y cuidado de la enfermedad de Alzheimer y, más en general, de enfermedades animales y/o humanas caracterizadas por depósitos anómalos de sustancia similar a amiloide y/o amiloide en tejidos y órganos.

GLOSARIO

EA = enfermedad de Alzheimer

AICD = fragmentos terminales del extremo C que derivan del corte de APP por la γ -secretasa

APP = precursor de proteína de amiloide β

APP_{0/0} = animal con genes suprimidos para APP endógeno

APP_{673A} = APP silvestre

APP_{673V} = APP con mutación Ala>Val en el codón 673

A β = amiloide β , péptido que deriva del catabolismo de APP

BACE = β -secretasa

pb = par de bases

Células COS = células de riñón de Cercopithecus aethiops macho adulto transformadas con un mutante defectuoso del virus SV40

5 Células CHO = células derivadas del ovario de hámster chino

DHPLC = cromatografía de líquidos de alto rendimiento desnaturalizante

ADN = ácido desoxirribonucleico

EAF = forma familiar de la enfermedad de Alzheimer

HPLC = cromatografía de líquidos de alto rendimiento

10 huAPP = APP humano normal

huAPP_{mut} = ratones transgénicos que expresan APP humano con mutación Ala>Val en la posición 2 del A β

huAPPwt = ratones transgénicos que expresan APP humano silvestre

MAPT = gen que codifica la proteína tau

moAPP = APP murino

15 moAPP^{+/+} = ratones con expresión de APP normal

moAPP^{0/0} = ratones con genes suprimidos para el APP endógeno

ARNm = ARN mensajero

Mut = mutado

P_{CMV} = promotor de citomegalovirus

20 PCR = reacción en cadena de la polimerasa

PSEN1 = presenilina 1

PSEN2 = presenilina 2

RM = resonancia magnética

ARN = ácido ribonucleico

25 iARN = interferencia por ARN

sAPP β = fragmento soluble que deriva del corte de APP por la β -secretasa

SSCP = polimorfismo de conformación de cadena única

Wt = silvestre

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cribado *in vitro* llevado a cabo sobre material biológico humano para determinar el riesgo de patologías caracterizadas por depósitos anómalos de amiloide β y/o sustancia similar a amiloide formados por cualquier isoforma de A β , basado en la determinación de la sustitución, en forma homocigota o heterocigota, de una citosina con una timidina en el codón 673 de la secuencia que codifica el gen de APP humano (D87675), correspondiente con el nucleótido 2212 (transición c.2212C>T) de la isoforma de APP770 (NM_000484.2), la mutación dando como resultado la sustitución de alanina con valina en el residuo 673 de APP770, o en el residuo análogo de otras isoformas de APP, que se corresponden con la posición 2 del A β .
2. Procedimiento de cribado *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, basado en la investigación del ARN mensajero (ARNm) transcrito por el gen.
3. Procedimiento de cribado *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, basado en la investigación de la proteína APP y/o sus isoformas.
4. Procedimiento de cribado *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que una de dichas patologías es la enfermedad de Alzheimer en su forma típica o expresada en fenotipos atípicos.
5. Vector que porta ácidos nucleicos que codifican isoformas de APP humano o un fragmento que contiene la mutación Ala673Val, bajo el control de un promotor no endógeno, para su uso en el tratamiento génico somático de patologías animales y/o humanas caracterizadas por los depósitos anómalos de la sustancia amiloide β y/o sustancia similar a amiloide en tejidos y órganos animales y/o humanos.
6. Vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se logra el tratamiento somático usando como vectores portadores, lípidos o polímeros, naturales o sintéticos, o agentes biológicos incluyendo agentes víricos, opcionalmente adenovirus, virus adenoasociado, virus SV40 o retrovirus.
7. Vector para su uso de conformidad con la reivindicación 5, para la transfección de células autógenas, heterógenas o xenógenas para su uso en el tratamiento celular de formas esporádicas o genéticas de la enfermedad de Alzheimer con fenotipo típico o atípico.
8. Hexapéptido sintético DVEFRH que contiene al menos un residuo aminoacídico en forma dextrógira para su uso en el tratamiento de patologías caracterizadas por los depósitos anómalos de la sustancia amiloide β y/o sustancia similar a amiloide en tejidos y órganos animales y/o humanos.
9. Péptidos sintéticos para su uso en el tratamiento de patologías caracterizadas por los depósitos anómalos de la sustancia amiloide β y/o sustancia similar a amiloide en tejidos y órganos animales y/o humanos, en el que el péptido sintético contiene al menos un residuo aminoacídico en forma dextrógira, es análogo a un fragmento de APP, incluyendo isoformas de A β que incluyen las truncadas en el lado terminal del extremo N y/o extendidas en el lado terminal del extremo C y comprende la mutación Ala673Val.

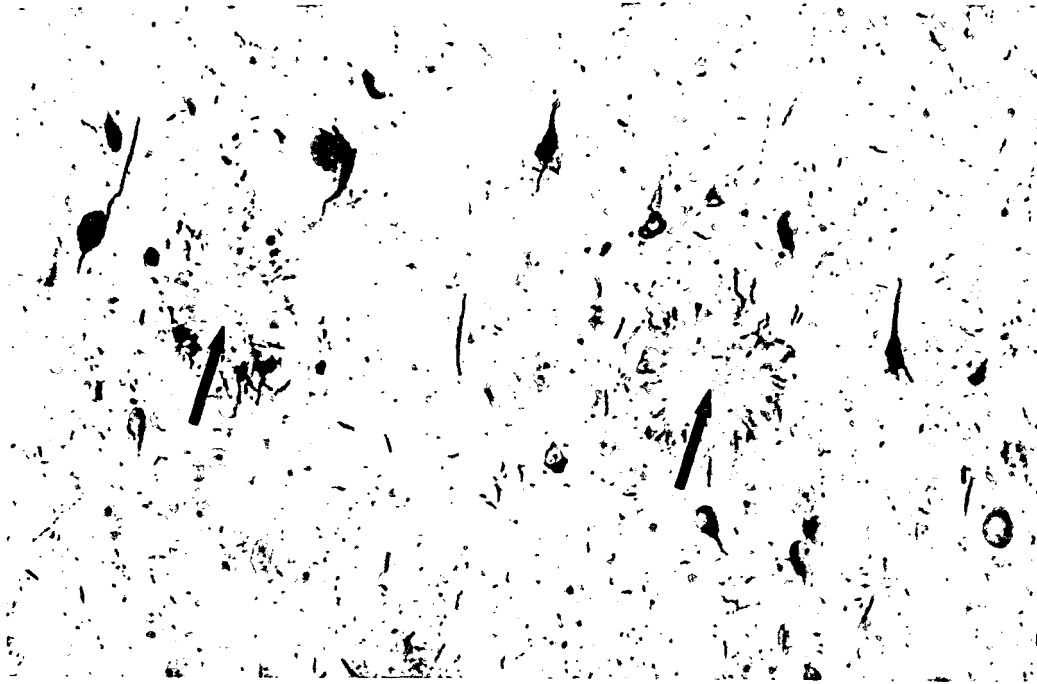


Figura 1. Alteraciones neuropatológicas de la enfermedad de Alzheimer: placas seniles (indicadas mediante flechas) y degeneraciones neurofibrilares (en marrón oscuro). Las placas seniles están formadas por amiloide β y por una corona de neuritas distróficas. Las degeneraciones neurofibrilares están formadas de tau hiperfosforilada. (Corteza cerebral; impregnación con plata).

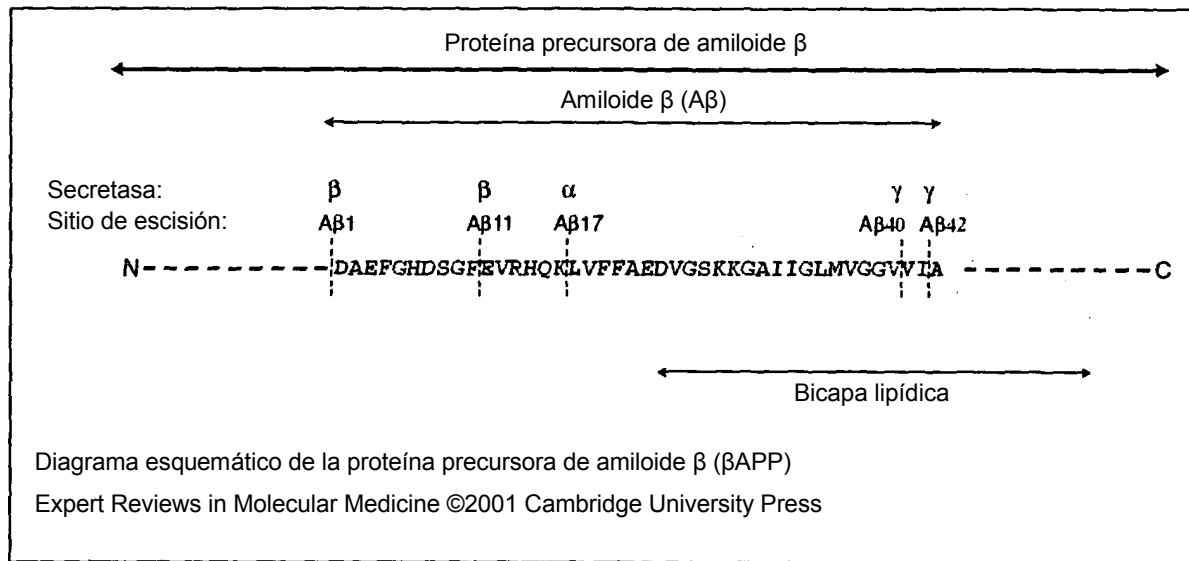


Figura 2. Diagrama que ilustra el catabolismo del APP por la secretasa.

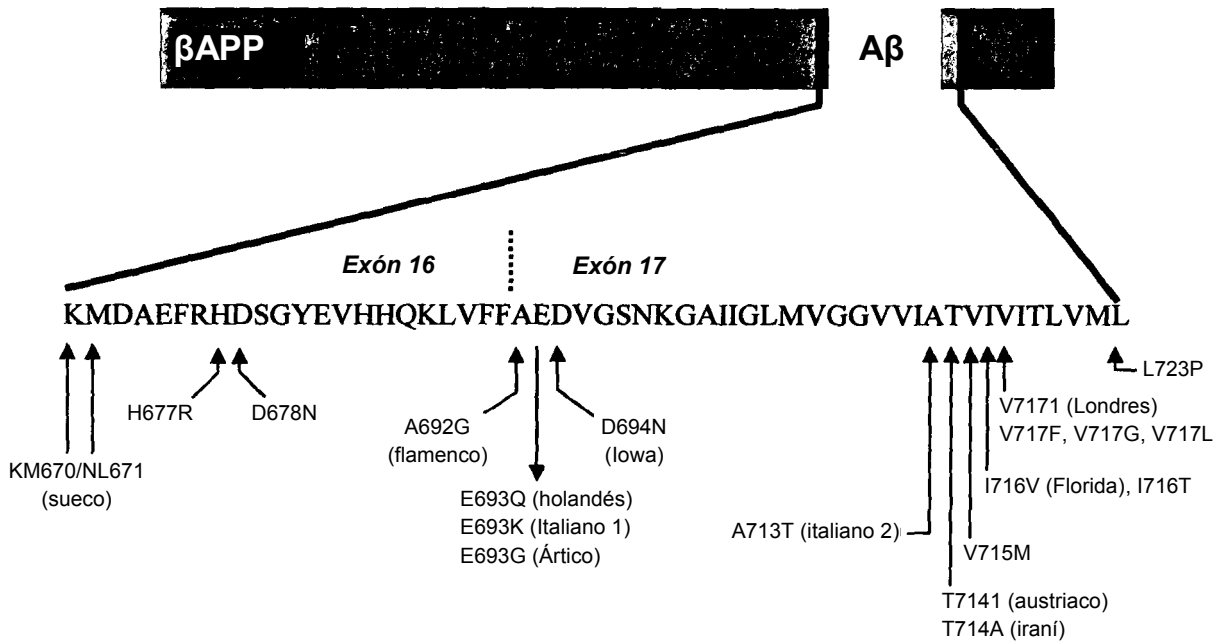


Figura 3. Mutaciones del gen de APP asociado con la enfermedad de Alzheimer y amiloidosis cerebrovascular (indicada en rojo). El Aβ 1-42 se indica en amarillo y la línea discontinua en rojo divide la parte del Aβ codificada por el exón 16 y por el exón 17 del gen APP. El aminoácido alanina (A) en la posición 2 del Aβ se corresponde con el residuo 673 de APP770.

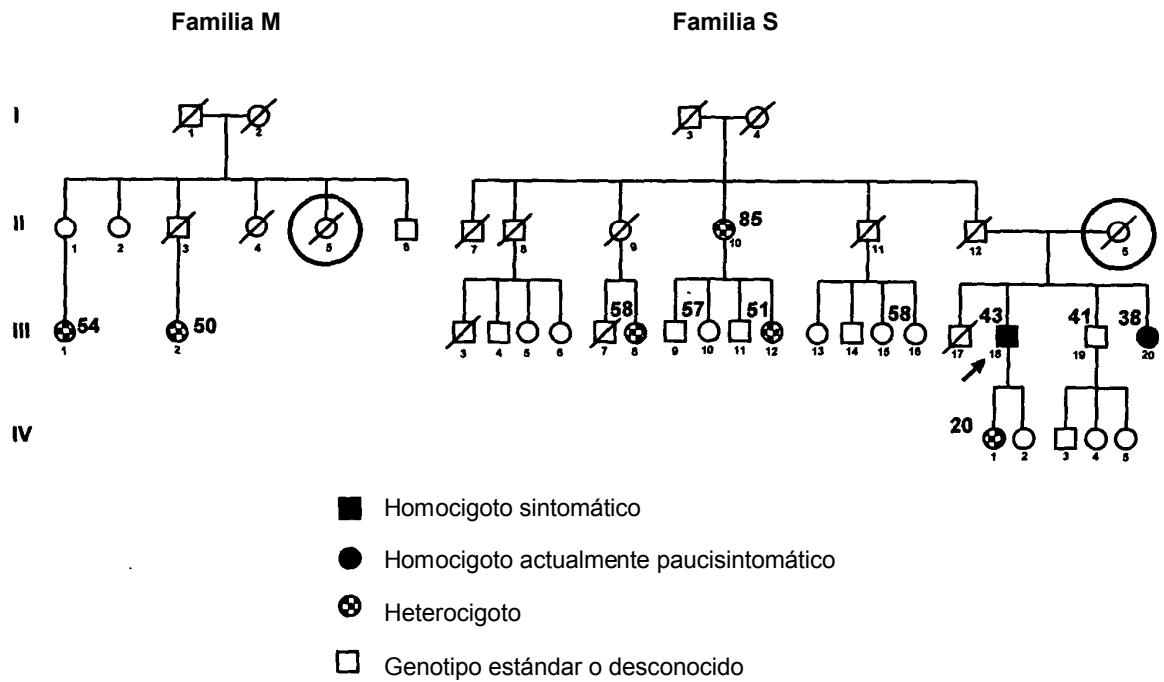


Figura 4. Árbol genealógico del objeto.

Familia M = rama materna; Familia S = rama paterna. Los dos sujetos dentro de un círculo en rojo son la misma persona. El objeto se indica mediante la flecha. Los números en negrita indican la edad actual de los sujetos.

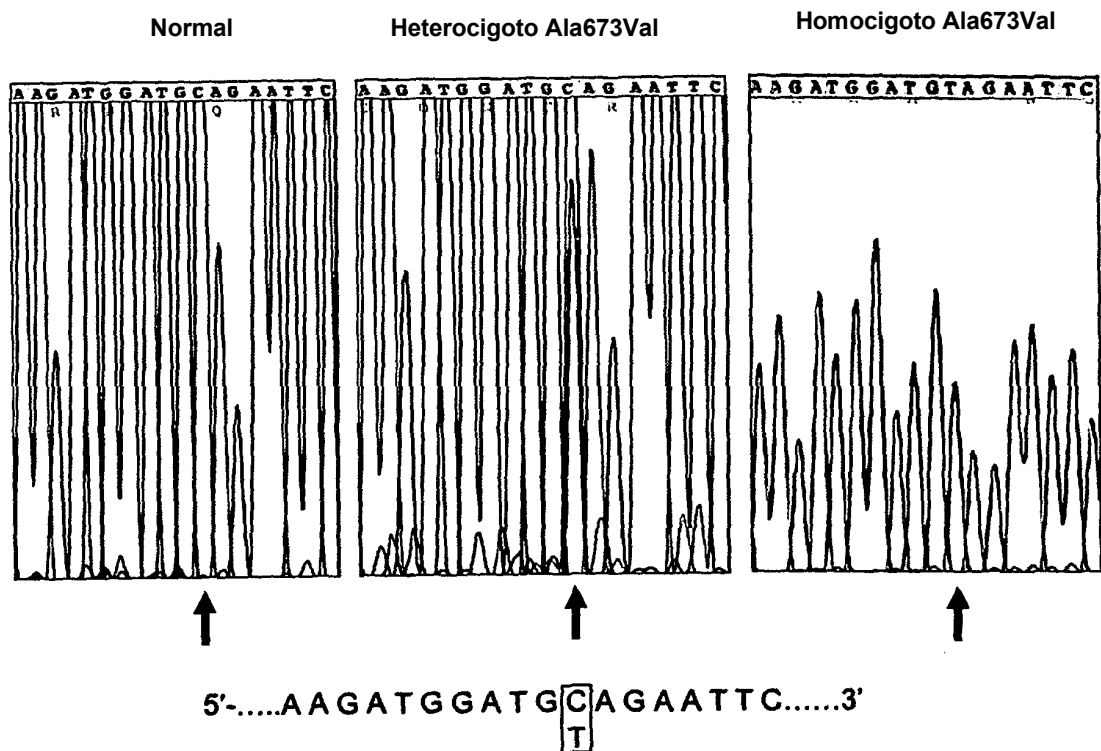


Figura 5. Secuencia del exón 16 del gen APP.

Los tres paneles exponen la secuencia normal, la secuencia de un sujeto heterocigoto para la mutación Ala673Val y la de un sujeto homocigoto (objeto).

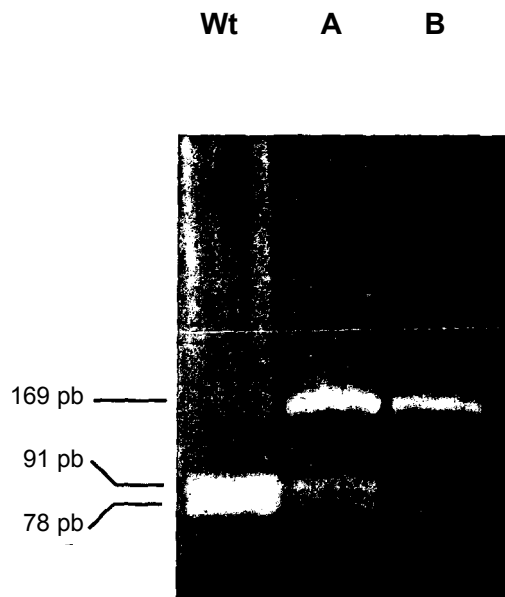


Figura 6. *Análisis por medio de digestión con enzimas de restricción de un fragmento de ADN que contiene el exón 16 del gen APP.*

El fragmento de ADN se amplificó por medio de PCR. El producto de amplificación se sometió a digestión con la enzima HpYCH4V y los productos de digestión se separaron por medio de electroforesis en gel de agarosa. Wt = sujeto normal; A = sujeto con mutación heterocigota Ala673Val; B = sujeto con mutación homocigota Ala673Val.

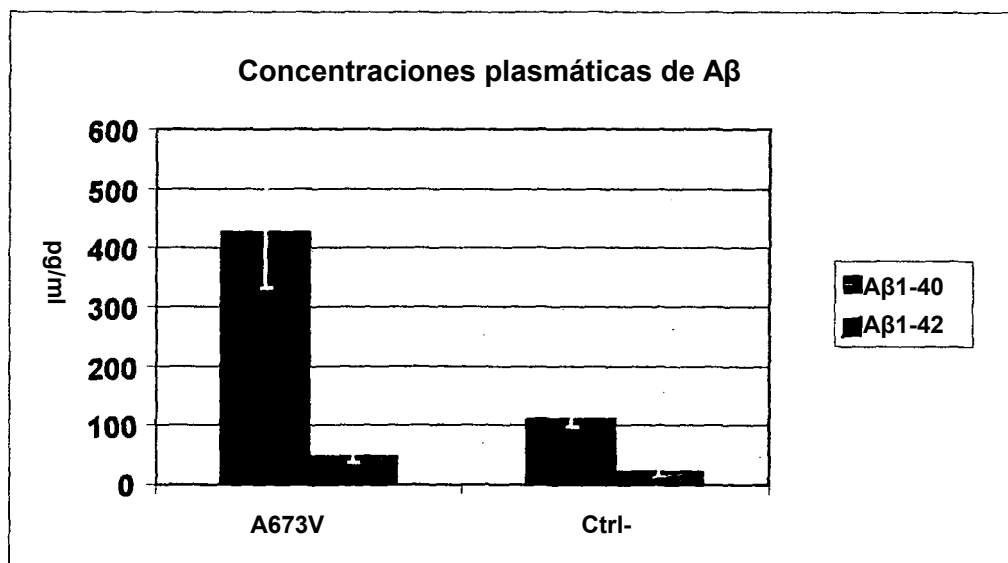


Figura 7. Comparación entre los valores de A β 1-40, A β 1-42 encontrados en el plasma del probando y en un grupo de controles negativos.

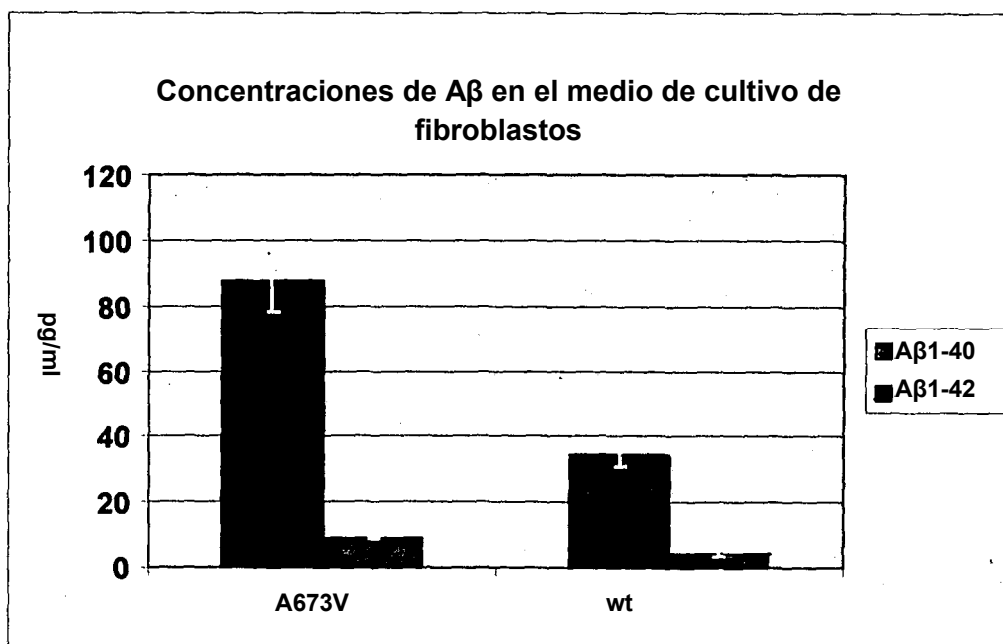


Figura 8. Comparación entre los valores de A β 1-40, A β 1-42 en el medio de cultivo de los fibroblastos extraídos del probando y de los fibroblastos que pertenecen a un control negativo.

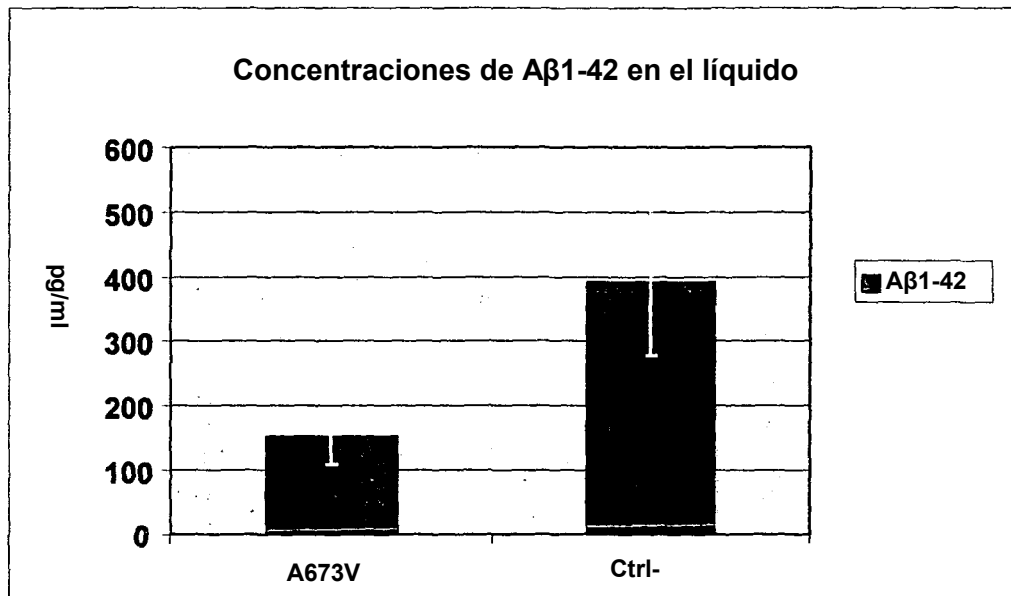


Figura 9. Comparación entre los valores de A β 1-42 detectados en el líquido del probando (A673V) y en un grupo de control normal (Ctrl-).

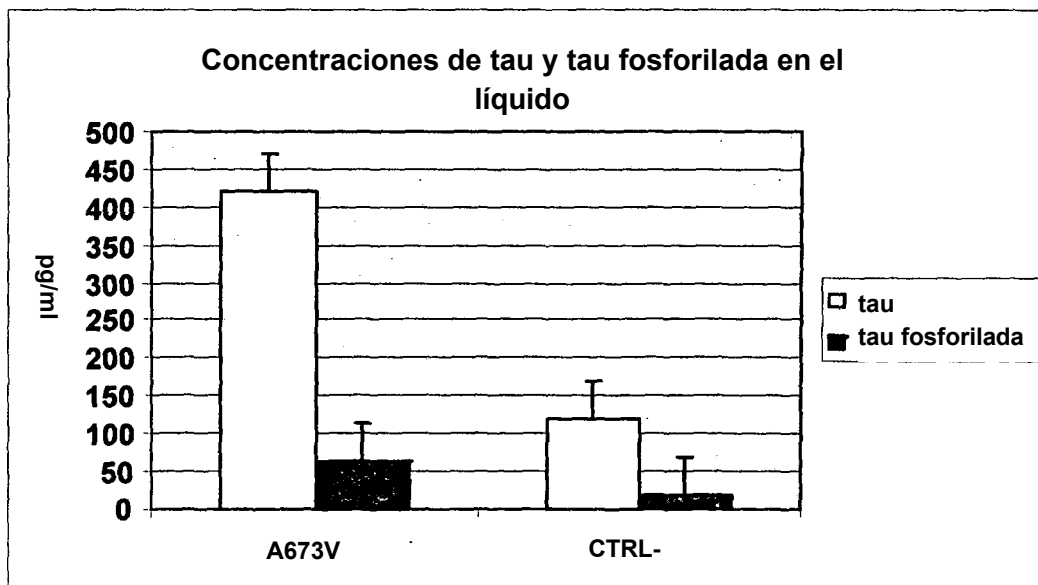


Figura 10. Comparación entre los valores de proteína tau total y valores de proteína tau fosforilada en el líquido del probando (A673V) y en un grupo de control normal (CTRL-).

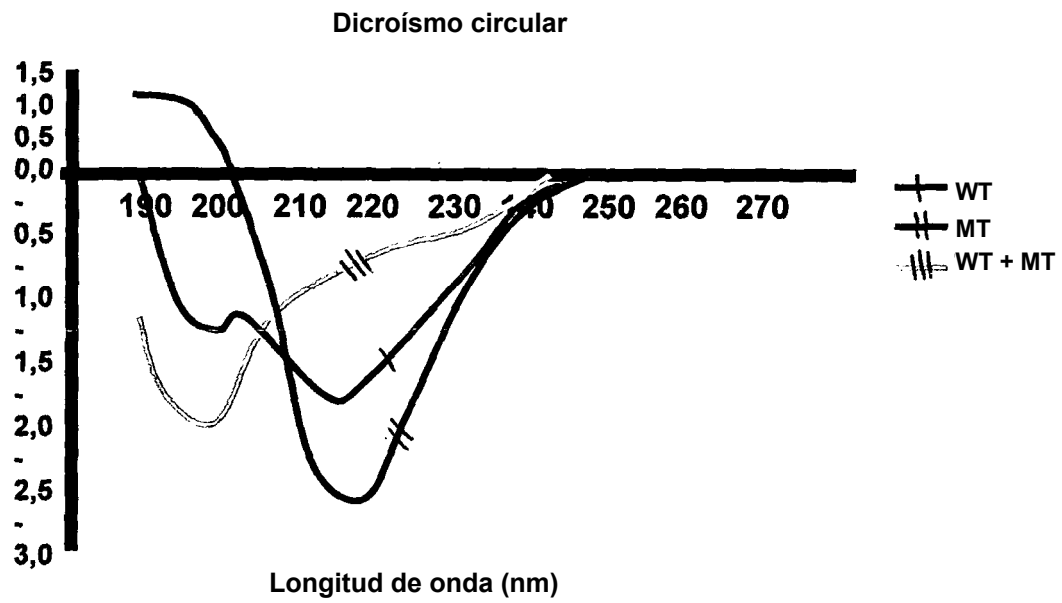


Figura 11. Comparación entre la estructura secundaria del péptido silvestre (WT), el péptido mutado (MT) y la mezcla de los dos (WT+MT), evaluada después de 7 días de incubación.

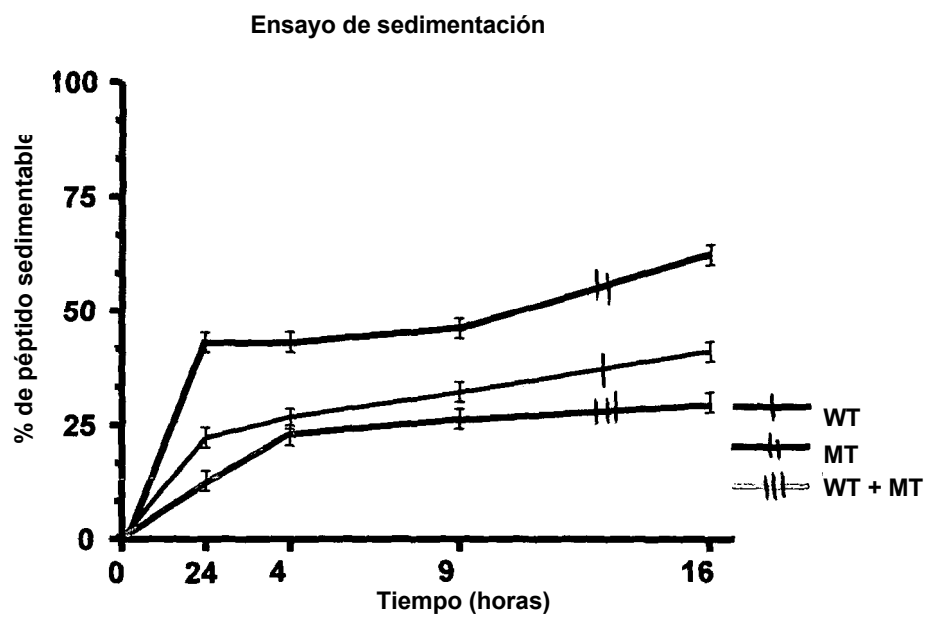


Figura 12. Comparación entre la capacidad de sedimentación del péptido silvestre (WT), el péptido mutado (MT) y la mezcla de los dos (WT+MT).

24 horas de incubación

Microscopio electrónico
Coloración negativa



Rojo Congo (luz polarizada)

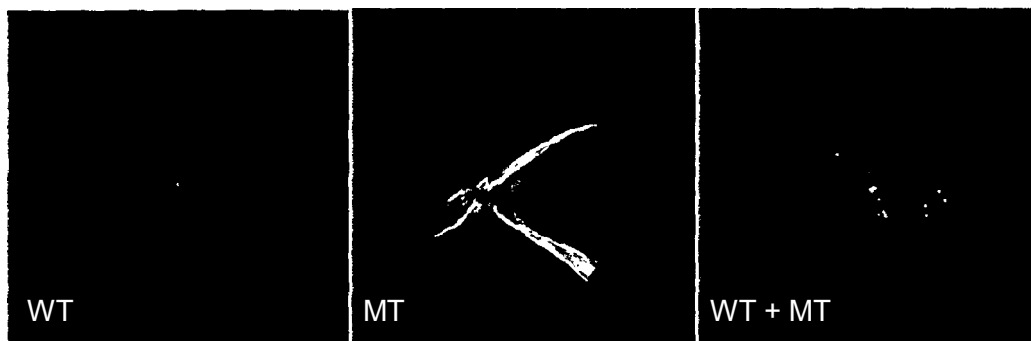


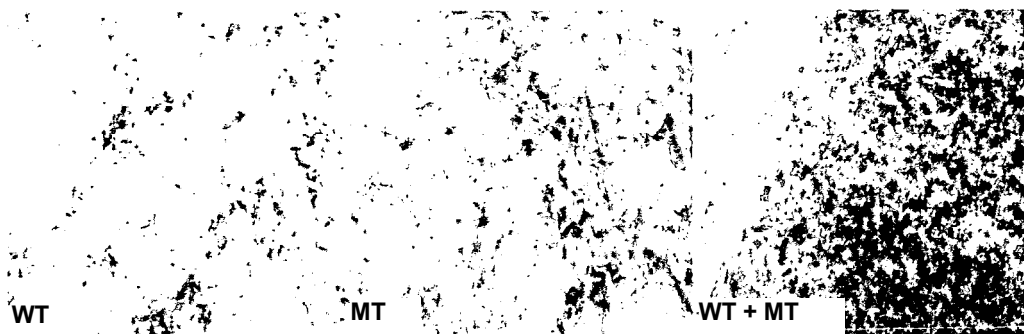
Figura 13. Ultraestructura y propiedades tintóreas de los agregados formados por el péptido silvestre (WT), por el péptido mutado (MT) y por la mezcla de los dos (WT+MT) después de 24 horas de incubación.

El examen ultraestructural demuestra que únicamente el péptido mutado forma agregados de fibrillas después de 24 horas de incubación. Los datos también se confirman mediante el examen de la luz polarizada, que demuestra la presencia de birrefringencia únicamente en las muestras de péptido mutado.

20 días de incubación

Microscopio electrónico

Coloración positiva



Rojo Congo (luz polarizada)



Figura 14. Ultraestructura y propiedades tintóreas de los agregados formados por el péptido silvestre (WT), por el péptido mutado (MT) y por la mezcla de los dos (WT+MT) después de 20 días de incubación.

Tras el examen ultraestructural, se puede observar que la mayor parte del material presente en la mezcla de los dos péptidos es amorfo. El examen de la luz polarizada después de la coloración con rojo Congo confirma que la mezcla de los dos péptidos forma agregados congófilos en un grado mucho más bajo que el péptido silvestre y el péptido mutado.

120 h de incubación
en ausencia o presencia de un hexapéptido
que contiene la mutación

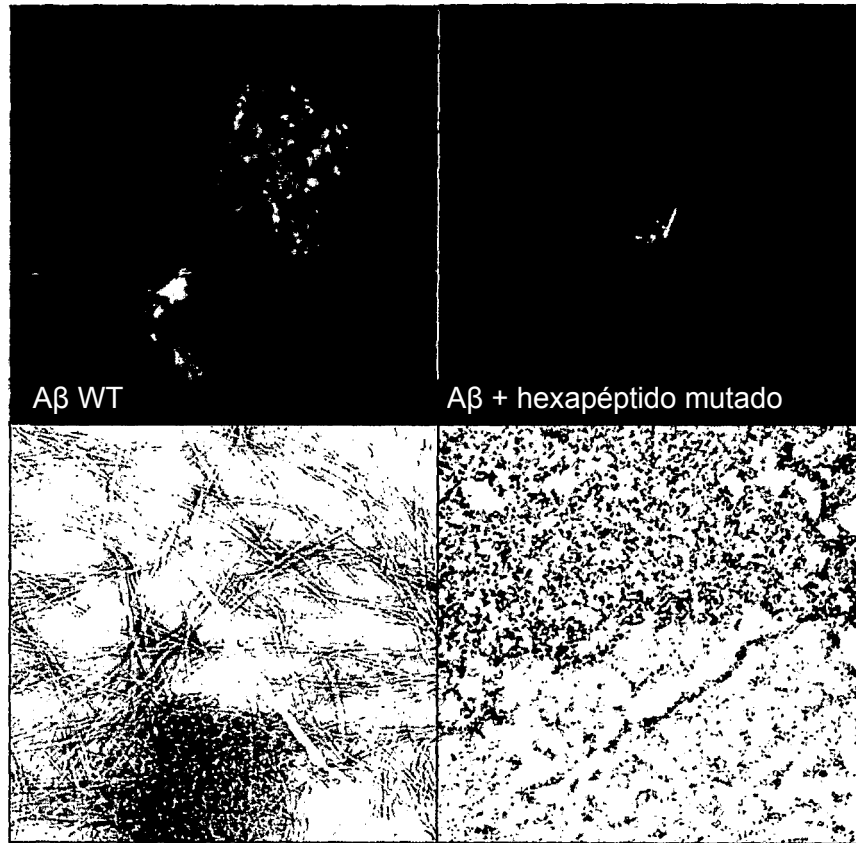


Figura 15. Ultraestructura y propiedades tintóreas de los agregados formados a partir del Aβ1-40 silvestre incubados durante 5 días en ausencia o presencia de hexapéptido mutado, en una proporción molar de 1:5.

Se puede observar que, en presencia de hexapéptido mutado en exceso, la capacidad de formar fibrillas de amiloide por el péptido Aβ1-40 está prácticamente suprimida por completo.

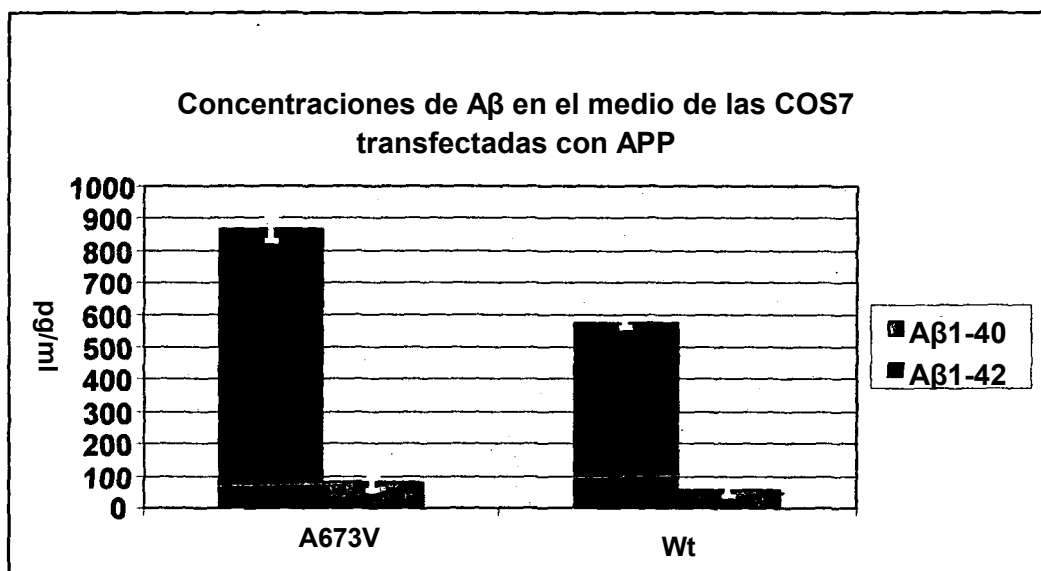


Figura 16. Comparación entre los valores de A β 1-40 y A β 1-42 en el medio de las COS7 transfectadas con APP A673V y las COS7 transfectadas con APP silvestre.

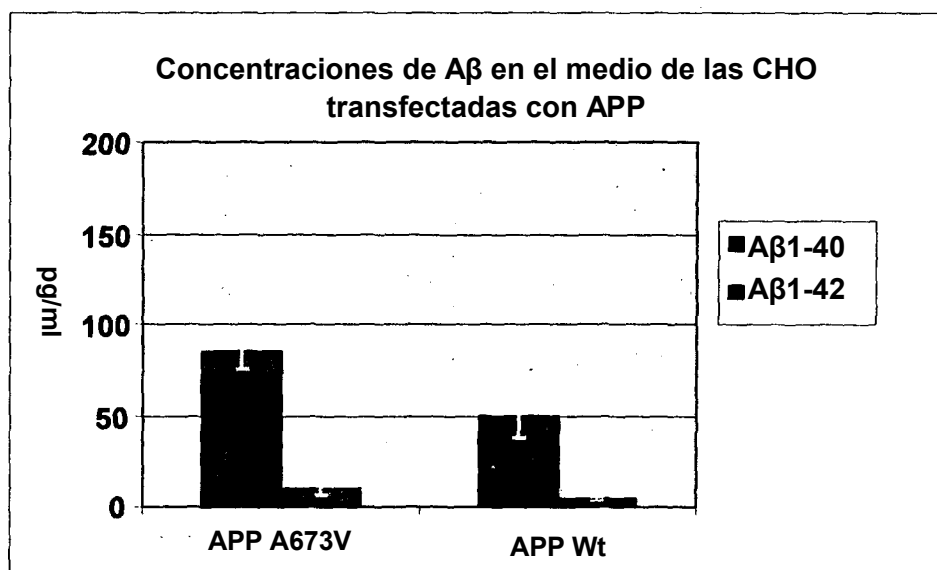


Figura 17. Comparación entre los valores de A β 1-40 y A β 1-42 en el medio de las CHO transfectadas con APP A673V y las CHO transfectadas con APP silvestre.

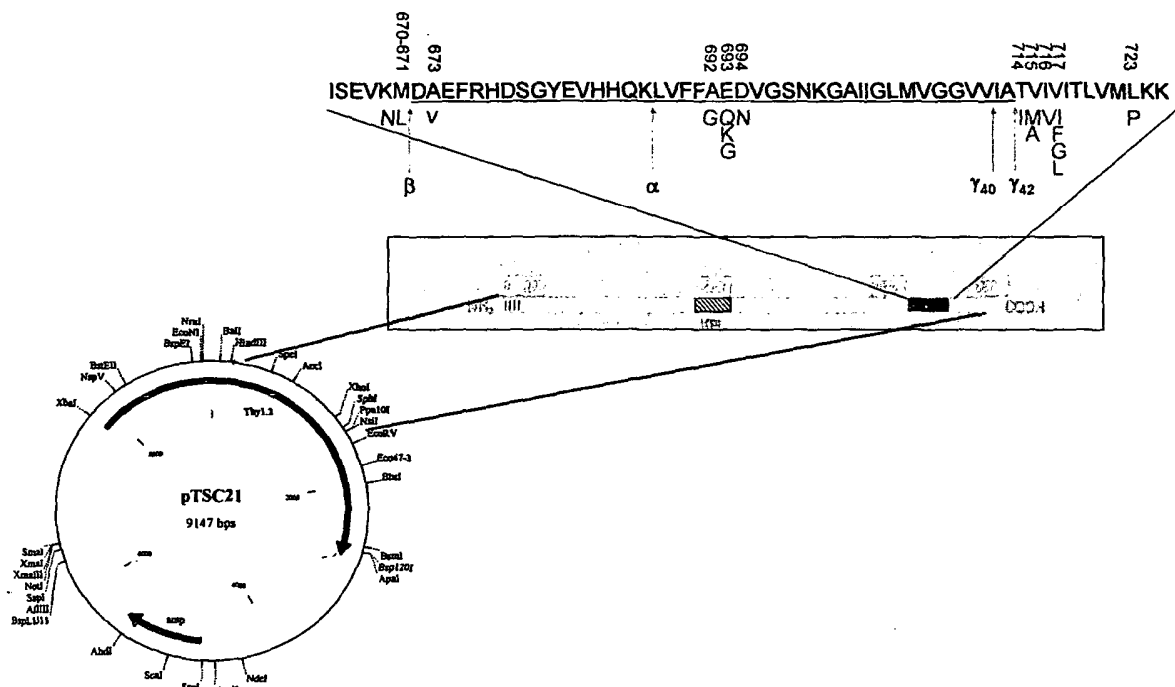


Figura 18. Diagrama de la construcción que porta APP humano, silvestre o con mutación Ala>Val en la posición 2 del A β , usada para la producción de ratones transgénicos.

Se introdujo el APP humano silvestre en el plásmido pTSC21, bajo el control del promotor murino Thy1.2. La mutación se introdujo posteriormente por medio de mutagénesis.

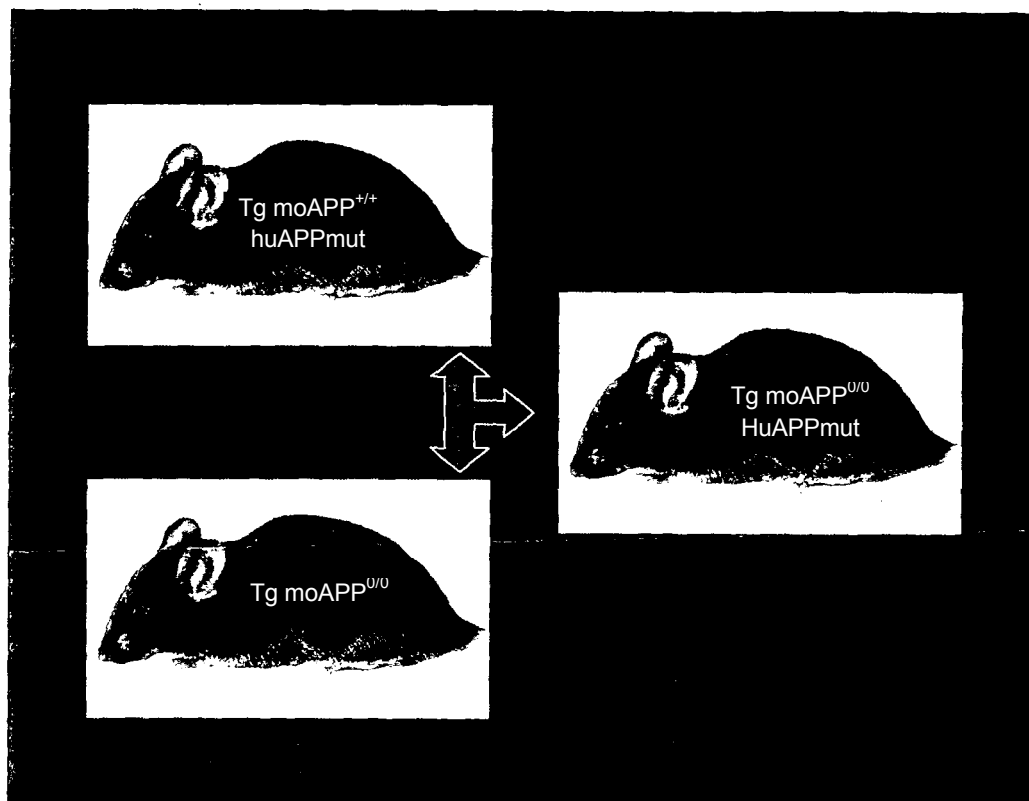


Figura 19. Diagrama de "reproducción" de los ratones transgénicos C57Bl, portadores de la mutación Ala>Val en la posición 2 del A β .

Los ratones transgénicos que expresan APP humano con mutación Ala>Val en la posición 2 del A β y APP endógeno (Tg moAPP^{+/+} huAPP_{mut}) se cruzan con ratones con genes suprimidos para el APP endógeno (Tg moAPP^{0/0}) para obtener así ratones (Tg moAPP^{0/0} huAPP_{mut}) que expresen únicamente APP humano con la mutación. Los últimos se cruzan por último con ratones transgénicos para APP humano silvestre a fin de obtener animales heterocigotos (huAPP_{wt}/huAPP_{mut}).