

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 529**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2011 PCT/JP2011/078036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12081433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2011 E 11849353 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2653872**

54 Título: **Biomarcador para trastornos neurológicos asociados a β -amiloide**

30 Prioridad:

16.12.2010 JP 2010280331

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

**SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)
291-85, Minami 1-jo Nishi 17-chome Chuo-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 060-8556, JP**

72 Inventor/es:

**KOKAI, YASUO;
SOHMA, HITOSHI;
IMAI, SHINICHI;
MATSUMOTO, KAYO y
KIMURA, MICHITOSHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 625 529 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

Biomarcador para trastornos neurológicos asociados a β -amiloide

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar enfermedad de Alzheimer y al uso de un reactivo de diagnóstico y de un kit de prueba para este método.

Antecedentes de la técnica

10 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y se caracteriza por la acumulación de una proteína fibrosa insoluble denominada β -amiloide en el cerebro. Se proponen diversos métodos para diagnosticar enfermedad de Alzheimer, incluyendo la detección de una proteína particular en el líquido cefalorraquídeo, la detección de una proteína o lipoproteína particular en la sangre o la detección de una mutación genética tal como polimorfismo genético. Sin embargo, no se ha puesto en uso práctico todavía un método de diagnóstico sencillo y eficaz que use sangre periférica.

15 El documento no de patentes 1: J Neuroimmune Pharmacol (2008) 3: 246-256. Silvestre *et al.*, Nature Medicine, 11 (2005), 499 - 506 da a conocer composiciones que comprenden un anticuerpo anti-MFG-E8 y un reactivo para detectar una proteína MFG-E8 unida al anticuerpo anti-MFG-E8.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un biomarcador novedoso para diagnosticar neuropatía asociada a β -amiloide tal como enfermedad de Alzheimer.

20 Los presentes inventores han llevado a cabo el examen de un grupo de proteínas presentes en un sobrenadante de cultivo de un cultivo primario de células nerviosas de ratón, que son un modelo de demencia, usando nanoliposomas magnéticos que imitan a una biomembrana cerebral, y han identificado una proteína MFG-E8 que se une a fosfatidilserina de manera dependiente de Ca^{2+} . Los presentes inventores hallaron además que el nivel de la proteína MFG-E8 está aumentado en pacientes con enfermedad de Alzheimer y, por tanto, MFG-E8 puede representar un biomarcador para enfermedad de Alzheimer.

25 Por tanto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar enfermedad de Alzheimer que comprende medir el nivel de una proteína MFG-E8 en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida a partir de un sujeto humano o animal, en el que el valor medido se usa como marcador para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer se realiza en un estadio en el que no se ha avanzado a una acumulación de una proteína β -amiloide. Preferiblemente, se mide el nivel de la proteína MFG-E8 con un anticuerpo anti-MFG-E8.

30 La presente invención proporciona también el uso de un reactivo de diagnóstico para enfermedad de Alzheimer que comprende un anticuerpo anti-MFG-E8. La presente invención proporciona además el uso de un kit de prueba para detectar enfermedad de Alzheimer que comprende un anticuerpo anti-MFG-E8 y un reactivo para detectar una proteína MFG-E8 unida al anticuerpo anti-MFG-E8.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar una sustancia candidata para un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer. El método comprende las etapas de administrar una sustancia de prueba a una célula modelo o un animal modelo de enfermedad de Alzheimer; medir la cantidad de una proteína MFG-E8 en un medio de cultivo de la célula modelo o una muestra obtenida a partir del animal modelo; y seleccionar la sustancia de prueba como sustancia candidata para un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer cuando la cantidad de la proteína MFG-E8 disminuye con la administración de la sustancia de prueba en comparación con la cantidad de la misma sin administración.

Según la presente invención, la aparición de enfermedad de Alzheimer puede diagnosticarse mediante un método sencillo.

Breve descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra las estructuras de MFG-E8 murina y humana;

la figura 2 muestra los resultados de SDS-PAGE de una fracción de un sobrenadante de cultivo que se une a nanoliposomas de manera dependiente de Ca^{2+} ;

la figura 3 muestra los resultados de la medición del nivel de expresión de MFG-E8 mediante inmunotransferencia de tipo Western; y

50 la figura 4 muestra una curva ROC de concentración de MFG-E8 en plasma para sujetos ancianos sanos frente a pacientes con EA.

Realizaciones preferidas de la invención

La presente invención presenta un método para diagnosticar enfermedad de Alzheimer midiendo el nivel de expresión de MFG-E8 en una muestra de un sujeto tal como sangre de un sujeto humano.

5 MFG-E8 (factor EGF de glóbulos de grasa láctea 8) es una proteína secretora también denominada lactoadherina, P47, Mfgm o SED1 (n.º GenBank NP_032620.2. n.º IPI, IPI00788387.1) y tiene dos dominios funcionales (dominio EGF N-terminal y dominio C2 C-terminal). Existen isoformas de tipo L (72 kDa, 61 kDa) y de tipo S (56 kDa, 48 kDa) y se notifica que el tipo L es una forma secretora (figura 1).

10 MFG-E8 contribuye a la fagocitosis de células apoptóticas en muchos tejidos. Se sabe que MFG-E8 es un factor regulador importante para la fagocitosis de células apoptóticas, que transmite la señal "eat-me" (fagocitosis) de células apoptóticas a macrófagos, fomenta la acción fagocitótica de macrófagos e inhibe completamente la acción fagocitótica a una cantidad en exceso en la sangre periférica. MFG-E8 se une a PS en células apoptóticas así como a integrina en macrófagos, y participa en la eliminación de células apoptóticas por macrófagos, la involución de las glándulas mamarias después del periodo de lactancia, la fagocitosis de membranas de segmentos externos de fotorreceptores después del desprendimiento de epitelios pigmentarios de la retina, y el aclaramiento de residuos de células apoptóticas intravasculares ateroscleróticas. También se sabe que MFG-E8 fomenta interacciones intercelulares y participa en la unión de espermatozoides y óvulos, el mantenimiento de epitelios epididimarios, la reparación de epitelios intestinales, el fomento de ramificación de conductos, la angiogénesis y el fomento de la función del exosoma de las células dendríticas.

20 Fuller *et al.* (J Neuroimmune Pharmacol (2008) 3: 246-256) estudiaron la cinética de MFG-E8 usando una línea celular derivada de la microglía y notificaron que las células de la microglía producen MFG-E8 en el cerebro y que MFG-E8 puede reconocer posiblemente células de neuroblastoma apoptóticas y desempeñar un papel en la fagocitosis. Esto puede corresponder a la función en la que los macrófagos producen MFG-E8 en la sangre periférica y MFG-E8 reconoce células apoptóticas y transmite la información a macrófagos. Fullers *et al.* llevaron a cabo además experimentos y hallaron que ratones TG (ratones modelo de Alzheimer) que tienen los genes APP de la enfermedad de Alzheimer familiar humana tienen un nivel disminuido de MFG-E8 en el cerebro en comparación con ratones normales. En este contexto, se interpreta que la perturbación del control de MFG-E8 puede desempeñar algún papel en la progresión de la enfermedad de Alzheimer. De manera similar, Boddaert J *et al.* (Am J Pathol (2007) 170: 921-929) también mostraron la expresión disminuida de ARNm de MFG-E8 en el cerebro de sujetos con enfermedad de Alzheimer en comparación con el cerebro de sujetos de edad coincidente.

30 Por el contrario, los presentes inventores han hallado en un experimento de inmunotinción que no se observaba acumulación de A β y MFG-E8 en el cerebro de ratones normales (12 meses de edad) y MFG-E8 se acumulaba en el mismo sitio que el sitio de acumulación de A β en el cerebro de ratones modelo con enfermedad de Alzheimer (12 meses de edad). Esto significa que los resultados de los presentes inventores se oponen completamente a los resultados de Fuller *et al.* y Boddaert *et al.*, cuyo motivo puede ser la diferencia en los anticuerpos usados; sin embargo los detalles no están claros. Antes de este hallazgo, los presentes inventores también hallaron que el nivel de MFG-E8 en la sangre periférica también era significativamente alto en pacientes con enfermedad de Alzheimer, tal como se muestra específicamente en los ejemplos a continuación en el presente documento. MFG-E8 observado en la sangre periférica también puede ser posiblemente MFG-E8 que se ha acumulado en el mismo sitio que el sitio de acumulación de A β y se ha escapado. Algunos estudios sugirieron que se eleva la permeabilidad desde la sangre al cerebro en la barrera hematoencefálica en pacientes con enfermedad de Alzheimer; sin embargo la extensión está limitada. La permeabilidad desde el cerebro a la sangre sigue sin estar clara. Por tanto, es poco probable que MFG-E8 observado en el sitio de acumulación de A β contribuya directamente a la concentración de MFG-E8 en la sangre más allá de la barrera hematoencefálica. El mecanismo detallado de la correlación entre el nivel aumentado de MFG-E8 y la enfermedad de Alzheimer hallada en la presente invención todavía no está claro.

45 La muestra de sujeto que va a analizarse para determinar el nivel de la proteína MFG-E8 puede incluir líquido corporal, sangre, suero y plasma obtenidos a partir de un sujeto humano o animal. Por el motivo descrito anteriormente, el líquido cefalorraquídeo no es adecuado como muestra.

50 La cantidad de la proteína MFG-E8 en la muestra obtenida a partir del sujeto puede medirse mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica usando un anticuerpo anti-MFG-E8. El anticuerpo anti-MFG-E8 puede ser monoclonal o policlonal. Diversos anticuerpos anti-MFG-E8 monoclonales y policlonales están disponibles comercialmente y pueden usarse para la presente invención. Alternativamente, el anticuerpo puede prepararse según un método bien conocido en la técnica.

55 La proteína MFG-E8 en la muestra obtenida a partir de un sujeto humano o animal se mide mediante un inmunoensayo que usa el anticuerpo anti-MFG-E8. La medición puede ser cualitativa o cuantitativa. El nivel de expresión de MFG-E8 en la muestra obtenida a partir de un sujeto puede someterse a ensayo de manera inmunológica mediante, por ejemplo, radioinmunoensayo, ensayo ELISA, inmunocromatografía, inmunoprecipitación, inmunoaglutinación e inmunotransferencia de tipo Western. Alternativamente, la medición puede llevarse a cabo con un biosensor utilizando el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales.

Como ejemplo típico, puede llevarse a cabo un ensayo ELISA tipo sándwich tal como sigue. Se añade plasma preparado a partir de sangre periférica extraída de un sujeto a una placa o un chip sobre el que se ha inmovilizado un anticuerpo anti-MFG-E8 y se incuba durante un periodo de tiempo apropiado. Se lava la placa o el chip para retirar los componentes no unidos seguido por la adición de un segundo anticuerpo anti-MFG-E8. El segundo anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable, tal como una enzima, un colorante fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, biotina, una sustancia radiactiva. Después de incubación durante un periodo de tiempo apropiado, se lava la placa o el chip y se mide la fluorescencia, luminiscencia o radiactividad para detectar el marcador. Alternativamente, después de la unión del anticuerpo anti-MFG-E8, puede añadirse un anticuerpo secundario (por ejemplo, anticuerpo de cabra anti-ratón) con el fin de potenciar la señal. El anticuerpo secundario puede marcarse con un marcador detectable, tal como una enzima, un colorante fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, biotina, una sustancia radiactiva. De esta manera, puede medirse la cantidad de la proteína MFG-E8 en el plasma obtenido a partir de un sujeto.

En otro aspecto, la proteína MFG-E8 puede detectarse mediante un método de detección que utiliza una reacción de aglutinación. En el método, puede unirse un anticuerpo anti-MFG-E8 a un portador, por ejemplo partículas de látex para detectar MFG-E8. Las partículas de látex que portan el anticuerpo anti-MFG-E8 se mezclan con una muestra y se incuban durante un determinado periodo de tiempo. Las partículas se aglutinarán cuando la muestra contenga MFG-E8. El grado de aglutinación puede observarse visualmente o cuantificarse con un espectrofotómetro para detectar MFG-E8 en la muestra.

La presente invención proporciona también un reactivo de diagnóstico para enfermedad de Alzheimer que comprende un anticuerpo anti-MFG-E8. El reactivo de diagnóstico para enfermedad de Alzheimer de la presente invención puede proporcionarse en forma de un kit de prueba. El kit de prueba comprende un reactivo para detectar MFG-E8, por ejemplo el anticuerpo anti-MFG-E8 como sustancia activa. El kit también puede comprender reactivos apropiados requeridos para las mediciones, por ejemplo, tampones, diluyentes, disoluciones de terminación de la reacción, disoluciones de lavado y patrones de control.

En la presente invención, la cantidad de la proteína MFG-E8 así medida puede usarse como marcador para enfermedad de Alzheimer. Específicamente, se mide la cantidad de la proteína MFG-E8 en una muestra obtenida a partir de un sujeto humano o animal, el valor medido resultante se compara con un valor medido obtenido a partir de un control sano. Cuando el valor medido del sujeto es mayor que el del control, se diagnostica que el sujeto humano o animal tiene una alta posibilidad de presentar enfermedad de Alzheimer. El desarrollo de la enfermedad de Alzheimer también puede monitorizarse con el método de la presente invención. La cantidad de la proteína MFG-E8 se mide en muestras obtenidas a partir de un sujeto humano o animal en múltiples puntos de tiempo, y un aumento de los valores medidos resultantes con el tiempo indica la progresión de la enfermedad de Alzheimer y una disminución indica la mejora de la enfermedad de Alzheimer. El transcurso del tratamiento puede monitorizarse mediante el método con el fin de determinar la eficacia terapéutica.

Según el método de la presente invención, puede diagnosticarse enfermedad de Alzheimer basándose en el nivel de la proteína MFG-E8 en la sangre como marcador sin extraer líquido cefalorraquídeo. Tal como se muestra en los ejemplos a continuación en el presente documento, el nivel de expresión de MFG-E8 en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer está aumentado significativamente en comparación con sujetos de control sanos. El método diagnóstico de la presente invención es útil para un diagnóstico precoz de enfermedad de Alzheimer (diagnóstico en un estadio inicial en el que no se ha avanzado a una acumulación de la proteína β -amiloide), un diagnóstico definitivo de la aparición, una monitorización del transcurso de la enfermedad, una determinación de la eficacia terapéutica y un pronóstico.

En otro aspecto de la presente invención, puede seleccionarse una sustancia candidata para un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer basándose en el nivel de expresión de la proteína MFG-E8 como marcador. El examen se lleva a cabo administrando una sustancia de prueba a una célula modelo o un animal modelo para detectar enfermedad de Alzheimer, por ejemplo un cultivo primario de células nerviosas de ratón o un ratón TG al que se le administra el péptido $A\beta_{42}$ citotóxico, y midiendo el nivel de la proteína MFG-E8 en un medio de cultivo de la célula modelo o una muestra obtenida a partir del animal modelo. La sustancia de prueba usada para el examen puede incluir diversos anticuerpos y productos químicos sintéticos. La sustancia de prueba puede obtenerse a partir de, por ejemplo, bibliotecas tales como diversas bibliotecas de productos químicos naturales o sintéticos, bibliotecas combinatorias, bibliotecas de oligonucleótidos y bibliotecas de péptidos. La sustancia de prueba pueden ser extractos de sustancias naturales tales como bacterias, hongos, algas, plantas y animales o productos parcialmente purificados de los mismos. La sustancia de prueba puede seleccionarse como sustancia candidata para un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer cuando el nivel de la proteína MFG-E8 disminuye con la administración de la sustancia de prueba en comparación con el nivel de la misma sin administración. Por tanto, el método de prueba de la presente invención proporciona una plataforma para el desarrollo de métodos terapéuticos novedosos de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se describirá en detalle a continuación por medio de los ejemplos, sin embargo la invención no está limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1

Investigación de biomarcadores para neuropatía asociada a β -amiloide ($A\beta$)

Se administró el péptido $A\beta_{42}$ citotóxico a un ratón y se usó un cultivo primario de células nerviosas de ratón como modelo de demencia. Se examinaron los candidatos a biomarcadores para la neuropatía asociada a β -amiloide usando nanoliposomas magnéticos que imitan a una biomembrana cerebral. $A\beta_{42}$ es uno de los productos finales generados después de la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP; 150 kD) con tres enzimas, que tiene la citotoxicidad más intensa y se ha usado para diversos estudios.

Se estimularon células de cultivo primario de telencéfalo de ratón (5×10^6 / placa de 10 ml) con $A\beta_{42}$ (0,1 μ M) durante 24 horas. Las condiciones seleccionadas fueron a baja concentración durante un corto tiempo con el fin de proporcionar citotoxicidad leve así como con la suposición del estado del estadio inicial de la enfermedad de Alzheimer. Concretamente, se seleccionaron la concentración de 0,1 μ M y un periodo de 24 horas de modo que se evitase la apoptosis o necrosis celular. Se usaron células sin estimulación con $A\beta_{42}$ como control. Se trató el sobrenadante de cultivo de células con EGTA (concentración final: 5 mM) y se combinó una determinada cantidad del mismo, que luego se concentró desde 10 ml hasta 1 ml mediante ultrafiltración con un filtro Amicon Ultra-15 de LPMN de 3.000. Se le añadió al sobrenadante concentrado 1 mg de nanoliposomas y $CaCl_2$ (concentración final: 10 mM), se ajustó el pH con HEPES 0,5 M (pH 7,5) y se permitió que reaccionase en un rotor a 4°C durante 1,5 horas. Después de la reacción, se queló Ca^{2+} con EGTA, se separaron las proteínas de los nanoliposomas para obtener una fracción que se unió a un fosfolípido ácido (fosfatidilserina) de manera dependiente de Ca^{2+} .

El principio y procedimientos detallados para el método de mezclado de una muestra y liposomas en presencia de iones de calcio y separación de una proteína de unión a liposomas con un agente quelante se dan a conocer en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2008-020383. Los nanoliposomas son partículas finas magnéticas modificadas en la superficie con un polímero termosensible y un fosfolípido y que pueden formar una estructura de tipo liposoma en una disolución acuosa. El principio y la estructura de los nanoliposomas se ilustran específicamente en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2010-066200. Cuando se mezclan los nanoliposomas con una muestra en una disolución acuosa, un componente de unión a fosfolípidos en la muestra se unirá a los nanoliposomas, que luego se recogen con ayuda de variación de la temperatura y magnetismo para permitir la recogida simplificada del componente de unión a fosfolípidos.

El fosfolípido usado en el presente documento fue fosfatidilserina. La fosfatidilserina es uno de los lípidos que constituyen la membrana celular. Habitualmente se ubica internamente en la membrana celular mientras que se exponen de manera externa a las células cuando las células experimentan apoptosis. Por tanto, se cree que las proteínas asociadas a apoptosis pueden identificarse mediante el examen de proteínas que se unen a fosfatidilserina.

Se separó la fracción así obtenida a partir del sobrenadante de cultivo que se unió a nanoliposomas de manera dependiente de Ca^{2+} , mediante SDS-PAGE unidimensional y tinción con plata. Se muestran los resultados en la figura 2.

A continuación, se dividió el gel en 10 secciones en las posiciones mostradas con las flechas en la figura 2 y se sometieron a una digestión en gel con tripsina para recoger péptidos, que luego se analizaron mediante espectrometría de masas. Entre las 100 mejores proteínas de unión a nanoliposomas identificadas, se analizaron las que tenían un nivel de expresión aumentado después de estimulación con $A\beta$, y se identificó MFG-E8 (isoforma 1 de proteína de factor EGF de glóbulos de grasa láctea 8) como proteína marcadora candidata.

Ejemplo 2

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se analizó la diferencia en el nivel de expresión de MFG-E8 a nivel de proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western.

El material usado fue una fracción de unión a nanoliposomas al 100% de PS obtenida a partir de un sobrenadante de cultivo que procedía de un lote diferente del lote usado para el análisis mediante espectrometría de masas. Se separó la fracción mediante electroforesis (gel Ready de Bio Rad (del 5 al 15%)) y se transfirió a una membrana de PVDF (9 V, 16,5 horas (aproximadamente 150 Vh)). Se usó un anticuerpo de hámster anti-MFG-E8 de ratón (MBL International Corporation) como anticuerpo primario para la reacción a 1 μ g/ml durante 2 horas (temperatura ambiente) y se usó una IgG de cabra anti-hámster conjugada con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a una dilución en 1000 veces como anticuerpo secundario para la reacción durante 1 hora (temperatura ambiente). Se llevó a cabo la detección con un agente de exposición de PIERCE durante un periodo de exposición de 3 minutos.

Se muestran los resultados en la figura 3. Se consideró que la señal obtenida correspondía a la forma larga de MFG-E8 (isoforma 1) basándose en su peso molecular. También se observó la diferencia significativa a nivel de proteína, en el que la banda detectada en el carril para la muestra estimulada con $A\beta_{42}$ (0,1 μ M) era más intensa que la banda detectada para el control (sin estimulación).

Ejemplo 3

Medición de la concentración de MFG-E8 en plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Se midió la concentración de MFG-E8 mediante ensayo ELISA en el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y sujetos ancianos sanos a las edades correspondientes.

- 5 Se preparó el plasma de 20 sujetos ancianos sanos y 20 pacientes con EA y se llevó a cabo el ELISA con un anticuerpo anti-MFG-E8 y un kit para ELISA para el factor EGF de glóbulos de grasa láctea humano 8 (USCN Life Science Inc.) siguiendo los procedimientos según las instrucciones adjuntas al kit. Se diluyeron las muestras 10 veces. Después de medirse la concentración, se llevó a cabo el análisis estadístico con JMP.

- 10 La figura 4 muestra la curva ROC de la concentración de MFG-E8 en el plasma de sujetos ancianos sanos frente a pacientes con EA (positivo: EA). El área bajo la curva ROC fue de 0,72000, lo que indica una diferencia significativa.

Estos resultados demuestran que MFG-E8 estaba presente en el medio de cultivo de las células nerviosas cerebrales de ratón estimuladas con $A\beta_{42}$ y se detectó a un nivel mayor en el plasma de pacientes con EA que en los de sujetos sanos.

Aplicabilidad industrial

- 15 La presente invención es útil para el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer.

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar enfermedad de Alzheimer, que comprende medir el nivel de una proteína MFG-E8 en una muestra de sangre, suero o plasma que va a obtenerse a partir de un sujeto humano o animal y comparar el valor medido resultante con respecto a un valor medido que va a obtenerse a partir de un control sano, en el que el valor medido del sujeto mayor que el del control indica que el sujeto tiene una alta posibilidad de presentar enfermedad de Alzheimer.
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que se realiza el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en un estadio en el que no se ha avanzado a una acumulación de una proteína β -amiloide.
3. Método según la reivindicación 1, en el que se mide el nivel de la proteína MFG-E8 con un anticuerpo anti-MFG-E8.
10
4. Uso de un reactivo de diagnóstico que comprende un anticuerpo anti-MFG-E8 para un método según la reivindicación 1.
5. Uso de un kit de prueba que comprende un anticuerpo anti-MFG-E8 y un reactivo para detectar una proteína MFG-E8 unida al anticuerpo anti-MFG-E8 para un método según la reivindicación 1.
- 15 6. Método para seleccionar una sustancia candidata para un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer, que comprende las etapas de:

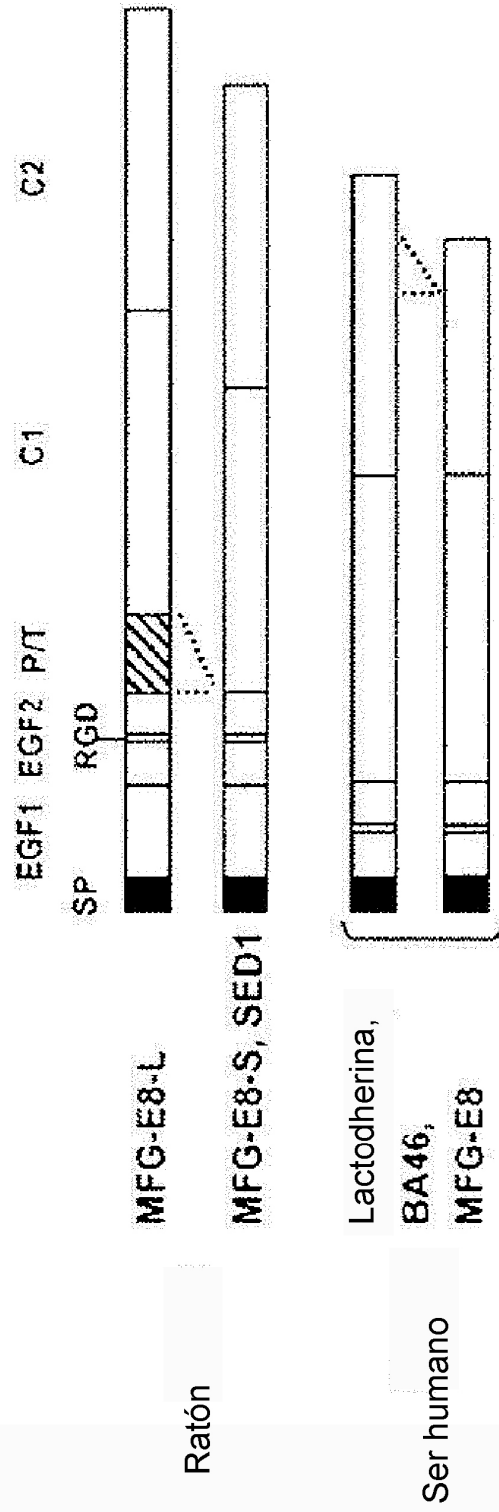
administrar una sustancia de prueba a una célula modelo o un animal modelo de enfermedad de Alzheimer;

medir la cantidad de una proteína MFG-E8 en un medio de cultivo de la célula modelo o una muestra obtenida a partir del animal modelo; y

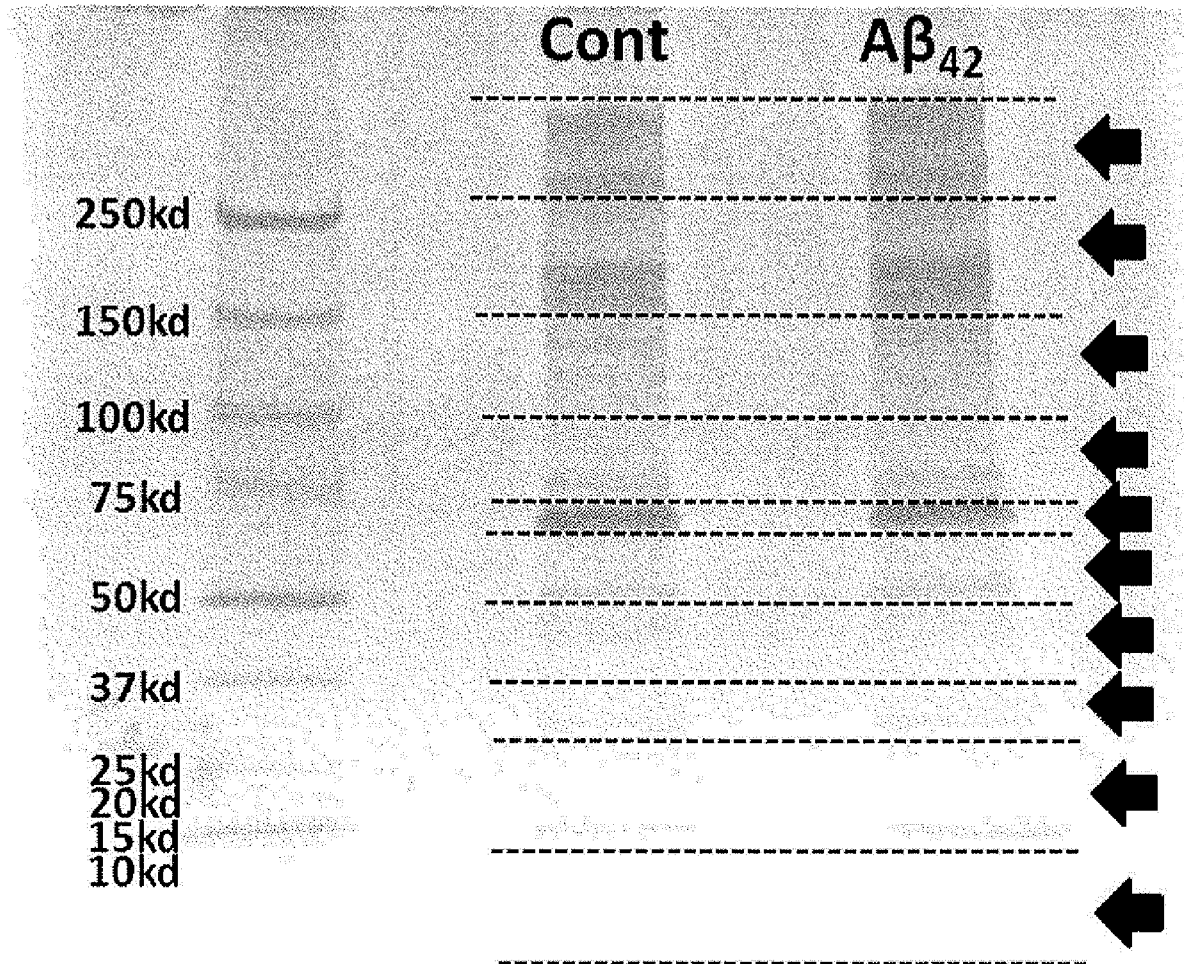
20 seleccionar la sustancia de prueba como sustancia candidata para un agente terapéutico para enfermedad de Alzheimer cuando la cantidad de la proteína MFG-E8 disminuye con la administración de la sustancia de prueba en comparación con la cantidad de la misma sin administración.

【Fig. 1】

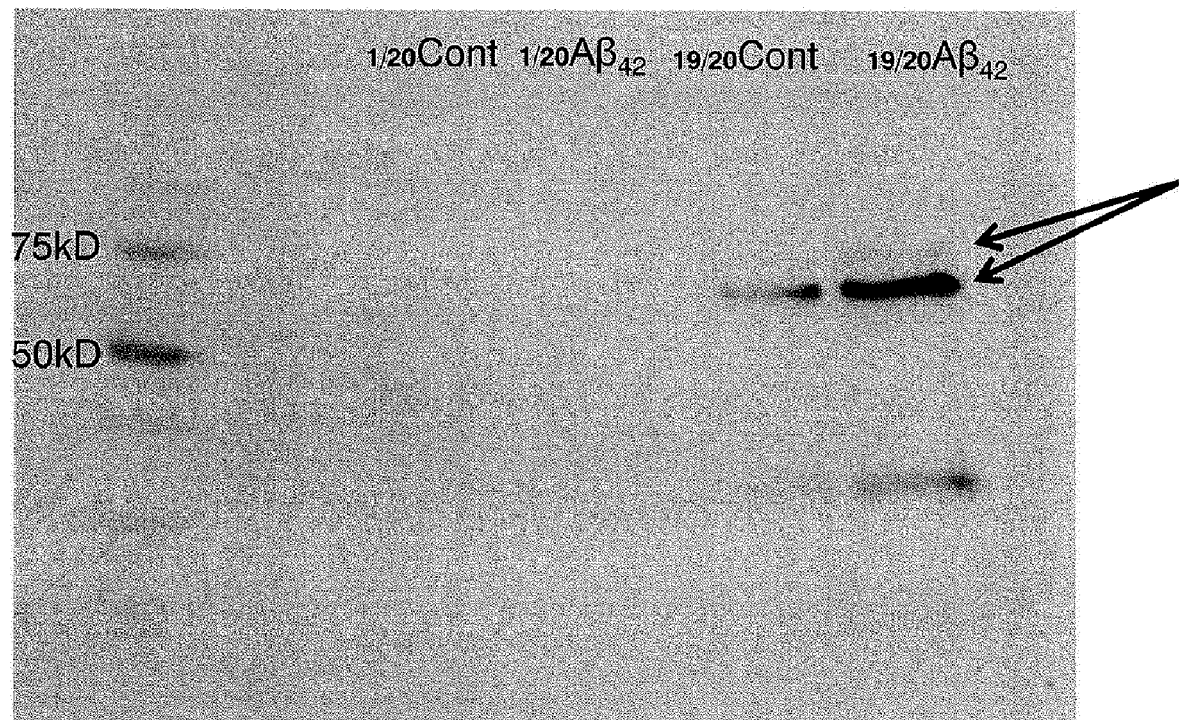
COMPARACIÓN ENTRE ESTRUCTURAS DE DOMINIO DE MFG-E8 DE RATÓN Y SER HUMANO



【Fig. 2】



【Fig. 3】



【Fig. 4】

