

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 596**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2011 PCT/IB2011/002999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12073111**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2011 E 11805939 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2646462**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para monitorizar la actividad fagocítica**

30 Prioridad:

29.11.2010 US 417559 P

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

03.08.2017

73 Titular/es:

**AKERSHUS UNIVERSITETSSYKEHUS (100.0%)
1478 Lorenskog, NO**

72 Inventor/es:

**FLADBY, TORMOD;
JOHNSEN, LISBETH y
MOLLERGARD, HANNE, MALI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 628 596 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

Procedimientos y composiciones para monitorizar la actividad fagocítica

Campo de la invención

5 La invención se refiere a procedimientos para diagnosticar, monitorizar y/o evaluar el riesgo de enfermedades neurodegenerativas (p.ej. enfermedad de Alzheimer (EA)).

Antecedentes de la invención

10 La EA, la causa más común de demencia, es un deterioro cognitivo y conductual adquirido que interfiere en el funcionamiento social y ocupacional. La EA es un problema para la salud pública importante desde el punto de vista económico, pues no solamente supone una tremenda carga económica en lo que se refiere a los propios pacientes, sino que también por el impacto social, económico, físico y psicológico que supone para los cuidadores. En los Estados Unidos, el coste que conlleva la atención sanitaria y los servicios de cuidado a largo plazo por paciente fue 33.007 \$ aproximadamente en 2004, según los datos disponibles más recientes (Alzheimer's Association (2010) Alzheimer's & Dementia 6:158-194).

15 La EA afectaba a aproximadamente 5.300.000 de personas en los Estados Unidos en 2010 (Alzheimer's Association (2010) Alzheimer's & Dementia 6:158-194) y a 26.600.000 de pacientes en todo el mundo en 2006. Un gran número de pacientes presentan un descenso de las funciones cognitivas (p.ej., deterioro cognitivo leve (DCL) cuantificable o incluso solo un deterioro cognitivo subjetivo (SCI) más temprano), que suele evolucionar en demencia completa, con lo que aumenta el número de personas afectadas. En 2030, se estima que 7.700.000 de norteamericanos de 65 años de edad tendrán EA (Hebert y col. (2003) Arch. Neurol. 60(8):1119-22). Las proyecciones estadísticas indican que el número de personas afectadas por este trastorno en los Estados Unidos podría oscilar entre 11 y 16 millones para el año 2050 (Hebert y col. (2003) Arch. Neurol. 60(8):1119-22).

25 Los factores causantes de EA esporádica siguen sin precisarse, si bien la progresión de la enfermedad está correlacionada con signos patológicos anatómicos evidentes entre los que se incluyen ovillos neurofibrilares (NFT); placas seniles (SP) a niveles microscópicos; y atrofia cerebrocortical. Los depósitos amiloides también tienen que ver con otras dos de las causas comunes de demencia, demencia vascular (DVa) y demencia con cuerpos de Lewy (DCL), así como la miositis con inclusión de cuerpos, una enfermedad muscular. Si bien EA sigue un curso de progresión típico, escasean los procedimientos de diagnóstico definitivos, en particular para EA en los primeros estadios. Esto es particularmente problemático ya que DCL y EA en los primeros estadios son períodos clínicamente valiosos para la implementación de terapias de modificación de la enfermedad. (Vellas y col. (2007) Lancet Neurol. 6:56-62). Es importante dado que la extensión del daño que provoca la EA es prácticamente irreversible en los últimos estadios de la progresión de la enfermedad (Braak y col. (1991) Acta Neuropathol.82:239-259).

35 El documento WO2010/011947 se refiere a análogos de péptido β -amiloide en los que la secuencia forma un bucle y tiene al menos un 66 % de identidad con el péptido A β -humano o una porción del mismo y comprende al menos 6 restos de aminoácido contiguos y tiene al menos 2 restos de aminoácidos no continuos que están unidos covalentemente entre sí.

Se necesita nuevos procedimientos para la detección, diagnóstico y monitorización de enfermedades neurodegenerativas, p.ej. EA.

Sumario de la invención

40 Un gran número de enfermedades y afecciones implican la activación de macrófagos y la proteólisis de proteínas, p.ej., agregados patológicos de proteínas endógenas. Por ejemplo, en EA, se produce la formación de placas amiloides en el cerebro cuando se forman agregados de péptidos beta amiloides (A β) tras la proteólisis de proteína precursora amiloide (PPA). La inmunización de un individuo con péptidos A β desencadena la fagocitosis (Schenk y col. (1999) Nature 400:173-177). La actividad inmune también puede participar en la evolución natural de patologías amiloides, p.ej., el nivel continuo de actividad fagocítica puede contribuir a la formación de placas con el tiempo. Existe evidencia de que los macrófagos circulan desde la médula ósea hasta el sistema nervioso central en los estados patológicos y contribuyen a la eliminación de placa en modelos de ratón de EA (Simard y col. (2006) Neuron 49:489-502), y los macrófagos aislados de pacientes EA presentan una menor fagocitosis de péptidos A β en comparación con los macrófagos de pacientes sin EA (Fiala y col. (2005) J. Alzheimers Dis. 7:221-232). Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de algunas realizaciones de la presente invención han identificado un A β péptido presente en macrófagos activados aislados de muestras de sangre periférica (SEQ ID NO 2). El péptido tiene 11 aminoácidos de longitud. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la determinación del nivel, presencia o ausencia del péptido A β (SEQ ID NO 2) en leucocitos o macrófagos (p.ej. macrófagos activados) de un paciente sirve como procedimiento de diagnóstico, monitorización y/o evaluación del riesgo de enfermedad (p.ej., EA, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, miositis con cuerpos de inclusión).

55 Los procedimientos de la presente invención comprenden proporcionar una muestra que se puede obtener de un paciente (p.ej., un paciente humano), comprendiendo dicha muestra leucocitos, monocitos y/o macrófagos (p.ej.,

macrófagos activados). La muestra puede comprender sangre (p.ej. sangre periférica), fluido cerebroespinal (FCE), tejido (p.ej. pulmón, bazo, hígado, cerebro, páncreas, intestino delgado, tumor). En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de lavado broncoalveolar (LBA). En algunas realizaciones la muestra es médula ósea. En realizaciones particularmente preferentes, la muestra es una muestra de sangre de una muestra FCE.

5 En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención comprenden una etapa de aislamiento de macrófagos (p.ej. macrófagos activados), sin limitación en cuanto a la técnica utilizada para dicho aislamiento (p.ej. tal como se describe en *Macrophages* (2000) ed. Paulnock, D.M., Oxford Univ. Press, Oxford, UK). Entre los ejemplos de aislamiento de macrófagos o técnicas de purificación se incluyen, pero sin limitarse solo a ellas los procedimientos de adhesión o adherencia (p.ej. adherencia a soporte sólido (p.ej. plástico, vidrio), ya esté revestido o no dicho soporte (p.ej. revestido con gelatina, microexudado, colágeno, lisina) o no esté revestido, centrifugación diferencial (p.ej. centrifugación gradiente, centrifugación de gradiente isopícnica, centrifugación de gradiente Ficoll-Hypaque, centrifugación de gradiente Percoll), citometría de flujo, separación de células activadas por fluorescencia (FACS), técnicas de flotación, técnicas de afinidad mediadas por anticuerpos (p.ej. inmunoprecipitación, unión a soporte sólido mediada por anticuerpo (p.ej. perlas magnéticas, partículas no magnéticas, placas, pocillos, tarjetas, chips, portaobjetos, matrices, etc.). En algunas realizaciones, técnica de purificación o aislamiento el macrófago (p.ej. macrófago activado) implica la unión de macrófagos con un socio de unión (p.ej. un anticuerpo) que está asociado de forma no covalente o covalente con una fracción utilizada para detección directa o indirecta (p.ej. una marca fluorescente, biotina, estreptavidina, un radioisótopo, un epítipo, una marca de afinidad).

20 En algunos modos de realización, los procedimientos de la presente invención comprenden la detección del nivel de péptido A β (SEQ ID.NO 2) de un estado patológico neurodegenerativo (p.ej. EA) presente en leucocitos y/o macrófagos (p.ej. macrófagos activados) sin limitación en cuanto a la técnica utilizada para dicha detección. El nivel de biomarcador (péptido A β , SEQ ID.NO 2) se puede determinar cuantitativamente o cualitativamente. Un descenso del nivel de biomarcador (p.ej. en una muestra de tejido o fluido biológico, en una muestra enriquecida para leucocitos y/o macrófagos (p.ej. macrófagos activados)) en relación con un control está correlacionado con un mayor riesgo de enfermedad (p.ej. EA), diagnóstico de enfermedad (p.ej. EA). En algunos aspectos de la presente divulgación, se evalúan las muestras que comprenden macrófagos y/o microglías para determinar el nivel de actividad fagocítica, p.ej. se exponen a un primer polipéptido (p.ej. un péptido A β , PPA) durante un período de tiempo y se determina el nivel de fagocitosis del polipéptido. En algunos aspectos de la divulgación, la presencia, ausencia o el nivel de polipéptidos de menor longitud que el primer polipéptido (p.ej. un segundo péptido A β , SEQ ID NO: 1-5) sirve como indicación del nivel de actividad fagocítica y/o proteolítica en la muestra original.

35 En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención implican la comparación del nivel del biomarcador (péptido A β , SEQ ID.NO 2) en muestras del mismo paciente en uno o más momentos diferentes (p.ej. muestreo longitudinal), p.ej., en los casos en los que dichos niveles están correlacionados con la progresión de enfermedad. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención implican la comparación del nivel de biomarcador (péptido A β , SEQ ID.NO 2) en una muestra de un paciente en relación con el nivel observado en una muestra de un paciente de control que no presenta la enfermedad (p.ej. EA). En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención implican la comparación del nivel de biomarcador (péptido A β , SEQ ID.NO 2) en una muestra de un primer paciente en relación con el promedio, la media u otro(s) nivel(es) estadísticamente determinados (p.ej. los "nivel(es) normal(es)" observados en muestras de una pluralidad de pacientes de control que no presentan la enfermedad (p.ej. EA), en los que el nivel del biomarcador en el primer paciente es anormal si existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al nivel normal.

45 La presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico, monitorización y/o evaluación del riesgo de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento 1) proporcionar una muestra obtenida de un paciente, comprendiendo dicha muestra un tipo de célula como leucocitos, monocitos, macrófagos o macrófagos activados, y b) detectar el nivel de un péptido en la muestra, en la que el péptido tiene al menos al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO: 2, en el que un descenso del péptido en relación con el nivel normal es indicativo de la presencia o gravedad de la enfermedad neurodegenerativa en el paciente. En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa es de un tipo como EA, demencia vascular, y demencia con cuerpos de Lewy. En algunas realizaciones, la muestra es de un tipo como una muestra de sangre, una muestra de tejido o una muestra de fluido cerebroespinal. En algunas realizaciones, el tipo de células es un macrófago. En algunas realizaciones, el tipo de célula es un macrófago activado. En algunas realizaciones, el nivel de control es el nivel en el paciente en un momento diferente, el nivel en un paciente diferente que no presenta la enfermedad neurodegenerativa, o el nivel promedio en una pluralidad de pacientes que no presentan la enfermedad neurodegenerativa. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además el aislamiento del tipo de célula, como, por ejemplo, leucocitos, monocitos, macrófagos, o macrófagos activados. En algunas realizaciones, las células aisladas son macrófagos. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la incubación de las células aisladas con polipéptido A β ₄₂.

Descripción de los dibujos

60 La **Figura 1** proporciona una representación del contenido A β en monocitos.
La **Figura 2** proporciona los datos que asocian el contenido intracelular de A β con diagnóstico clínico.
La **Figura 3** proporciona una curva de respuesta a dosis típica para un ensayo de fagocitosis *in vitro*, presenta

microscopía confocal de un macrófago incubado con 0,5 ng/ml $A\beta_{1-42}$ durante toda la noche y marcada con anticuerpos específicos de $A\beta_{1-42}$ de fluorescencia verde ((6E10 y 4G8). Izquierda, señal fluorescente observada durante la microscopía inmunofluorescente. Derecha, transiluminación.

La **Figura 4** presenta una representación de péptidos $A\beta$ identificados a través del análisis de espectrometría de masas (EM) tal como se describe en el presente documento. Los campos sombreados del centro presentan la localización de los péptidos individuales dentro de la molécula $A\beta_{1-42}$. La región sombreada que se solapa a la derecha de la región sombreada central muestra la región de transmembrana. Todos los péptidos bordean la región intramembrana (transmembrana) de la molécula.

La **Figura 5** presenta los resultados del análisis de espectrometría de masas (EM) durante los experimentos llevados a cabo a lo largo del desarrollo de algunas realizaciones de la presente invención. El panel superior presenta el espectro EM en bruto desde lisosomas de células incubadas en presencia de $A\beta_{1-42}$ y de células de control. El panel inferior presenta otros análisis de los datos de EM del panel superior basados en la secuencia $A\beta_{1-42}$; las barras grises indican fragmentos potenciales y los rectángulos oscuros indican hits significativos de estos fragmentos.

La **Figura 6** proporciona una representación esquemática de un ensayo para la detección y cuantificación de metabolitos de PPA específico de Alzheimer utilizando PCR en tiempo real.

La **Figura 7** proporciona un gráfico de amplificación de PCR en tiempo real.

La **Figuras 8a y 8b** proporcionan histogramas de células THP-1 tras la citometría de flujo. El histograma 8a presenta células THP-1 a las que se ha añadido $A\beta_{1-42}$ en medio. El histograma 8b presenta células THP-1 sin $A\beta_{1-42}$ en medio. El contenido de $A\beta$ intracelular se ilustra en los histogramas. La mediana de isotipo de señal FITC-A Abeta es 102 (no se muestran los resultados). Un desplazamiento de FITC-A Abeta hacia la derecha en comparación con el isotipo indica células con presencia de $A\beta$ intracelular. La elipse en el histograma 8a muestra la presencia de una cola de células $A\beta$ positivas, que está ausente en el histograma 8b. Esta cola indica una cantidad más alta de células que contienen $A\beta$ intracelular fagocitado en el histograma 8b.

La **Figura 9** proporciona una curva de PCR patrón que muestra el ciclo umbral (valor Ct) frente al log de la concentración de péptido. El gráfico presenta el ciclo umbral (valor Ct) frente al log de concentración. La ecuación para la curva es $y = -0,6056x + 32,629$. $R^2 = 0,8653$.

La **Figuras 10a and 10b** proporcionan histogramas de monocitos/macrófagos de paciente y control tras la citometría de flujo. 10a presenta una muestra del paciente intracelular manchada con 6E10/4G8. 10b presenta una muestra de control manchada intracelular con 6E10/4G8. En los histogramas se ilustra el contenido $A\beta_{1-42}$ intracelular en macrófagos/monocitos del paciente y el control. La mediana de isotipo de señal FITC-A Abeta es 102 (no se muestran los resultados). Un desplazamiento de FITC-A Abeta hacia la derecha en comparación con el isotipo indica células con presencia de $A\beta_{1-42}$ intracelular. Los histogramas 3 y 4 indican la presencia aproximada de $A\beta_{1-42}$ intracelular cuando se compara con isotipos.

La **Figura 11** proporciona una curva PCR normal que presenta el ciclo umbral (valor Ct) frente al log de la concentración de péptido. El gráfico presenta el ciclo umbral (valor Ct) frente al log de concentración. La ecuación para la curva es $y = -3,8956x + 37,275$. $R^2 = 0,8818$.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación, se define una serie de términos y expresiones:

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sensibilidad" se define como una medida estadística del rendimiento de un ensayo (p.ej., procedimiento, prueba), calculado dividiendo el número de verdaderos positivos entre la suma de los verdaderos positivos y los falsos negativos.

Tal como se utiliza en el presente documento, "especificidad" se define como una medida estadística del rendimiento de un ensayo (p.ej. procedimiento, prueba), calculado dividiendo el número de verdaderos negativos por la suma de verdaderos negativos y falsos positivos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "informativo" o "capacidad informativa" se refiere a la calidad de un marcador o panel de marcadores, y específicamente a la probabilidad de encontrar un marcador (o panel de marcadores) en una muestra positiva.

Tal como se utiliza en el presente documento "un individuo sospechoso de ser susceptible de riesgo de EA" se refiere a un individuo que está en riesgo por encima de la media de desarrollar EA (EA). Entre los ejemplos de individuos que se encuentran en particular riesgo de desarrollar EA se incluyen aquellos cuya historia médica familiar indica una incidencia por encima de la media de EA, individuos de edad avanzada, individuos que presentan signos o síntomas de CDL o SCI. Otros factores que pueden contribuir al riesgo por encima de la media de desarrollar EA pueden basarse en la genética, así como los antecedentes y las características genéticas, médicas, fisiológicas, psicosociales y/o conductuales específicos del individuo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aislado" cuando se emplea en relación con un material (p.ej., una célula, un leucocito, un macrófago, un macrófago activado, una microglía) se refiere a un material que se identifica y está separado por al menos un componente o contaminante con el que está normalmente asociado en su fuente natural. Un material aislado está presente así en una forma o situación que es diferente de aquella en la que

se encuentra en la naturaleza.

5 Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “inmunoglobulina” y “anticuerpo” se refieren a proteínas que se unen a un antígeno específico. Inmunoglobulinas incluye, sin limitarse solo a ellas, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, e incluye inmunoglobulinas de las siguientes clases: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, e inmunoglobulinas secretadas (slg). Las inmunoglobulinas generadas comprenden dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras. Sin embargo, los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” también abarcan anticuerpos de cadena simple y anticuerpos de doble cadena.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “proteína de unión a antígeno” se refiere a proteínas que se unen a un antígeno específico. “Proteínas de unión a antígeno” incluyen, sin limitarse a ellas, inmunoglobulinas, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados; fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y genotecas de expresión Fab; y anticuerpos de cadena simple.

El término “epítipo” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la porción de un antígeno que hace contacto con una inmunoglobulina en particular.

15 Las expresiones “unión específica” o “que se une específicamente”, cuando se utilizan en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido significa que la interacción depende de la presencia de una estructura en particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en la proteína; es decir, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de una proteína que contiene epítipo A (o A libre, sin marcar) en una reacción que contienen “A” marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

20 Tal como se utilizan en el presente documento las expresiones “unión no específica” y “unión de fondo” cuando se emplean haciendo referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido se refieren a una interacción que no depende de la presencia de una estructura en particular (es decir, el anticuerpo se une a proteínas en general, en lugar de a una estructura en particular, como pueda ser un epítipo).

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “paciente” se refiere a cualquier animal (p.ej. un mamífero), incluyendo, sin limitarse a ellos, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares (p.ej., que será el receptor de un tratamiento en particular (p.ej. un injerto o trasplante) o que es el donante de un injerto. Los términos “paciente” y “sujeto” se utilizan indistintamente para hacer referencia un paciente humano, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento (p.ej., cuando el paciente es un donador de injerto).

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “muestra” se utiliza en su más amplio sentido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, incluye una muestra de ensayo (p.ej., muestra de sangre, muestra de fluido cerebroespinal FCE). En realizaciones preferentes, incluye una muestra biológica.

35 La presente invención no queda limitada por el tipo de muestra biológica utilizada o analizada. La presente invención es útil con diversas muestras biológicas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, tejido (p.ej., órgano (p.ej., corazón, hígado, cerebro, pulmón, estómago, intestino, bazo, riñón, páncreas u órganos reproductores (p.ej. ovarios); biopsia pulmonar), glandular, de piel y de tejido muscular), celular (p.ej. células sanguíneas (p.ej., linfocitos o eritrocitos), células musculares, células tumorales, células bronquiales, células bronquioalveolares, y células de la piel), gas, fluido corporal (p.ej., fluido de aspirado traqueal, fluido broncoalveolar, muestra de lavado broncoalveolar, sangre o porciones de la misma, suero, plasma, orina, semen, saliva, etc.) o sólidas (p.ej. heces) muestras obtenidas de un ser humano (p.ej., un adulto, un niño, o un embrión) o animales (p.ej., ganado bovino, aves, ratones, ratas, perros, cerdos, gatos, caballos y similares). Las muestras biológicas se pueden obtener de todas las familias de animales domésticos, así como de fieras o animales salvajes, incluyendo, sin limitarse a ellos, animales como los ungulados, osos, peces, lagomorfos, roedores, etc.

45 Las muestras biológicas incluyen también biopsias y secciones de tejido (p.ej. biopsia o secciones de tumor, tumor, sarpullido, infección o secciones embebidas en parafina), muestras médicas u hospitalarias (p.ej. incluyendo, pero sin limitarse a ellas, fluido de lavado broncoalveolar (LBA), fluido de aspirado traqueal, muestras de sangre, saliva, hisopo bucal, fluido cerebroespinal, fluido pleural, leche, calostro, ganglio linfático, esputo, vómito, bilis, semen, ovocitos, células cervicales, fluido amniótico, orina, heces, pelo y sudor) y muestras de laboratorio (p.ej., fracciones subcelulares).

50 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la eliminación de componentes (p.ej., contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, se purifican anticuerpos eliminando proteínas que no son inmunoglobulinas contaminantes; también se purifican eliminando la inmunoglobulina que no se une a la molécula diana. La eliminación de proteínas que no son inmunoglobulina y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a la molécula diana tienen como resultado un aumento del porcentaje de inmunoglobulinas reactivas con la diana en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células huésped bacterianas y se purifican los polipéptidos por eliminación de las proteínas de las células huésped; en virtud de lo cual, aumenta el porcentaje de polipéptidos recombinantes en la muestra. En otro ejemplo más, se puede purificar o enriquecer un tipo de célula específico (p.ej. leucocito, macrófago, macrófago activado, célula microglial) utilizando una técnica de separación de células (p.ej., citometría de flujo, separación de células activadas por fluorescencia (FACS)).

Tal como se aplica para polipéptidos, el término “sustancial identidad” significa que dos secuencias de polipéptido, cuando se alinea óptimamente, como por ejemplo con los programas GAP o BESTFIT utilizando los pesos de hueco por defecto, comparten al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia (p.ej., 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticos difieren por sustituciones de aminoácido conservadoras. Sustituciones de aminoácido conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contiene amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferentes son: valina-leucina-isoleucina; fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

15 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona procedimientos que se refiere a la detección, monitorización, diagnóstico o valoración del riesgo de desarrollar enfermedad neurodegenerativa (p.ej. EA, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, miositis con cuerpos de inclusión u otras enfermedades neurodegenerativas).

20 En los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de algunas realizaciones de la presente invención, se ha demostrado que los monocitos/macrófagos derivados de la sangre internalizan $A\beta_{1-42}$ en una situación *in vitro*. En la Figura 1 se muestra una descripción del contenido en $A\beta$. En la Figura 2 se proporcionan los datos que asocian el contenido intracelular de $A\beta$ con el diagnóstico clínico. En la Figura 3 se proporciona una curva de respuesta a dosis típica para un ensayo de fagocitosis *in vitro* y demuestra que tiene lugar la internalización a través del sistema endosomal-lisosomal, ya que aparece fluorescencia verde específica de $A\beta_{1-42}$ en los gránulos intracelulares; véase también (Boland y col. (2010), en prensa, doi: 10.1074/jbc.M110.186411; Lorenzen y col. (2010) Mol. Brain 3:11). Se postula que el procedimiento de evaluación de la eficacia de dicha eliminación es necesario para mejorar el proceso de diagnóstico, p.ej., cuando se diagnostica EA.

30 En algunos aspectos, la presente divulgación describe procedimientos para diagnosticar actividad fagocítica de monocito/macrófago en muestras, p.ej., muestras de fluido corporal, por detección de fragmentos de péptido fagocitados. Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de algunas realizaciones de la presente invención permitieron identificar estructuras de fragmento de péptido específicas para proteína precursora amiloide (PPA) fagocitada y parcialmente degradada, p. ej., tal como se describe en el Ejemplo 1 (p.ej., SEQ ID NO: 1-5). En algunos aspectos de la divulgación, se sintetizan los fragmentos de Péptido $A\beta$ (p. ej., SEQ ID NO: 1-5) (p.ej., se sintetizan químicamente, se sintetizan por expresión recombinante) y se inmuniza a los animales con péptidos individuales (p.ej., péptidos codificados por SEQ ID NO: 1-5) para producir anticuerpos específicos de péptido. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos específicos de péptido pueden utilizarse en un kit (p.ej., un kit para el diagnóstico, monitorización o determinación del riesgo de desarrollo) de una enfermedad (p.ej. EA) tal como se describe con mayor detalle a continuación.

40 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de inmunoglobulinas que se unen a péptidos que son idénticos en al menos un 80 %, 90 %, o 100 % al péptido codificado por SEQ ID NO: 2 en un procedimiento de la invención. En aspectos de la divulgación, los péptidos tienen una longitud de 5 a 20 aminoácidos y los péptidos que son idénticos al menos en un 80 %, 90 %, o 100 % con los péptidos codificados por la SEQ ID NO: 1-5 proporcionan al menos una porción de un epítipo dentro de la secuencia de péptido más larga. Tal como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo o anticuerpo policlonal” significa una proteína que se produce como respuesta a la inmunización con un antígeno o receptor. El término “anticuerpo monoclonal” significa una inmunoglobulina derivada de un único clon de células. Todos los anticuerpos monoclonales derivados del clon son química y estructuralmente idénticos, y específicos para un determinante antígeno único.

50 Los procedimientos de laboratorio para producir anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, así como para deducir sus correspondientes secuencias de ácido nucleico, son conocidos en la técnica, véase Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988) and Sambrook y col. (1989) *supra*. Los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación se pueden producir biológicamente introduciendo un péptido tal como se ha descrito o una proteína de fusión o un fragmento de proteína más largo que comprende el péptido en un animal, p.ej., un ratón o un conejo. Se aíslan las células que producen anticuerpo en el animal y se fusionan con células de mieloma o células de heteromieloma para producir células híbridas o hibridomas.

55 Por lo tanto, al utilizar los péptidos descritos, y procedimientos muy conocidos, las personas especializadas en la técnica pueden producir y explorar las células de hibridoma y los anticuerpos de la presente divulgación para detectar anticuerpos que tienen la capacidad de unirse al péptido deseado (p.ej., SEQ ID NO: 1-5).

Si un anticuerpo monoclonal que se está sometiendo a ensayo se une con el péptido, entonces el anticuerpo sometido a ensayo y los anticuerpos proporcionados por los hibridomas de la presente divulgación son equivalentes.

También es posible determinar sin una experimentación indebida, si el anticuerpo tiene la misma especificidad o no que el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación determinando si el anticuerpo que se está sometiendo a ensayo evita que un anticuerpo monoclonal de la presente divulgación se una al péptido con el que el anticuerpo monoclonal es normalmente reactivo. Si el anticuerpo que se somete a ensayo compite con el anticuerpo monoclonal de la divulgación, tal como se muestra por una menor unión con el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación, entonces, es probable que los dos anticuerpos se unan con el mismo epítipo o un epítipo íntimamente relacionado. Alternativamente, se puede pre-incubar el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación con el péptido con el que es normalmente reactivo y determinar si el anticuerpo monoclonal sometido a ensayo es inhibido en su capacidad para unirse al antígeno. Si el anticuerpo monoclonal sometido a ensayo es inhibido, entonces, con toda probabilidad, tiene a misma especificidad epitópica o íntimamente relacionada, que el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación.

Se pretende que el término anticuerpo incluya también anticuerpos de un isotipo diferente que el anticuerpo monoclonal de la presente divulgación. Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal pueden prepararse o bien directamente seleccionándolos de una fusión inicial, o bien pueden prepararse secundariamente a partir del hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de diferente isotipo utilizando la técnica de selección sib para aislar variantes de cambios de clase aplicando el procedimiento descrito en Steplewski y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:8653 o Spira y col. (1984) J. Immunol. Methods 74:307. Por tanto, los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación podrían incluir variantes de cambio de clase que tienen especificidad con el péptido deseado (p.ej., SEQ ID NO: 1-5).

La presente divulgación describe asimismo fragmentos biológicamente activos de los anticuerpos policlonales y monoclonales descritos. Dichos fragmentos de anticuerpo retienen la capacidad para unirse selectivamente con su antígeno o inmunógeno. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden incluir, sin limitarse a ellos: (1) Fab, el fragmento que contienen un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producida por digestión con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenida por tratamiento con pepsina, seguido de reducción para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se obtiene por tratamiento con la enzima pepsina sin la posterior reducción; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento obtenido por ingeniería genética que contienen la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (5) SCA, definido como una molécula obtenida por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas por un engarce polipéptido adecuado, como la molécula de cadena fusionada genéticamente.

Los ejemplos específicos de "fragmento de anticuerpo biológicamente activo" incluyen las regiones CDR de los anticuerpos. Los procedimientos para fabricar estos fragmentos son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, Harlow and Lane, (1988) *supra*.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden modificar también para crear anticuerpos quiméricos (Oi, y col. (1986) BioTechniques 4(3):214). Los anticuerpos quiméricos son aquellos en los que varios dominios de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos están codificados por ADN de más de una especie.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden unir a un agente detectable o un hapteno. El complejo es útil para detectar los péptidos de la muestra utilizando técnicas inmunoquímicas normales, tales como inmunohistoquímica, tal como describe Harlow and Lane (1988) *supra* y a través de los procedimientos que se describen con más detalle a continuación. Entre los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar los anticuerpos monoclonales de la divulgación se incluyen inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Como ejemplos de dichos inmunoensayos se pueden mencionar ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y los ensayos tipo sándwich (inmunométrico) e inmuno-PCR. La detección del (los) péptido(s) utilizando los anticuerpos monoclonales de la divulgación se puede realizar empleando inmunoensayos que se ponen en marcha de forma directa, inversa o simultánea, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Las personas especializadas en la técnica sabrán o podrán discernir fácilmente otros formatos de inmunoensayo sin una experimentación indebida.

Otra técnica que puede tener como resultado una mayor sensibilidad consiste en el acoplamiento de anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular. Dichos haptenos se pueden detectar específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, está extendido el uso de haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitroterilo, pirodoxal y fluoresceína que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos. Véase Harlow and Lane (1988) *supra*.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden unir a muchos vehículos diferentes. Entre los ejemplos de vehículos conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilón, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Las personas especializadas en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos monoclonales, o podrán determinarlos aplicando la experimentación de

rutina.

Existen muchos marcadores diferentes y procedimientos de marcado, conocidos entre las personas especializadas en la técnica. Entre los ejemplos de los tipos de marcas que se pueden utilizar en la presente invención se incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Las personas especializadas en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para su unión con el anticuerpo monoclonal, o podrán determinarlos aplicando la experimentación de rutina. Asimismo, la unión de estos marcadores con el anticuerpo monoclonal de la divulgación puede realizarse aplicando las técnicas convencionales habituales entre las personas especializadas en la técnica.

En algunas realizaciones, la presente invención facilita el diagnóstico, monitorización y/o determinación del riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa (p.ej., EA) sobre la base del nivel de un péptido biomarcador (p.ej., fragmento de péptido A β , SEQ ID NO: 2) en células (p.ej. macrófagos, macrófagos activados). En algunas realizaciones, las células (p.ej. macrófagos, macrófagos activados) se aíslan desde sangre (p.ej., sangre periférica) y/o fluido cerebroespinal. En algunos aspectos, el período de tiempo que transcurre entre el aislamiento de la célula (p.ej., macrófago, macrófago activado) y el ensayo es menos de 5 días, menos de 4 días, menos de 3 días, menos de 2 días, menos de 1 día, menos de 18 horas, menos de 12 horas, menos de 8 horas, preferentemente menos de 6 horas, siendo sobre todo preferente menos de 4 horas. En algunos aspectos, se aíslan o se purifican una o más fracciones subcelulares, desde un tipo de célula (p.ej., macrófago, macrófago activado) desde una muestra. En algunos aspectos, la fracción subcelular es una fracción lisosomal. En algunos aspectos, los procedimientos de la presente invención se combinan con evaluación *ex vivo* de la actividad fagocitosis (p.ej., tal como se describe en el Ejemplo 1 y en PCT App. No. PCT/EP09/001210). En algunos aspectos, dicha valoración de la actividad de fagocitosis comprende la incubación de células (p.ej. macrófagos, macrófagos activados) desde una muestra con o sin péptidos (p.ej. fragmentos de péptido A β (p.ej., SEQ ID NO: 1-5)). En algunos aspectos, la fagocitosis se evalúa empleando técnicas como separación de células activadas por fluorescencia (FACS) y/o microscopía confocal. En algunos aspectos, los procedimientos de la presente invención incluyen el uso de técnicas como inmunoprecipitación en solitario o combinada con espectroscopia de masas (p.ej. IP-EM). En algunas realizaciones, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos específicos de fragmento de péptido A β (SEQ ID NO 2) en el procedimiento de la invención. En algunos aspectos, los procedimientos de la presente invención encuentran uso en la monitorización de la eficacia del tratamiento y/o el avance de la enfermedad. En algunos aspectos, los procedimientos de la presente invención encuentran uso en el diagnóstico, monitorización, y/o evaluación del riesgo de desarrollar enfermedades que implican la activación de monocito/macrófago, extravasación, fagocitosis y reentrada en la circulación. En algunos aspectos, los procedimientos de la presente invención encuentran uso en la monitorización de la fagocitosis de proteína de precursor amiloide (PPA). Si bien la presente invención no está limitada a ningún mecanismo en particular, y no es necesaria una comprensión del mecanismo para poner en práctica la presente invención, se contempla que la fagocitosis de PPA es un mecanismo central en la homeostasis PPA-amiloide alterada durante el avance de la enfermedad de Alzheimer.

A continuación, se describirá una realización de la presente invención. Se obtiene una muestra de fluido cerebroespinal (FCE) de un paciente por punción lumbar. Se manchan los macrófagos de la muestra con anticuerpos anti-CD 14 y anti-CD16 marcados con fluorescente y, a continuación, se extraen los macrófagos de la muestra por separación de células activadas por fluorescencia.

Se seleccionan las células sobre la base de la expresión CD14 y CD16 ya que esto permite diferenciar los macrófagos activados de las células quiescentes (el aumento de la expresión CD16 significa un estado activado). Esta técnica también evita el muestreo inadvertido de otros tipos de células como células dendríticas CD68 positivas. Este enfoque contrasta con el indicado por Fiala y col (39) en el que se seleccionan células CD68 positivas.

Se lisan las células macrófagos resultantes y se preparan para análisis de proteínas. Se mezcla el lisado celular con anticuerpos monoclonales capaces de unirse a fragmentos de la proteína A β (SEQ. ID NO: 6, DAEFRHDSGYEVHMQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLVGQV). Ejemplos de anticuerpos son 6E10, 4G8 y 11A50-B10 de los Signet Laboratories Inc., y los anticuerpos específicos por ejemplo SEQ ID No: 1-5 antes descritos. Se usa el anticuerpo 6E10 para inmunoprecipitar los fragmentos A β 1-16, los fragmentos A β inmunoprecipitados 17-24 de anticuerpo 4G8 y los fragmentos A β inmunoprecipitados 1-40 de anticuerpo 11A50-B10. En realizaciones alternativas, se puede utilizar un panel de anticuerpos diferente, específico para otros fragmentos. Los anticuerpos monoclonales también se acoplan a perlas magnéticas, por ejemplo, con perlas unidas a anticuerpos anti-IgG. Las perlas magnéticas se utilizan para extraer los fragmentos de la proteína A β . Los anticuerpos y las perlas se separan posteriormente de los fragmentos de péptido. Se analizan los fragmentos de péptido por espectrometría de masas MALDI-TOF y la secuencia de los fragmentos derivados de la masa molecular de cada fragmento. Se visualizan los resultados cuantitativamente para indicar la cantidad relativa de cada fragmento. Cuando no se detecta proteína A β ni fragmentos de proteína A β en los macrófagos, es indicativo de que el paciente tiene EA.

Los fragmentos A β presentados en los espectros IP-EM son el resultado de la degradación intracelular de acuerdo con el carácter del sitio catalíticamente activo y las condiciones de acción de proteasa/ peptidasas intracelulares. Dichos fragmentos no necesariamente corresponden a las secuencias de los fragmentos A β encontrados extracelularmente en FCE. Por tanto, en algunos aspectos, para identificar la longitud exacta de cada fragmento A β

obtenido en el experimento, se aíslan los péptidos para determinar sus correspondientes secuencias de aminoácido.

Se podrá apreciar que el procedimiento descrito detecta la presencia de los fragmentos de proteína A β que están presentes *in vivo* en el paciente. El procedimiento no implica una etapa por separado de exposición de los macrófagos a la proteína A β *in vivo*, después de la extracción desde el paciente.

5 En algunas realizaciones, se compara el nivel de los fragmentos de proteína A β detectado con el nivel detectado en un individuo de control que no tienen EA. En dichas realizaciones, se hace una comparación entre el nivel y el patrón de los fragmentos de proteína A β del paciente y los del individuo de control. Cuando el nivel de los fragmentos de proteína A β está significativamente por debajo de aquel del individuo de control, es indicativo de EA en el paciente. De manera similar, si el tipo de fragmentos de proteína A β presente en el individuo es significativamente diferente de los del individuo de control, es indicativo de EA en el paciente. En realizaciones alternativas, se genera un nivel normal de fragmentos de proteína A β detectando la presencia de dichos fragmentos en los macrófagos en FCE en una pluralidad de individuos de control que no tienen EA. A continuación, se compara el nivel y el patrón de fragmentos de proteína A β del paciente con el nivel normal y una reducción estadísticamente significativa del nivel o diferencia con el patrón de la presencia de fragmentos es indicativa de EA.

15 En otros aspectos, se examina un solo paciente anualmente durante un período de tiempo (p.ej. 10 años). En cada ocasión, se estudian los niveles de los fragmentos de proteína A β en los macrófagos de una muestra de FCE del paciente, tal como se ha descrito. Un cambio significativo en el nivel o el patrón de los fragmentos de proteína A β cada año, en particular, una reducción en el nivel de los fragmentos de proteína A β de año en año, es indicativa de la presencia de EA.

20 En ciertos aspectos de la divulgación, se miden en el paciente también otros marcadores de EA, al mismo tiempo que se lleva a cabo el análisis descrito. Dichos marcadores de EA adicionales incluyen niveles anormales de A β ₄₂, Tau, Fosfo-Tau o la relación A β ₄₂/A β ₄₀ en la muestra de FCE obtenida del paciente o en el perfil de ARN de la sangre o muestra de FCE obtenida del paciente. Un nivel anormal de alguno de estos marcadores de EA adicionales, así como un nivel anormal de fragmentos de proteína A β en los macrófagos en el FCE del paciente es indicativo de la presencia de EA. A modo de ejemplo, un nivel anormal (es decir patológico) de A β ₄₂ es una concentración en FCE de menos de 550 pg/ml. La concentración de Tau depende de la edad, siendo los niveles altos patológicos. Un nivel patológico de Fosfo-tau es una concentración en FCE de más de 85 pg/ml. Un nivel patológico de la relación A β ₄₂/A β ₄₀ es aquella en la que (A β ₄₂/A β ₄₀) x 10 es menos de 1.

30 En los aspectos que se han descrito, se obtiene una muestra de FCE del paciente. Sin embargo, alternativamente, se estudia un tipo de muestra diferente, como por ejemplo una muestra de sangre. Dicha muestra alternativa se puede utilizar, ya que los macrófagos circulan desde la médula ósea al SNC y por tanto, los macrófagos en la sangre del paciente pueden haber sido expuestos a proteínas en el SNC. Naturalmente, es más fácil obtener una muestra de sangre que una muestra de FCE del paciente.

35 Un aspecto de la presente divulgación aplica los siguientes criterios como base de una prueba de diagnóstico para evaluar la enfermedad de Alzheimer en macrófagos activados/microglías del paciente: 1) Se cumplen todos los criterios de la enfermedad, 2) Presencia y separación de población de células CD16⁺ en FCE y sangre según la citometría de flujo; 3) Presencia/ausencia de fragmentos de péptido A β en el espectro EM después de la inmunoprecipitación con anticuerpos, 4) Procedimientos adoptados en la clínica. Se puede reemplazar la citometría de flujo e IPEM por otros procedimientos de separación y diferenciación de subtipos de células y análisis de fragmentos de péptidos.

40 Procedimientos de evaluación del cumplimiento de los criterios de la enfermedad. Se somete al paciente a una investigación clínica exhaustiva incluyendo un estudio de su historia médica, un examen físico, neurológico y psiquiátrico, pruebas de exploración en laboratorio e imágenes MRI y PET del cerebro. Se realiza el diagnóstico de EA de acuerdo con los criterios publicados recientemente [12]. El paciente es sometido a un examen físico y fisiológico exhaustivo al incorporarse en el programa de diagnóstico en el hospital. El examen incluye cuestionarios neurofisiológicos para la identificación de déficits cognitivos, examen neurológico, análisis genético, biomarcadores FCE, imágenes y perfil metabólico.

45 Procedimientos para evaluar la presencia y separación de población de células CD16⁺ en FCE y sangre por citometría de flujo. Se adquieren las células en un sistema de separación de células FACSAria y se analizan utilizando un software FACSDiva (ambos de Becton Dickinson). Se separan las poblaciones de células FCE sobre la base de su expresión de marcadores superficiales pertinentes (CD). Se seleccionan las células con arreglo a las propiedades de dispersión de la luz directa o lateral y se seleccionan positivamente según la presencia de CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8 (caracterización de población de linfocitos T), y CD45⁺ CD14⁺ CD16⁺ CD19 (caracterización de macrófagos activados y población de linfocitos B). Para preservar intactas las células inmunes, se realiza la separación de células a un máximo de cuatro horas tras la punción. Se lisan las células separadas CD14⁺/CD16⁺ y se mantienen congeladas a - 80 °C para posterior análisis (análisis de proteínas). Además de recoger las células para el análisis de proteínas, los resultados de citometría indican la distribución de células inmunes de FEC y (sangre) periférica del paciente.

Procedimiento de preparación de células para inmunoprecipitación. Se separan poblaciones de células FCE sobre la base de su expresión de marcadores superficiales pertinentes (CD). Se seleccionan las células con arreglo a las propiedades de dispersión de luz directa y lateral y se seleccionan positivamente según la presencia de CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8 (caracterización de población de linfocitos T), y CD45⁺ CD14⁺ CD16⁺ CD19 (caracterización de macrófagos activados y población de células B). Se obtiene y se registra la población de células y el número de células de cada población. El número de células activadas en pacientes a los 7-10 días de un ictus es alto, lo que indica la circulación de células reclutadas también en el compartimento de FCE de un gran número de células inmunes. El número de macrófagos activados en EA equivale en gran medida al del grupo DCL/no-EA. El total del % de células activadas en EM es inferior que en EA; lo que puede deberse al proceso inmune en EM implica principalmente linfocitos T. Se lavan las células separadas con 400 µl de PBS y se centrifugan (4 °C, 750 x g, 5 min). Se retira el sobrenadante y se prepara para análisis IPEM añadiendo 10 mil de tampón RIPA para lisis celular y manteniéndolo a - 80°C antes del análisis de proteínas.

Procedimiento de inmunoprecipitación. Se añaden por separado una parte alícuota (4 µg) de anticuerpos monoclonales 6E10 (1 mg/ml, epítipo 4-9), 4G8 (1 mg/ml, epítipo 18-22), o 11A50-B10 (0,5 mg/ml, reactivo con el término C) (Signet Laboratories, Inc.) a 50 µl de perlas magnéticas Dynabeads (IgG anti ratón de oveja) y se incuba durante toda la noche en una plataforma oscilante a + 4 °C. Se separa el anticuerpo sin unir restante por lavado dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). Después de añadir 1 ml de FCE a las perlas revestidas con anticuerpo, se continúa la incubación durante 1 hora más a + 4 °C. Se aglomeran las perlas durante 5 minutos utilizando un concentrador de partículas magnético (DynaL MPC) y se lavan dos veces con PBS (pH 7,4) y dos veces con 50 mM bicarbonato de amonio (pH 7,3). Después del lavado final, se eluyen los péptidos Aβ extraídos añadiendo 20 µl de ácido fórmico al 0,5 % (AF) en agua. Después de aplicar agitación vorticial durante 2 minutos a temperatura ambiente, se aglomeran las perlas utilizando el concentrador de partículas magnético y se recoge el sobrenadante. Se seca el sobrenadante recogido en una centrifuga de vacío y se vuelve a disolver en 5 µl de 0,1 % de AF en 20 % de acetonitrilo (ACN). Todos los disolventes utilizados tienen calidad HPLC y todas las soluciones acuosas se preparan utilizando 18,2 M de agua desionizada obtenida de un sistema de purificación Millipore.

Procedimientos de evaluación de la presencia /ausencia de Aβ en espectros de EM tras inmunoprecipitación. Se utiliza IP-EM para aislar y determinar el contenido en péptido Aβ (signatura Aβ) en macrófagos CD14⁺/CD16⁺ separados por citometría de flujo. Los péptidos Aβ procesados proteolíticamente son difíciles de detectar aplicando los procedimientos proteómicos normales, posiblemente porque comprenden un grupo heterogéneo de péptidos N- y C-terminalmente truncados, algunos en baja cantidad. El análisis IP-EM ha sido utilizado anteriormente para obtener una signatura de péptido Aβ con éxito [43] [44]. Brevemente, se han aislado péptidos Aβ de macrófagos lisados utilizando anticuerpos monoclonales anti Aβ y perlas magnéticas Dynabead. A continuación, se realiza un análisis de espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) sobre los péptidos inmunoprecipitados y se calcula la signatura Aβ de macrófago. La ausencia de señal Aβ en la muestra de ensayo se interpreta como un diagnóstico EA positivo.

Procedimientos alternativos. En las variantes de los procedimientos descritos se aplican las siguientes técnicas.

1. En lugar de utilizar citometría de flujo para separar las células, se extraen las células macrófagos activados /microglía por extracción magnética, técnicas de flotación u otras técnicas de extracción basadas en anticuerpos o por afinidad, p.ej. cromatografía, centrifugación de gradiente. Alternativamente, se estudian las células utilizando inmunohistoquímica.
2. Inmunoprecipitación utilizando otros anticuerpos específicos para el péptido/proteína de interés.
3. En lugar de utilizar espectrometría de masas, se emplea otra técnica para el análisis cuantitativo o semi-cuantitativo de péptido/proteína como por ejemplo: HPLC-fluorescencia o - UV, luminiscencia, sistemas estreptavidina/biotina, inmunohistoquímica.

Afecciones alternativas. En aspectos alternativos, se estudia un estado patológico diferente caracterizado por la presencia de fragmentos de una proteína marcadora en el cerebro del paciente. En cada caso, es necesario identificar la afección que se va a estudiar y la correspondiente proteína que caracteriza la afección. Entre los ejemplos de afecciones se incluyen: enfermedad de Parkinson, en la que la proteína de caracterización es ubiquitina; Esclerosis múltiple, en la que la proteína básica mielina caracteriza la afección; Demencia Fronto-Temporal y esclerosis lateral amiotrófica que se caracterizan por la proteína tau; y enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y EA que se caracterizan por proteína alfa-sinucleína. En cada uno de estos casos, el procedimiento de detección o monitorización se lleva a cabo tal como se ha descrito en relación con EA, con la excepción de que los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar los péptidos desde los macrófagos se sustituyen por anticuerpos que son capaces de unirse a fragmentos de la proteína que caracteriza la afección. Asimismo, en el caso de esclerosis múltiple, unos niveles anormalmente altos de proteína marcadora ubiquitina son indicativos de la presencia de la enfermedad.

En algunos aspectos, se determinan por ensayo varias de estas afecciones simultáneamente por inmunoprecipitación de lisados celulares con múltiples grupos de anticuerpos, siendo específico cada grupo de anticuerpos para fragmentos de diferentes proteínas de caracterización.

En algunos aspectos de la divulgación, se proporciona un kit de diagnóstico con el fin de dar cabida a la detección de un estado patológico según la invención (es decir una afección caracterizada por la presencia de fragmentos de una proteína marcadora en el cerebro de un paciente que padece dicha afección). El kit es adecuado para su uso en los laboratorios clínicos habituales, ya que se basa en una técnica ELISA/inmuno-PCR y por tanto no requiere el uso de técnicas MALDI-TOF o IP-EM, tal como se ha descrito en algunas realizaciones anteriores. El kit comprende un panel de anticuerpos específicos diana que son específicos para un primer epítipo de la proteína marcadora. Por tanto, por ejemplo, en los casos en los que el estado patológico que se ha detectar es enfermedad de Alzheimer, la proteína marcadora es una proteína Abeta 42. El kit comprende asimismo un suministro de perlas magnéticas que despliegan anticuerpos específicos de macrófago (por ejemplo, anticuerpos específicos para marcadores celulares CD14 y CD16); un agente de lisado celular como, por ejemplo, tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) que contiene 25 mM Tris- HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % desoxicolato de sodio y 0,1 % SDS (Pierce Biotechnology); y un anticuerpo secundario que es específico para un segundo epítipo de la proteína marcadora. Se conjuga el anticuerpo secundario con una molécula marcadora de ADN de doble cadena.

A continuación, se describirá el kit en la práctica. Se obtiene una muestra, como por ejemplo sangre periférica o FCE, de un paciente y se aíslan las células macrófago de la muestra por mezclando con las perlas magnéticas proporcionadas en el kit. Los anticuerpos específicos de macrófago que se despliegan en las perlas magnéticas se unen a los macrófagos en la muestra del paciente y a continuación, se retiran los macrófagos y las perlas magnéticas de la muestra por medios magnéticos. A continuación, se liberan las células macrófago de los anticuerpos específicos de macrófago ajustando el pH de la solución y se lisan las células macrófago con un agente de lisado para liberar el contenido de células que incluye la proteína marcadora. En el kit de diagnóstico se proporciona también un soporte sólido en el que se inmoviliza una pluralidad de anticuerpos diana que son específicos para la proteína marcadora. El contenido de la célula macrófago lisada se pone en contacto después con el soporte sólido de manera que el primer epítipo de la proteína marcadora se une al anticuerpo diana.

Se pone en contacto el soporte sólido con un anticuerpo secundario que se conjuga con una molécula marcadora de ADN de doble cadena. El anticuerpo secundario es específico para el segundo epítipo de la proteína marcadora de manera que el anticuerpo secundario se inmoviliza sobre el soporte sólido cuando está presente la proteína marcadora. A continuación, se lavan las proteínas sin unir y el anticuerpo secundario sin unir y se retiran.

A continuación, se somete el soporte sólido lavado a PCR en tiempo real que funde la molécula marcadora de ADN de doble cadena y amplifica el número de copias para identificar el número de copias de la molécula marcadora de ADN. El número de copias de la molécula marcadora de ADN tras una serie de ciclos predeterminados de amplificación por PCR es indicativo del número de partida de moléculas de ADN. Por otra parte, existe una relación uno-a-uno entre el número de partida de moléculas de ADN y el número de proteínas marcadoras unidas. Por lo tanto, esta técnica de inmuno-PCR proporciona una indicación precisa del número de moléculas de proteína marcadora en la muestra del paciente.

Por consiguiente, dichos kits de diagnóstico dan cabida a un procedimiento inmunológico sencillo que se puede utilizar en los laboratorios clínicos normales disponibles en todos los hospitales, clínicas privadas y laboratorios comerciales para analizar muestras de paciente de acuerdo con la presente invención. El uso del kit del procedimiento de la invención no requiere el uso de instrumentos caros o avanzados de laboratorio y la detección mediante el uso de la técnica inmuno-PCR asegura una alta sensibilidad.

En algunas variantes de los kit de diagnóstico que se han descrito, se proporciona una pluralidad de paneles de anticuerpos en el kit. Por ejemplo, en una variante, el kit comprende anticuerpos de primera diana que son específicos de un primer epítipo (p.ej. SEQ ID No: 1-5) de la proteína A β y anticuerpos de segunda diana que son específicos para un segundo epítipo de proteína A β (p.ej. SEQ ID No: 1-5). En otros aspectos más, se proporciona una pluralidad de paneles de anticuerpo en el kit y los anticuerpos son específicos para proteínas marcadoras que corresponden a uno o más estados patológicos. Por ejemplo, en una variante en particular, se proporciona un panel de anticuerpos específico para la proteína Abeta (la proteína marcadora para la enfermedad de Alzheimer) y se proporciona un panel de anticuerpos específico para esclerosis múltiple (en la que la proteína mielina básica es la proteína marcadora). En estas variantes, es preferible, que los diferentes paneles de anticuerpos secundarios, cada uno de ellos específico para la correspondiente proteína marcadora y conjugados cada uno de ellos con una molécula marcadora de ADN diferente, se proporcionen de modo que la señal para la detección de cada proteína marcadora se pueda distinguir.

En los aspectos del kit de diagnóstico que se han descrito, la marca detectable es una molécula marcadora de ADN. Sin embargo, en otros aspectos, se utiliza una marca detectable diferente. Por ejemplo, la marca detectable puede ser un fluoróforo, una microperla de látex o una partícula de oro. Dichas marcas detectables alternativas son útiles cuando se proporciona el kit solamente para proporcionar un resultado cualitativo en lugar de un resultado cualitativo.

En algunos aspectos alternativos del kit, no se proporciona agente de lisado como tal, sino que se lisan las células mecánicamente, p.ej., por centrifugación, antes del aislamiento de los macrófagos.

5 Se debe apreciar también que los kits de diagnóstico de la presente divulgación no se limitan a kits que comprenden anticuerpos. En realizaciones alternativas, los anticuerpos de kit están reemplazados por otros reactivos de unión como fragmentos de unión a antígeno (p.ej., fragmentos F(ab')₂ o fragmentos Fab) o una secuencia de polinucleótidos. Normalmente, dichos reactivos de unión distintos tienen afinidades de unión a sus dianas comparables a las de los anticuerpos como por ejemplo tienen afinidad de unión de menos de 100 nm en una solución acuosa tamponada a un pH comprendido entre 4 y 8.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para demostrar e ilustrar mejor ciertas realizaciones y aspectos preferentes de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos de su ámbito.

10 **Ejemplo 1 Identificación de péptidos beta amiloides (A β) en monocitos /macrófagos aislados**

Se aislaron monocitos/macrófagos de sangre periférica de un voluntario sano y se incubaron con la adición de A β ₄₂ sintético en el medio de cultivo durante toda la noche para facilitar la absorción y fagocitosis de A β ₄₂. Se incluyó una muestra sin la adición de A β ₄₂. La recogida de la muestra y el aislamiento de monocito/macrófago se realizaron tal como se describe en el documento PCT App. No. PCT/EP09/001210.

15 Después de recoger las células, se extrajeron orgánulos celulares (ER, mitocondria, endosomas, lisosomas, etc.) y se separaron posteriormente en un gradiente iodixanol por centrifugación. Se analizaron polipéptidos presentes en la fracción de orgánulos que correspondían a los lisosomas por espectroscopia de masa con búsqueda de bases de datos basadas en la secuencia de aminoácido A β ₄₂.

20 Se identificaron varios fragmentos A β ₄₂ y se observó que eran específicos para el estado de fagocitosis de A β ₄₂. Asimismo, dos péptidos más cortos fueron identificados inequívocamente y aun con ello suficientemente largos para epítopos antigénicos presentes con bastante probabilidad, los tramos GSNKGAI (25-32 de la molécula A β ₄₂, que corresponde a la secuencia 621-627 de la PPA), y FAEDVG (20-25 de la molécula A β ₄₂, que corresponde a 616-621 en PPA) ambos parcialmente en la región de transmembrana (Figura 4).

25 Se identificaron cinco nuevos fragmentos A β ₁₋₄₂ y estos epítopos de antígeno presentes con bastante probabilidad. Estos fragmentos se representan como SEQ ID NO: 1-5 en la Figura 2 y tienen las siguientes secuencias de aminoácido:

SEQ ID NO: 1: **FAEDVG** (20-25 de la molécula A β ₁₋₄₂, que corresponde a 616-621 en PPA)

SEQ ID NO: 2: **AEDVGSNKGAI** (21-31 de la molécula A β ₁₋₄₂, que corresponde a la secuencia 617-627 de la PPA)

30 SEQ ID NO: 3: **GSNKGAIIGLM** (25-35 de la molécula A β ₁₋₄₂, que corresponde a 621-631 en PPA)

SEQ ID NO: 4: **GSNKGAI** (25-32 de la molécula A β ₁₋₄₂, que corresponde a la secuencia 621-627 en PPA)

SEQ ID NO: 5: **VGSNKGAIGL** (24-34 de la molécula A β ₁₋₄₂, que corresponde a el tramo 620-630 en PPA)

35 Todos los fragmentos están localizados dentro de la región de transmembrana de la molécula A β ₁₋₄₂. Aunque la presente invención no está limitada a ningún mecanismo en particular, ni es necesario comprender el mecanismo para poner en práctica la presente invención, se contempla que es probable que se generen mediante enzimas de segmentación de A β como la enzima degradante de la insulina (EDI) y neprilisina (Malito y col. (2008) Cell Mol Life Sci, 65:2574-2585).

Ejemplo 2

40 **Síntesis de Antígenos**

Sobre la base del experimento descrito en el Ejemplo 1, se seleccionaron los siguientes péptidos para un posterior estudio y se produjeron por Eurogentec, (MedProbe Noruega):

Antígeno 1 (SEQ ID NO: 2): H₂N - AED VGS NKG AI - CONH₂

Antígeno 2 (SEQ ID NO: 3): H₂N - GSN KGA IIG LM - CONH₂

45 Antígeno 3: (SEQ ID NO: 5): H₂N - VGS NKG AIG L- CONH₂

Ejemplo 3

Inmunización de ratones para obtener respuesta a los péptidos sintéticos. Establecimiento de clones que producen anticuerpos monoclonales contra metabolitos de A β ₁₋₄₂ específicos de Alzheimer desde dentro de lisosomas de monocitos

50 Animales: 6 ratones hembra BALB/c, 10 ratones NMRI

Se inmunizó a los ratones BALB/c 27/12-10 siguiendo la pauta que se registra en la Tabla 1. Se realizó una segunda inmunización (refuerzo), 31/1-11, con la misma pauta aplicada sin adyuvantes y se inyectó el péptido i.p. e i.v. Se extrajo sangre de los ratones y se analizó en Diatec Monoclonals AS para determinar la presencia de anticuerpos

específicos. Los macrófagos de ratones NMRI sirvieron como células nutrientes para la producción de anticuerpos *in vitro*. La exploración de las muestras de sangre de los ratones n. 1-6 contra la mezcla de antígenos con y sin KLH tuvo como resultado hits de los ratones n. **1,4 y 5**, así como hits negativos del ratón n. **6**. La sangre del ratón n. 2 fue negativa mientras que la sangre del ratón n. 3 fue fuertemente positiva para la mezcla de péptidos que incluía KLH, lo que indica una respuesta inmune contra KLH en lugar de los péptidos. Se extrajeron los bazos de los tres ratones positivos + el ratón de control en la semana 7 de 2011, concluyendo así el trabajo con animales sin un tercer refuerzo de inmunización.

Tabla 1

N ratón	Péptido	Adyuvante
1	Ag1 200 µl IP	Adyuvante completo de Freund 200 µl IP (1:1 emulsión con péptido)
2	Ag2 200 µl IP	
3	Ag1 66,7 µl IP	
4	Ag2 66,7 µl IP	
5	Ag3 66,7 µl IP	
6	PBS 200 µl IP	

Se disgregaron los bazos de los ratones que incluyeron anticuerpos contra los péptidos y se incubaron las células con células nutrientes de ratones NMRI para expansión clonal. Tras ELISA y una segunda reclonación de clones seleccionados que presentaban buena especificidad contra el clon antígeno 6D3/1/15 (ratón 5), 2A3/1/13 (ratón 1) y 3B7/1/16 (ratón 5) dieron buenos resultados. Los tres clones dieron una respuesta específica contra **Antígeno 1** y fueron incluidos en el banco de células y el banco de células maestras (MCB). Se realizó una producción de ensayo de una ampolla (el MCB) de cada clon. Concentración: 1mg/ml, 0,09% azida. 3B7/2/6 (6,7 ml), 2A3/2/15 (12,2 ml), 6D3/2/22 (28 ml). Entregado 29.06.2011. IgG de ratón isotipo.

Ejemplo 4

Medida de la presencia de antígeno en una muestra biológica utilizando células de leucemia monocítica aguda THP-1 (colección de cultivos tipo de Estados Unidos (ATCC)).

En la Figura 6 se proporciona una descripción esquemática de un ensayo inmune-PCR utilizando los anticuerpos descritos en el Ejemplo 3. El anticuerpo de captura es uno de los tres anticuerpos desarrollados por inmunización. Los otros dos anticuerpos se conjugarán directamente con una marca ADN específica que se amplifica por PCR en tiempo real.

Para el ensayo, se cultivan células THP-2 en 2 botellas con medio RPMI que contiene 10 % FBS y 1 % de antibiótico. Las células se diferencian utilizando una concentración final de 100 nM TPA durante 17 h. Se añade a una botella A β_{1-42} sintético hasta una concentración final de 2,5 ng/ μ l, el otro se mantiene sin tratar. Se incuban las células durante toda la noche a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. A continuación, se lavan las células y se tripsinizan (Trypsin-Versene (EDTA) de Lonza) para liberar las células unidas de la superficie del fondo.

Citometría de flujo de células THP-1. Se hace un recuento de las células y se someten cuatro tubos con un contenido de 100.000 células cada uno a fijación y permeabilización utilizando un equipo IntraPrep de Beckman Coulter, Inc. Estados Unidos para permitir el manchado de dianas intracelulares. Se manchan dos tubos (un tubo que ha recibido A β y otro sin tratar) con dos anticuerpos monoclonales con A β_{1-42} disponibles en el mercado (6E10 y 4G8 originados en ratones) y se manchan dos tubos (un tubo que ha recibido A β y un tubo sin tratar) con anticuerpos de control de isotipo apropiado (IgG1 e IgG2b de ratón). Todos estos anticuerpos se obtienen de Nordic BioSite AS, Noruega. Se utiliza el anticuerpo secundario anti ratón de cabra AlexaFluor488 (Invitrogen Dynal AS, Noruega) para detectar tanto los anticuerpos específicos de A β como los controles isotipos. Se mantienen las células en una solución fijadora IOTest3 (Beckman Coulter, INC, Estados Unidos) a 4 °C durante toda la noche antes de realizar el análisis de citometría de flujo en un FACS Cantoll de BD. Finalmente se adquieren las células y se seleccionan sobre la base de sus propiedades de dispersión y fluorescencia. Los monocitos/macrófagos positivos para AlexaFluor488, es decir con una señal fluorescente mayor que los controles isotipo, se consideran A β -positivos. Se realiza el análisis utilizando un software FACS Diva (BD).

Preparación de muestras para inmuno-PCR. Se centrifuga el resto de las células (Aprox. 319 000 células que reciben A β_{1-42} y aprox. 560 000 células sin tratar), a 1000 g durante 10 minutos. Se separa el sobrenadante y se añaden 40 µl de agente de lisado, M-PER® (reactivo de extracción de proteína de mamífero de Pierce), se añade 1 % de cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma Life Sciences) al aglomerado de células.

Se incuban los lisados en una mezcladora durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se mantienen las muestras congeladas hasta el análisis.

Se biotinila el anticuerpo de detección 3B7/2/6 internamente (kit de conjugación de biotina Lightning-Link tipo A (Innova Biosciences)) para su unión a un conjugado de detección anti-iotina.

5 Se realiza el desarrollo de inmuno-PCR utilizando el kit de desarrollo de ensayo Imperacer® (Chimera Biotec, Alemania).

10 Ensayo de pre-preparación – Inmovilización de anticuerpo de captura. Se diluye anticuerpo 6D3/2/22 en tampón de revestimiento (concentración final 10 µmg/ml). Se añaden 30 µl de anticuerpo diluido a cada uno de los pocillos. Se sellan los pocillos con papel metalizado y se incuban durante al menos 16 horas a 4 °C. Se lavan los pocillos y se añade bloque directo de quimera (240 µl/pocillo) durante 30-60 segundos a temperatura ambiente con agitación orbital. Se añaden 30 µl de cuatro diluciones utilizando el antígeno 1 sintetizado a cada pocillo (0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, y 10 ng/ml) como patrones. Se añaden 30 µl del lisado de células tratadas con Aβ y células sin tratar a cada pocillo. Se incuban las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente durante la agitación orbital.

15 Después de la incubación del analito, se añaden 30 µl de anticuerpo de detección primario biotinilado (anticuerpo 3B7/2/6, concentración final 1 µg/ml) a la muestra para acoplarlo al analito inmovilizado. Se incuban las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital.

Después de la incubación con anticuerpo de detección primario, se añaden 30 µl/pocillo de conjugado Imperacer® CHI-biotina (1:3000) a las muestras. Se incuban las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital.

20 Se lavan las muestras y se añaden 35 µl de mezcla maestra de PCR. A continuación, se incuban los pocillos a 95 °C durante 5 minutos. Después de la incubación, se transfieren 30 µl de las muestras a la placa de reacción (placa de reacción de 96 pocillos Micro Amp Fast Optical (Applied Biosystems)). Además de los patrones y las muestras, se incluye un control de PCR positivo y negativo en la placa de reacción.

25 **PCR en tiempo real.** Se lleva a cabo la PCR utilizando un sistema de PCR en tiempo real 7900HT Fast (Applied Biosystems). Se establece FAM como fluoróforo (emisión a 518 nm).

Tabla 2. Programa de PCR en tiempo real:

Tiempo	Temperatura	Repeticiones
4 minutos	95 °C	1x
12 segundos	95 °C	50x
30 segundos	50 °C	
30 segundos	72 °C	

En la figura 7, la Figura 8 y la Tabla 3 se dan los resultados.

Tabla 3.

Muestra	Valor Ct
0 ng/ml	33,497
0,1 ng/ml	33,216
1 ng/ml	30,347
10 ng/ml	26,734
lisado celular de células THP-1 que recibieron Aβ	29,65
lisado celular de THP-1 sin tratar	30,332

30 El valor Ct representa el primer ciclo de PCR en el que la señal indicadora excede la señal de un “umbral” uniforme dado.

Conclusión.

El valor Ct para la muestra que recibió Aβ adicional es inferior que el de la muestra sin tratar. La concentración para esta muestra es 4, 91 ng/ml cuando se aplica la ecuación para una curva normal. La concentración para la muestra sin tratar es 3, 79 ng/ml. Esto indica una mayor presencia de antígeno 1 en el lisado celular que recibió Aβ y

demuestra que es posible medir los productos de degradación de A β en muestras biológicas con este procedimiento.

Ejemplo 5

Medida de la presencia de antígeno en monocitos/macrófagos de paciente con EA (F, edad 62 años) y control de persona sana (cónyuge) (M, edad 60 años).

- 5 Se extrajo sangre heparinizada (8 ml) por venipuntura. Se aislaron de la muestra de sangre, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con Histopaque®1077 de Sigma-Aldrich Corporation, Estados Unidos, es decir, los granulocitos y los glóbulos rojos se excluyen de las siguientes etapas. Se aíslan monocitos/macrófagos de otras células por citometría de flujo. Se analizan las células en un FACS Aria de BD. Se adquieren las células y se seleccionan sobre la base de sus propiedades de dispersión directa (tamaño) y dispersión lateral (granularidad). Se separa la población de monocitos/macrófagos en tubos dedicados (paciente y control).

Citometría de flujo de monocitos/macrófagos de paciente y control

- 15 Manchado intracelular de macrófagos/monocitos de paciente y control utilizando anticuerpos monoclonales disponibles en el comercio contra A β ₁₋₄₂. Se sometió todas las células a fijación y permeabilización empleando el kit IntraPrep de Beckman Coulter, Inc, EE.UU. para permitir el manchado de dianas intracelulares. Un tubo (100.000 PBMC) tanto del paciente como el control se mancha con dos anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado contra A β 42 (6E10 y 4G8 originados de ratones) y un tubo tanto del paciente como del control se mancha con anticuerpos de control de isotipo apropiado (IgG1 e IgG2b de ratón). Todos estos anticuerpos se obtienen de Nordic BioSite AS, Noruega. Se utiliza el anticuerpo secundario anti-ratón de cabra AlexaFluor488 (Invitrogen Dynal AS, Noruega) para detectar tanto los anticuerpos específicos de A β como los controles de isotipo. Se mantienen las células en solución fijadora IOTest3 (Beckman Coulter, INC, Estados Unidos) a 4°C durante hasta 5 días antes del análisis de citometría de flujo en un FACS Cantoll de BD. Los monocitos/macrófagos positivos para AlexaFluor488, es decir con una señal fluorescente mayor que los controles de isotipo, se consideran A β -positivos. Se realiza el análisis utilizando software FACS Diva (BD).

Preparación de células para inmuno-PCR

- 25 Se centrifugan monocitos/macrófagos (440 000 células) a 1200 g durante 10 min. Se retira el sobrenadante y se añaden 50 μ l de agente de lisado, M-PER® (reactivo de extracción de proteína de mamífero de Pierce) se añade 1 % de cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma Life Sciences) al aglomerado celular.

Se incuban los lisados en una mezcladora durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se mantienen las muestras congeladas hasta el análisis.

30 Inmuno-PCR.

Se lleva a cabo la Inmuno-PCR tal como se ha descrito antes. Se añaden 30 μ l de cuatro diluciones utilizando el antígeno sintetizado 1 a cada pocillo (0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,5 ng/ml, y 1,0 ng/ml) como patrones.

Resultados del ejemplo 5

En la Figura 10 se dan los resultados del análisis de citometría de flujo (histogramas 10a y 10b).

35 PCR en tiempo real

En la Tabla 4 y la Figura 11 se dan los resultados.

Tabla 4

Muestra	Valor Ct
0 ng/ml	38,005
0,1 ng/ml	36,419
0,5 ng/ml	34,708
1 ng/ml	33,736
Paciente	36,415
Control	35,71

- 40 El valor Ct representa el primer ciclo de PCR en el que la señal indicadora excede la señal de un “umbral” uniforme dado.

Conclusión: El valor Ct para el control es más bajo que para el paciente. La concentración para el control es 0, 40 ng/ml cuando se aplica la ecuación para la curva patrón. La concentración para el paciente es 0, 22 ng/m, lo que demuestra una mayor cantidad de antígeno 1 en células de control en comparación con el paciente. Aunque tanto el paciente como el control parecen tener una cantidad próxima o igual de A β ₁₋₄₂ intracelular según la citometría de flujo, este resultado de PCR en tiempo real indica que este procedimiento de puede utilizar para medir productos de degradación específicos en muestras biológicas diferenciando pacientes de controles.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Akershus universitetssykehus Fladby, Tormod Johnsen, Lisbeth Mollergard, Hanne Mali

<120> Procedimientos y composiciones para monitorizar actividad fagocítica

<130> INVEN-31699/WO-1/ORD

15 <150> US 61/417.559

<151> 29-11-2010

<160> 6

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Phe Ala Glu Asp Val Gly
1 5

30 <210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 2

Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
1 5 10

40 <210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 3

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met
1 5 10

50 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 4

ES 2 628 596 T3

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
1 5

5
<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Gly Leu
1 5 10

10

15
<210> 6
<211> 42
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico, monitorización y/o evaluación del riesgo de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 5 a) proporcionar una muestra obtenida de un paciente, comprendiendo dicha muestra un tipo de célula seleccionado del grupo que consiste en leucocitos, monocitos, macrófagos y macrófagos activados; y
 - b) detectar el nivel del péptido que tiene al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO: 2 en dicha muestra, en el que una disminución en el nivel de dicho péptido en relación con el nivel del control es indicativa de la presencia o gravedad de dicha enfermedad neurodegenerativa en dicho paciente.
- 10 2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy.
3. Procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de tejido y una muestra de fluido cerebroespinal.
4. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho tipo de célula es un macrófago.
- 15 5. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho nivel de control se selecciona del grupo que consiste en el nivel en dicho paciente en un momento diferente, el nivel en un paciente diferente que no presenta dicha enfermedad neurodegenerativa y el nivel promedio en una pluralidad de pacientes que no presentan dicha enfermedad neurodegenerativa.
- 20 6. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además el aislamiento de dicho tipo de célula seleccionado del grupo que consiste en leucocitos, monocitos, macrófagos y macrófagos activados.
7. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la incubación de dichas células aisladas con el polipéptido sintético A β ₄₂.
8. Uso de una inmunoglobulina que se une a un péptido que tiene al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO: 2 en un procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Uso de una inmunoglobulina de la reivindicación 8, estando la inmunoglobulina marcada o haptenilada.
- 25 10. Uso de un kit que comprende uno o más de un primer anticuerpo capaz de unirse específicamente a un péptido que tiene al menos un 80% de identidad con SEQ ID NO: 2 en un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Uso de un sistema que comprende dos inmunoglobulinas que se unen a un péptido que tiene al menos 80 % de identidad con SEQ ID NO: 2 en un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 12. Uso de un sistema de la reivindicación 11, en el que al menos una de dichas inmunoglobulinas está preferentemente haptenilada o marcada.
13. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, teniendo el péptido al menos 85 %, preferentemente 90 %, más preferentemente 95 % de identidad con SEQ ID NO: 2.
- 35 14. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, consistiendo el péptido en SEQ ID NO: 2.

Figura 1

FriTT_Direkte1 Abeta.fcs... Leucocitos

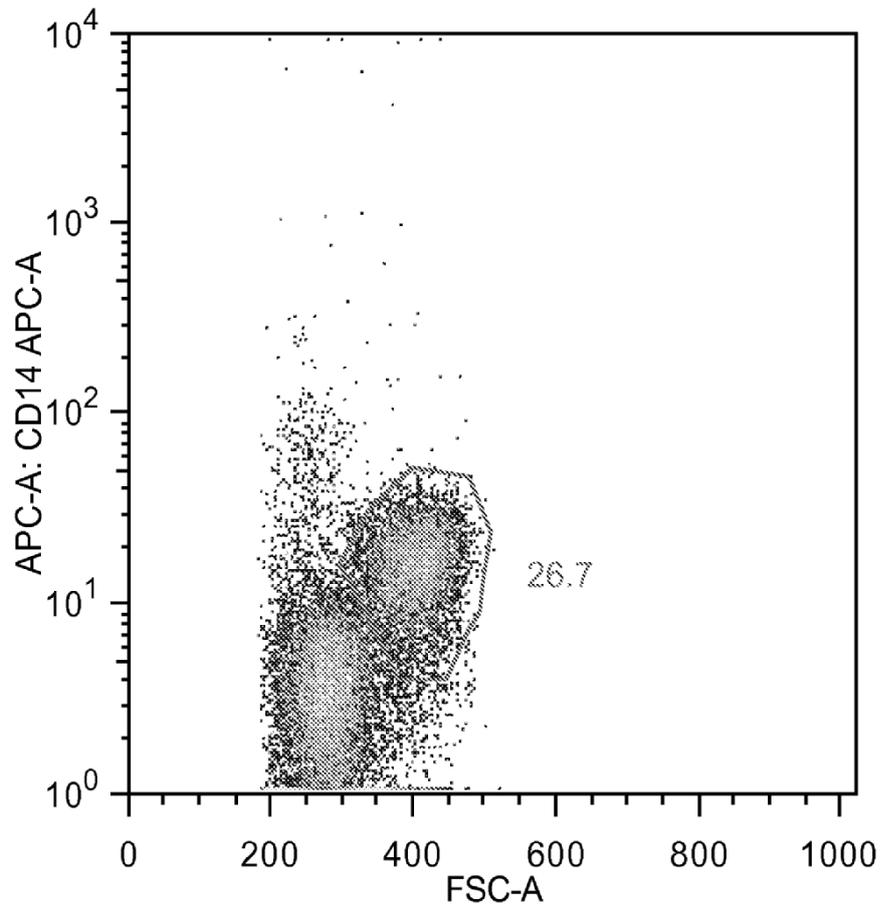


Figura 2

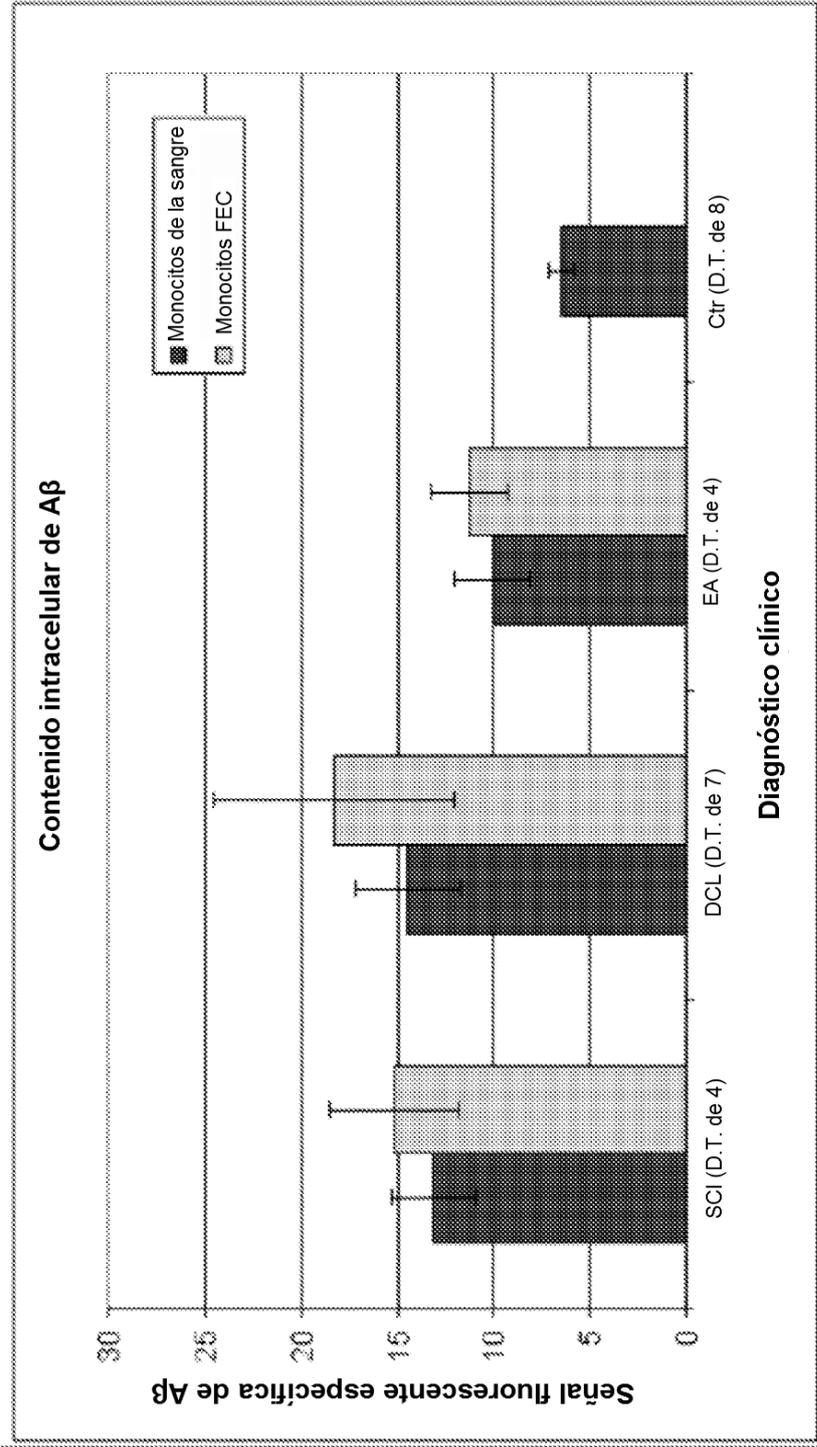


FIGURA 3

Resultado típico de un ensayo de fagocitosis *in vitro*: Curva de respuesta a dosis y microscopía que muestra fagocitosis de A β

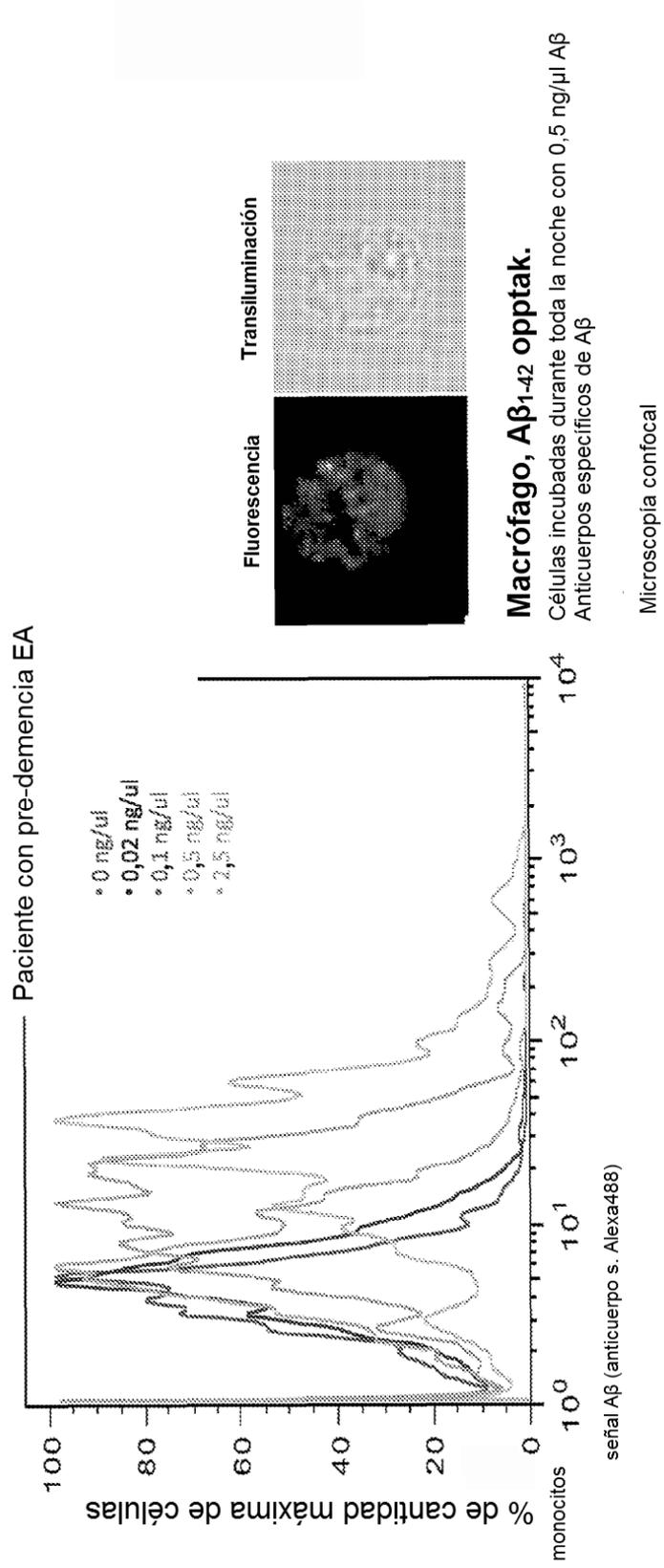


FIGURA 5

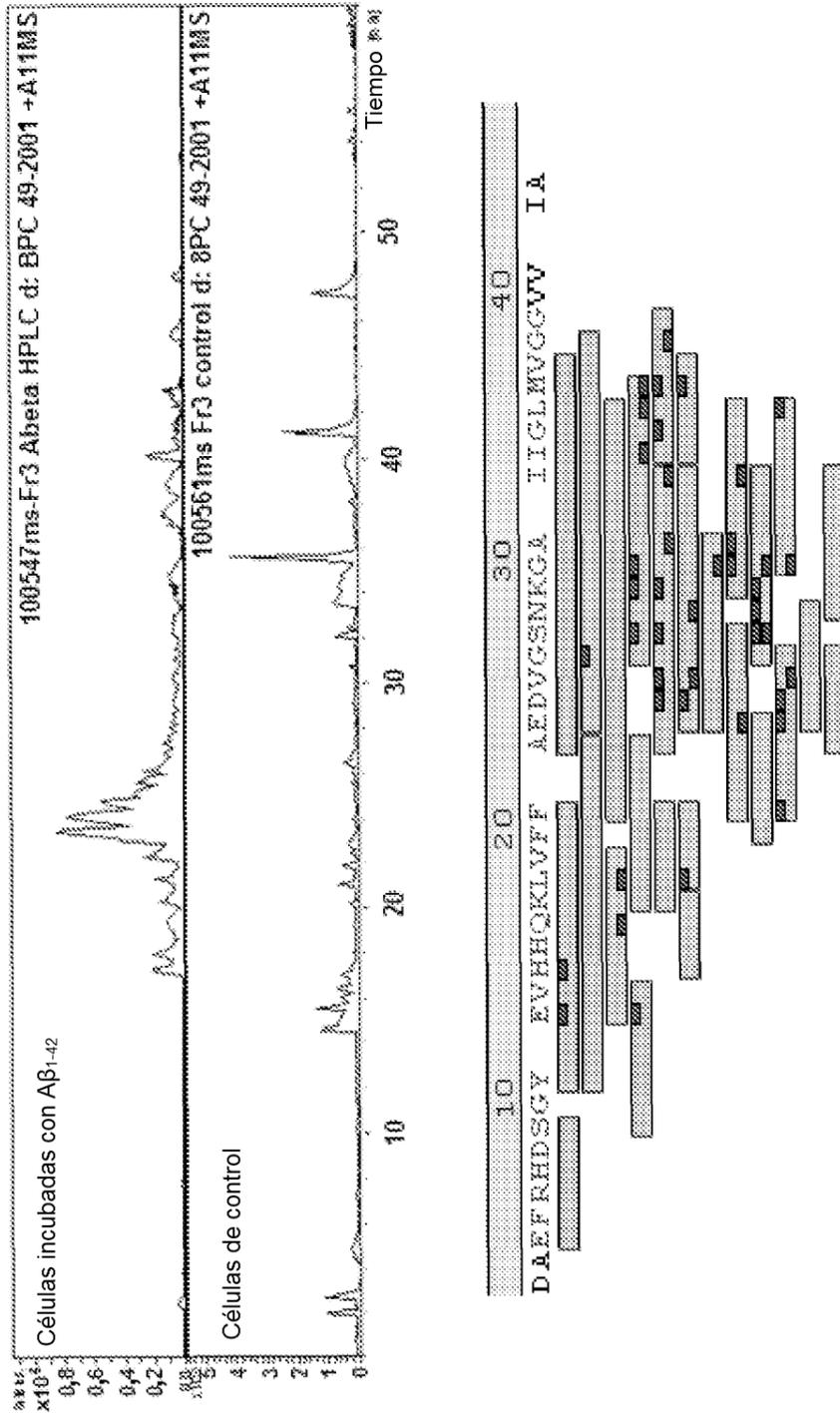


Figura 6

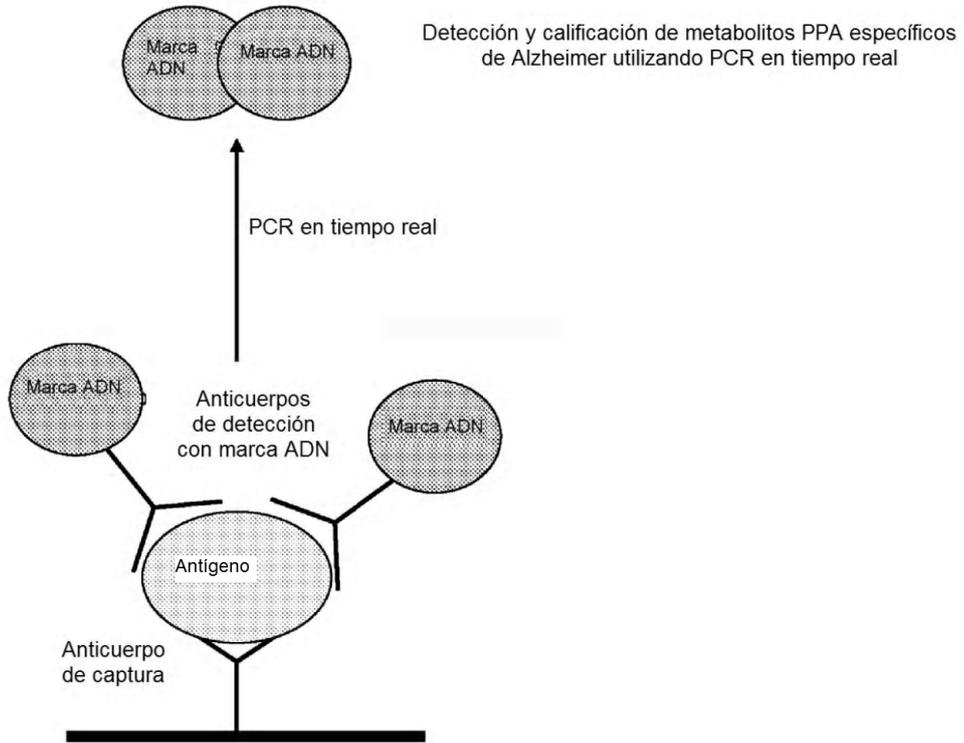


Figura 7

8/5/2011 14:28:24 19130

Inmuno-PCR1111111.sda

Usuario:administrador

Gráfico de amplificación

Gráfico de amplificación

Gráfico de amplificación

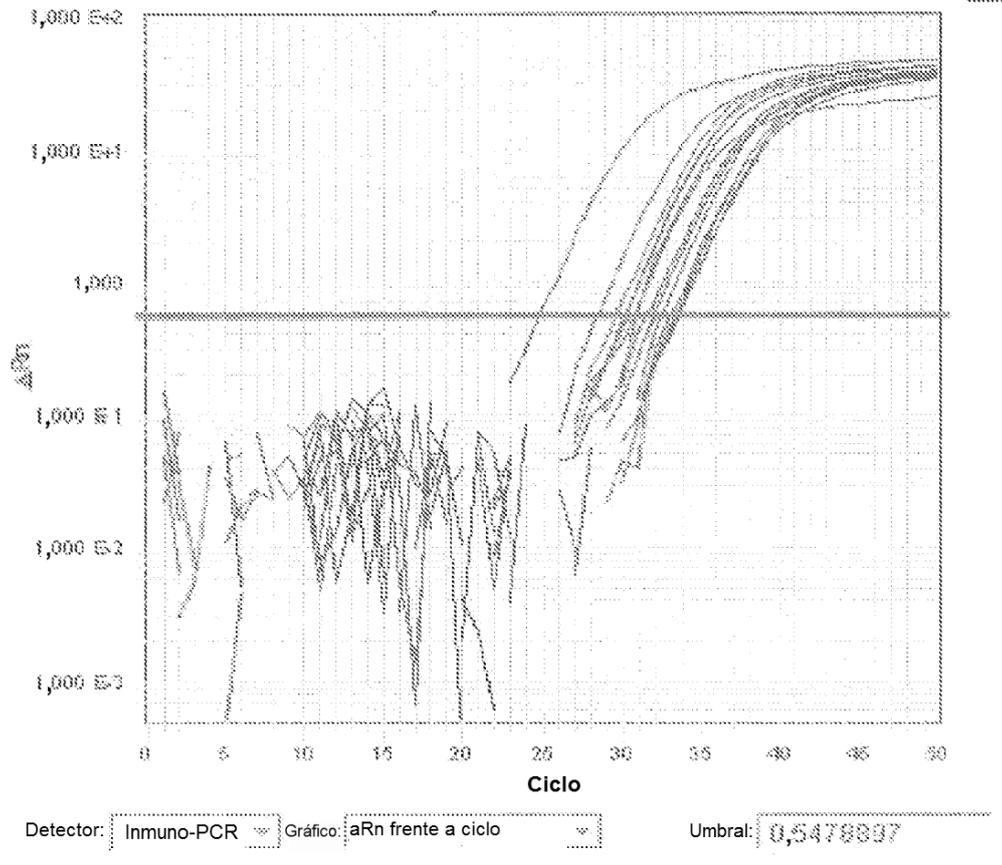
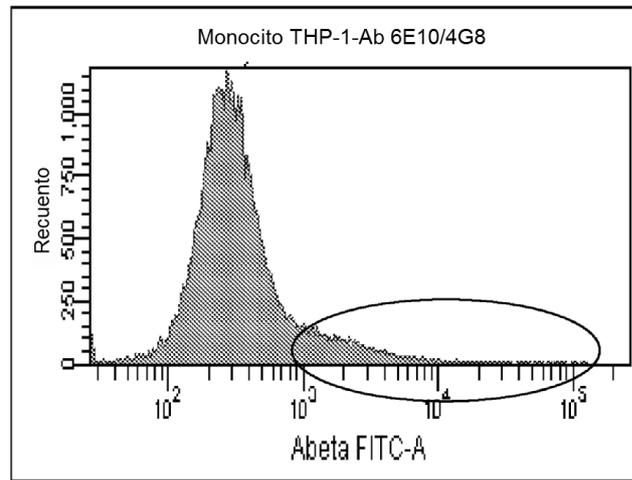
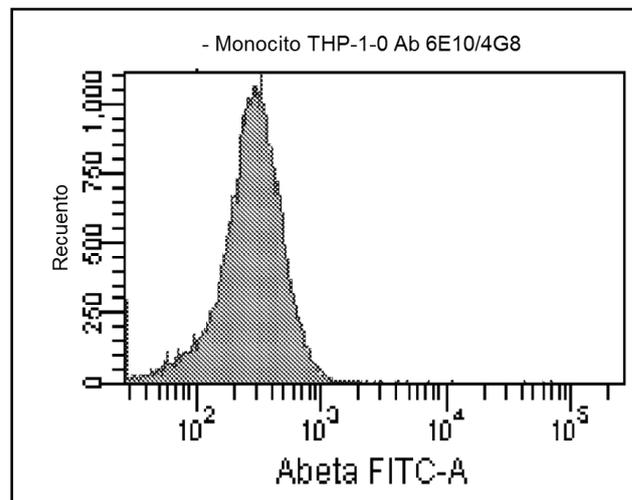


Figura 8



8a



8b

Figura 9

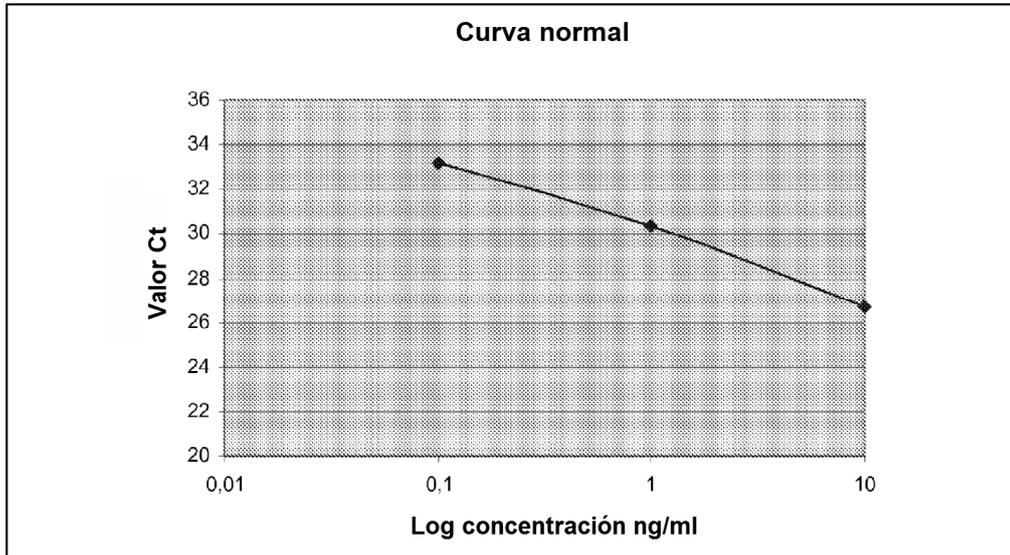


Figura 10

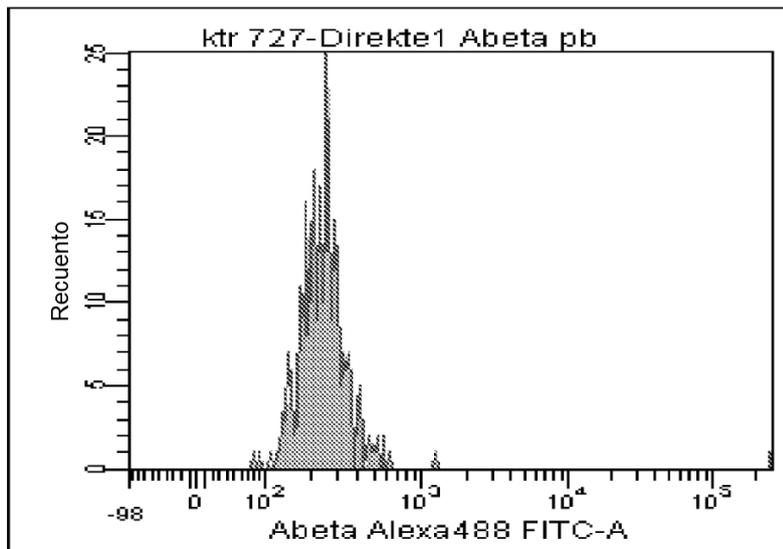
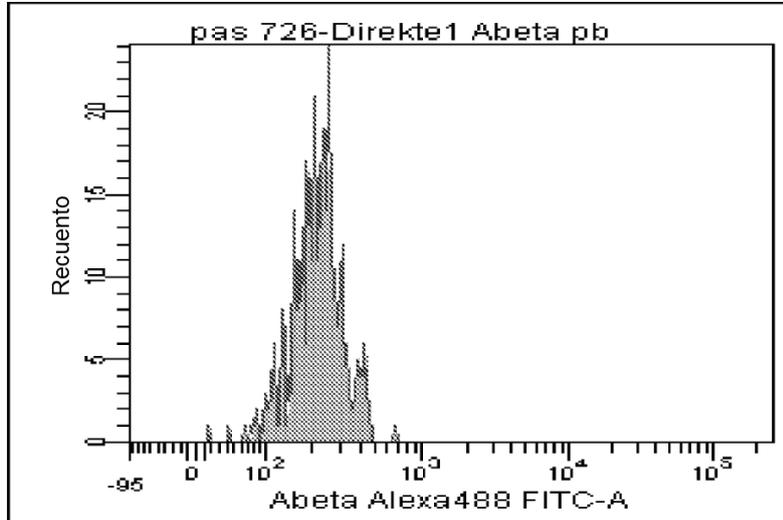


Figura 11

