

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 414**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2015** E 15195662 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** EP 3171174

54 Título: **Uso de la lactoferrina en el diagnóstico o el pronóstico de la enfermedad de Alzheimer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

73 Titular/es:

GEROA DIAGNOSTICS, S.L (100.0%)
Edificio CEIA c/ Albert Einstein 15
01510 - Minano Mayor - Alava, ES

72 Inventor/es:

CARRO DÍAZ, EVA MARÍA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 657 414 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

Uso de la lactoferrina en el diagnóstico o el pronóstico de la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

5 La presente invención tiene su aplicación en la ciencia médica, particularmente en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) representa la mayoría de los casos de demencia. La enfermedad demora décadas en desarrollarse por completo y comparte muchos efectos pre-sintomáticos con otras demencias degenerativas cuyo primer cuadro clínico es el deterioro cognitivo leve (DCL). Los primeros síntomas de la EA suelen atribuirse erróneamente al envejecimiento o el estrés.

15 Actualmente, la enfermedad de Alzheimer se diagnostica en función del historial médico de la persona y sus parientes y las observaciones de su comportamiento. Mediante estudios neuropsicológicos detallados, pueden determinarse dificultades cognitivas leves varios años antes de que una persona cumpla los criterios clínicos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Los problemas sutiles en las funciones ejecutivas de atención, planificación, flexibilidad y pensamiento abstracto o los impedimentos en la memoria semántica también pueden ser sintomáticos. La evaluación del funcionamiento intelectual, incluyendo el análisis de la memoria, puede ser otro medio para determinar el estado de la enfermedad.

20 Todos los esfuerzos de los médicos para generar criterios de diagnóstico que permitan facilitar y estandarizar el proceso de diagnóstico se han basado en estos parámetros. En la actualidad, para obtener un diagnóstico definitivo de la EA, es necesaria una confirmación histopatológica, que abarca el examen microscópico del tejido cerebral.

25 La definición y el diagnóstico actuales de la EA son clínicos. En la mayoría de los casos, el diagnóstico clínico se realiza sin marcadores biológicos. Solamente los casos monogénicos de EA familiar tienen marcadores genéticos propios, y éstos representan menos de 2% de todos los casos de la enfermedad. El descubrimiento de Kane de que el alelo ApoE4 es un factor de riesgo para la demencia tipo Alzheimer, que incrementa la propensión a contraerla e influye en la edad de inicio, ha tenido una importancia más científica que clínica y ha sido asociado a un poder de diagnóstico pobre (Kane, R. A., Kane, R. L., Effect of genetic testing for risk of Alzheimer's disease, N. Engl. J. Med., 2009, 361(3), 298-299).

30 Los biomarcadores candidatos más importantes para la EA abarcan estudios de imágenes cerebrales como resonancias magnéticas o tomografías por emisión de positrones y análisis de proteínas como los péptidos beta-amiloides o tau en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El énfasis en la investigación de la EA se ha centrado en el diagnóstico de la afección antes del inicio de los síntomas. Se han empleado y desarrollado numerosos biomarcadores y estudios bioquímicos para permitir la detección temprana de la enfermedad de Alzheimer.

35 Algunos de los inconvenientes más importantes del uso de estudios basados en proteínas abarcan los costos elevados, la necesidad de procedimientos invasivos y las complicaciones derivadas de la interpretación de los resultados, que imposibilitan un uso prolongado. Por ejemplo, el estudio de neuroimágenes de la carga de péptidos amiloides en la corteza, los cambios volumétricos en el cerebro o la concentración de las proteínas en el LCR son herramientas de diagnóstico que no están ampliamente disponibles.

40 En función del nivel de las proteínas de los autolisosomas en la sangre, también pueden diferenciarse los controles de la población enferma entre 1 y 10 años antes del diagnóstico (Goetzl et al., Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer's disease, Neurology, 7 de Julio de 2015, 85(1):40-7). En otro estudio reciente, se han convalidado algunos biomarcadores plasmáticos descritos con anterioridad para predecir la conversión en demencia desde etapas prodómicas (Hye et al., Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease, Alzheimer & Dementia, 2014, 10, 799-807). Sin embargo, todos estos estudios se han centrado en un conjunto o un panel de biomarcadores, que abarcan proteínas, lípidos u otros metabolitos. En general, los biomarcadores abarcan moléculas beta-amiloides y derivadas de tau. Estos biomarcadores potenciales se presentan como indicadores de una enfermedad ya iniciada, lo que elimina la posibilidad de una detección temprana o un pronóstico real. En este contexto, la presente invención se corresponde bien con el consenso científico de la necesidad de un diagnóstico en la etapa de pre-demencia de la EA.

50 Recientemente, se han publicado diversos trabajos donde se describen alteraciones moleculares o bioquímicas detectables antes de la aparición de los síntomas de demencia tempranos, por ejemplo, una disminución en el nivel de los fosfolípidos en el plasma (Mapstone et al., Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in

older adults, *Nat. Med.*, 2014, 20(4):415-420). En este estudio, fue posible predecir el DCL o la EA en un período de 2-3 años usando un panel de diez lípidos en la sangre periférica. La limitación del tiempo es significativa.

El esfuerzo reciente de Dubois para establecer un diagnóstico de la pre-demencia de la EA en función de criterios clínicos estrictos, análisis de neuroimágenes y resultados biológicos, principalmente en el LCR, es de interés en la búsqueda de fenotipos clínicos mejor definidos para integrar los biomarcadores en el proceso de diagnóstico y desarrollar terapias preventivas o modificadoras de la enfermedad (Dubois et al., *Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease*, *Lancet Neurol.*, Junio de 2014, 13(6):614-29). Sin embargo, los biomarcadores actuales, tales como la determinación del nivel en el LCR o los análisis estructurales y funcionales de imágenes de resonancia magnética, no son satisfactorios debido a que son invasivos, lentos o costosos.

En la solicitud US 20140602046 A1 se describe un tratamiento para la EA que abarca la administración de un anticuerpo específico contra péptidos derivados de la proteína tau. El documento está relacionado con el progreso lento de la enfermedad y su prevención en un sujeto asintomático. Se recomienda la administración profiláctica a toda la población de más de 10 años. Según se ha indicado, es muy probable que los isómeros de tau que se desea detectar sean producidos en el cuerpo una vez que se haya desarrollado la enfermedad, por lo cual se descarta el pronóstico.

En US 20110236917 A1 se describe un método para diagnosticar la EA en un sujeto, que abarca la detección de un panel de cuarenta y siete (47) proteínas biomarcadoras en una muestra de suero del sujeto. Se mencionan las transferrinas I y II entre los marcadores del panel. Un primer inconveniente de este abordaje es la necesidad de una muestra de suero, para cuya extracción es necesario un profesional. Además, no se indica que ninguna proteína particular del conjunto sea útil para proveer información más precisa. En función del contenido de este documento, aquellos versados en la técnica no podrían haber inferido que ninguna de estas proteínas pudiera haber sido relevante por sí sola para el diagnóstico de la EA en un sujeto. De hecho, todavía no se ha identificado un biomarcador individual que sea ideal para la predicción o la detección temprana de la EA.

En diversas líneas de investigación, se ha sugerido una correlación posible entre la inflamación en el cerebro y la salud oral. Recientemente, se ha incrementado la cantidad de publicaciones relacionadas con la proteómica salival donde se propone la saliva humana como fluido biológico para el diagnóstico. La saliva tiene numerosas ventajas: invasividad baja, costo mínimo y recolección y procesamiento sencillos. Se ha informado la presencia de proteínas A y tau en la saliva humana, por lo cual ésta podría ser útil como biomarcador potencial para la EA (Shi et al., *Salivary tau species are potential biomarkers of Alzheimer's disease*, *J. Alzheimer's Dis.*, 2011, 27(2):299-305). Se han descrito otras proteínas en muestras salivales, incluyendo proteínas asociadas a las respuestas inflamatorias y la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Ciregia et al., *A multidisciplinary approach to study a couple of monozygotic twins discordant for the chronic fatigue syndrome: a focus on potential salivary biomarkers*, *J. Transl. Med.*, 2 de Octubre de 2013, 11:243).

En este contexto, en WO 2013/153461 A2 se describe el diagnóstico de la EA en función de la presencia de dos biomarcadores seleccionados entre un conjunto de moléculas presentes en la saliva. Una vez más, las proteínas mencionadas son más bien indicativas de una enfermedad ya iniciada, por lo cual los resultados obtenidos no pueden usarse para el pronóstico de la enfermedad.

La lactoferrina es una glicoproteína de unión al hierro de la familia de las transferrinas que ha sido usada ampliamente en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias. La molécula suprime la producción de citoquinas inflamatorias y modula el estrés oxidativo. También está asociada a la protección del tejido cerebral del daño oxidativo en otras enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson (EP), y ha sido detectada en los haces neurofibrilares de proteínas tau y en las placas amiloides beta (A β) seniles, que son las características histopatológicas principales de la EA junto con la muerte neuronal (Wang et al., *Deposition of lactoferrin in fibrillar-type senile plaques in the brains of transgenic mouse models of Alzheimer's disease*, *Neurosci. Lett.*, 2010, 481:164-7). La proteína es un componente de las secreciones humanas sintetizadas por las glándulas exocrinas y los neutrófilos en los sitios de infección/inflamación. Entre las proteínas salivales, es el factor más importante de la inmunidad natural, y en la saliva constituye un factor importante en la defensa contra las lesiones bacterianas.

Welling describe algunos péptidos antimicrobianos (AMP) que pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Welling, M., et al., *Potential role of antimicrobial peptides in the early onset of Alzheimer's disease*, *Alzheimer & Dementia*, 11, p. 51-57, 2015). En esta publicación, se destaca la capacidad de la lactoferrina de atravesar la BHE cuando se la administra en un paciente, así como el hecho de que su nivel se incrementa durante procesos infecciosos. Además, propone el uso de estos AMP en la detección de infecciones cerebrales in vivo. Sin embargo, cualquier relación que pueda establecerse entre la detección del incremento de su nivel en un proceso infeccioso y un uso eficaz en el diagnóstico de EA es especulativa.

Sin embargo, en US 2003/0096736 A1 se ha indicado que la lactoferrina es útil en el tratamiento de diversas enfermedades, que abarcan enfermedades neurodegenerativas, particularmente la EA. No se establece ninguna

relación ni se proveen sugerencias sobre el uso de la molécula en el diagnóstico o la predicción de cualquier otra enfermedad neurodegenerativa, particularmente la EA.

En la técnica no se ha mencionado el uso de la lactoferrina en el diagnóstico ni el pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.

5 WO 2009074331 A3 es el antecedente técnico más cercano a la presente invención. El objetivo de este documento es describir un método para el diagnóstico temprano de la EA, que abarca la detección del producto proteico de diversos genes en una muestra biológica de un sujeto. Entre estos biomarcadores, se encuentran los productos del gen de la transferrina (TF) y los de otros genes, por ejemplo, IGF-1R o HISTH3E. No hay ninguna relación biológica entre los genes propuestos, y todos presentan valores predictivos similares en el método. En particular, no se destaca el uso de los productos de los genes de la TF o la lactoferrina. El alcance resultante de la aplicación en términos de productos genéticos es inviable y representa una cantidad excesiva de trabajo en el contexto del diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, se especifica que la muestra biológica comprende saliva, y los ejemplos se basan en el análisis de muestras de sangre. Se identifica el problema más importante de los métodos de diagnóstico de los antecedentes técnicos: solamente son útiles para detectar la enfermedad en un paciente que ya la padece, por lo que no puede establecerse un pronóstico ni puede concebirse una acción preventiva. Sin embargo, a pesar de las expectativas de los autores, vale destacar que el problema sigue sin resolverse. En las poblaciones de pacientes analizadas, los genes evaluados, HIST3H3E y CNR2, aparentemente fueron útiles para comprobar la presencia de la enfermedad, pero no para pronosticarla. Además, ninguno de estos genes está relacionado con la lactoferrina.

10
15
20 Por lo tanto, en la técnica subsiste la necesidad de un biomarcador individual que sea útil en el diagnóstico o el pronóstico de la enfermedad de Alzheimer. La solución propuesta por la presente invención es un método donde se detecta el nivel de la lactoferrina en una muestra de saliva o tejido mucoso de un sujeto.

Descripción de la invención

25 La presente invención está relacionada con el uso de la lactoferrina, o una molécula de ácido nucleico que la codifica, en el diagnóstico o el pronóstico de la EA en una muestra biológica seleccionada entre tejido mucoso, preferiblemente tejido mucoso oral, o saliva, obtenida de un sujeto.

Según se lo emplea en la presente, el término "diagnóstico" abarca un grado de evolución determinado de la enfermedad que puede evaluarse en los pacientes, independientemente del hecho de que se compruebe la presencia de la EA o un DCL en cualquiera de sus etapas.

30 Según se lo emplea en la presente, el término "pronóstico" hace referencia a la predicción de la EA cuando todavía no puede detectarse una fenoc conversión para producir síntomas en un sujeto saludable.

Se han determinado los valores de separación para una proteína lactoferrina identificada en un modelo de fenoc conversión. El valor predictivo para la fenoc conversión en DCL/EA fue inferior a 6,5 µg/ml. Esto implica que todos los sujetos con un diagnóstico de DCL o EA presentaron valores de lactoferrina en la saliva inferiores a 6,5 µg/ml, y que todos los sujetos saludables control presentaron valores de lactoferrina en la saliva superiores a 6,5 µg/ml.

35 En función de lo anterior, otro aspecto de la invención es un método para diagnosticar la EA en un sujeto, que comprende evaluar el nivel de la lactoferrina en una muestra de saliva obtenida del sujeto y determinar si este nivel supera o no un valor de 6,5 µg/ml, donde un valor inferior a 6,5 µg/ml es indicativo de la EA. Si el nivel de la lactoferrina es inferior a 6,5 µg/ml y el sujeto presenta una fenoc conversión en una enfermedad neurológica, el método es indicativo de la EA.

40 Otro aspecto preferido de la invención es un método para pronosticar la EA en un sujeto, que comprende evaluar el nivel de la lactoferrina en una muestra de saliva obtenida del sujeto y determinar si este nivel supera o no un valor de 6,5 µg/ml, donde un valor inferior a 6,5 µg/ml es indicativo del pronóstico de la EA. Si el nivel de la lactoferrina es inferior a 6,5 µg/ml y el sujeto no presenta una fenoc conversión en una enfermedad neurológica, el método es indicativo del pronóstico de la EA.

45 En este contexto, pueden hallarse niveles más bajos de lactoferrina en la saliva de pacientes humanos con DCL o EA que en la saliva de controles saludables de la misma edad, una indicación de que esta proteína podría participar en las primeras etapas de la EA. Se sugiere que la determinación de un nivel más bajo de lactoferrina en la saliva sería una indicación específica de la patología de la EA.

50 En la presente, la determinación de la presencia de lactoferrina en la saliva no abarca ningún paso invasivo ni quirúrgico que pueda representar un riesgo sustancial para la salud del sujeto, independientemente de si dicha determinación se realiza ex vivo o in vivo.

5 Se ha indicado que, mediante la determinación del nivel de la lactoferrina en la saliva, pueden distinguirse inequívocamente los sujetos cognitivamente normales que han de progresar en DCL o EA en 5 años de aquellos que han de permanecer cognitivamente normales en el futuro. En función del conocimiento disponible, este sería el primer biomarcador individual descripto útil para predecir la fenoc conversión en un período de 5 años con una precisión de 100%. Con la presente invención, también podría predecirse la fenoc conversión en DCL y/o EA desde un estado saludable en un período de 9 años.

Se realizó un análisis de regresión logística con una combinación del nivel de la lactoferrina en la saliva y la edad en el momento de la recolección de muestras de saliva de sujetos clasificados con precisión como grupos jóvenes o mayores (figura 5A), y dentro de los grupos etarios, fenoc convertidos en DCL/AD o no fenoc convertidos (figura 5B).

10 El momento de la fenoc conversión se determinó mediante un análisis de regresión lineal, con una correlación entre el agotamiento de la lactoferrina en la saliva y el inicio de la fenoc conversión. El nivel más bajo de la lactoferrina fue asociado a un riesgo mayor de fenoc conversión en este modelo (figura 6). El nivel de la lactoferrina en la saliva fue asociado a los cambios en el momento del inicio de la fenoc conversión.

Con el análisis de regresión, se generó la ecuación

15 $y = 0,5755x + 1,1539,$

que representa la relación entre el nivel de la lactoferrina en la saliva y el momento del inicio en años. En esta fórmula, "y" es el nivel de la lactoferrina en la saliva y "x" es el momento de la fenoc conversión en años. Al aplicarse esta ecuación en un caso hipotético, un sujeto con un nivel de la lactoferrina en la saliva inferior al valor de separación, por ejemplo, 6,45 µg/ml, puede concluirse que el marco de tiempo resultante para la fenoc conversión en DCL/AD es de más de 9 años.

Por ende, en otro aspecto preferido, el pronóstico puede realizarse en un período de hasta nueve años antes de que el sujeto experimente una fenoc conversión en AD, más preferiblemente hasta ocho años, siete años, seis años o cinco años.

En otro aspecto preferido de la invención, el sujeto es un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

25 Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en la saliva a partir de lágrimas y gránulos de mucosa oral, donde también se comprobó que el nivel de la lactoferrina en muestras periféricas no invasivas del cuerpo podría ser útil como herramienta para diagnosticar la EA. Es posible que la lactoferrina en la saliva represente una primera línea de defensa, incluso antes de que se detecten alteraciones cerebrales patológicas y/o clínicas, y que la disminución de su nivel en los sujetos con DCL sea útil como biomarcador temprano de la EA.

30 De hecho, también pudo detectarse una disminución similar en el nivel de la lactoferrina en saliva proveniente de mucosa oral en un estudio piloto con dos grupos: un control saludable y un grupo con EA, con proporciones de edades y sexos similares. El nivel de la lactoferrina en los pacientes con EA se redujo significativamente en comparación con los sujetos control saludables: $5,93 \pm 0,56$ µg/ml para la EA versus $9,05 \pm 1,47$ µg/ml para los controles. En el modelo de la invención, los grupos fueron clasificados como enfermos (DCL/AD) o saludables con un AUC de 0,89 y un intervalo de confianza (IC) de 95% de 0,93-0,98 (figura 4B). Sin embargo, estos resultados no pudieron ser reproducidos en muestras de sangre ni LCR.

En función de estos resultados, puede inferirse que cualquier glicoproteína de unión al hierro de la familia de la transferrina podría ser útil como marcador potencial de la EA.

40 Sin embargo, los resultados de la presente invención no pueden extrapolarse a otras enfermedades neurológicas. Las enfermedades neurológicas son muy diferentes y tienden a presentar causas y etiologías propias. Esto se determina en particular en el ejemplo 2, donde puede observarse la ausencia de cambios en el nivel de la lactoferrina en la enfermedad de Parkinson (EP). Al realizarse comparaciones entre pares con pacientes con EP y grupos control saludables, no se hallaron alteraciones significativas: $12,73 \pm 1,56$ µg/ml para la EP versus $9,50 \pm 1,27$ µg/ml para los controles.

45 En la invención se provee la posibilidad de gestionar el diagnóstico o el pronóstico de una gran cantidad de pacientes en sitios diferentes de los centros donde se obtienen las muestras biológicas. En este contexto, otra forma de realización de la invención es un sistema para predecir la evolución de un sujeto en EA, que comprende medios de procesamiento de datos configurados para evaluar el nivel de la lactoferrina o una molécula de ácido nucleico que la codifica en una muestra de saliva, determinar si este nivel supera o no un valor de separación predeterminado, preferiblemente 6,5 µg/ml, y predecir el resultado funcional de la EA en el sujeto en función de esta determinación.

Descripción breve de las figuras

- 5 En la figura 1A se observa una banda de lactoferrina de 75 kDa en todas las muestras después de un fraccionamiento mediante una PAGE con SDS. La lactoferrina fue identificada en saliva humana de pacientes con DCL o EA o controles saludables. Se aplicó una coloración con azul de Coomassie sobre una PAGE con SDS donde se evaluaron diversas muestras de saliva. Carril 1: grupo control. Carril 2: grupo con DCL. Carriles 3 y 4: grupos con EA. La banda correspondiente a aproximadamente 75kDa está indicada con una flecha.
- 10 En la figura 2A puede observarse que el nivel de la lactoferrina en la saliva, determinado con un conjunto de elementos de ELISA para muestras humanas, fue menor en los pacientes con DCL o EA que en el grupo control.
- En la figura 2B puede observarse que no hubo diferencias en el nivel de la lactoferrina en la saliva entre el control y la EP, lo cual se determinó con un conjunto de elementos de ELISA para muestras humanas.
- 15 En la figura 3A puede observarse una correlación entre el nivel de la lactoferrina en la saliva y el deterioro cognitivo en los grupos con DCL o EA. Esta relación se debió principalmente a una asociación negativa significativa entre las etapas de la enfermedad y el nivel de la lactoferrina ($R=0,61$, $p=0,01$).
- En la figura 3B puede observarse una correlación entre el nivel de la lactoferrina en la saliva y la calificación MMSE, una medida de la cognición en pacientes con DCL o EA ($R=0,73$, $p=0,003$).
- 20 En la figura 4A se provee una curva de la característica de la operación de un receptor (ROC) obtenida en el análisis del nivel de la lactoferrina en la saliva de un grupo control completo y un grupo convertido. El gráfico ROC representa la sensibilidad (o frecuencia de positivos verdaderos) versus la 1-especificidad (o frecuencia de positivos falsos). Con este sistema de clasificación binaria (curva ROC), se obtuvo un área bajo la curva (AUC) robusta: 0,92. El AUC es una medida de la utilidad de un parámetro para distinguir dos grupos de diagnóstico, con un intervalo de confianza (IC) de 95% de 0,93-0,98.
- En la figura 4B se provee una curva ROC obtenida en el análisis del nivel de la lactoferrina en la saliva de un grupo control completo y un grupo con DCL/AD. El gráfico ROC representa la sensibilidad (o frecuencia de positivos verdaderos) versus la 1-especificidad (o frecuencia de positivos falsos). El área bajo la curva (AUC) ROC fue de 0,89.
- 25 En la figura 5A se representa un análisis de regresión realizado con valores correspondientes a la expresión de la lactoferrina en la saliva y la edad, como una medida precisa para clasificar los grupos saludables jóvenes o mayores. Los círculos negros representan los jóvenes sin demencia. Los círculos blancos representan los pacientes mayores sin demencia.
- 30 En la figura 5B se representa un análisis de regresión realizado con valores correspondientes a la expresión de la lactoferrina en la saliva y la edad, como una medida precisa para clasificar los grupos de pacientes mayores (no fenocconvertidos) y fenocconvertidos en DCL o EA. Los recuadros blancos representan los fenocconvertidos. Los círculos negros representan los pacientes mayores sin demencia.
- 35 En la figura 6 se provee un análisis de regresión logística donde se usaron los valores de expresión de la lactoferrina y el momento del inicio o la fenocconversión en años. La ecuación generada con el análisis de regresión fue $y = 0,5755x + 1,1539$.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proveen para ilustrar la presente invención sin limitarla.

Ejemplo 1. Extracción de muestras de saliva

- 40 En el estudio se incluyeron dos grupos de donantes: (n=80) pacientes con EA y (n=90) controles mayores sin demencia, reclutados en el Hospital 12 de Octubre, Madrid, España (tabla 1). Para los pacientes con AD, el diagnóstico se estableció según el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares y las directrices de la Asociación de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINDS-ADRDA) (McKhann et al., The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease, *Alzheimer's Dement.*, 2011, 7:263-9). Se agregó un
- 45 grupo de pacientes con la enfermedad de Parkinson (EP), diagnosticados según criterios definidos para la EP (Gelb et al., Diagnostic criteria for Parkinson disease, *Arch Neurol.*, Enero de 1999, 56(1):33-9). También se agregó un grupo de pacientes con DCL que no cumplieron con los criterios para la demencia (Pedersen, Mild cognitive impairment as a diagnostic entity, *J. Intern. Med.*, 2004, 256:183-94). La severidad de la enfermedad se evaluó con la calificación del examen breve para el estado mental (MMSE). Se obtuvo el consentimiento de los sujetos según la Declaración de

Helsinki, junto con la aprobación del Comité de Ética en la Investigación del Hospital 12 de Octubre. Se recolectó saliva entera no estimulada en recipientes de plástico estériles recubiertos con antelación con una solución de azida de sodio al 2%, según el protocolo de Bermejo-Pareja (Bermejo-Pareja et al., Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study, BMC Neurol., 2010, 10:108). Las muestras recolectadas se colocaron inmediatamente en hielo y se depuraron de manera preliminar centrifugándolas a 600 x G durante 10 minutos a 4°C. Se almacenaron alícuotas de 0,5 ml de las muestras a -80°C después de aplicar un tratamiento con un cóctel inhibidor de proteasas (Roche). La estimación del nivel de la proteína se realizó con un conjunto de elementos BCA (Pierce, Rockford, IL), según las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Características demográficas de los sujetos

Diagnóstico	Cantidad	H/M	Edad (media±SEM)	Calificación MMSE (media±SEM)
Controles	90	31/59	73,7±1,2	29±0,5
DCL	44	11/17	75,4±0,9	26,8±0,8
EA	80	14/29	76,2±1,2	19,25±0,7
EP	58	27/31	69,5±2,6	

EA: enfermedad de Alzheimer, DCL: deterioro cognitivo leve, EP: enfermedad de Parkinson, H: hombres, M: mujeres, SEM: error estándar de la media

Ejemplo 2. Análisis de la lactoferrina en muestras de saliva

Se detectó el nivel de expresión de la lactoferrina humana (SEQ ID N° 1) en muestras de saliva recolectadas de pacientes con EA y se lo comparó con lo determinado en donantes con DCL o sujetos control. Se combinaron muestras de saliva de 4 sujetos masculinos de cada grupo (DCL, EA o pacientes mayores sin demencia como control) mezclando cantidades idénticas. Se procesaron muestras de 50 µl de cada grupo mediante una PAGE con SDS. Después del fraccionamiento mediante la PAGE con SDS, se detectó una banda de 75 kDa en todas las muestras que coincidió con el peso molecular de la lactoferrina, lo cual fue confirmado con un análisis de espectrometría de masa (31% de cobertura). Las diferencias en la expresión de la proteína se evaluaron con el programa ImageQuant (GE Healthcare). Después de cargar una cantidad idéntica de la proteína, se analizó la intensidad de las bandas y se observaron niveles de lactoferrina menores en los sujetos con DCL (14%) o EA (51% y 58%) que en el grupo control saludable (figura 1A). Para validar la presencia de lactoferrina en la saliva humana, se la identificó con un abordaje de MALDITOF/TOF en un espectrómetro de masa Proteomics Analyzer 4800 (Applied Biosystems, Framingham, MA) o Explorer™ serie 4000 (Applied Biosystems), después de realizar una digestión en un gel con tripsina y endopeptidasa Asp-N (Thermo Fisher Scientific). La cobertura de aminoácidos para la lactoferrina fue de 31%.

Se obtuvo una confirmación adicional de estas diferencias promediando los niveles de expresión de la lactoferrina determinados con un conjunto de elementos de ELISA y lactoferrina humana comercial (Abcam), según las instrucciones del fabricante. Mediante comparaciones entre pares de los tres grupos, con un ANOVA seguido por un análisis de Tuckey-Kramer, se determinó una disminución significativa en el nivel de la lactoferrina en los grupos de pacientes con DCL o EA, en comparación con el grupo control saludable ($p < 0,05$, figura 2A). El nivel de la lactoferrina en la saliva de los pacientes con EP fue similar al observado en el grupo control saludable (figura 2B).

Ejemplo 3. Contenido de lactoferrina en la saliva como herramienta de diagnóstico

Se evaluó el nivel de la lactoferrina en la saliva a lo largo del progreso de la demencia. La correlación entre el nivel de la lactoferrina en la saliva y la disminución cognitiva en los grupos con DCL o EA parece evidente. Esta conclusión se debió principalmente a la asociación negativa significativa entre las etapas de la enfermedad y el nivel de la lactoferrina ($R=0,61$, $p=0,01$) (figura 3A). Se usó la calificación MMSE para monitorear el progreso de la demencia. La concentración de la lactoferrina en la saliva también presentó una correlación altamente significativa con la calificación MMSE en los pacientes con DCL o AD ($R=0,73$, $p=0,003$) (figura 3B): 15 ó 10 µg/ml para los sujetos humanos saludables versus menos de 6,5 µg/ml para los pacientes con demencias como el DCL o la EA. El análisis de correlación se basó en una correlación de rango de Spearman.

Ejemplo 4. Contenido de lactoferrina en la saliva como herramienta predictiva

Para investigar el potencial predictivo del nivel de la lactoferrina en la saliva, en este grupo se incluyeron participantes control cognitivamente saludables, sin deterioro en la memoria (tabla 2).

Tabla 2. Características demográficas de los sujetos

Sujetos	Cantidad	H/M	Edad (media±SEM)
Controles (sin demencia)	116	45/71	68,06±1,12

5 H: hombres, M: mujeres

Se recolectó saliva entera no estimulada en recipientes de plástico estériles y se determinó el nivel de la lactoferrina según se indica en el ejemplo 1. En la saliva de ocho (8) sujetos, se halló un nivel significativamente reducido de lactoferrina en comparación con el grupo control saludable (3,47±0,41 µg/ml versus 10,54±1,58 µg/ml, p<0,05). En promedio, la fenoverción en DCL o EA ocurrió después de 3,25 años (con un rango de 1-5 años). En la tabla 3 se observa la presencia de una asociación entre el momento de la fenoverción (inicio) y la edad, ya que aquella ocurrió más rápidamente en los sujetos mayores.

Tabla 3. Características demográficas de los convertidos

Sujetos	Sexo	Edad	Inicio	Nivel de lactoferrina (µg/ml)	Diagnóstico neurológico	Otros diagnósticos clínicos
1	H	82	2	3,01	DCL	HT, DM
2	M	70	4	3,17	DCL	
3	M	71	5	3,69	DCL	HT, HC
4	M	68	5	5,10	DCL/AD	
5	M	81	1	1,65	DCL/AD	
6	H	77	2	1,89	DCL	HT
7	H	83	3	6,18	DCL/AD	HT, DM, HD
8	H	88	4	4,45	DCL	HT

15 EA: enfermedad de Alzheimer, DCL: deterioro cognitivo leve, H: hombres, M: mujeres, HT: hipertensión, DM: diabetes Mellitus, HD: enfermedad de Heard, HC: hipercolesterolemia

Ejemplo 5. Contenido de lactoferrina en la mucosa

20 Se recolectó mucosa oral en recipientes de plástico estériles según Aagaard (Aagaard et al., The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters, FASEB J., Marzo de 2013, 27(3):1012-22) Brevemente, los participantes descritos en la tabla 4 depositaron saliva en un tubo de recolección de 50 ml después de permitir que se acumulara en su boca durante más de 1 minuto, se centrifugó la saliva a 6000 x G durante 10 minutos a 4°C y se almacenó el precipitado a -80°C.

Tabla 4. Características demográficas de los sujetos

Sujetos	Cantidad	H/M	Edad (media±SEM)
Controles (sin demencia)	190	110/80	62±1,23

H: hombres, M: mujeres

5 El nivel de la lactoferrina se determinó según el ejemplo 1. En seis (6) sujetos, se hallaron niveles significativamente reducidos de lactoferrina, en comparación con el grupo control saludable ($4,28 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$ para los sujetos con EA versus $9,05 \pm 1,47 \mu\text{g/ml}$ para los sujetos saludables, $p < 0,05$, tabla 5). En promedio, la fenoverción en DCL o EA ocurrió después de 3,83 años (con un rango de 4-3 años). Los participantes control cognitivamente saludables, sin deterioro de la memoria, integraron el grupo de la tabla 4.

Tabla 5. Características demográficas de los convertidos

Sujetos	Sexo	Edad	Inicio	Nivel de lactoferrina ($\mu\text{g/ml}$)	Diagnóstico neurológico
1	F	96	4	5,02	EA
2	M	66	4	3,66	DCL
3	M	82	4	2,51	EA
4	M	67	4	5,92	DCL
5	M	84	4	4,17	EA
6	M	85	3	4,13	DCL/AD

10

EA: enfermedad de Alzheimer, DCL: deterioro cognitivo leve, M: masculino, F: femenino

Ejemplo 6. Construcción de un modelo para predecir la fenoverción en DCL/AD

15 Se usaron los resultados obtenidos con los ELISA para la lactoferrina en los ejemplos anteriores para construir un modelo de clasificación lineal separado, útil para distinguir entre los estados patológico y no patológico de la EA. Mediante el análisis de la característica de la operación de un receptor (ROC), puede evaluarse el rendimiento de los modelos para clasificar grupos. Mediante un modelo de clasificación donde se usó el nivel de la lactoferrina determinado en el análisis de la saliva, fue posible clasificar efectivamente los convertidos y los grupos control saludables, con un área bajo la curva (AUC) de 0,92 y un intervalo de confianza de 95% (IC, figura 4A) de 0,93-0,98. Este modelo tuvo una sensibilidad de 90% y una especificidad de 90% para clasificar los convertidos y los grupos control saludables (figura 4A).

20

25 Con esta curva ROC, una herramienta fundamental para la evaluación de los análisis de diagnóstico, se comprobó la precisión de los análisis con los que se discriminaron los casos enfermos y los casos normales. Una curva ROC puede ser interpretada como una representación de la probabilidad de clasificar correctamente las muestras positivas versus la frecuencia de clasificaciones incorrectas de muestras negativas verdaderas. Por ende, el AUC en un diagrama ROC es una medida de la precisión predictiva.

30

En este estudio, el AUC de 0,92 fue una indicación de un poder de discriminación robusto, ya que 1 habría sido una discriminación perfecta. Con un análisis de regresión, se generó una ecuación para describir la relación entre el nivel de la lactoferrina en la saliva y el tiempo transcurrido hasta la fenoverción (inicio) en años: $y = 0,5755x + 1,1539$, donde "y" es el nivel de la lactoferrina en la saliva y "x" es el tiempo transcurrido hasta la fenoverción en años

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GEROA

<120> USO DE LA LACTOFERRINA EN EL DIAGNÓSTICO O EL PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

5 <130> P2015/11298

<160> 1

<170> BISSAP 1.3

ES 2 657 414 T3

<210> 1
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
1      5      10
Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser
20      25      30
Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg
35      40      45
Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln
50      55      60
Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp
65      70      75      80
Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro
85      90      95
Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr
100     105     110
Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu
115     120     125
Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Asn Ala Gly
130     135     140
Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly
145     150     155     160
Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser
165     170     175
Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu
180     185     190
Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro
195     200     205
Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly
210     215     220
Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp
225     230     235     240
Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg
245     250     255
Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser
260     265     270
His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp
275     280     285
Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro
290     295     300
Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe
305     310     315     320
Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser
325     330     335
Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg
340     345     350
Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys
    
```

ES 2 657 414 T3

		355						360						365			
Ala	Val	Gly	Glu	Gln	Glu	Leu	Arg	Lys	Cys	Asn	Gln	Trp	Ser	Gly	Leu		
	370					375					380						
Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Thr	Cys	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Thr	Glu	Asp	Cys		
385					390					395					400		
Ile	Ala	Leu	Val	Leu	Lys	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Met	Ser	Leu	Asp	Gly		
				405					410					415			
Gly	Tyr	Val	Tyr	Thr	Ala	Gly	Lys	Cys	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Leu	Ala		
			420						425				430				
Glu	Asn	Tyr	Lys	Ser	Gln	Gln	Ser	Ser	Asp	Pro	Asp	Pro	Asn	Cys	Val		
		435					440					445					
Asp	Arg	Pro	Val	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Val	Arg	Arg	Ser		
	450					455					460						
Asp	Thr	Ser	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His		
465					470					475					480		
Thr	Ala	Val	Asp	Arg	Thr	Ala	Gly	Trp	Asn	Ile	Pro	Met	Gly	Leu	Leu		
				485					490					495			
Phe	Asn	Gln	Thr	Gly	Ser	Cys	Lys	Phe	Asp	Glu	Tyr	Phe	Ser	Gln	Ser		
			500					505					510				
Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Asp	Pro	Arg	Ser	Asn	Leu	Cys	Ala	Leu	Cys	Ile		
		515					520					525					
Gly	Asp	Glu	Gln	Gly	Glu	Asn	Lys	Cys	Val	Pro	Asn	Ser	Asn	Glu	Arg		
	530					535					540						
Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	Ala	Glu	Asp	Ala	Gly		
545					550					555					560		
Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Thr	Asp	Gly		
				565					570					575			
Asn	Asn	Asn	Glu	Ala	Trp	Ala	Lys	Asp	Leu	Lys	Leu	Ala	Asp	Phe	Ala		
			580					585					590				
Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Gly	Lys	Arg	Lys	Pro	Val	Thr	Glu	Ala	Arg	Ser		
		595				600						605					
Cys	His	Leu	Ala	Met	Ala	Pro	Asn	His	Ala	Val	Val	Ser	Arg	Met	Asp		
	610					615					620						
Lys	Val	Glu	Arg	Leu	Lys	Gln	Val	Leu	Leu	His	Gln	Gln	Ala	Lys	Phe		
625					630						635				640		
Gly	Arg	Asn	Gly	Ser	Asp	Cys	Pro	Asp	Lys	Phe	Cys	Leu	Phe	Gln	Ser		
				645					650					655			
Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu	Phe	Asn	Asp	Asn	Thr	Glu	Cys	Leu	Ala	Arg		
			660					665					670				
Leu	His	Gly	Lys	Thr	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gln	Tyr	Val		
		675				680						685					
Ala	Gly	Ile	Thr	Asn	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Thr	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu		
	690					695					700						
Ala	Cys	Glu	Phe	Leu	Arg	Lys											
705						710											

REIVINDICACIONES

1. El uso de la lactoferrina o una molécula de ácido nucleico que la codifica en el diagnóstico o el pronóstico de la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica seleccionada entre tejido mucoso y saliva obtenida de un sujeto.
- 5 2. Un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto donde se ha observado una fenoverción en una enfermedad neurológica, que comprende
 - evaluar el nivel de la lactoferrina en una muestra de saliva obtenida del sujeto y
 - determinar si este nivel supera o no un valor de 6,5 µg/ml, donde un valor inferior a 6,5 µg/ml es indicativo de la enfermedad de Alzheimer.
- 10 3. Un método para pronosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto donde no se ha observado una fenoverción en una enfermedad neurológica, que comprende
 - evaluar el nivel de la lactoferrina en una muestra de saliva obtenida del sujeto y
 - determinar si este nivel supera o no un valor de 6,5 µg/ml, donde un valor inferior a 6,5 µg/ml es indicativo del pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.
- 15 4. Un método de pronóstico según la reivindicación 3, donde el pronóstico puede realizarse en un período de hasta nueve años antes de que el sujeto presente una fenoverción en la enfermedad de Alzheimer.
5. Un método de pronóstico según la reivindicación 4, donde el periodo es de cinco años.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, donde el sujeto es un mamífero.
7. Un método según la reivindicación 6, donde el mamífero es un ser humano.
- 20 8. Un sistema para predecir la evolución de un sujeto hasta la enfermedad de Alzheimer, que comprende medios de procesamiento de datos configurados para
 - evaluar el nivel de la lactoferrina o una molécula de ácido nucleico que la codifica en una muestra de saliva,
 - determinar si este nivel supera o no un valor de separación predeterminado y
 - predecir el resultado funcional de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto en función de esta determinación.

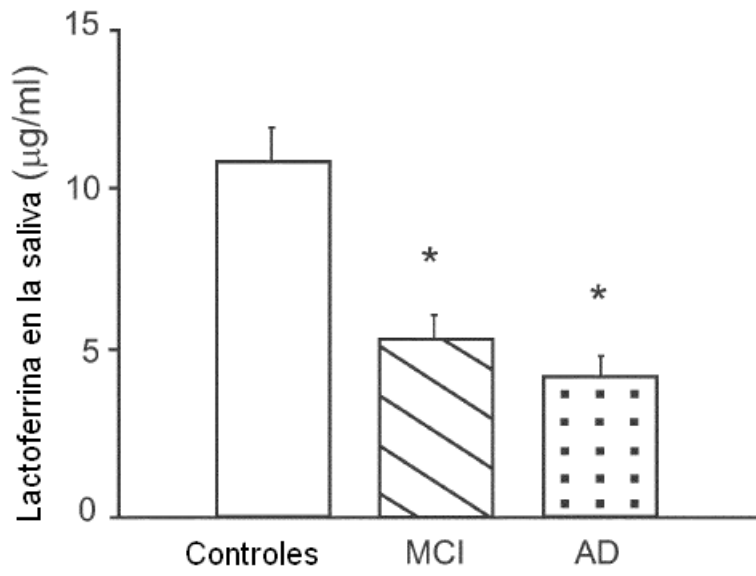
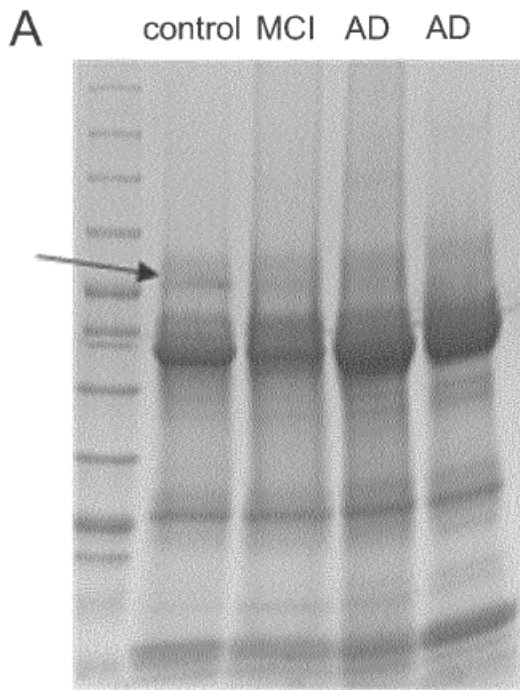


Fig. 2A

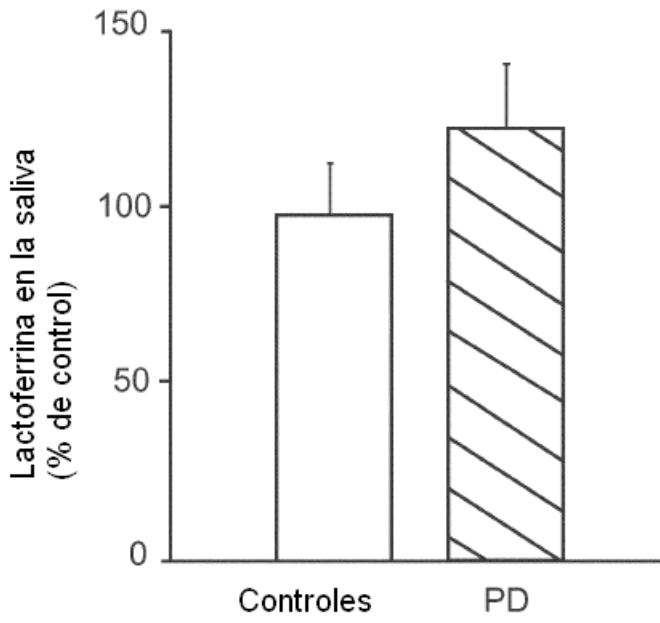


Fig. 2B

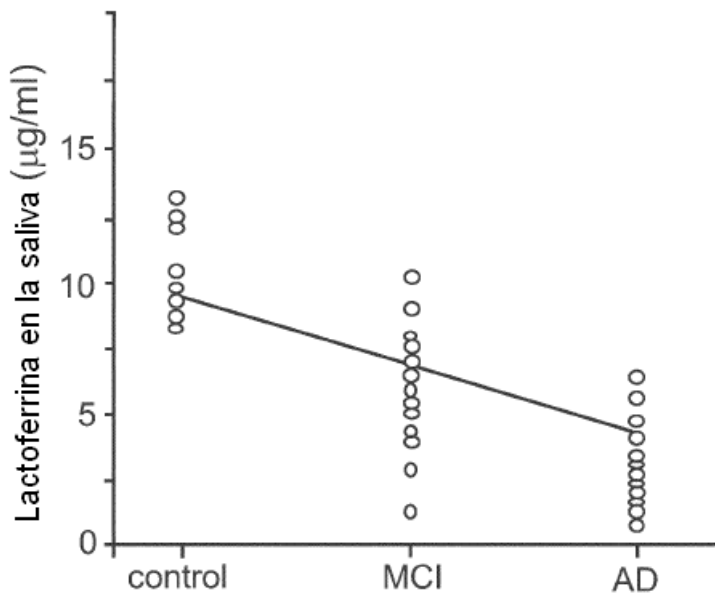


Fig. 3A

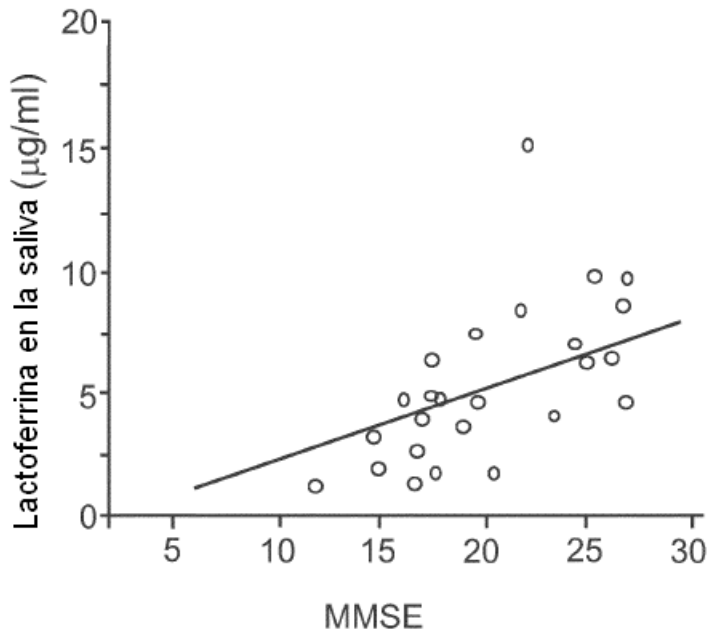


Fig. 3B

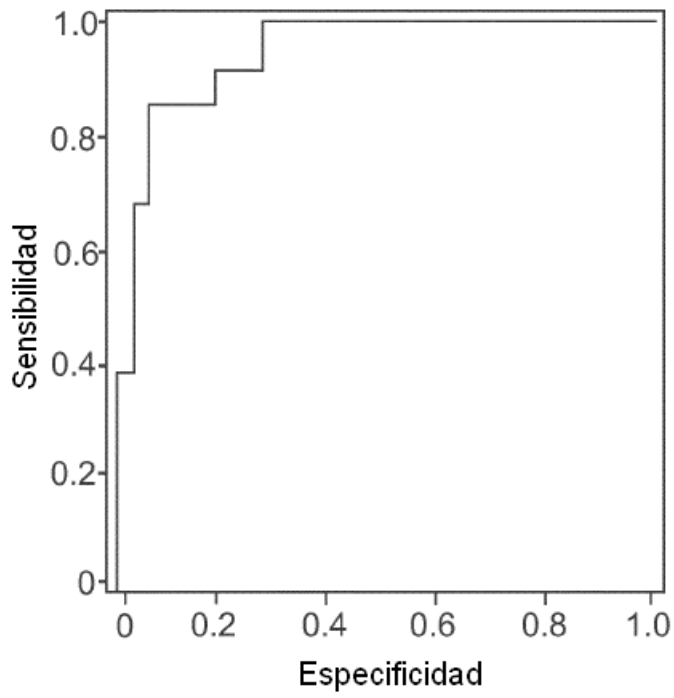


Fig. 4A

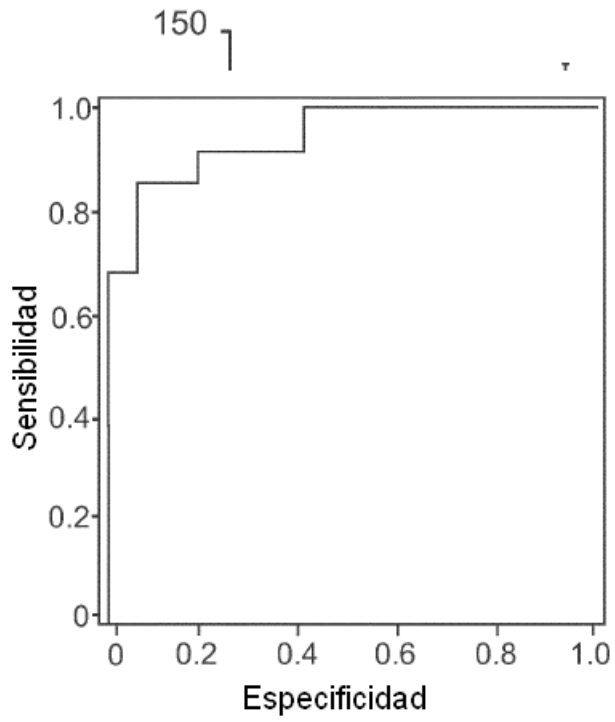


Fig. 4B

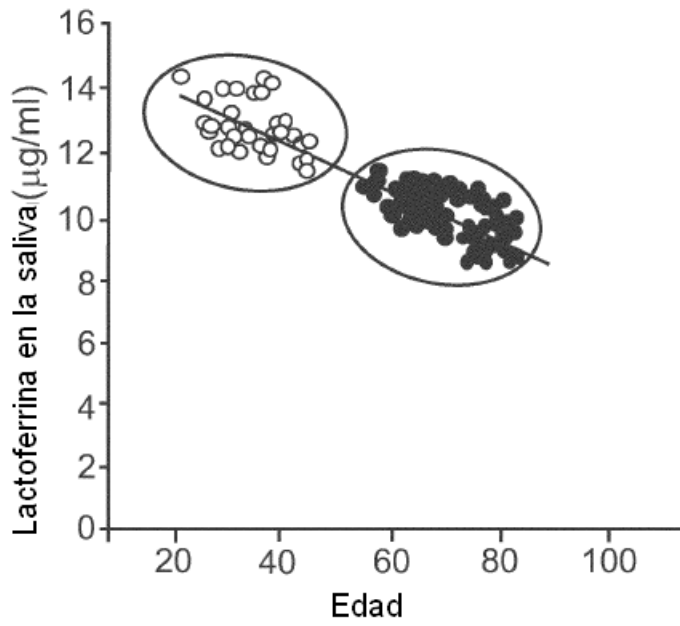


Fig. 5A

