

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 279**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 14172848 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2813853**

54 Título: **Uso de un estándar interno en un método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

04.12.2009 GB 0921447

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

14.03.2018

73 Titular/es:

**RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
Ardmore, 55 Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es:

**UMLAUF, ELLEN y
ZELLNER, MARIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 659 279 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 un estándar interno en un método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de una proteína estándar interna para normalizar la variación biológica en los niveles de expresión, en un método diagnóstico ex vivo de la enfermedad de Alzheimer que usa la cuantificación de proteínas en una muestra de plaquetas.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que afecta a aproximadamente 24 millones de personas en todo el mundo. La enfermedad se caracteriza por una disfunción cognitiva y del comportamiento que resulta de una pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales del cerebro.

La enfermedad puede empezar muchos años antes de que sea finalmente diagnosticada. En las primeras fases, la pérdida de la memoria a corto plazo es el síntoma más común. Más adelante, los síntomas incluyen desorientación, ira, cambios del estado de ánimo, alteración del lenguaje, pérdida de la memoria a largo plazo, y el deterioro general de los sentidos y las funciones corporales.

15 La enfermedad de Alzheimer es el tipo más común de demencia en las personas mayores y afecta a casi la mitad de todos los pacientes con demencia. En consecuencia, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para la enfermedad. Entre las personas con 65 años de edad, el 2-3% muestra signos de la enfermedad, mientras que el 25-50% de las personas con 85 años de edad presenta síntomas de enfermedad de Alzheimer y un número aún mayor presenta algunos de los rasgos patológicos de la enfermedad sin los síntomas característicos. La Organización Mundial de la Salud estima que, globalmente, los años de vida potencialmente perdidos por discapacidad (DALY; del inglés, *disability adjusted life years*) totales excedieron de 11 millones en 2005 para la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, con un previsto aumento anual del 3,4%. En la actualidad no hay una cura conocida para la enfermedad de Alzheimer, y los tratamientos disponibles ofrecen beneficios sintomáticos relativamente pequeños y son de naturaleza paliativa.

25 La depresión es un síntoma precoz común en la enfermedad de Alzheimer y se cree que se atribuye, entre otros factores, a una suprarregulación de la enzima monoamino oxidasa (MAO). Hay dos isoformas de esta enzima, MAO-A y MAO-B. Ambas se encuentran por todas las células del sistema nervioso central (CNS; del inglés, *central nervous system*), donde actúan para inactivar neurotransmisores monoaminérgicos que incluyen la fenetilamina y la dopamina. La MAO-B es también abundante en plaquetas sanguíneas.

30 El inicio y la progresión de la enfermedad de Alzheimer se asocian con el desarrollo de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares. Las placas de amiloide (también conocidas como "placas seniles") comprenden densos depósitos insolubles de beta-amiloide, una proteína derivada de la proteína precursora amiloidea (APP; del inglés, *amyloid precursor protein*), una proteína transmembranal.

35 Después de la proteólisis de la APP, las proteínas beta-amiloideas se agregan extracelularmente formando placas. Los ovillos neurofibrilares se forman a causa de la hiperfosforilación de tau, una proteína asociada a los microtúbulos que es abundante en el CNS. Múltiples moléculas de tau hiperfosforiladas llegan a enredarse y formar masas en el interior de los cuerpos celulares nerviosos. Dichos ovillos neurofibrilares causan que los microtúbulos se desintegren, lo que da lugar al colapso del sistema de transporte neuronal.

40 Normalmente, la enfermedad de Alzheimer se diagnostica clínicamente a partir de la historia del paciente, las observaciones de parientes y las observaciones clínicas. Sin embargo, la presencia de rasgos neurológicos y neuropsicológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer, tales como las placas de amiloide y los ovillos neurofibrilares, sólo puede ser frecuentemente determinada post mórtem.

45 La mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer no presentan herencia familiar; sin embargo, en al menos el 80% de los casos esporádicos de Alzheimer están implicados factores de riesgo genéticos. La herencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (ApoE) se considera un factor de riesgo para el desarrollo en hasta el 50% de los casos esporádicos de Alzheimer de inicio tardío.

50 La glutatión S-transferasa omega-1 (GSTO-1) es un miembro de la familia de enzimas de tipo glutatión S-transferasa que catalizan la conjugación de glutatión reducido (GSH) con diversos sustratos hidrófobos que contienen centros electrófilos. Se sabe que el gen que codifica GSTO-1 existe en diferentes isoformas genéticas. Estas isoformas se correlacionan con la edad de inicio (AAO; del inglés, *age-at-onset*) de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson [Y. Li et al., Hum. Mol. Genet. (2003) 12 (24): 3259-67]. Li y sus colaboradores describieron que la GSTO-1h SNP 7-1 (rs4825, nucleótido A) está asociada con un retraso en la AAO de 6,8 años (+/- 4,41) para la enfermedad de Alzheimer y de 8,6 años (+/- 5,71) para la enfermedad de Parkinson [Y. Li et al., Neurobiol. Aging (2006) 27 (8): 1087-93].

Los marcadores diagnósticos para trastornos neurológicos son especialmente importantes en el diagnóstico al principio del curso de la enfermedad, cuando los compuestos terapéuticos presentan el máximo efecto posible. Sin embargo, es difícil un diagnóstico preciso. Se dispone de pocos marcadores diagnósticos para trastornos neuronales en fase precoz, y aquellos que están disponibles se basan en el análisis de un material de muestra (por ejemplo, fluido cerebroespinal) cuya obtención es difícil y dolorosa.

Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos métodos diagnósticos en que se utilicen biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer que sean periféricamente asequibles de muestras fácilmente obtenibles de un paciente, lo que facilitaría un diagnóstico sencillo y preciso.

R. Maas et al "Simultaneous Assessment of Endothelial Function, Nitric Oxide Synthase Activity, Nitric Oxide-Mediated Signalling and Oxidative Stress in Individuals with and without Hypercholesterolemia" vol. 54, no. 2, 1 febrero 2008, páginas 292-300, DOI: 10.1373/clinchem.2007.093575 detalla un estudio de función endotelial donde se usa β -tubulina como una referencia para calcular niveles normalizados de proteínas NOS en plaquetas.

El documento US 2008/318229 A1, Zellner, Maria y col. Describe un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer mediante la cuantificación de los niveles de uno o más biomarcadores.

15 Sumario de la invención

Un aspecto de la invención está dirigido al uso de la proteína 14-3-3 gamma para normalizar la variación biológica en el nivel de expresión de una o más proteínas plaquetarias, en un método de diagnóstico *ex vivo* de la enfermedad de Alzheimer, que usa la cuantificación de proteínas en una muestra de plaquetas.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 es una transferencia Western 1D que muestra la idoneidad de 14-3-3 gamma como un patrón de extracción interno.

La Figura 2 es una comparación de la expresión aumentada de MAO-B, analizada sólo después de la determinación de proteína (P < 0,01) y después de la normalización con la proteína de extracción interna 14-3-3 gamma (P < 0,00000007).

La Figura 3 es una transferencia Western representativa para la aplicación de ERK2 como un patrón de extracción interno.

Descripción detallada de la invención

La expresión de las proteínas plaquetarias monoamino oxidasa B, factor XIIIa de coagulación, tropomiosina α y tropomiosina β , proteína 1 con repeticiones WD, y apolipoproteína E4 (ApoE4) está significativamente alterada en pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con testigos sanos de edad y sexo correspondientes. Por lo tanto, estas proteínas plaquetarias actúan como biomarcadores de la enfermedad. Además, se ha hallado que la wtGSTO-1 (alanina en la posición 140) está sobrerrepresentada en pacientes con enfermedad de Alzheimer que no portan ningún alelo ApoE4, mientras que la wtGSTO-1 está infrarrepresentada en pacientes con enfermedad de Alzheimer que son positivos para ApoE4.

Por lo tanto, los métodos *ex vivo* pueden ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende determinar el nivel de expresión de al menos cuatro proteínas plaquetarias en una muestra de plaquetas del paciente, seleccionadas de entre monoamino oxidasa B, factor XIIIa de coagulación, tropomiosina total (α y β), proteína 1 con repeticiones WD, y ApoE4, y comparar el nivel de expresión combinado (medido como abundancia normalizada) con el valor testigo, en donde un resultado que sea mayor que el valor testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, unos resultados mayores que el valor testigo pueden ser utilizados para diagnosticar positivamente la enfermedad de Alzheimer.

El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer puede verse facilitado al comparar con un valor testigo el nivel de expresión total de cada uno de los biomarcadores en la muestra de plaquetas aislada. El diagnóstico de la enfermedad se puede llevar a cabo en combinación con otros factores tales como observaciones clínicas y la historia del paciente, y mediante referencia a resultados de ensayos previos del paciente.

Sin embargo, puesto que las plaquetas tienen diferente concentración en la sangre, también varía la concentración de las proteínas plaquetarias. Los coeficientes de variación para las concentraciones de plaquetas en plasma rico en plaquetas y en plaquetas filtradas por gel son 38% y 32%, respectivamente, y la correlación de la cuenta de plaquetas a la concentración de plaquetas es insatisfactoria (K = 0,58 para una normalización analítica de biomarcadores plaquetarios mediante la cuenta de plaquetas). Esto hace que la concentración de proteínas plaquetarias en una muestra de sangre sea un indicador poco fiable para la determinación de cambios patológicos en el cerebro y se requieran operaciones adicionales para normalizar las concentraciones de las proteínas plaquetarias.

Por lo tanto, la presente invención utiliza estándares de extracción internos para permitir la cuantificación precisa de la expresión de proteínas plaquetarias en términos de "abundancia estandarizada".

En una realización preferida, el estándar de extracción interno se deriva del proteoma de plaquetas humanas y está presente en una muestra de paciente, o muestra de control del lisado de plaquetas.

- 5 Como se emplea en esta memoria, el término "baja variación biológica" se refiere a proteínas de extracto celular con un valor de CV inferior a 0,18.

10 Como se emplea en esta memoria, el término "normalizar la variación biológica natural" se refiere al uso de un valor de referencia que corresponde a la concentración de una proteína que varía de manera despreciable entre muestras, frente a la cual, la concentración de proteínas con mayor variación natural entre muestras se puede determinar de forma precisa.

En una realización preferida de la invención, la proteína estándar de extracción interna es la proteína 14-3-3 gamma.

Por lo tanto, el uso de proteína 14-3-3 gamma según la presente invención se puede utilizar para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, junto con otros métodos tales como la consulta del médico y la calificación mediante un miniexamen del estado mental (MMSE; del inglés, mini-mental state examination).

- 15 Como se emplea en esta memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, del que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer o una persona de la que se piensa que tiene predisposición a la enfermedad.

En una realización preferida, el material de muestra se aísla de un lisado de plaquetas sanguíneas obtenido, por ejemplo, usando técnicas de flebotomía estándares.

- 20 El término "isoforma" se define en esta memoria como una proteína con una función equivalente a la de otra proteína y con una secuencia similar o idéntica, pero que es codificada por un gen diferente.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "producto génico" se refiere al mRNA o producto proteico que resulta de la transcripción del gen.

- 25 Como se emplea en esta memoria, la frase "nivel de expresión" se refiere a la cantidad de la proteína especificada (o del mRNA que codifica la proteína) en las plaquetas de la muestra. Las técnicas para determinar el nivel de expresión proteica resultarán evidentes a la persona experta e incluyen el uso de la tecnología de biochips matriciales y la diferencia bidimensional en electroforesis en gel (2D DIGE; del inglés, 2-dimensional difference in gel electrophoresis).

- 30 Preferiblemente, el nivel de expresión de proteínas plaquetarias específicas se cuantifica en términos de "abundancia normalizada", que proporciona un valor numérico que tiene en cuenta la variación natural de la concentración de proteínas plaquetarias. El valor de abundancia normalizada permite la comparación con un valor testigo conocido. La expresión "biomarcador periférico" se define como una proteína que está periféricamente presente en las plaquetas sanguíneas, en donde alteraciones de la expresión periférica de la proteína reflejan cambios patológicamente significativos en el CNS, en donde tales cambios se refieren a la patología de la enfermedad de Alzheimer.
- 35

Como se emplea en esta memoria, el término "GSTO-1" se refiere a la proteína identificada como EC 2.5.1.18, que tiene el número de acceso primario P78417 en la base de datos UniProtKB/SwissProt (versión secuencial 2), o a variantes o isoformas de la misma.

- 40 Como se emplea en esta memoria, la expresión "monoamino oxidasa" o "MAO" se refiere a la proteína identificada como EC 1.4.3.4, que es una enzima que cataliza la oxidación de monoaminas. En los seres humanos hay dos formas de MAO, MAO-A, que tiene el número de acceso primario P21397 en UniProtKB/SwissProt, y MAO-B, que tiene el número de acceso primario P27338 en UniProtKB/SwissProt. Ambas están presentes en las neuronas y la astrogliá. La MAO-A también está presente en el hígado, el tracto gastrointestinal y la placenta, mientras que la MAO-B se halla en las plaquetas sanguíneas.

- 45 Como se emplea en esta memoria, la expresión "factor XIIIa de coagulación" se refiere a la proteína que tiene el número de acceso primario P00488 en UniProtKB/SwissProt y es codificada en seres humanos por el gen F13A1. El factor XIIIa de coagulación es la subunidad catalíticamente activa del factor XIII de coagulación y actúa en la cascada de la coagulación sanguínea para estabilizar los coágulos de fibrina.

- 50 La tropomiosina es una proteína ligante de actina que regula el mecanismo de la actina. Dos cadenas de tropomiosina se ensamblan en dímeros con hélices superenrolladas en paralelo y en exacta correspondencia. La tropomiosina alfa es codificada por el gen TPM1 en seres humanos y tiene el número de acceso primario P09493 en UniProtKB/SwissProt. La tropomiosina beta es codificada por el gen TPM2 en seres humanos y tiene el número de acceso primario P07951 en UniProtKB/SwissProt. Para la finalidad del método de la presente invención, las

abundancias estándares de α -tropomiosina y β -tropomiosina se combinan para obtener un valor de "tropomiosina total" que luego se utiliza en el ensayo.

5 Como se emplea en esta memoria, la expresión "proteína 1 con repeticiones WD" se refiere a la proteína que tiene el número de acceso primario O75083 en UniProtKB/SwissProt. La proteína 1 con repeticiones WD (también conocida como proteína 1 que interacciona con actina) es una proteína muy conservada en eucariontes que actúa para inducir el desensamblaje de los filamentos de actina junto con proteínas de la familia de ADF/cofilina.

10 El término "ApoE" es una abreviación de apolipoproteína E. Hay tres isoformas principales de ApoE, conocidas como ApoE2, E3 y E4, codificadas por los alelos ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4, respectivamente. La ApoE3 es la isoforma más común. Se sabe que la ApoE4 está asociada con la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, representando dos copias del alelo ϵ 4 un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que una o ninguna copia del alelo. Por lo tanto, los pacientes de Alzheimer pueden ser categorizados como pacientes ApoE4 y no ApoE4.

15 Los presentes inventores han descubierto que la proteína 14-3-3 gamma se puede usar para normalizar la variación biológica en los niveles de expresión de una o más proteínas plaquetarias, en un método diagnóstico ex vivo de la enfermedad de Alzheimer, que usa la cuantificación de proteínas en una muestra de plaquetas. El método de diagnóstico ex vivo de la enfermedad de Alzheimer puede comprender las etapas de:

(i) determinar el nivel de expresión de al menos cuatro proteínas plaquetarias en una muestra de plaquetas del paciente, seleccionadas de entre la monoamino oxidasa B, el factor XIIIa de coagulación, la tropomiosina total, la proteína 1 con repeticiones WD, y ApoE4; y

(ii) comparar el resultado de (i) con un valor testigo,

20 en donde un resultado mayor que el valor testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer,

Según la presente invención, el valor de control se determina usando proteína 14-3-3 gamma como la proteína estándar de extracción interna. La proteína 14-3-3 gamma tiene un valor de CV de 0,084.

25 En una realización preferida, el nivel de expresión de cada una de las proteínas plaquetarias se determina usando un biochip matricial. Se pone un biochip que tiene ligandos para las proteínas plaquetarias que se van a detectar, inmovilizados en su superficie, en contacto con una muestra de lisado celular de plaquetas del paciente y luego se lava el biochip, de modo que se identifican proteínas presentes en la muestra de acuerdo con las interacciones detectables formadas con los ligandos inmovilizados.

30 Como se emplea en esta memoria la proteína 14-3-3 gamma se pueden identificar de acuerdo con el número de acceso primario de SwissProt número P61981. El número de acceso de SwissProt identifica el producto de mRNA que codifica cada proteína.

35 La base de conocimientos de proteínas UniProtKB/SwissProt es una base de datos de secuencias proteicas anotadas, establecida por la fusión de las bases de datos de proteínas con bases de conocimiento SwissProt y UniProt. Es mantenida en forma de colaboración por el Swiss Institute for Bioinformatics (SIB), el European Bioinformatics Institute (EBI) y la National Biomedical Research Foundation. La emisión de UniProtKB/SwissProt a la que se hace referencia en esta memoria es v55.2, de 8 de abril de 2008, y se puede acceder a ella en <http://expasy.org/sprot>. El siguiente ejemplo no limitante ilustra aspectos de la invención.

Ejemplo 1: Selección de 14-3-3 gamma como un patrón proteico de extracción interno

40 Se analizaron en una transferencia Western 1D 12,5 μ g de proteína plaquetaria de 24 pacientes con enfermedad de Alzheimer y 24 testigos de sexo y edad correspondientes. Los resultados se ilustran en la Figura 1 y muestran que la señal de MAO-B es más intensa en las muestras de plaquetas de los pacientes con enfermedad de Alzheimer que en las muestras testigo, mientras que la intensidad de la señal para 14-3-3 gamma es igual en todas las muestras. Como se muestra en la Figura 2, midiendo la señal de MAO-B de 12,5 μ g de proteína plaquetaria sin ninguna normalización sólo se puede detectar un aumento poco significativo ($P < 0,01$) en las muestras de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, después de la normalización con 14-3-3 gamma la significación aumenta a $P < 0,00000007$, lo que demuestra que la precisión con que se puede cuantificar una proteína en una muestra aumenta enormemente con la aplicación de un patrón de extracción interno.

50 En la Figura 3 se muestra una transferencia Western representativa para la aplicación de ERK2 como un patrón de extracción interno. La señal para la expresión de MAO-B en plaquetas de pacientes con enfermedad de Alzheimer es más intensa en comparación con la señal de las muestras testigo, mientras que las señales para 14-3-3 gamma y ERK2 resultan inalteradas en todas las muestras de plaquetas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de proteína 14-3-3 gamma para normalizar la variación biológica en el nivel de expresión de una o más proteínas plaquetarias en un método de diagnóstico *ex vivo* de la enfermedad de Alzheimer, que usa la cuantificación de proteínas en una muestra de plaquetas.
5. 2. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que la muestra es una muestra de plaquetas humana.
3. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que la una o más proteínas plaquetarias en la muestra incluyen una o más de monoamino oxidasa B, el factor XIIIa de coagulación, la tropomiosina α y/o β , la proteína 1 con repeticiones WD, la GSTO-1 mutante y/o de tipo silvestre, y la apolipoproteína E.

Figura 1

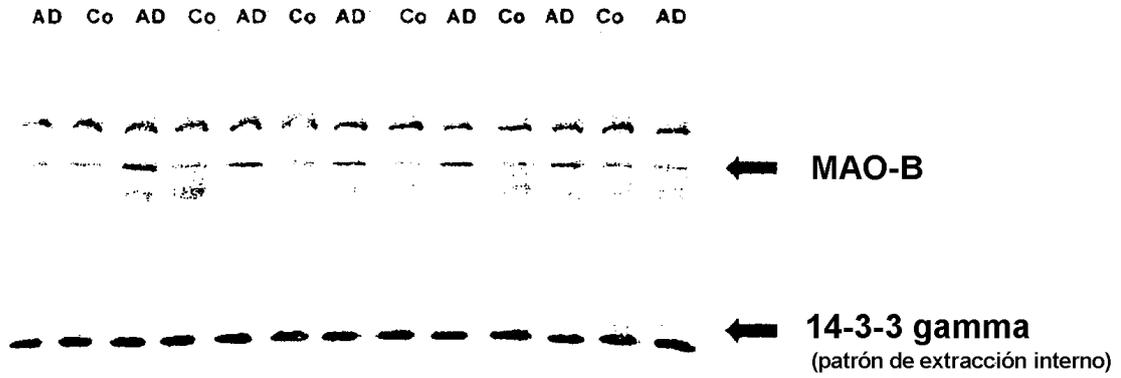


Figura 2

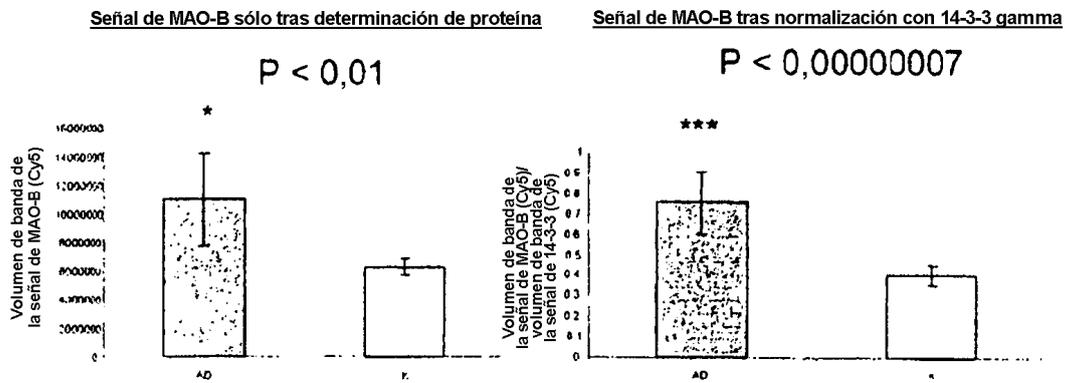


Figura 3

