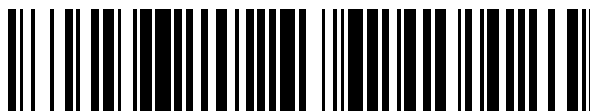


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 753**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011** **PCT/JP2011/080517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012** **WO12091138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011** **E 11853134 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2660600**

54 Título: **Fármaco de diagnóstico y método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

28.12.2010 JP 2010293891

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2018

73 Titular/es:

SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD
(100.0%)

6-8, Dosho-machi 2-chome, Chuo-ku, Osaka-shi
Osaka 541-8524, JP

72 Inventor/es:

HASHIMOTO, MASAKAZU;
NAKAGAWA, HIROYUKI;
AOKI, MIKIO;
TJERNBERG, LARS O. y
WINBLAD, BENGT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 689 753 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

Fármaco de diagnóstico y método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer

Campo técnico

- 5 La presente invención es definida por las reivindicaciones. Se refiere al uso de un anticuerpo anti-S38AA en la determinación de la enfermedad de Alzheimer, un método de determinación de la enfermedad de Alzheimer en un animal, que comprende la detección de un fragmento de S38AA en una muestra recogida de dicho animal, y un método de investigación para una sustancia capaz de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, como se define por las reivindicaciones.

Técnica anterior

- 10 La enfermedad de Alzheimer es una demencia progresiva que comienza con la reducción de la memoria a corto plazo y la leve capacidad de aprendizaje, desarrolla mayor disfunción cerebral, particularmente agnosia visuoespacial, apraxia ideacional, apraxia constructiva y similares, y finalmente alcanza el trastorno del movimiento y la denominada destrucción de la personalidad, para lo cual hasta la fecha no se ha encontrado un método de tratamiento radical. Se ha previsto que serán 2,4 millones de pacientes con enfermedad de Alzheimer en el mundo
- 15 en 2040, y está creciendo la importancia de un método de tratamiento radical para la misma o un diagnóstico temprano de la misma. Su progresión es diferente de la demencia angiopática con frecuencia encontrada en Japón y se considera que continua durante varios años hasta diez años o más. En el caso de una enfermedad de Alzheimer familiar causada por mutación génica anormal, que es una de las enfermedades de Alzheimer, la condición de muchos de los pacientes empeora rápidamente en varios años, y la enfermedad se caracteriza por una aparición temprana puesto que la edad de aparición está en sus 30 a 40 años. La edad, el historial familiar, el genotipo, la hipertensión, la diabetes, fumar y similares son conocidos como los factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer además de la mutación génica, de lo cual la relación con el genotipo APOE está clara. En particular, el alelo ApoE4 ya ha sido publicado como un factor de riesgo de la enfermedad de Alzheimer (documento de no patente 1).
- 20 Como cambios patológicos característicos en la enfermedad de Alzheimer, es ampliamente conocido que se da acumulación extracelular de la placa amiloide que contiene beta amiloide como componente constitutivo principal, y acumulación de la proteína tau altamente fosforilada en las células nerviosas. Con respecto a los cambios patológicos espaciales y temporales en el cerebro, puesto que la acumulación de tau fosforilada en las células piramidales en el hipocampo, particularmente la región denominada CA1, ya se observa en pacientes con enfermedad de Alzheimer con aparición temprana, las células piramidales en esta región se consideran que están espacial y temporalmente expuestas a la fuerte influencia de la enfermedad de Alzheimer en fases tempranas, principalmente muestran fragilidad (documento de no patente 2). Por otro lado, puesto que el trastorno de movimiento surge casi en la fase final de la enfermedad de Alzheimer como se mencionó anteriormente, se considera que la célula de Purkinje en el cerebelo es la más resistente a la enfermedad de Alzheimer.
- 25 La tasa de incidencia de la enfermedad de Alzheimer se considera que incrementa rápidamente después de los 75 años de edad, y la detección temprana y el inicio de un tratamiento temprano son importantes para suprimir la progresión patológica mediante una terapia con fármaco sintomático.

- Debido a la ausencia en la actualidad de una cura radical para la enfermedad de Alzheimer, se investiga energéticamente un marcador diagnóstico para la detección temprana de la enfermedad de Alzheimer, y la medición de la beta amiloide (A β 40, A β 42) y la proteína tau fosforilada en sangre o fluido cerebroespinal se considera que es lo más prometedor. Sin embargo, aún es difícil encontrar claramente la adquisición de la enfermedad de Alzheimer en el futuro, es decir, pacientes potenciales con enfermedad de Alzheimer, incluso cuando estos marcadores se usan solos o en combinación (por ejemplo, relación de A β 40 y A β 42).
- 40

Lista de documento

- 45 Documentos de no patente
- Documento de no patente 1: *Science*. (1993) 261:921-3
- Documento de no patente 2: *Exp. Gerontol.* (2000) 35:851-64

Compendio de la invención

Problema técnico

- 50 El problema de la presente invención es proporcionar un agente para determinar la enfermedad de Alzheimer, un método de determinación de la enfermedad de Alzheimer, y un método de investigación de una sustancia para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Medios para resolver el problema

Los presentes inventores han conducido estudios intensos y han encontrado que la cantidad de fragmento de S38AA se incrementa en el fluido cerebroespinal y el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con persona normal, y este fragmento de S38AA es un polipéptido que contiene el dominio extramembranoso de la isoforma 1 de S38AA.

Además, los presentes inventores han medido la cantidad del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal de sin enfermedad de Alzheimer (persona normal), y pacientes con enfermedad de Alzheimer presunta (enfermedad de Alzheimer potencial) y enfermedad de Alzheimer grave, y han encontrado que la cantidad del fragmento de S38AA se incrementa con el empeoramiento de la patología (progresión) de la enfermedad de Alzheimer y, puesto que este incremento dependiente de patología en la cantidad del fragmento de S38AA en la enfermedad de Alzheimer muestra una correlación positiva con el portador de ApoE4 y una correlación negativa con el portador de ApoE2, el fragmento de S38AA tiene alta fiabilidad como índice para la determinación de la enfermedad de Alzheimer.

Basándose en estos descubrimientos, los presentes inventores se han convencido de que un anticuerpo anti-S38AA es útil como agente determinante de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Alzheimer se puede detectar midiendo el fragmento de S38AA, lo cual da como resultado la conclusión de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

[1] Uso de un anticuerpo anti-S38AA en la determinación de la enfermedad de Alzheimer *in vitro* o *ex vivo*.

[2] Un método de determinación de la enfermedad de Alzheimer en un animal, que comprende la detección de un fragmento de S38AA en una muestra recogida de dicho animal.

[3] El método según [2], en donde el animal es un ser humano.

[4] El método según [2] o [3], en donde el fragmento de S38AA es un fragmento derivado de la isoforma 1 de S38AA.

[5] El método según la reivindicación [2] o [3], en donde el fragmento de S38AA es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 3.

[6] El método según una cualquiera de las reivindicaciones [2] a [5], en donde la muestra es sangre, fluido cerebroespinal u orina.

[7] El método según una cualquiera de las reivindicaciones [2] a [5], en donde la muestra es fluido cerebroespinal.

[8] El método según una cualquiera de las reivindicaciones [2] a [5], en donde la muestra es sangre.

[9] El método según una cualquiera de las reivindicaciones [2] a [5], en donde la muestra es plasma.

[10] El método según una cualquiera de las reivindicaciones [2] a [9], que comprende además la detección de uno o más marcadores de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer.

[11] Un método de investigación de una sustancia candidata para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, que comprende las siguientes etapas:

(1) poner en contacto una sustancia de ensayo con una célula permitiendo la medición de la producción de un fragmento de S38AA;

(2) medir la cantidad de producción del fragmento de S38AA en la célula puesta en contacto con la sustancia de ensayo, y comparar la cantidad de producción con la del fragmento de S38AA en una célula control libre de contacto con la sustancia de ensayo; y

(3) seleccionar una sustancia de ensayo que regula a la baja la cantidad de producción del fragmento de S38AA como sustancia candidata para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, basándose en los resultados de comparación del anteriormente mencionado punto (2).

[12] El método según [4], en donde la isoforma 1 de S38AA es un polipéptido de los siguientes (a) o (b):

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2, o

(b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2.

[13] El método según [5], en donde el fragmento de S38AA es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del 505° al 1.014° mostrada por la SEQ ID NO: 2.

Efecto

En la presente memoria también se describe un agente para determinar la enfermedad de Alzheimer y un método de determinación de la enfermedad de Alzheimer.

- 5 Además, según el método de investigación descrito en la presente memoria, se puede proporcionar un agente capaz de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Figura 1 muestra una imagen de inmunotinción de una región CA1 del hipocampo representativa de un ejemplo normal. Las partes intensamente teñidas (flechas) en la célula nerviosa de la Figura 1 muestran la expresión fuerte de S38AA. El panel inferior derecho es una vista ampliada de la parte rodeada por una línea discontinua. La barra de escala muestra 20 μ m.

La Figura 2 muestra una imagen de inmunotinción de una región CA1 del hipocampo representativa de un ejemplo de enfermedad de Alzheimer definitiva. El panel inferior derecho es una vista ampliada de la parte rodeada por una línea discontinua. La barra de escala muestra 20 μ m.

- 15 La Figura 3 muestra una región extramembrana prevista de la secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de S38AA en el recuadro. El fragmento de S38AA inmunoprecipitado se analizó por proteómica aleatoria ("shotgun"), y la secuencia del fragmento peptídico identificado y su posición están subrayadas.

La Figura 4 muestra un ejemplo del análisis de transferencia Western de S38AA en el fluido cerebroespinal y los resultados del análisis del peso molecular del fragmento de S38AA detectado.

- 20 La Figura 5 muestra los resultados de cuantificación de los fragmentos S38AA en el fluido cerebroespinal de pacientes sin enfermedad de Alzheimer, pacientes con enfermedad de Alzheimer presunta y pacientes con enfermedad de Alzheimer definitiva, mediante el método de transferencia Western. El eje Y muestra la intensidad de señal de cada grupo, lo cual está estandarizado por el fluido cerebroespinal estándar.

- 25 La Figura 6 muestra la cantidad de un fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal de grupos representativos de todos los pacientes divididos según el genotipo APOE (dividido en 4 tipos de genotipos de ApoE2/3, ApoE3/3, ApoE3/4, ApoE4/4).

La Figura 7 muestra la relación entre la cantidad de fragmento de S38AA y genotipo APOE de 11 pacientes sin enfermedad de Alzheimer. El eje Y muestra la intensidad de señal de cada grupo, lo cual está estandarizado por el fluido cerebroespinal estándar.

- 30 La Figura 8 muestra los resultados del análisis del peso molecular del fragmento de S38AA específicamente separado por un método de inmunoprecipitación que usa un anticuerpo anti-S38AA (HPA021374, HPA023161).

La Figura 9 muestra un ejemplo del análisis de transferencia Western del fragmento de S38AA en plasma humano y los resultados del análisis del peso molecular del fragmento de S38AA determinado.

Descripción de las realizaciones

Por consiguiente, lo descrito en la presente memoria es lo siguiente.

- 35 1. Agente para determinar la enfermedad de Alzheimer

- Los presentes inventores han encontrado que (1) la cantidad de fragmento de S38AA se incrementa en el fluido cerebroespinal y el plasma de pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con persona normal, (2) se encuentra que la cantidad del fragmento de S38AA se incrementa incluso en pacientes con enfermedad de Alzheimer presunta más que en persona normal, y la cantidad del fragmento de S38AA se incrementa con el empeoramiento de patología (progresión) de la enfermedad de Alzheimer, y (3) puesto que este incremento dependiente de patología en la cantidad del fragmento de S38AA en la enfermedad de Alzheimer muestra una correlación positiva con el portador de ApoE4 y una correlación negativa con el portador de ApoE2, el fragmento de S38AA tiene alta fiabilidad como índice para la determinación de la enfermedad de Alzheimer.

- 45 Por consiguiente, en la presente memoria se describe un agente para determinar la enfermedad de Alzheimer, que comprende un anticuerpo anti-S38AA.

El agente determinante descrito en la presente memoria no solamente puede determinar si una persona está afectada con la enfermedad de Alzheimer sino también si una persona es sospechosa de estar afectada con la enfermedad de Alzheimer, es decir, si la persona tiene una alta posibilidad de estar afectada con la enfermedad en el futuro cercano, aunque la persona aún no esté padeciendo de la enfermedad.

- 50 Por lo tanto, la "determinación" de la enfermedad de Alzheimer en la presente invención se usa no solamente para

querer decir la determinación de si una persona está ya afectada con la enfermedad de Alzheimer, sino que abarca el dictamen de si una persona tiene una alta posibilidad de estar afectada en el futuro cercano, aunque la persona aún no esté padeciendo de la enfermedad.

En la presente memoria, “enfermedad de Alzheimer presunta” se refiere a una condición asociada con una alta posibilidad de estar afectado (definitivamente diagnosticado) en el futuro, aunque no se ha hecho un diagnóstico definitivo de la enfermedad de Alzheimer. Ejemplos específicos de la misma incluye la condición a clasificar en nivel leve o moderado mediante la clasificación de gravedad en el diagnóstico según la realización de imagen amiloide, MRI, CT, SPET o síntoma clínico, el estado de deficiencia cognitiva leve y similares.

Como S38AA, se conocen, por ejemplo, secuencias de aminoácidos tales como la isoforma 1 de S38AA humana (número de UniProtKB/Swiss-Prot: Q9HBR0-1, SEQ ID NO: 2), isoforma 1 de S38AA de rata (número de secuencia de referencia de NCBI: XP_002727892.1), isoforma 1 de S38AA de ratón (número de secuencia de referencia de NCBI: NP_077211.4), isoforma 2 de S38AA humana (número de UniProtKB/Swiss-Prot: Q9HBR0-2) y similares.

Además, como secuencia de un ácido nucleico que codifica S38AA (más adelante referido como “gen S38AA”), se conoce, por ejemplo, la secuencia de ADNc de la isoforma 1 de S38AA humana (número de secuencia de referencia de NCBI: NM_001037984.1, SEQ ID NO: 1).

Se predice que S38AA es una proteína diez-transmembrana según la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot, y se asume que la secuencia de aminoácidos desde el 399° inclusive (al 1.119° en la isoforma 1, y al 780° en la isoforma 2) es la región extramembrana.

“S38AA” en la presente memoria abarca no solamente la “proteína” o el “(poli)péptido” mostrado por estas secuencias conocidas, sino también, por ejemplo, sus equivalentes (homólogos y variantes de corte y empalme), variantes, derivados, formas maduras, formas modificadas por aminoácido y similares siempre que tengan funciones biológicas equivalentes a aquellas de una secuencia de aminoácidos particular que muestra la isoforma 1 de S38AA humana (SEQ ID NO: 2). En la presente memoria, ejemplos del homólogo incluyen proteínas de otras especies biológicas tales como ratón, rata y similares, que corresponden a proteína humana. Se pueden identificar deductivamente a partir de la secuencia de bases de un gen identificado por HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HomoloGene/>). Ejemplos de la variante de corte y empalme incluyen la isoforma 2 de S38AA humana (la secuencia de aminoácidos del 689° al 780° es diferente de la isoforma 1, y la secuencia de aminoácidos del 781° al 1.119° está eliminada). Además, la variante abarca variantes alélicas de origen natural (polimorfismo), variantes no presentes en la naturaleza, y variantes que tienen secuencias de aminoácidos alteradas artificialmente mediante delección, sustitución, adición o inserción. Ejemplos de la variante anteriormente mencionada incluyen aquellos que tienen al menos 70 %, preferiblemente 80 %, más preferiblemente 95 %, además más preferiblemente 97 %, de identidad con una proteína o (poli)péptido libre de mutación. Ejemplos de la variante alélica de origen natural (polimorfismo) incluyen, una variante de la SEQ ID NO: 2 en donde la 559° Lys está sustituida por Arg (ddbSNP: rs35546507) y una variante en donde la 831° Ala está sustituida por Gly (dbSNP: rs2725405). Además, la forma modificada por aminoácido abarca las formas modificadas por aminoácido de origen natural y las formas modificadas por aminoácido no presentes en la naturaleza, y específicamente, se pueden incluir las formas fosforiladas por aminoácido (por ejemplo, la forma fosforilada de la SEQ ID NO: 2 en donde la 889° Ser está fosforilada).

Fácilmente se puede asumir que el dominio extramembranoso y la región transmembrana y similares de una proteína usan, por ejemplo, los datos de predicción descritos en las bases de datos de UniProtKB/Swiss-Prot, y una herramienta de predicción conocida y programa informático tal como TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y similares.

El “fragmento de S38AA” en la presente memoria solamente necesita ser un (poli)péptido que contenga el dominio extramembranoso de S38AA. El “dominio extramembranoso de S38AA” en la presente memoria significa una región peptídica que contiene la región extramembrana completa o parcial en el lado C-terminal de cualquiera de los anteriormente mencionados S38AA, o la región extramembrana completa o parcial en el lado C-terminal de S38AA en el orgánulo celular tal como Golgi y similares. Además, el “fragmento de S38AA” en la presente memoria se caracteriza por que es reconocido por el anticuerpo anti-S38AA HPA024631 (Atlas Antibodies; producido usando un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos del 402° al 491° de la SEQ ID NO:2 como inmunogen).

Preferiblemente, el fragmento de S38AA contiene la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial del 761° al 770° de la isoforma 1 de S38AA humana (en la isoforma 2, la secuencia de aminoácidos desde el 689° inclusive es diferente debido al corte y empalme alternativo). Por lo tanto, aunque el fragmento de S38AA preferiblemente es un fragmento derivado de la isoforma 1 de S38AA, puesto que se predice que el sitio de escisión de S38AA, a partir del peso molecular aparente del fragmento de S38AA por SDS-PAGE, está en la secuencia de aminoácidos (hasta el aminoácido 688° de la SEQ ID NO: 2) común a las dos isoformas, si la reacción de escisión se da tras el reconocimiento de solamente la secuencia de aminoácidos en el sitio de escisión, un fragmento derivado de la isoforma 2 también puede estar incluido en el fragmento de S38AA descrito en la presente memoria.

Aunque el peso molecular del fragmento de S38AA no está limitado, es preferiblemente de aproximadamente 76 a aproximadamente 102 kDa en el peso molecular aparente por SDS-PAGE. Por lo tanto, un fragmento escindido después del 161º aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2 es más preferible (peso molecular (calculado) del fragmento que consiste en la secuencia de aminoácidos del 161º al 1.119º es de aproximadamente 102 kDa). Además, a partir de los resultados del ensayo de precipitación ("pull-down") y análisis por MS por corte aleatorio ("shotgun") mencionados más adelante, el fragmento de S38AA descrito en la presente memoria es más preferiblemente un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos del 505º al 1.014º de la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2.

El "anticuerpo anti-S38AA" a usar en la presente invención es un anticuerpo que reconoce el dominio extramembranoso de S38AA, con preferencia dada a un anticuerpo que reconoce el dominio extramembranoso de la isoforma 1 de S38AA. Dicho dominio extramembranoso puede estar en la región de aminoácidos específica a la isoforma 1 (en la SEQ ID NO: 2, la región de aminoácidos del 689º al 1.119º), en la región de aminoácidos común con la isoforma 2 (la región de aminoácidos del 399º al 688º) o atraviesa ambas regiones. Además, el dominio extramembranoso puede ser una secuencia de aminoácidos parcial continua en la región extramembrana de S38AA o una conformación formada por dos o más secuencias de aminoácidos parciales separadas y posteriores.

El anticuerpo anti-S38AA también puede ser, por ejemplo, el anticuerpo policlonal o monoclonal producido usando un método conocido, tal como anticuerpos anti-S38AA comercialmente disponibles (por ejemplo, HPA024631, HPA023161, HPA021374 (cada uno fabricado por Atlas Antibodies)) y similares, o sus fragmentos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, ScFv, minicuerpo, etc.).

Como anticuerpo anti-S38AA a usar en la presente invención, un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal derivado de mamíferos son preferibles.

Ejemplos del anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal derivados de mamíferos incluyen aquellos producidos en la sangre de animal, aquellos producidos por hibridomas, y aquellos producidos por un hospedador transformado con un vector de expresión que contiene un gen anticuerpo mediante un medio de ingeniería genética, aquellos producidos en grandes cantidades en una fábrica de célula CHO mediante el gen de un anticuerpo óptimo investigado a partir de una biblioteca de clon enorme que consiste en 1.000.000.000.000 moléculas por presentación en fago ("phage display"), o anticuerpo humano directamente producido usando ratón transgénico que produce anticuerpo humano, y similares.

El anticuerpo monoclonal y el anticuerpo policlonal se pueden producir por un método conocido por los expertos en la técnica.

(1) Producción del anticuerpo monoclonal

S38AA se administra solo o junto con un portador y un diluyente a un sitio donde se puede producir un anticuerpo mediante la administración a un animal. Para incrementar la producibilidad del anticuerpo mediante la administración, también se puede administrar un adyuvante completo de Freund o un adyuvante incompleto de Freund. La administración generalmente se realiza una vez cada 2 a 6 semanas, y aproximadamente 2 a 10 veces en total. Ejemplos del mamífero a usar incluyen mono, conejo, perro, cobaya, ratón, rata, oveja y cabra, con preferencia dada a ratón y rata.

Para la producción de células productoras de anticuerpo monoclonal, se seleccionan a partir de mamíferos, por ejemplo, ratón inmunizado con un antígeno, individuos encontrados que muestran un título de anticuerpo, el bazo o el nódulo linfático se recoge 2 a 5 días después de la inmunización final, las células productoras de anticuerpo contenidas en el mismo se fusionan con células de mieloma, de ese modo se puede preparar un hibridoma productor de anticuerpo. El título de anticuerpo en el antisuero se puede medir, por ejemplo, haciendo reaccionar la S38AA marcada mencionada más adelante con antisuero, y midiendo la actividad de un marcador unido al anticuerpo. Una operación de fusión se puede realizar mediante un método conocido, por ejemplo, el método de Köhler y Milstein [*Nature*, 256, 495 (1975)]. Como estimulante de la fusión se pueden mencionar, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), virus Sendai y similares, y se usa preferiblemente PEG.

Como célula de mieloma, por ejemplo, se pueden mencionar NS-1, P3U1, SP2/0 y similares, y preferiblemente se usa P3U1. Una relación preferible de los números de las células productoras de anticuerpo (células del bazo) y células de mieloma a usar es de aproximadamente 1:1 a 20:1, PEG (preferiblemente PEG 1000-PEG 6000) se añade a una concentración de aproximadamente 10 a 80 %, y la fusión celular se puede realizar eficazmente incubando a aproximadamente 20 a 40 °C, preferiblemente aproximadamente 30 a 37 °C, durante aproximadamente 1 a 10 min.

Para investigar un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal, se pueden usar diversos métodos. Sus ejemplos incluyen un método que comprende añadir un sobrenadante de cultivo de hibridoma a una fase sólida (por ejemplo, microplaca) adsorbida con un antígeno tal como una proteína y similares directamente o junto con un portador, añadir un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con una sustancia radioactiva, una enzima o similares (cuando la célula usada para la fusión celular es de un ratón, se usa un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón) o proteína A, y detectar un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida, un método que comprende añadir un sobrenadante de

cultivo de hibridoma a una fase sólida adsorbida con un anticuerpo anti-inmunoglobulina o proteína A, añadir una proteína marcada con una sustancia radioactiva, una enzima, etc., y similares, y detectar un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida, y similares.

- Se puede seleccionar el anticuerpo monoclonal mediante un método conocido por sí mismo o un método análogo al mismo, y generalmente se puede seleccionar usando un medio para células animales que se añaden con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina), y similares. Como medio para la selección y el crecimiento, se puede usar cualquier medio siempre que los hibridomas puedan crecer. Por ejemplo, se pueden usar el medio RPMI 1640 que contiene 1 a 20 %, preferiblemente 10 a 20 %, de suero fetal bovino, medio GIT que contiene 1 a 10 % de suero fetal bovino (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), un medio libre de suero para el cultivo de hibridoma (SFM-101, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y similares. La temperatura de cultivo generalmente es de 20 a 40 °C, preferiblemente aproximadamente 37 °C. El tiempo de cultivo generalmente es de 5 días a 3 semanas, preferiblemente 1 semana a 2 semanas. El cultivo en general se puede realizar generalmente en gas de dióxido de carbono al 5 %. El título del anticuerpo del sobrenadante de cultivo de hibridoma se puede medir de la misma manera que en la medición anteriormente mencionada del título del anticuerpo del antisuero.
- El anticuerpo monoclonal se puede separar y purificar según un método de separación y purificación de inmunoglobulina, de la misma manera que en la separación general y purificación del anticuerpo policlonal [por ejemplo, método de precipitación salina ("salting out"), método de precipitación por alcohol, método de precipitación por punto isoelectrico, electroforesis, método de adsorción y desorción por intercambio iónico (por ejemplo, DEAE), método de ultracentrifugación, método de filtración en gel, método de purificación específica incluyendo la recogida solamente de un anticuerpo mediante un adsorbente activo tal como la fase sólida unida a antígeno, proteína A, proteína G o similares, y disociación del enlace para dar el anticuerpo].

(2) Producción del anticuerpo policlonal

- El anticuerpo policlonal a S38AA se puede producir mediante un método conocido por sí mismo o un método análogo al mismo. Por ejemplo, un anticuerpo policlonal se puede producir produciendo un complejo de un antígeno de inmunización (antígeno tal como proteína y similares) y una proteína portadora, inmunizando un mamífero de la misma manera que en el método de producción anteriormente mencionado del anticuerpo monoclonal o pollo, recogiendo una sustancia que contiene un anticuerpo a S38AA del animal inmunizado, y separando y purificando el anticuerpo.

- Con respecto al complejo de un antígeno de inmunización y una proteína portadora a usar para la inmunización de un mamífero o pollo, el tipo de la proteína portadora y la relación de mezcla del portador y hapteno puede ser cualquiera y cualquier relación siempre que el anticuerpo se pueda producir eficazmente frente a hapteno usado para la inmunización por entrecruzamiento con el portador. Por ejemplo, se usa un método que incluye el acoplamiento de albúmina de suero bovino, tiroglobulina bovina, hemocianina de "lapa californiana" y similares a una relación en peso de aproximadamente 0,1 a 20, preferiblemente aproximadamente 1 a 5, a hapteno de 1.

- Aunque se pueden usar diversos agentes de condensación para el acoplamiento de hapteno con un portador, se pueden usar un reactivo de éster activado que contiene glutaraldehído, carbodiimida, éster activado con maleimida, un grupo tiol y un grupo ditiopiridilo, y similares.

- El producto de condensación se administra a un mamífero o pollo solo o junto con un portador y un diluyente a un sitio en donde se puede producir un anticuerpo. Para incrementar la productibilidad del anticuerpo mediante la administración, también se puede administrar un adyuvante completo de Freund o un adyuvante incompleto de Freund. La administración generalmente se realiza una vez cada 2 a 6 semanas, y aproximadamente 3 a 10 veces en total.

- El anticuerpo policlonal se puede recoger de la sangre, ascitis, leche materna y similares del mamífero inmunizado por el método anteriormente mencionado, preferiblemente de la sangre, y en el caso del pollo, se puede recoger de la sangre y de la yema de huevo.

- El título del anticuerpo policlonal en el antisuero se puede medir de la misma manera que en la medición anteriormente mencionada del título del anticuerpo del antisuero. El anticuerpo policlonal se puede separar y purificar según un método de separación y purificación de inmunoglobulina, de la misma manera que en la separación y purificación anteriormente mencionada del anticuerpo monoclonal.

50 2. Kit para determinar la enfermedad de Alzheimer

En el presente documento también se describe un kit para determinar la enfermedad de Alzheimer. El kit descrito en la presente memoria contiene un reactivo para medir la cantidad del fragmento de S38AA. Al medir la cantidad del fragmento de S38AA usando el kit descrito en el presente documento, se puede determinar la enfermedad de Alzheimer.

- El kit descrito en la presente memoria específicamente contiene un anticuerpo anti-S38AA que reconoce S38AA. Ejemplos del anticuerpo anti-S38AA incluyen el anticuerpo anti-S38AA descrito en detalle en el anteriormente

mencionado punto "1. Agente para determinar la enfermedad de Alzheimer". El anticuerpo puede ser un anticuerpo marcado con fluorescencia, anticuerpo marcado con enzima, anticuerpo marcado con estreptavidina, anticuerpo marcado con biotina o anticuerpo marcado con radioactividad.

- 5 El anticuerpo anti-S38AA generalmente está contenido en el kit descrito en la presente memoria en forma de una solución acuosa del mismo disuelto en agua o un tampón adecuado (por ejemplo, tampón TE, PBS etc.) a una concentración adecuada o un producto liofilizado.

- 10 El kit descrito en la presente memoria además puede contener, en su constitución, otros componentes necesarios para la realización del método, según el método de medición del fragmento de S38AA. Por ejemplo, para la medición por transferencia Western, el kit descrito en la presente memoria además puede contener un tampón de transferencia, un reactivo de marcación, una membrana de transferencia y similares, un reactivo de determinación, una solución estándar y similares. Ejemplos de la "solución estándar" en la presente memoria incluyen una solución acuosa obtenida disolviendo un producto estándar purificado del "fragmento de S38AA" anteriormente mencionado en agua o un tampón adecuado (por ejemplo, tampón TE, PBS y similares) a una concentración particular.

- 15 Para la medición por ELISA tipo sándwich, el kit descrito en la presente memoria además puede contener, además de lo anterior, una placa de medición de anticuerpo inmovilizado, una solución de lavado y similares. Para la medición mediante un método de aglutinación que incluye el método de aglutinación por látex, se puede contener un látex revestido con anticuerpo, gelatina o similares. Para la medición mediante un método de fluorescencia química o un método de electrón de fluorescencia química, se pueden contener partículas magnéticas conjugadas a anticuerpo y un tampón adecuado. Para la detección de S38AA usando LC/MS, LC-MS/MS o un método de
20 inmunocromatografía, se pueden contener una columna o microcolumna revestida con anticuerpo, y un macro chip como parte del instrumento de detección. Además, en un método de medición de fluorescencia resuelta en el tiempo o un método de medición de fluorescencia similar al mismo, se puede contener en la constitución una pluralidad de anticuerpos anti-S38AA marcados y otros componentes necesarios.

3. Método para determinar la enfermedad de Alzheimer

- 25 Los presentes inventores han encontrado que (1) la cantidad de fragmento de S38AA se incrementa en el fluido cerebroespinal y el plasma de los pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con la persona normal, (2) se encuentra que la cantidad del fragmento de S38AA se incrementa incluso en pacientes con enfermedad de Alzheimer leve más que en persona normal, y la cantidad del fragmento de S38AA se incrementa con el empeoramiento de la patología (progresión) de la enfermedad de Alzheimer, y (3) puesto que este incremento
30 dependiente de patología en la cantidad del fragmento de S38AA en la enfermedad de Alzheimer muestra una correlación positiva con el portador ApoE4 y una correlación negativa con el portador ApoE2, el fragmento de S38AA tiene alta fiabilidad como índice para la determinación de la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto, la presente invención proporciona un método para determinar la enfermedad de Alzheimer que comprende detectar un fragmento de S38AA en una muestra recogida de un animal.

- 35 El método de determinación de la presente invención puede determinar no solamente si una persona está afectada con la enfermedad de Alzheimer sino también si la persona tiene una alta posibilidad de estar afectada con la enfermedad en el futuro cercano, aunque la persona aún no esté padeciendo de la enfermedad.

- 40 El método de detección de la presente invención contiene una etapa de detección de un fragmento de S38AA en una muestra de ensayo recogida de un animal, y una etapa de determinación de la enfermedad de Alzheimer basada en la correlación positiva entre la cantidad del fragmento de S38AA y la enfermedad de Alzheimer.

Aunque el animal que puede ser un sujeto de ensayo para el método de determinación de la presente invención no está particularmente limitado siempre que produzca S38AA, se pueden mencionar, por ejemplo, mamíferos (por ejemplo, ser humano, mono, bovino, cerdo, caballo, perro, gato, oveja, cabra, conejo, hámster, cobaya, ratón, rata, etc.), aves (por ejemplo, pollo, etc.) y similares. Preferido es un mamífero, y más preferido es un ser humano.

- 45 Aunque una muestra biológica derivada de un animal de ensayo para ser la muestra no está particularmente limitada, por ejemplo, se pueden mencionar sangre, suero, plasma, saliva, orina, fluido cerebroespinal y similares. Más preferido es el plasma o el fluido cerebroespinal.

- 50 El suero y el plasma se puede preparar recogiendo sangre de un animal de ensayo según un método convencional, y separando el componente líquido. El fluido cerebroespinal se puede recoger mediante un medio conocido tal como punción lumbar y similares.

- 55 Se puede detectar un fragmento de S38AA en una muestra mediante un método conocido. Se puede detectar sometiendo a, por ejemplo, transferencia Western, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE, electroforesis en gel bidimensional y similares), diversos métodos de separación y purificación (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía por filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa, cromatografía por punto isoelectrico, electroforesis capilar y similares), método de ionización (por ejemplo, método de ionización por impacto de electrones, método de desorción de campo, método de

ionización secundario, bombardeo atómico rápido, desorción/ionización por láser asistida en matriz (MALDI, del inglés "Matrix Assited Laser Desorption/ionization"), método de ionización por electropulverización y similares), espectrómetro de masas (por ejemplo, espectrómetro de masas de doble enfoque, espectrómetro de masas cuadrupolo, espectrómetro de masas de tiempo de vuelo ("time-of-flight"), espectrómetro de masas de transformación Fourier, espectrómetro de masas ciclotrón iónico y similares) y similares.

Además, el fragmento de S38AA se puede detectar según un método inmunoquímico conocido (nefelometría, método competitivo, método inmunométrico, método de fluorescencia química, método de electrón de fluorescencia química, método tipo sándwich, etc.). En cuanto a estos métodos inmunoquímicos, la referencia se puede hacer a, por ejemplo, "Radioimmunoassay" editado por Hiroshi Irie (Kodansha, publicado en 1974), "radioimmunoassay (sequel)" editado por Hiroshi Irie (Kodansha, publicado en 1979), "Enzyme Immunoassay" editado por Eiji Ishikawa et al. (la 3ª edición, Igaku-Shoin, publicado en 1987), "Methods in Enzymology" Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (publicado por Academic Press) y similares.

Ejemplos del anticuerpo anti-S38AA capaces de detectar específicamente S38AA incluyen el anticuerpo anti-S38AA descrito en detalle en el punto "1. Agente para determinar la enfermedad de Alzheimer".

Entonces, basándose en la concentración del fragmento de S38AA detectado, se puede detectar la enfermedad de Alzheimer. Como se muestra en el Ejemplo 2 mencionado más adelante, la concentración del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal de los pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes con enfermedad de Alzheimer presunta es mayor que la de la persona normal, y la concentración del fragmento de S38AA en el plasma es también mayor en pacientes con enfermedad de Alzheimer que en persona normal. Por lo tanto, basándose en la correlación positiva entre la concentración del fragmento de S38AA y la enfermedad de Alzheimer, se puede hacer un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer cuando la concentración del fragmento de S38AA en la muestra es alta.

Además, incluso para personas normales, un grupo portador de ApoE4, el cual es un alelo sensible a enfermedad de Alzheimer (grupo de alto riesgo de enfermedad de Alzheimer), muestra una alta concentración del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal en comparación con un grupo de genotipo homo ApoE3. A la inversa, un grupo portador de ApoE2, el cual es un alelo resistente a la enfermedad de Alzheimer, muestra una concentración baja del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal en comparación con el grupo del genotipo homo ApoE3. Por lo tanto, una alta concentración del fragmento de S38AA en la muestra se puede juzgar que muestra una alta posibilidad de estar afectado por la enfermedad de Alzheimer en el futuro.

El método de determinación de la presente invención puede determinar la enfermedad de Alzheimer con mayor precisión midiendo, además del fragmento de S38AA, la alteración de otros marcadores diagnósticos para la enfermedad de Alzheimer. Ejemplos de otros marcadores diagnósticos para la enfermedad de Alzheimer incluyen marcadores conocidos tales como beta amiloide (A β 40, A β 42), proteína tau fosforilada y similares. Estos se pueden detectar según un método de detección bien conocido convencional.

4. Método para investigar la sustancia capaz de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer

La presente invención también proporciona un método para investigar una sustancia que trata o previene la enfermedad de Alzheimer como se define por las reivindicaciones, el cual comprende evaluar si una sustancia de ensayo suprime la producción de un fragmento de S38AA, y una sustancia obtenible por dicho método. En el método de investigación de la presente invención, una sustancia que regula a la baja la producción de un fragmento de S38AA se selecciona como una sustancia que trata o previene la enfermedad de Alzheimer.

La sustancia de ensayo para someter al método de investigación de la presente invención puede ser cualquier compuesto conocido o nuevo. Ejemplos de esta incluyen ácido nucleico, carbohidrato, lípido, proteína, péptido, compuesto de bajo peso molecular orgánico, biblioteca de compuesto producida usando una técnica química combinatoria, biblioteca de péptidos aleatoria, compuesto natural derivado de microorganismo, animales y plantas, organismo marino, etc., y similares.

El método de investigación de la presente invención comprende las siguientes etapas:

(1) poner en contacto una sustancia de ensayo con una célula permitiendo la medición de la producción de un fragmento de S38AA;

(2) medir la cantidad de producción del fragmento de S38AA en la célula puesta en contacto con la sustancia de ensayo, y comparar la cantidad de producción con la del fragmento de S38AA en una célula control libre de contacto con la sustancia de ensayo; y

(3) seleccionar una sustancia de ensayo que regula a la baja la cantidad de producción del fragmento de S38AA como una sustancia capaz de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, basándose en los resultados de comparación del anteriormente mencionado punto (2).

La "célula" a usar para el método de investigación de la presente invención significa una célula que permite la evaluación del nivel de producción del objeto de medición, un fragmento de S38AA. Ejemplos de la célula incluyen

una célula capaz de producir naturalmente el fragmento de S38AA del objeto de medición, una célula que expresa S38AA capaz de producir un fragmento de S38AA mediante la estimulación, y una célula modificada por ingeniería genética para ser capaz de producir un fragmento de S38AA.

- 5 El objetivo de medición, es decir, la célula capaz de producir naturalmente un fragmento de S38AA, no está particularmente limitado y, como tal célula, se pueden usar una célula cultivada primaria de un mamífero (por ejemplo, ser humano, ratón, etc.), una línea celular inducida a partir de dicha célula cultivada primaria y similares.

- 10 Se sabe que S38AA se expresa en célula U251 y célula SHSY-5Y, y también se expresa en célula BE(2)-C y célula SK-N-MC. Además, una célula modificada por ingeniería genética que sobreexpresa S38AA o S38AA marcado con etiqueta FLAG, etc., y similares también se pueden producir usando una técnica conocida. Mediante el cultivo, S38AA se escinde de la célula que expresa S38AA y se libera el fragmento de S38AA producido. Cuando la cantidad del fragmento de S38AA producido es pequeña, la producción del fragmento de S38AA se puede medir cultivando, como sea apropiado, bajo condiciones que causan fácilmente la escisión de S38AA.

- 15 Ejemplos de las condiciones que causan fácilmente la escisión de S38AA incluyen cultivar en un medio de eliminación de glucosa o un medio que contiene una sustancia conocida para estimular fisiológicamente el cerebro. Ejemplos específicos de tal sustancia incluyen citoquinas tales como $TNF\alpha$, interferón- γ , interleuquina-1, interleuquina-6 y similares, beta amiloide o su agregado y similares.

- 20 La sustancia de ensayo y la célula que permite la medición de la producción de un fragmento de S38AA se ponen en contacto en un medio de cultivo. El medio de cultivo se selecciona apropiadamente según la célula que permite la medición de la producción de un fragmento de S38AA. Sus ejemplos incluyen medio esencial mínimo (MEM), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, del inglés "Dulbecco's modified Eagle médium"), que contienen aproximadamente 5 a 20 % de suero fetal bovino, y similares. Las condiciones de cultivo se determinan apropiadamente de la misma manera. Por ejemplo, el pH del medio es de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, la temperatura de cultivo generalmente es de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 °C, y el tiempo de cultivo es de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 72 horas.

- 25 La cantidad de producción del fragmento de S38AA se puede medir midiendo la cantidad del fragmento de S38AA liberado en el sobrenadante del cultivo celular según el método descrito en el punto de (3. Método para determinar la enfermedad de Alzheimer).

- 30 La cantidad de producción se puede comparar preferiblemente basándose en la presencia o ausencia de una diferencia significativa. La cantidad de producción de un fragmento de S38AA en la célula control libre de contacto con la sustancia de ensayo se puede medir antes o simultáneamente con la medición de la cantidad de producción del fragmento de S38AA en la célula en contacto con la sustancia de ensayo.

Por lo tanto, una sustancia obtenida por comparación que regula a la baja la cantidad de producción del fragmento de S38AA, se selecciona como un agente capaz de tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

- 35 El compuesto obtenido por el método de investigación de la presente invención es útil como sustancia candidata para el desarrollo de un nuevo agente terapéutico o preventivo para la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplos

La presente invención se explica en lo siguiente en referencia a los Ejemplos, los cuales de ninguna manera limitan la presente invención.

Ejemplo de referencia 1. Estudio de la cantidad de expresión de S38AA en tejido cerebral

- 40 Se usó una sección de cerebro conservado en el banco de cerebro sueco (Brain Power), cuyo uso fue permitido por el Comité Ético del "Karolinska Institute". Se partió en rodajas una sección del hipocampo (5 micras de grosor) a partir de un bloque de tejido cerebral fijado con formalina e incrustado en parafina, y se adhirió a un portaobjetos de vidrio. Después de una desparafinización y tratamiento hidrófilo con xileno-alcohol, se recuperó el antígeno calentando a 121 °C durante 25 min en Diva Decloaker (Biocare Medical). Después del enfriamiento, se bloqueó una
45 reacción no específica con suero completo de cabra al 3 % diluido con solución salina tamponada Tris (pH 7,6), y después de eso un anticuerpo anti-S38AA (número de catálogo: HPA024631, Atlas Antibodies) diluido 200 veces con solución salina tamponada con Tris se incubó durante la noche con el espécimen a 4 °C. Después de lavar con solución salina tamponada Tris, el espécimen se incubó con un anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra biotinilado diluido 300 veces, a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eso, para el desarrollo de color, el
50 espécimen se trató con el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) durante 30 min y además con HCl de 3-3-diaminobenzidina-4 (DAB/H₂O₂) para desarrollar color. Para el recuento de la tinción, se usó hematoxilina.

- La Figura 1 muestra una imagen de inmunotinción de una región CA1 del hipocampo representativa de un ejemplo normal, y la Figura 2 muestra una imagen de inmunotinción de una región CA1 del hipocampo representativa de un caso con enfermedad de Alzheimer definitiva. La longitud de la barra en la Figura corresponde a 200 μ m. Como se muestra con las flechas en la Figura 1, las partes profundamente teñidas en la célula muestran fuerte expresión de

S38AA. En el caso de enfermedad de Alzheimer grave, la tinción a penas se encuentra en las células nerviosas. Puesto que el sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-S38AA usado es el dominio extramembranoso de la isoforma 1 de S38AA y la isoforma 2 de S38AA, los resultados muestran un descenso en el dominio extramembranoso de S38AA en la región CA1 del hipocampo en un caso de enfermedad de Alzheimer con diagnóstico definitivo. A partir de estos resultados, está claro que la cantidad de expresión de S38AA desciende drásticamente en el caso de enfermedad de Alzheimer grave.

Ejemplo de Referencia 2. Espectrometría de masas cuantitativa de la proteína S38AA en célula piramidal de CA1 del hipocampo mediante método de marcación con oxígeno pesado

Después de obtener permiso de uso del Comité Ético del "Karolinska Institute", se preparó una sección congelada del cerebro post mortem de pacientes conservado en el banco de cerebro sueco (Brain Power), y las células piramidales de CA1 del hipocampo se recuperaron por un método de captura por láser según el método de Aoki et al. ya publicado (*Neuroreport* (2008) 19:1.085-9).

Las células piramidales de CA1 del hipocampo (cada 12.000 células) se separaron y recogieron de un paciente con enfermedad de Alzheimer definitiva y un paciente sin enfermedad de Alzheimer. Las células recuperadas en un tubo se sometieron a lisis con 1 µl de solución de RapiGest SF (Waters) al 0,5 %, y se incubaron a 95 °C durante 90 min. Después de eso, el disolvente se separó mediante un sistema al vacío centrífugo, además se añadieron solución mezclada de 2 µl de cloruro de calcio 4 mM, RapiGest SF al 1 %, hidrogenocarbonato de sodio 360 mM y 5 µl de agua destilada, y la mezcla se sometió a un tratamiento de sonicación durante 5 min. Para tripsinólisis limitada de una proteína derivada de la célula nerviosa, se añadieron además 3 µl de 0,1 mg/ml de tripsina, y la mezcla se incubó a 37 °C durante 24 horas. Después de eso, se recogió una muestra (1 µl) y se sometió a electroforesis en gel de SDS-PAGE en gradiente del 4 al 12 %, sometido a tinción con plata, y se confirmó la finalización de la degradación limitada. La muestra de degradación limitada derivada del paciente con enfermedad de Alzheimer definitiva se marcó con oxígeno pesado. Los detalles del método están descritos a continuación.

Después de la tripsinólisis limitada, se añadió ácido clorhídrico concentrado (3 µl) a RapiGest SF químicamente degradado. El producto de degradación resultante se precipitó mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min, y se separó el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se adsorbió a la columna ZipTipC₁₈ (Millipore), se lavó tres veces con solución de ácido fórmico al 0,3 %, y se purificó eluyendo con solución de acetonitrilo al 80 %/ácido fórmico al 0,3 %. El disolvente en la muestra purificada se separó mediante un sistema al vacío centrífugo, y el residuo se disolvió de nuevo en solución de deuterio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2, 1,7 µl), cloruro de calcio 50 mM (1 µl) y agua con oxígeno pesado (47,3 µl). Se añadió a la misma 0,5 mg/ml de tripsina (Trypsin Gold, Promega, 1 µl) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 48 horas. Para parar la reacción de marcaje, se añadió solución de ácido fórmico al 5 % (8 µl) diluida con agua con oxígeno pesado y la mezcla se incubó a 95 °C durante 90 min. La muestra final se conservó a -80 °C. Aunque la muestra derivada del paciente sin enfermedad de Alzheimer se trató de la misma manera que la muestra derivada del paciente con enfermedad de Alzheimer definitiva, se usó agua destilada en lugar de agua con oxígeno pesado. Inmediatamente antes de llevar a cabo la espectrometría de masas, una cantidad igual de 20 µl de cada una de la muestra con oxígeno pesado derivada del paciente con enfermedad de Alzheimer definitiva y la muestra derivada del paciente sin enfermedad de Alzheimer se mezclaron, y se inyectaron a una columna de análisis (Zorbax 300SB, 0,1x150 mm, Agilent Technologies Inc.). Como fase móvil para el análisis, se usaron ácido acético al 0,1 % (fase móvil A) y ácido acético al 0,1 %-metanol (fase móvil B), en donde se usó un programa de gradiente de incrementar la concentración de la fase móvil B linealmente desde 5 % a 75 % durante 90 min, y después de eso mantener igual en la fase móvil B al 95 % durante 10 min. Como espectrómetro de masas, se usó Thermo Fisher, sistema LTQ-Orbitrap. El intervalo de medición de masas se fijó a 400 a 2.000 m/z. Usando los datos obtenidos, el péptido se identificó mediante el programa informático Mascot versión 2.2 y la base de datos Swiss-Prot (versión 55), y además, cuantitativamente se analizó por el programa informático Xome (Mitsui Knowledge Industry Co., Ltd.). El parámetro de análisis en el programa informático Mascot es como sigue. La masa monoisotópica se usó para el análisis, la tolerancia de masa peptídica se fijó en 10 ppm y la tolerancia de la MS/MS iónica del fragmento se fijó en 0,8 Da. Como enzima digestiva, se especificó la tripsina, y el número de escisión perdida se fijó en 1 como máximo. El objetivo de análisis era solo el marcador doble de C-terminal, y se permitió la oxidación de metionina.

Según el análisis de proteoma anteriormente mencionado, S38AA se identificó con éxito. Además, la diferencia en la cantidad de expresión de S38AA se estudió entre pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y pacientes sin enfermedad de Alzheimer (control) (Tabla 1). La secuencia identificada por la investigación peptídica MASCOT corresponde al dominio extramembranoso de la isoforma 1 de S38AA (la región de aminoácidos del 761° al 770° de la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2), y la identificación peptídica era estadísticamente significativa.

La cantidad del dominio extramembranoso de S38AA en las células piramidales descendió a 1/20 en pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con el control sin enfermedad de Alzheimer. El sitio de reconocimiento del anticuerpo usado en el estudio inmunohistológico era un dominio extramembranoso, y puesto que la cantidad de expresión también descendió incluso en ese caso, los resultados se igualaron con aquellos del estudio inmunohistológico. Es decir, está claro que al menos el dominio extramembranoso de S38AA desciende en las células nerviosas de la región CA1 del hipocampo en la enfermedad de Alzheimer

Tabla 1

Relación de la cantidad de expresión de paciente con la enfermedad de Alzheimer/ paciente sin la enfermedad de Alzheimer	Secuencia peptídica identificada	Nivel de significancia de la identificación
0,053	GQEAPGKAR (SEQ ID NO: 3)	0,032

Ejemplo 1. Detección y predicción del peso molecular del fragmento de S38AA en fluido cerebroespinal

Se usaron los fluidos cerebroespinales de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (10 casos, puntuación patológica 9 a 12: puntuación patológica en el banco de cerebros suecos), enfermedad de Alzheimer presunta (6 casos, puntuación patológica 3 a 7) y normal (11 casos, puntuación patológica 0 a 4). La puntuación se realizó según el método de evaluación de Alafuzoff et al. (*Acta Neuropathol.* (Berl) (1987) 74:209-225). La determinación de la patología se realizó teniendo en consideración la puntuación patológica y el examen ante mortem por los médicos. La muestra de SDS se preparó añadiendo 1 volumen de un tampón de muestra LDS (Invitrogen) por 3 volúmenes de fluido cerebroespinal y calentando la mezcla a 70 °C durante 10 min. Usando la muestra preparada (10 µl), S38AA se separó en gel de SDS-PAGE en gradiente del 4 al 12 %. Después de eso, usando el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories), se transfirió la proteína total separada a membrana PVDF, y se aplicó a la etapa de tinción por anticuerpo. Antes de la detección de S38AA con el anticuerpo, la membrana PVDF se bloqueó de las reacciones no específicas con solución salina tamponada con fosfato que contenía leche desnatada al 5 % (pH 7,4) a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo primario (número de catálogo: HPA024631, Atlas Antibodies) se diluyó 1.000 veces con solución salina tamponada con fosfato y se incubó a 4 °C durante la noche. Después de eso, la membrana se incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con HRP (GE healthcare) diluido 50.000 veces a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó suficientemente y se trató con SuperSignal (marca registrada) West Dura (Thermo Fisher Scientific) para permitir el desarrollo de color.

Una señal derivada del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal se pudo detectar mediante transferencia Western, y se encontró que su intensidad tendía a incrementarse en la enfermedad de Alzheimer (Figura 4). El peso molecular detectado era de 76 a 102 kDa, que correspondía a la longitud total de la isoforma 2 de S38AA. Sin embargo, la isoforma 2 es una proteína diez-transmembrana que tiene una posibilidad considerablemente baja de que la proteína de longitud completa secrete en el fluido cerebroespinal. Por lo tanto, se examinó la posibilidad de escisión parcial y secreción de S38AA.

La secuencia de aminoácidos de la isoforma 1 de S38AA se obtuvo a partir de la información registrada de la base de datos de UniProtKB. La región extramembrana se predijo usando el programa informático TMHMM, y la región extramembrana prevista obtenida se muestra en un recuadro (Figura 3). La región extramembrana consistía en 721 aminoácidos desde el 399° al 1.119° y el peso molecular se calculó que era de aproximadamente 76 kDa. Por otro lado, se estimó que el peso molecular de S38AA en el fluido cerebroespinal era de aproximadamente 76 a 102 kDa mediante transferencia Western (Figura 4), lo cual casi se igualaba con el tamaño de peso molecular asumido de la región extramembrana. A partir del aspecto del peso molecular, se sugirió que la S38AA detectada en el fluido cerebroespinal era un (poli) péptido (fragmento de S38AA) que contenía el dominio extramembranoso de la isoforma 1.

Ejemplo 2. Antecedentes del paciente, análisis cuantitativo del fragmento de S38AA en fluido cerebroespinal y correlación con el alelo APOE

Para el análisis cuantitativo, los fluidos cerebroespinales de varios casos se mezclaron con antelación, y se usaron como el fluido cerebroespinal patrón para todos los análisis. Todas las muestras se trataron de la misma manera, y se dibujó una curva patrón para cada gel de SDS-PAGE. La transferencia Western para el análisis cuantitativo del fragmento de S38AA se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 1. La intensidad de señal derivada del anticuerpo S38AA se analizó en imagen por el analizador de imagen LAS3000 (Fujifilm Corp.) y se cuantificó usando el programa informático MultiGauge V3.0 (Fujifilm Corp.). Cada intensidad de señal se normalizó mediante la curva patrón preparada a partir del fluido cerebroespinal patrón transferido simultáneamente sobre cada membrana.

En cuanto a los antecedentes del paciente, los números de paciente específicos se concedieron en el presente ensayo desde el aspecto de protección de la información personal, la cual no correspondía con los números de referencia usados por el banco de cerebro sueco. El genotipo APOE se analizó según el manual de procedimiento estándar del banco de cerebro sueco. Se conocía el genotipo para los pacientes de los 27 casos (Tabla 2) y el análisis se realizó usando el mismo.

Tabla 2

Clasificación de la gravedad de la enfermedad de Alzheimer	Nº Paciente	Diagnóstico	Puntuación	Alelo ApoE
normal	1	Sin enfermedad de Alzheimer	01	3/3
	2	Sin enfermedad de Alzheimer	04	2/3
	3	Sin enfermedad de Alzheimer	02	2/3
	4	Sin enfermedad de Alzheimer	00	3/4
	5	Sin enfermedad de Alzheimer	00	3/3
	6	Sin enfermedad de Alzheimer	01	3/3
	7	Sin enfermedad de Alzheimer	04	3/4
	8	Sin enfermedad de Alzheimer	02	3/3
	9	Sin enfermedad de Alzheimer	00	2/3
	10	Sin enfermedad de Alzheimer	00	2/3
	11	Sin enfermedad de Alzheimer	00	3/3
leve o moderada	12	enfermedad de Alzheimer presunta	06	3/4
	13	enfermedad de Alzheimer presunta	03	3/3
	14	enfermedad de Alzheimer presunta	07	3/4
	15	enfermedad de Alzheimer presunta	07	3/4
	16	enfermedad de Alzheimer presunta	07	3/3
	17	enfermedad de Alzheimer presunta	ND	3/3
grave	18	Enfermedad de Alzheimer definitiva	10	3/3
	19	Enfermedad de Alzheimer definitiva	10	3/4
	20	Enfermedad de Alzheimer definitiva	12	3/4
	21	Enfermedad de Alzheimer definitiva	11	3/4
	22	Enfermedad de Alzheimer definitiva	10	3/4
	23	Enfermedad de Alzheimer definitiva	11	4/4
	24	Enfermedad de Alzheimer definitiva	09	4/4
	25	Enfermedad de Alzheimer definitiva	09	3/4
	26	Enfermedad de Alzheimer definitiva	10	3/4
	27	Enfermedad de Alzheimer definitiva	ND	4/4

ND: no determinado

puntuación: método de evaluación de Alafuzoff et al. (*Acta Neuropathol* (1987) 74:209-225).

- 5 Como se muestra en la Figura 5, está claro que la cantidad del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal se incrementa en la enfermedad de Alzheimer, y la cantidad del fragmento de S38AA tiende a incrementarse incluso en pacientes con enfermedad de Alzheimer presunta. Esto muestra que el fragmento de S38AA se incrementa desde las fases tempranas o preclínicas de la enfermedad de Alzheimer, y se observa un claro incremento en pacientes con enfermedad de Alzheimer definitiva.

Todos los pacientes se clasificaron por el genotipo APOE (4 tipos de ApoE2/3, ApoE3/3, ApoE3/4, ApoE4/4; véase

la Tabla 2), y la cantidad de S38AA en el fluido cerebroespinal de cada grupo se muestra en una gráfica (Figura 6). La cantidad del fragmento de S38AA notablemente se incrementó particularmente en los pacientes homocigotos (ApoE4/4) que tenían ApoE4. ApoE4 es un gen de riesgo de aparición de la enfermedad de Alzheimer, y ApoE2 se considera que es un factor de resistencia de la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Es decir, la Figura 6 muestra que los factores de riesgo de aparición de la enfermedad de Alzheimer del genotipo APOE y la cantidad del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal están correlacionados.

En cuanto a la relación entre la cantidad del fragmento de S38AA en 11 pacientes sin enfermedad de Alzheimer y el genotipo APOE, la cantidad del fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal se incrementó en el orden de ApoE2/3, ApoE3/3 y ApoE3/4, como se muestra en la Figura 7.

Estas correlaciones indican que S38AA en el fluido cerebroespinal está correlacionada con el riesgo de la aparición de la enfermedad de Alzheimer en el futuro, y además sugiere que S38AA tiene una posibilidad de ser un biomarcador para estimar el riesgo de la aparición de la enfermedad de Alzheimer en el futuro incluso en pacientes con enfermedad de Alzheimer preclínica. Aunque se considere que la detección temprana y el inicio de un tratamiento temprano son importantes en la enfermedad de Alzheimer, no se ha encontrado un marcador diagnóstico capaz de la detección temprana de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, la detección de la enfermedad de Alzheimer presunta es extremadamente útil.

Ejemplo 3. Confirmación de que el fragmento de S38AA en el fluido cerebroespinal contiene la región extramembrana de S38AA

(1) Confirmación del fragmento de S38AA basándose en el anticuerpo usado para la inmunoprecipitación

Un anticuerpo anti-S38AA (HPA023161 o HPA021374, Atlas Antibodies, 2 µl) para la inmunoprecipitación se añadió al fluido cerebroespinal (500 µl) derivado del paciente con enfermedad de Alzheimer y la mezcla se incubó durante 20 horas a 4 °C, y después de eso se incubó junto con ProteinG Mag Sepharose (GE healthcare) durante 1 hora a 4 °C, de ese modo se inmunoprecipitó un fragmento de S38AA. Después de eso, se añadió tampón de muestra LDS (Invitrogen, 10 µl) a perlas magnéticas para dar una muestra para SDS-PAGE (fracción unida a ProteinG Mag Sepharose). Además, se tomó 9 µl de la fracción sobrenadante libre de precipitación por ProteinG Mag Sepharose, y el tampón de muestra LDS (3 µl) se añadió para dar una muestra de una fracción no unida (fracción no unida a ProteinG Mag Sepharose).

Después de realizar la SDS-PAGE de la misma manera que en el Ejemplo 1, se realizó transferencia Western usando HPA024631 como anticuerpo primario.

Como resultado, en tanto HPA023161 como HPA021374 usado para inmunoprecipitación, se pudo detectar un inmunoprecipitado que tenía un peso molecular similar al encontrado en el fluido cerebroespinal mediante transferencia Western (Figura 8: línea unido). Por otro lado, el fragmento de S38AA no se detectó en el sobrenadante del inmunoprecipitado (Figura 8: línea no unido).

Puesto que las secuencias de aminoácidos de los péptidos usados para la producción de los anticuerpos de HPA023161 y HPA021374 eran

MKPKQVSRDLGLAADLPGGAEGAAAQPVAVLRQPELRVISDGEQGGQGHRLDHGGHLEMRKA (SEQ ID NO: 4; correspondiente a la región de aminoácidos del 926° al 988° en la SEQ ID NO: 2) y

PVPFHDKVVVDEGQDREVPEENKPPSRHAGGKAPGVQGMAPPPLPDSEREKQEPEQGEVVGKRP
QAQALEEAGDLPEDPQKVPEADGQPA

(SEQ ID NO: 5; correspondiente a la región de aminoácidos del 500° al 588° en la SEQ ID NO: 2), respectivamente, se ha demostrado que al menos el fragmento de S38AA en el cordón cerebroespinal contiene una secuencia de aminoácidos que es una parte de estas secuencias de dominio extramembranoso de S38AA.

(2) Confirmación del fragmento de S38AA por análisis por MS por corte aleatorio ("shotgun")

Para mostrar que la muestra de inmunoprecipitación del Ejemplo 3(1) contiene el dominio extramembranoso de S38AA, agua MilliQ (90 µl), tampón Tris 1 M (pH 8, 5 µl), urea (48 mg) y ditiotretol 0,5 M (1 µl) se añadieron a los dos tipos de muestras de inmunoprecipitación, y las mezclas se incubaron a 30 °C durante 2 horas. Después de eso, se añadió yodoacetamida 0,5 M (2 µl), y la mezcla se trató a una temperatura ambiente durante 1 hora para someter a alquilación el resto tiol. Después de eso, se añadió carbonato de amonio 50 mM (750 µl), se añadió tripsina (Promega, 2 µg), y la mezcla se incubó a 37 °C durante la noche para dar una digestión triptica. La digestión triptica obtenida se trató con ácido trifluoroacético para disminuir el pH a 1 a 2, y se purificó por columna TopTip200 (Glygen Corp.) según el manual de funcionamiento.

La digestión triptica inmunoprecipitada por HPA023161 o HPA021374 se disolvió en solución de ácido trifluoroacético al 0,1 % (20 µl), y 5 µl del mismo se inyectó en una columna de análisis (Zorbax 300SB, 0,1x150 mm,

Agilent Technologies). Para la fase móvil del análisis, se usaron ácido fórmico al 0,1 % (fase móvil A) y ácido fórmico al 0,1 %-metanol (fase móvil B). Se usó un programa de gradiente de incrementar la concentración de la fase móvil B linealmente de 5 % a 75 % durante 30 min, y después de eso a fase móvil B al 98 % (31 min), y mantener durante 5 min (36 min). El espectrómetro de masas usado era Thermo Fisher, LTQ velos sistema. El intervalo de medición de masas se fijó a 400 a 1.400 m/z. Usando los datos obtenidos, el péptido se identificó usando el programa informático Mascot versión 2.2 y la base de datos de Swiss-Prot (20110804).

Las condiciones de parámetro de análisis en el programa informático Mascot eran las siguientes:

se seleccionó masa monoisotópica

tolerancia de masa peptídica: 15 Da

tolerancia de MS/MS iónica del fragmento: 0,8 Da

enzima digestiva: se especificó la tripsina

número de escisión perdida: 1 como máximo

oxidación de metionina: permitida

Como resultado del análisis por MS por corte aleatorio ("shotgun") de los inmunoprecipitados por HPA023161 y HPA021374, se pudo identificar un total de 6 secuencias peptídicas derivadas del dominio extramembranoso de S38AA (Figura 3, parte subrayada, SEQ ID NO: 6-11). Por lo tanto, se ha demostrado que los inmunoprecipitados ciertamente contienen el dominio extramembranoso de S38AA

Ejemplo 4. Detección y predicción del peso molecular del fragmento de S38AA en plasma

Si también se puede detectar o no el fragmento de S38AA se estudió en plasma humano. El plasma con heparina se separó de pacientes con enfermedad de Alzheimer y pacientes sin enfermedad de Alzheimer. Se colocaron perlas magnéticas de separación de albumina PureProteoma (Millipore, 500 µl) y ProteinG Mag Sepharose (GE healthcare, 60 µl) en un tubo Eppendorf, y se lavó con solución salina tamponada. Después de eso, el plasma (20 µl) y la solución salina tamponada con fosfato (60 µl) se añadieron a las perlas magnéticas mezcladas, y la mezcla se incubó a 4 °C durante 2 horas. Se confirmó por SDS-PAGE que el plasma obtenido estaba libre de albúmina e inmunoglobulina. A esta muestra (60 µl) se añadió el tampón de muestra LDS (Invitrogen, 20 µl) para dar una muestra para SDS-PAGE, la cual se analizó por transferencia Western usando HPA024631 como anticuerpo primario de la misma manera que en el Ejemplo 3 anteriormente mencionado.

Como resultado, se encontró un banda considerada por tener el mismo peso molecular que el del fluido cerebroespinal como se muestra en la Figura 9, y la cantidad de la correspondiente banda incrementada en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, el fragmento de S38AA también está presente en plasma humano, y se aclaró que la cantidad del fragmento de S38AA en plasma se incrementa en pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con la persona normal.

Ejemplo 5. Ejemplo de detección 1 del fragmento de S38AA producido en el sobrenadante de la célula cultivada

Se cultivaron célula BE(2)-C, célula SK-N-MC, célula SHSY-5Y y célula SHSY-5Y (APP) (línea celular obtenida mediante la introducción del gen APP humano en célula SHSY-5Y) en D-MEM (Invitrogen) que contenía suero fetal bovino al 10 % durante 2 días, y después de eso, se recuperó el medio. Se cultivó célula nerviosa primaria fetal de rata en medio Neurobasal (Invitrogen) que contenía B27 durante 7 días, y el medio se recuperó. El anticuerpo HPA021374 se añadió a cada medio recuperado (1 ml), y la mezcla se incubó a 4 °C durante 20 horas. Después de eso, se añadió ProteinG Mag Sepharose (30 µl) y la mezcla se incubó a 4 °C durante 2 horas. Las perlas magnéticas se lavaron con PBS(-), y se añadió tampón de muestra LDS (20 µl) diluido 4 veces para dar una muestra para SDS-PAGE. De la misma manera que en el Ejemplo 3 anteriormente mencionado, la muestra se analizó mediante transferencia Western usando HPA024631 como un anticuerpo primario.

Como resultado, se observó una banda considerada por tener el mismo peso molecular que el del fluido cerebroespinal y el plasma. Por lo tanto, se ha aclarado que la escisión de S38AA, principalmente, la producción y secreción del fragmento de S38AA, también se puede detectar en células cultivadas y células cultivadas primarias de rata, igual que la célula nerviosa humana.

Ejemplo 6. Ejemplo de detección 2 del fragmento de S38AA producido en el sobrenadante de la célula cultivada

Se construyó un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN añadida con etiqueta Flag (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 12) al C-terminal de S38AA, y se introdujo en la célula SHSY-5Y. Después de 48 horas, el medio se recuperó (75 µl), y el tampón de muestra LDS (25 µl) se añadió para dar una muestra para SDS-PAGE. Esta vez, la

muestra se analizó mediante transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal anti-Flag M2 (Sigma-Aldrich Corp.) como anticuerpo primario.

- 5 Como resultado, se pudo detectar una banda considerada por tener el mismo peso molecular que el del fluido cerebroespinal y el plasma sin inmunoprecipitación, distinta del Ejemplo 5. Por lo tanto, se ha aclarado que la introducción de gen permite la detección más fácil del fragmento de S38AA incluso en el sobrenadante de cultivo de las células cultivadas.

Aplicabilidad industrial

- 10 Según la presente invención, se puede proporcionar un método de determinación de la enfermedad de Alzheimer, el cual puede determinar no solamente los pacientes afectados con la enfermedad de Alzheimer sino también los pacientes que tiene un riesgo alto de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en el futuro.

Además, según la presente invención, se puede proporcionar un método de investigación de una sustancia que trata o previene la enfermedad de Alzheimer.

Lista de secuencias

- <110> Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.
- 15 <120> Reactivo de diagnóstico y método de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer
- <130> 091796
- <150> JP 2010-293891
- <151> 2010-12-28
- <160> 12
- 20 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 4303
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- 25 <220>
- <221> CDS
- <222> (376)..(3735)
- <400> 1

ES 2 689 753 T3

cgccgcggcg gcagctgagt tgggctgagg tgtccctagc tggtctcgcg gctcttcggg	60
gtctgggctc ggagattcac aggcggcccc cgaggccgag cgagggacgc atggccctga	120
ggcggccgca gggcttggcg gggcccgag gttagacctc ccccgcgagc cggccttcga	180
ggctgcctcc tccaggcagc ctctggggcc cgcgcccgcg cctgctcagg ctcccgtgtt	240
caggctgccc atccccctcc caccggcgtc ccggacgttg ggacctgtga ccgtggcctc	300
gggctgggct tccaaagccg gccgcagccc ggcgaccccc gaggcctctc gccccgggcc	360
cctagacctc tcaact atg acc gcg gcc gcc gcc tcc aac tgg ggg ctg atc	411
Met Thr Ala Ala Ala Ala Ser Asn Trp Gly Leu Ile	
1 5 10	
acg aac atc gtg aac agc atc gta ggg gtc agt gtc ctc acc atg ccc	459
Thr Asn Ile Val Asn Ser Ile Val Gly Val Ser Val Leu Thr Met Pro	
15 20 25	
ttc tgc ttc aaa cag tgc ggc atc gtc ctg ggg gcg ctg ctc ttg gtc	507
Phe Cys Phe Lys Gln Cys Gly Ile Val Leu Gly Ala Leu Leu Leu Val	
30 35 40	
ttc tgc tca tgg atg acg cac cag tcg tgc atg ttc ttg gtg aag tcg	555
Phe Cys Ser Trp Met Thr His Gln Ser Cys Met Phe Leu Val Lys Ser	
45 50 55 60	
gcc agc ctg agc aag cgg agg acc tac gcc ggc ctg gca ttc cac gcc	603
Ala Ser Leu Ser Lys Arg Arg Thr Tyr Ala Gly Leu Ala Phe His Ala	
65 70 75	
tac ggg aag gca ggc aag atg ctg gtg gag acc agc atg atc ggg ctg	651
Tyr Gly Lys Ala Gly Lys Met Leu Val Glu Thr Ser Met Ile Gly Leu	
80 85 90	
atg ctg ggc acc tgc atc gcc ttc tac gtc gtg atc ggc gac ttg ggg	699

ES 2 689 753 T3

Met	Leu	Gly	Thr	Cys	Ile	Ala	Phe	Tyr	Val	Val	Ile	Gly	Asp	Leu	Gly	
	95						100					105				
tcc	aac	ttc	ttt	gcc	cgg	ctg	ttc	ggg	ttt	cag	gtg	ggc	ggc	acc	ttc	747
Ser	Asn	Phe	Phe	Ala	Arg	Leu	Phe	Gly	Phe	Gln	Val	Gly	Gly	Thr	Phe	
	110					115					120					
cgc	atg	ttc	ctg	ctg	ttc	gcc	gtg	tcg	ctg	tgc	atc	gtg	ctc	ccg	ctc	795
Arg	Met	Phe	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Ser	Leu	Cys	Ile	Val	Leu	Pro	Leu	
125					130					135					140	
agc	ctg	cag	cgg	aac	atg	atg	gcc	tcc	atc	cag	tcc	ttc	agc	gcc	atg	843
Ser	Leu	Gln	Arg	Asn	Met	Met	Ala	Ser	Ile	Gln	Ser	Phe	Ser	Ala	Met	
				145					150					155		
gcc	ctc	ctc	ttc	tac	acc	gtg	ttc	atg	ttc	gtg	atc	gtg	ctc	tcc	tct	891
Ala	Leu	Leu	Phe	Tyr	Thr	Val	Phe	Met	Phe	Val	Ile	Val	Leu	Ser	Ser	
			160					165					170			
ctc	aag	cac	ggc	ctc	ttc	agt	ggg	cag	tgg	ctg	cgg	cgg	gtc	agc	tac	939
Leu	Lys	His	Gly	Leu	Phe	Ser	Gly	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg	Val	Ser	Tyr	
	175						180					185				
gtc	cgc	tgg	gag	ggc	gtc	ttc	cgc	tgc	atc	ccc	atc	ttc	ggc	atg	tcc	987
Val	Arg	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Arg	Cys	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Met	Ser	
	190					195					200					
ttc	gcc	tgc	cag	tcc	cag	gtg	ctg	ccc	acc	tac	gac	agc	ctg	gat	gag	1035
Phe	Ala	Cys	Gln	Ser	Gln	Val	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	
205					210					215					220	
ccg	tca	gtg	aaa	acc	atg	agc	tcc	ata	ttt	gct	tcc	tcc	ctt	aat	gtg	1083
Pro	Ser	Val	Lys	Thr	Met	Ser	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	
				225					230					235		
gtc	acc	acc	ttc	tac	gtc	atg	gtg	ggg	ttt	ttc	ggc	tac	gtc	agc	ttc	1131
Val	Thr	Thr	Phe	Tyr	Val	Met	Val	Gly	Phe	Phe	Gly	Tyr	Val	Ser	Phe	
			240					245					250			
acc	gag	gcc	acg	gcc	ggc	aac	gtg	ctc	atg	cac	ttt	ccc	tcc	aac	ctg	1179
Thr	Glu	Ala	Thr	Ala	Gly	Asn	Val	Leu	Met	His	Phe	Pro	Ser	Asn	Leu	
		255				260					265					
gtg	acg	gag	atg	ctc	cgt	gtg	ggc	ttc	atg	atg	tca	gtg	gct	gtg	ggc	1227
Val	Thr	Glu	Met	Leu	Arg	Val	Gly	Phe	Met	Met	Ser	Val	Ala	Val	Gly	
	270					275					280					
ttc	ccc	atg	atg	atc	ctg	cca	tgc	agg	cag	gcc	ctg	agc	acg	ctg	ctg	1275
Phe	Pro	Met	Met	Ile	Leu	Pro	Cys	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	
285					290					295					300	
tgt	gag	cag	cag	caa	aaa	gat	ggc	acc	ttt	gca	gca	ggg	ggc	tac	atg	1323
Cys	Glu	Gln	Gln	Gln	Lys	Asp	Gly	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Gly	Tyr	Met	
				305					310					315		
ccc	cct	ctc	cgg	ttt	aaa	gca	ctt	acc	ctc	tct	gtg	gtg	ttt	gga	acc	1371
Pro	Pro	Leu	Arg	Phe	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Val	Phe	Gly	Thr	
			320					325					330			
atg	gtt	ggt	ggc	atc	ctt	atc	ccc	aac	gtg	gag	acc	atc	ctg	ggc	ctc	1419
Met	Val	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Pro	Asn	Val	Glu	Thr	Ile	Leu	Gly	Leu	
		335					340					345				

ES 2 689 753 T3

aca gga gcg acc atg gga agc ctc atc tgc ttc atc tgc ccg gcg ctg Thr Gly Ala Thr Met Gly Ser Leu Ile Cys Phe Ile Cys Pro Ala Leu 350 355 360	1467
atc tac aag aaa atc cac aag aac gca ctt tcc tcc cag gtg gtg ctg Ile Tyr Lys Lys Ile His Lys Asn Ala Leu Ser Ser Gln Val Val Leu 365 370 375 380	1515
tgg gtc ggc ctg ggc gtc ctg gtg gtg agc act gtc acc aca ctg tct Trp Val Gly Leu Gly Val Leu Val Val Ser Thr Val Thr Thr Leu Ser 385 390 395	1563
gtg agc gag gag gtc ccc gag gac ttg gca gag gaa gcc cct ggc ggc Val Ser Glu Glu Val Pro Glu Asp Leu Ala Glu Glu Ala Pro Gly Gly 400 405 410	1611
cgg ctt gga gag gcc gag ggt ttg atg aag gtg gag gca gcg cgg ctc Arg Leu Gly Glu Ala Glu Gly Leu Met Lys Val Glu Ala Ala Arg Leu 415 420 425	1659
tca gcc cag gat ccg gtt gtg gcc gtg gct gag gat ggc cgg gag aag Ser Ala Gln Asp Pro Val Val Ala Val Ala Glu Asp Gly Arg Glu Lys 430 435 440	1707
ccg aag ctg ccg aag gag aga gag gag ctg gag cag gcc cag atc aag Pro Lys Leu Pro Lys Glu Arg Glu Glu Leu Glu Gln Ala Gln Ile Lys 445 450 455 460	1755
ggg ccc gtg gat gtg cct gga cgg gaa gat ggc aag gag gca ccg gag Gly Pro Val Asp Val Pro Gly Arg Glu Asp Gly Lys Glu Ala Pro Glu 465 470 475	1803
gag gca cag ctc gat cgc cct ggg caa ggg att gct gtg cct gtg ggc Glu Ala Gln Leu Asp Arg Pro Gly Gln Gly Ile Ala Val Pro Val Gly 480 485 490	1851
gag gcc cac cgc cac gag cct cct gtt cct cac gac aag gtg gtg gta Glu Ala His Arg His Glu Pro Pro Val Pro His Asp Lys Val Val Val 495 500 505	1899
gat gaa ggc caa gac cga gag gtg cca gaa gag aac aaa cct cca tcc Asp Glu Gly Gln Asp Arg Glu Val Pro Glu Glu Asn Lys Pro Pro Ser 510 515 520	1947
aga cac gcg ggc gga aag gct cca ggg gtc cag ggc cag atg gcg ccg Arg His Ala Gly Gly Lys Ala Pro Gly Val Gln Gly Gln Met Ala Pro 525 530 535 540	1995
cct ctg ccc gac tca gaa aga gag aaa caa gag ccg gag cag gga gag Pro Leu Pro Asp Ser Glu Arg Glu Lys Gln Glu Pro Glu Gln Gly Glu 545 550 555	2043
gtt ggg aag agg cct gga cag gcc cag gcc ttg gag gag gcg ggt gat Val Gly Lys Arg Pro Gly Gln Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ala Gly Asp 560 565 570	2091
ctt cct gaa gat ccc cag aaa gtt cca gaa gca gat ggt cag cca gct Leu Pro Glu Asp Pro Gln Lys Val Pro Glu Ala Asp Gly Gln Pro Ala 575 580 585	2139
gtc cag cct gca aag gag gac ctg ggg cca gga gac agg ggc ctg cat Val Gln Pro Ala Lys Glu Asp Leu Gly Pro Gly Asp Arg Gly Leu His 590 595 600	2187

ES 2 689 753 T3

cct cgg ccc cag gca gtg ctg tct gag cag cag aac ggc ctg gcg gtg Pro Arg Pro Gln Ala Val Leu Ser Glu Gln Gln Asn Gly Leu Ala Val 605 610 615 620	2235
ggg gga ggg gaa aag gcc aag ggg gga ccg ccg cca ggc aac gcc gcc Gly Gly Gly Glu Lys Ala Lys Gly Gly Pro Pro Pro Gly Asn Ala Ala 625 630 635	2283
ggg gac aca ggg cag ccc gca gag gac agc gac cac ggt ggg aag cct Gly Asp Thr Gly Gln Pro Ala Glu Asp Ser Asp His Gly Gly Lys Pro 640 645 650	2331
ccc ctc cca gcg gag aag ccg gct cca ggg cct ggg ctg ccg ccc gag Pro Leu Pro Ala Glu Lys Pro Ala Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro Glu 655 660 665	2379
cct cgc gag cag agg gac gtg gag cga gcg ggt gga aac cag gcg gcc Pro Arg Glu Gln Arg Asp Val Glu Arg Ala Gly Gly Asn Gln Ala Ala 670 675 680	2427
agc cag ctg gag gaa gct ggc agg gcg gag atg ctg gac cac gcc gtc Ser Gln Leu Glu Glu Ala Gly Arg Ala Glu Met Leu Asp His Ala Val 685 690 695 700	2475
ctg ctt cag gtg atc aaa gaa cag cag gtg cag caa aag cgc ttg ctg Leu Leu Gln Val Ile Lys Glu Gln Gln Val Gln Gln Lys Arg Leu Leu 705 710 715	2523
gac cag cag gag aag ctg ctg gcg gtg atc gag gag cag cac aag gag Asp Gln Gln Glu Lys Leu Leu Ala Val Ile Glu Glu Gln His Lys Glu 720 725 730	2571
atc cac cag cag agg cag gag gac gag gag gat aaa ccc agg cag gtg Ile His Gln Gln Arg Gln Glu Asp Glu Glu Asp Lys Pro Arg Gln Val 735 740 745	2619
gag gtg cat caa gag ccc ggg gca gcg gtg ccc aga ggc cag gag gcc Glu Val His Gln Glu Pro Gly Ala Ala Val Pro Arg Gly Gln Glu Ala 750 755 760	2667
cct gaa ggc aag gcc agg gag acg gtg gag aat ctg cct ccc ctg cct Pro Glu Gly Lys Ala Arg Glu Thr Val Glu Asn Leu Pro Pro Leu Pro 765 770 775 780	2715
ttg gac cct gtc ctc aga gct cct ggg ggc cgc cct gct cca tcc cag Leu Asp Pro Val Leu Arg Ala Pro Gly Arg Pro Ala Pro Ser Gln 785 790 795	2763
gac ctt aac cag cgc tcc ctg gag cac tct gag ggg cct gtg ggc aga Asp Leu Asn Gln Arg Ser Leu Glu His Ser Glu Gly Pro Val Gly Arg 800 805 810	2811
gac cct gct ggc cct cct gac ggc ggc cct gac aca gag cct cgg gca Asp Pro Ala Gly Pro Pro Asp Gly Gly Pro Asp Thr Glu Pro Arg Ala 815 820 825	2859
gcc cag gcc aag ctg aga gat ggc cag aag gat gcc gcc ccc agg gca Ala Gln Ala Lys Leu Arg Asp Gly Gln Lys Asp Ala Ala Pro Arg Ala 830 835 840	2907
gct ggc act gtg aag gag ctc ccc aag ggc ccg gag cag gtg ccc gtg Ala Gly Thr Val Lys Glu Leu Pro Lys Gly Pro Glu Gln Val Pro Val 845 850 855 860	2955

ES 2 689 753 T3

845	850	855	860	
cca gac ccc gcc agg gaa gcc ggg ggc cca gag gag cgc ctc gca gag Pro Asp Pro Ala Arg Glu Ala Gly Gly Pro Glu Glu Arg Leu Ala Glu 865 870 875				3003
gaa ttc cct ggg caa agt cag gac gtt act ggc ggt tcc caa gac agg Glu Phe Pro Gly Gln Ser Gln Asp Val Thr Gly Gly Ser Gln Asp Arg 880 885 890				3051
aaa aaa cct ggg aag gag gtg gca gcc act ggc acc agc att ctg aag Lys Lys Pro Gly Lys Glu Val Ala Thr Gly Thr Ser Ile Leu Lys 895 900 905				3099
gaa gcc aac tgg ctc gtg gca ggg cca gga gca gag acg ggg gac cct Glu Ala Asn Trp Leu Val Ala Gly Pro Gly Ala Glu Thr Gly Asp Pro 910 915 920				3147
cgc atg aag ccc aag caa gtg agc cga gac ctg ggc ctt gca gcg gac Arg Met Lys Pro Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Gly Leu Ala Ala Asp 925 930 935 940				3195
ctg ccc ggt ggg gcg gaa gga gca gct gca cag ccc cag gct gtg tta Leu Pro Gly Gly Ala Glu Gly Ala Ala Gln Pro Gln Ala Val Leu 945 950 955				3243
cgc cag ccg gaa ctg cgg gtc atc tct gat ggc gag cag ggt gga cag Arg Gln Pro Glu Leu Arg Val Ile Ser Asp Gly Glu Gln Gly Gly Gln 960 965 970				3291
cag ggc cac cgg ctg gac cat ggc ggt cac ctg gag atg aga aag gcc Gln Gly His Arg Leu Asp His Gly Gly His Leu Glu Met Arg Lys Ala 975 980 985				3339
cgc ggg ggg gac cat gtg cct gtg tcc cac gag cag ccg aga ggc ggg Arg Gly Asp His Val Pro Val Ser His Glu Gln Pro Arg Gly Gly 990 995 1000				3387
gag gac gct gct gtc cag gag ccc agg cag agg cca gag cca gag Glu Asp Ala Ala Val Gln Glu Pro Arg Gln Arg Pro Glu Pro Glu 1005 1010 1015				3432
ctg ggg ctc aaa cga gct gtc ccg ggg ggc cag agg ccg gac aat Leu Gly Leu Lys Arg Ala Val Pro Gly Gly Gln Arg Pro Asp Asn 1020 1025 1030				3477
gcc aag ccc aac cgg gac ctg aaa ctg cag gct ggc tcc gac ctc Ala Lys Pro Asn Arg Asp Leu Lys Leu Gln Ala Gly Ser Asp Leu 1035 1040 1045				3522
cgg agg cga cgg cgg gac ctt ggc cct cat gca gag ggt cag ctg Arg Arg Arg Arg Asp Leu Gly Pro His Ala Glu Gly Gln Leu 1050 1055 1060				3567
gcc ccg agg gat ggg gtc atc att ggc ctt aac ccc ctg cct gat Ala Pro Arg Asp Gly Val Ile Ile Gly Leu Asn Pro Leu Pro Asp 1065 1070 1075				3612
gtc cag gtg aac gac ctc cgt ggc gcc ctg gat gcc cag ctc cgc Val Gln Val Asn Asp Leu Arg Gly Ala Leu Asp Ala Gln Leu Arg 1080 1085 1090				3657
cag gct gcg ggg gga gct ctg cag gtg gtc cac agc cgg cag ctt				3702

ES 2 689 753 T3

Gln Ala Ala Gly Gly Ala Leu Gln Val Val His Ser Arg Gln Leu
1095 1100 1105

aga cag gcg cct ggg cct cca gag gag tcc tag cacctgctgg 3745
Arg Gln Ala Pro Gly Pro Pro Glu Glu Ser
1110 1115

ccatgagggc cacgccagcc actgccctcc tcggccagca gcaggtctgt ctcagccgca 3805
tcccagccaa actctggagg tcacactcgc ctctcccag ggtttcatgt ctgaggccct 3865
caccaagtgt gactgacagt ataaaagatt cactgtggca tcgtttccag aatgttcttg 3925
ctgtcgttct gttgcagctc ttagtctgag gtcctctgac ctctagactc tgagctcact 3985
ccagcctgtg aggagaaacg gcctccgctg cgagctggct ggtgcactcc caggctcagg 4045
ctggggagct gctgcgtctg tggtcaggcc tcctgctcct gccagggagc acgcgtggtc 4105
ttcgggttga gctcgcccggt gcgtggaggt gcgcatggct gctcatggtc ccaacacagg 4165
ctactgtgag agccagcatc caaccccacg cttgcagtga ctcagaatga taattattat 4225
gactgtttat cgatgcttcc cacagtgtgg tagaaagtct tgaataaaca cttttgcctt 4285
cacccagaaa aaaaaaaaa 4303

<210> 2
<211> 1119
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 2
Met Thr Ala Ala Ala Ala Ser Asn Trp Gly Leu Ile Thr Asn Ile Val
1 5 10 15

Asn Ser Ile Val Gly Val Ser Val Leu Thr Met Pro Phe Cys Phe Lys
20 25 30

Gln Cys Gly Ile Val Leu Gly Ala Leu Leu Leu Val Phe Cys Ser Trp
35 40 45

Met Thr His Gln Ser Cys Met Phe Leu Val Lys Ser Ala Ser Leu Ser
50 55 60

Lys Arg Arg Thr Tyr Ala Gly Leu Ala Phe His Ala Tyr Gly Lys Ala
65 70 75 80

Gly Lys Met Leu Val Glu Thr Ser Met Ile Gly Leu Met Leu Gly Thr
85 90 95

Cys Ile Ala Phe Tyr Val Val Ile Gly Asp Leu Gly Ser Asn Phe Phe
100 105 110

ES 2 689 753 T3

Ala Arg Leu Phe Gly Phe Gln Val Gly Gly Thr Phe Arg Met Phe Leu
 115 120 125
 Leu Phe Ala Val Ser Leu Cys Ile Val Leu Pro Leu Ser Leu Gln Arg
 130 135 140
 Asn Met Met Ala Ser Ile Gln Ser Phe Ser Ala Met Ala Leu Leu Phe
 145 150 155 160
 Tyr Thr Val Phe Met Phe Val Ile Val Leu Ser Ser Leu Lys His Gly
 165 170 175
 Leu Phe Ser Gly Gln Trp Leu Arg Arg Val Ser Tyr Val Arg Trp Glu
 180 185 190
 Gly Val Phe Arg Cys Ile Pro Ile Phe Gly Met Ser Phe Ala Cys Gln
 195 200 205
 Ser Gln Val Leu Pro Thr Tyr Asp Ser Leu Asp Glu Pro Ser Val Lys
 210 215 220
 Thr Met Ser Ser Ile Phe Ala Ser Ser Leu Asn Val Val Thr Thr Phe
 225 230 235 240
 Tyr Val Met Val Gly Phe Phe Gly Tyr Val Ser Phe Thr Glu Ala Thr
 245 250 255
 Ala Gly Asn Val Leu Met His Phe Pro Ser Asn Leu Val Thr Glu Met
 260 265 270
 Leu Arg Val Gly Phe Met Met Ser Val Ala Val Gly Phe Pro Met Met
 275 280 285
 Ile Leu Pro Cys Arg Gln Ala Leu Ser Thr Leu Leu Cys Glu Gln Gln
 290 295 300
 Gln Lys Asp Gly Thr Phe Ala Ala Gly Gly Tyr Met Pro Pro Leu Arg
 305 310 315 320
 Phe Lys Ala Leu Thr Leu Ser Val Val Phe Gly Thr Met Val Gly Gly
 325 330 335
 Ile Leu Ile Pro Asn Val Glu Thr Ile Leu Gly Leu Thr Gly Ala Thr
 340 345 350
 Met Gly Ser Leu Ile Cys Phe Ile Cys Pro Ala Leu Ile Tyr Lys Lys
 355 360 365

ES 2 689 753 T3

Ile	His	Lys	Asn	Ala	Leu	Ser	Ser	Gln	Val	Val	Leu	Trp	Val	Gly	Leu	370	375	380	
Gly	Val	Leu	Val	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Glu	Glu	385	390	395	400
Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro	Gly	Gly	Arg	Leu	Gly	Glu	405	410	415	
Ala	Glu	Gly	Leu	Met	Lys	Val	Glu	Ala	Ala	Arg	Leu	Ser	Ala	Gln	Asp	420	425	430	
Pro	Val	Val	Ala	Val	Ala	Glu	Asp	Gly	Arg	Glu	Lys	Pro	Lys	Leu	Pro	435	440	445	
Lys	Glu	Arg	Glu	Glu	Leu	Glu	Gln	Ala	Gln	Ile	Lys	Gly	Pro	Val	Asp	450	455	460	
Val	Pro	Gly	Arg	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ala	Pro	Glu	Glu	Ala	Gln	Leu	465	470	475	480
Asp	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Ile	Ala	Val	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	His	Arg	485	490	495	
His	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	His	Asp	Lys	Val	Val	Val	Asp	Glu	Gly	Gln	500	505	510	
Asp	Arg	Glu	Val	Pro	Glu	Glu	Asn	Lys	Pro	Pro	Ser	Arg	His	Ala	Gly	515	520	525	
Gly	Lys	Ala	Pro	Gly	Val	Gln	Gly	Gln	Met	Ala	Pro	Pro	Leu	Pro	Asp	530	535	540	
Ser	Glu	Arg	Glu	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Gln	Gly	Glu	Val	Gly	Lys	Arg	545	550	555	560
Pro	Gly	Gln	Ala	Gln	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Gly	Asp	Leu	Pro	Glu	Asp	565	570	575	
Pro	Gln	Lys	Val	Pro	Glu	Ala	Asp	Gly	Gln	Pro	Ala	Val	Gln	Pro	Ala	580	585	590	
Lys	Glu	Asp	Leu	Gly	Pro	Gly	Asp	Arg	Gly	Leu	His	Pro	Arg	Pro	Gln	595	600	605	
Ala	Val	Leu	Ser	Glu	Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Glu	610	615	620	

ES 2 689 753 T3

Lys Ala Lys Gly Gly Pro Pro Pro Gly Asn Ala Ala Gly Asp Thr Gly
 625 630 635 640
 Gln Pro Ala Glu Asp Ser Asp His Gly Gly Lys Pro Pro Leu Pro Ala
 645 650 655
 Glu Lys Pro Ala Pro Gly Pro Gly Leu Pro Pro Glu Pro Arg Glu Gln
 660 665 670
 Arg Asp Val Glu Arg Ala Gly Gly Asn Gln Ala Ala Ser Gln Leu Glu
 675 680 685
 Glu Ala Gly Arg Ala Glu Met Leu Asp His Ala Val Leu Leu Gln Val
 690 695 700
 Ile Lys Glu Gln Gln Val Gln Gln Lys Arg Leu Leu Asp Gln Gln Glu
 705 710 715 720
 Lys Leu Leu Ala Val Ile Glu Glu Gln His Lys Glu Ile His Gln Gln
 725 730 735
 Arg Gln Glu Asp Glu Glu Asp Lys Pro Arg Gln Val Glu Val His Gln
 740 745 750
 Glu Pro Gly Ala Ala Val Pro Arg Gly Gln Glu Ala Pro Glu Gly Lys
 755 760 765
 Ala Arg Glu Thr Val Glu Asn Leu Pro Pro Leu Pro Leu Asp Pro Val
 770 775 780
 Leu Arg Ala Pro Gly Gly Arg Pro Ala Pro Ser Gln Asp Leu Asn Gln
 785 790 795 800
 Arg Ser Leu Glu His Ser Glu Gly Pro Val Gly Arg Asp Pro Ala Gly
 805 810 815
 Pro Pro Asp Gly Gly Pro Asp Thr Glu Pro Arg Ala Ala Gln Ala Lys
 820 825 830
 Leu Arg Asp Gly Gln Lys Asp Ala Ala Pro Arg Ala Ala Gly Thr Val
 835 840 845
 Lys Glu Leu Pro Lys Gly Pro Glu Gln Val Pro Val Pro Asp Pro Ala
 850 855 860
 Arg Glu Ala Gly Gly Pro Glu Glu Arg Leu Ala Glu Glu Phe Pro Gly

ES 2 689 753 T3

865						870										875													880
Gln	Ser	Gln	Asp	Val	Thr	Gly	Gly	Ser	Gln	Asp	Arg	Lys	Lys	Pro	Gly														
				885					890																				
Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Thr	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Lys	Glu	Ala	Asn	Trp														
			900					905						910															
Leu	Val	Ala	Gly	Pro	Gly	Ala	Glu	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg	Met	Lys	Pro														
		915					920						925																
Lys	Gln	Val	Ser	Arg	Asp	Leu	Gly	Leu	Ala	Ala	Asp	Leu	Pro	Gly	Gly														
	930					935								940															
Ala	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Gln	Pro	Gln	Ala	Val	Leu	Arg	Gln	Pro	Glu														
945					950					955																			
Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Gly	Glu	Gln	Gly	Gly	Gln	Gln	Gly	His	Arg														
				965					970					975															
Leu	Asp	His	Gly	Gly	His	Leu	Glu	Met	Arg	Lys	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp														
			980					985						990															
His	Val	Pro	Val	Ser	His	Glu	Gln	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Ala														
		995					1000						1005																
Val	Gln	Glu	Pro	Arg	Gln	Arg	Pro	Glu	Pro	Glu	Leu	Gly	Leu	Lys															
	1010					1015						1020																	
Arg	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Gln	Arg	Pro	Asp	Asn	Ala	Lys	Pro	Asn															
	1025					1030																							
Arg	Asp	Leu	Lys	Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Arg	Arg															
	1040					1045																							
Arg	Asp	Leu	Gly	Pro	His	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Ala	Pro	Arg	Asp															
	1055					1060								1065															
Gly	Val	Ile	Ile	Gly	Leu	Asn	Pro	Leu	Pro	Asp	Val	Gln	Val	Asn															
	1070					1075																							
Asp	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Asp	Ala																						

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Gly Gln Glu Ala Pro Glu Gly Lys Ala Arg
1 5 10

ES 2 689 753 T3

<210> 4
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 4
 Met Lys Pro Lys Gln Val Ser Arg Asp Leu Gly Leu Ala Ala Asp Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Ala Glu Gly Ala Ala Ala Gln Pro Gln Ala Val Leu Arg
 20 25 30
 Gln Pro Glu Leu Arg Val Ile Ser Asp Gly Glu Gln Gly Gly Gln Gln
 35 40 45
 Gly His Arg Leu Asp His Gly Gly His Leu Glu Met Arg Lys Ala
 50 55 60

<210> 5
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5
 Pro Val Pro His Asp Lys Val Val Val Asp Glu Gly Gln Asp Arg Glu
 1 5 10 15
 Val Pro Glu Glu Asn Lys Pro Pro Ser Arg His Ala Gly Gly Lys Ala
 20 25 30
 Pro Gly Val Gln Gly Gln Met Ala Pro Pro Leu Pro Asp Ser Glu Arg
 35 40 45
 Glu Lys Gln Glu Pro Glu Gln Gly Glu Val Gly Lys Arg Pro Gly Gln
 50 55 60
 Ala Gln Ala Leu Glu Glu Ala Gly Asp Leu Pro Glu Asp Pro Gln Lys
 65 70 75 80
 Val Pro Glu Ala Asp Gly Gln Pro Ala
 85

15 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Lys Val Val Val Asp Glu Gly Gln Asp Arg Glu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 7
 Lys Leu Leu Ala Val Ile Glu Glu Gln His Lys Glu
 1 5 10

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<400> 8
Arg Ser Leu Glu His Ser Glu Gly Pro Val Gly Arg Asp
1          5          10

5 <210> 9
  <211> 16
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens

  <400> 9
  Leu Pro Lys Gly Pro Glu Gln Val Pro Val Pro Asp Pro Ala Arg Glu
  1          5          10          15

10 <210> 10
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

    <400> 10
    Arg Leu Asp His Gly Gly His Leu Glu Met Arg Lys Ala Arg Gly
15  1          5          10          15

    <210> 11
    <211> 13
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

20 <400> 11
    Arg Gly Gly Glu Asp Ala Ala Val Gln Glu Pro Arg Gln
    1          5          10

    <210> 12
    <211> 8
    <212> PRT
25 <213> Homo sapiens

    <400> 12
    Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
    1          5

```

REIVINDICACIONES

1. El uso de un anticuerpo anti-S38AA en la determinación de la enfermedad de Alzheimer *in vitro* o *ex vivo*.
2. Un método de determinación de la enfermedad de Alzheimer en un animal, que comprende detectar un fragmento de S38AA en una muestra recogida de dicho animal.
- 5 3. El método según la reivindicación 2, en donde el animal es un ser humano.
4. El método según la reivindicación 2 o 3, en donde el fragmento de S38AA es un fragmento derivado de la isoforma 1 de S38AA.
5. El método según la reivindicación 2 o 3, en donde el fragmento de S38AA es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 3.
- 10 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la muestra es sangre, fluido cerebroespinal u orina.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la muestra es fluido cerebroespinal.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la muestra es sangre.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la muestra es plasma.
- 15 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, que comprende además detectar uno u otros más marcadores diagnósticos para la enfermedad de Alzheimer.
11. Un método de investigación para una sustancia candidata para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, que comprende las siguientes etapas:
 - (1) poner en contacto una sustancia de ensayo con una célula que permite la medición de la producción de un fragmento de S38AA;
 - (2) medir la cantidad de producción del fragmento de S38AA en la célula puesta en contacto con la sustancia de ensayo, y comparar la cantidad de producción con la del fragmento de S38AA en una célula control libre de contacto con la sustancia de ensayo; y
 - (3) seleccionar una sustancia de ensayo que regula a la baja la cantidad de producción del fragmento de S38AA como una sustancia candidata para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer, basándose en los resultados de comparación del anteriormente mencionado punto (2).
- 20 12. El método según la reivindicación 4, en donde la isoforma 1 de S38AA es un polipéptido de la siguiente (a) o (b):
 - (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2, o
 - (b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 2.
- 30 13. El método según la reivindicación 5, en donde el fragmento de S38AA es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del 505° al 1.014° mostrada por la SEQ ID NO: 2.
- 35

Fig. 1

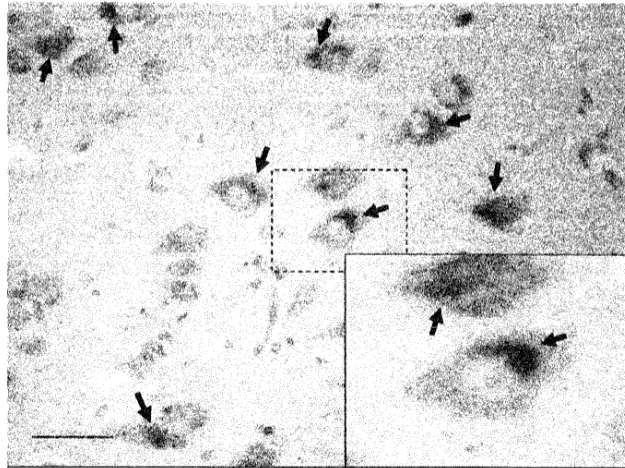


Fig. 2

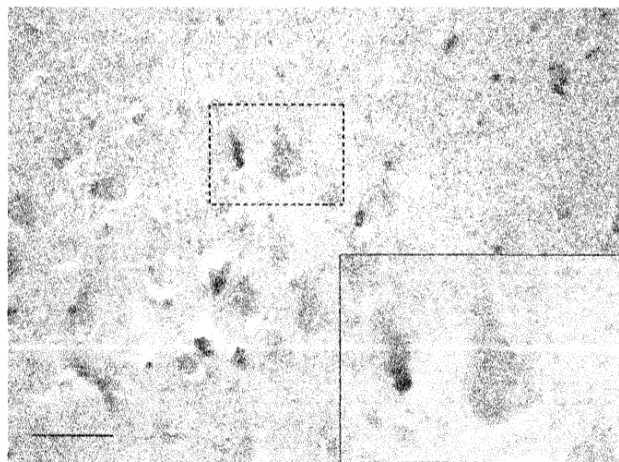


Fig. 3

	10	20	30	40	50	60
mtaaaaasnwg	litnivnsiv	gvsvltmpfc	fkqcgivlga	lllvfcswn	hqsomflvks	
70	80	90	100	110	120	
aslskrtya	glafhaygka	gkmlvetsmi	gimlgtciaf	yvvigdlgsn	ffarlfgfqv	
130	140	150	160	170	180	
ggtfrmllf	avslcivlpl	slqrnmmsi	qsfsamallf	ytvmfvivl	sslkghlfsg	
190	200	210	220	230	240	
qwlrrvsyvr	wegvfrcipi	fgmsfacqsq	vlptydsld	psvktmssif	asslnvttf	
250	260	270	280	290	300	
yvmvgffgyv	sftatagnv	lmhpsnlvt	emlrvgfmms	vavgfpmml	pcrqalstll	
310	320	330	340	350	360	
ceqqkdgtf	aaggymplr	fkaltlsvvf	gtmvggilip	nvetilglgt	atngslicfi	
370	380	390	400	410	420	
cpaliykkih	knaissqvvl	wvglgvlvvs	tvttlsvsee	vpedlaeeap	ggrlgeaegl	
430	440	450	460	470	480	
mkveaarlsa	qdpvvavaed	grekpkpkpe	reeleaqik	gpvdvpgrd	gkeapeeaql	
490	500	510	520	530	540	
drpgqgiavp	vgeahrhepp	vphdkvvvde	gqdvpeen	kpsrhaggk	apgvqgqmap	
550	560	570	580	590	600	
plpdserekq	epeqgevgkr	pgqaqaleea	gdldedpdkv	peadgqpavq	pakedlpggd	
610	620	630	640	650	660	
rglhprpqav	lseqqnglav	gggekakggp	ppgnaagdtg	qpaedsdhgg	kpplpaekpa	
670	680	690	700	710	720	
pgpglppepr	eqrdveragg	nqaasqleea	graemldhav	llqvikeqqv	qqkrilddqe	
730	740	750	760	770	780	
<u>kllavieeqh</u>	<u>keihqqrqed</u>	eedkprqev	hqepgaavpr	gqeapegkar	etvenlplp	
790	800	810	820	830	840	
ldpvlrapgg	rpapsqdlng	<u>rslehsepgv</u>	<u>grdpagppdg</u>	gpdtepraaq	aklrdgqkda	
850	860	870	880	890	900	
apraagtuke	lpkgpeqvpy	pdpaeaggp	eerlaeefpg	qsqdvttggsq	drkkpgkeva	
910	920	930	940	950	960	
atgtsilkea	nwlvagpgae	tgdrnkpkkq	vsrdlglaad	lpggagaaaa	qpqavlrqpe	
970	980	990	1000	1010	1020	
lrvisdgeeq	<u>gqqghrldhg</u>	<u>ghlemrkarg</u>	gdhvpvsheq	<u>prggedaavq</u>	<u>eprgrpepel</u>	
1030	1040	1050	1060	1070	1080	
glkravpggq	rpdnkpnd	lklqagsdlr	rrrrldgpha	egqlaprdgv	iiglnplpdy	
1090	1100	1110				
qvndlrqald	aqlrqaagga	lqvhsrqlr	qapgppees			

Fig. 4

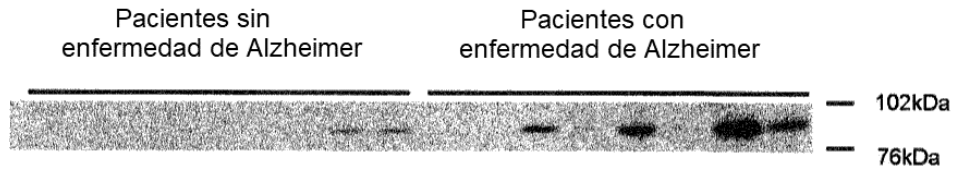


Fig. 5

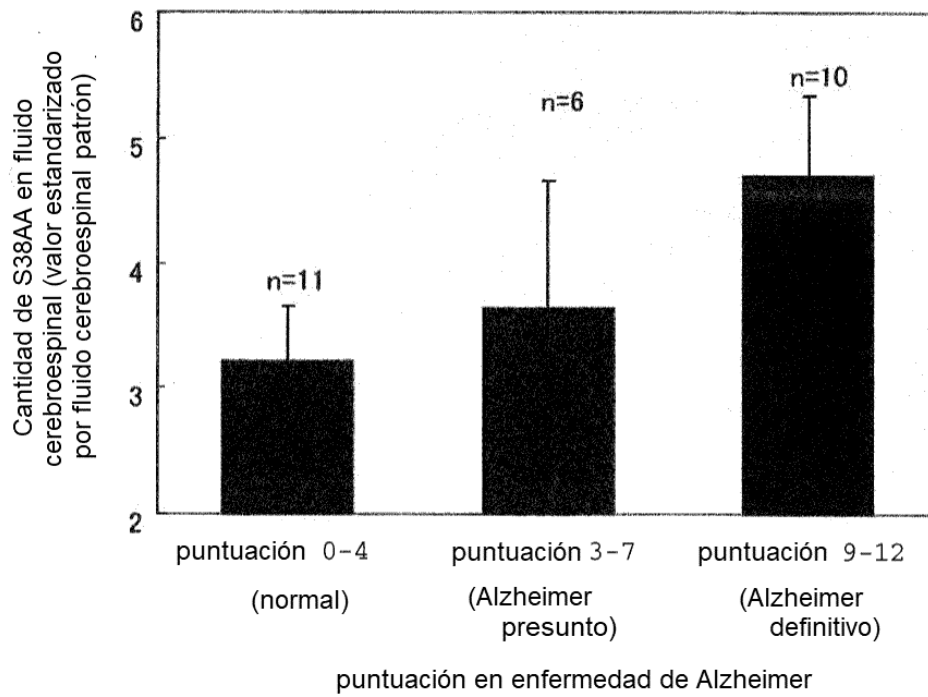


Fig. 6

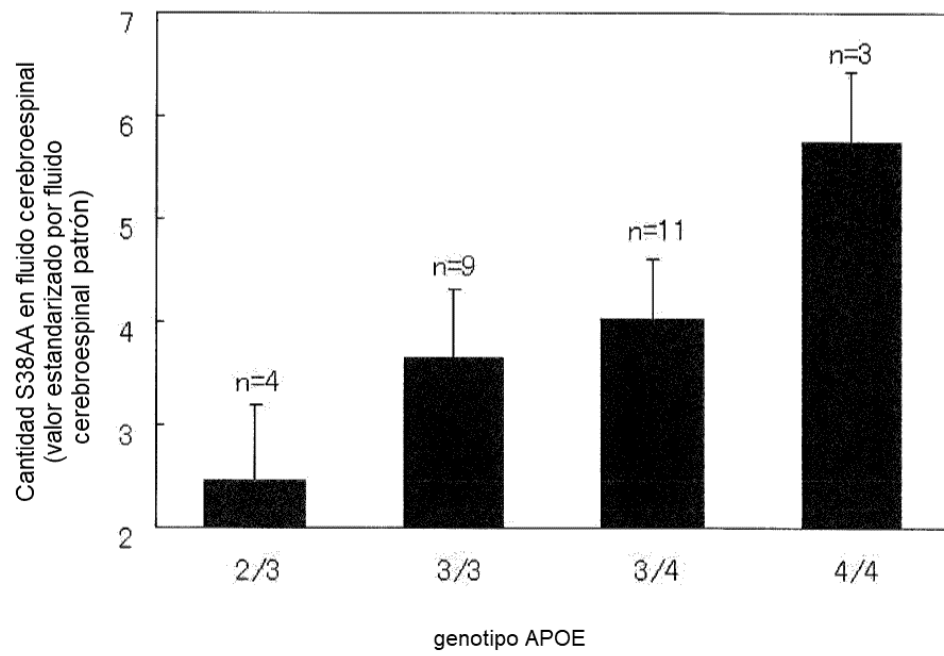


Fig. 7

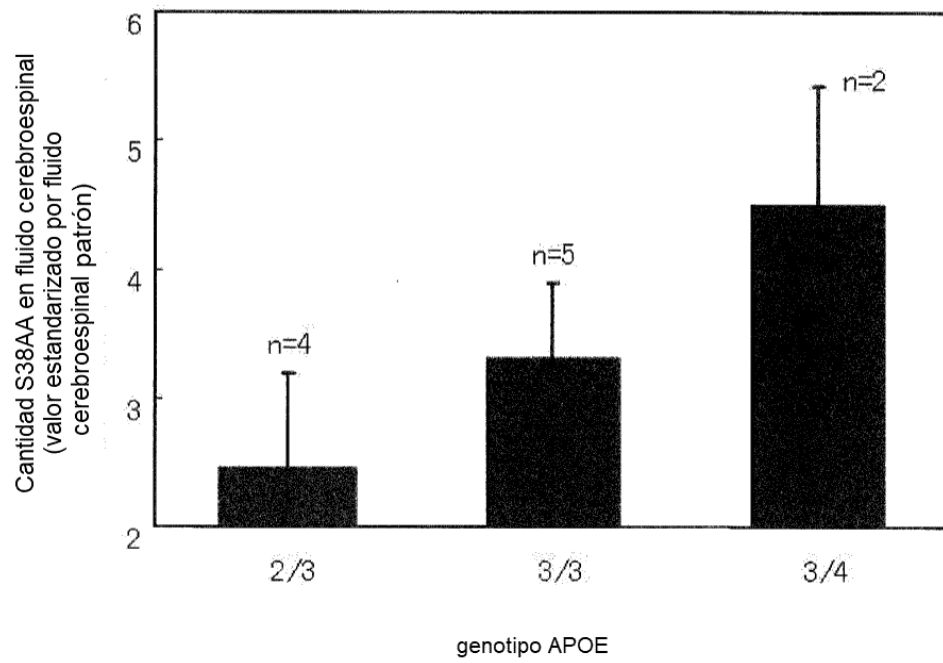


Fig. 8

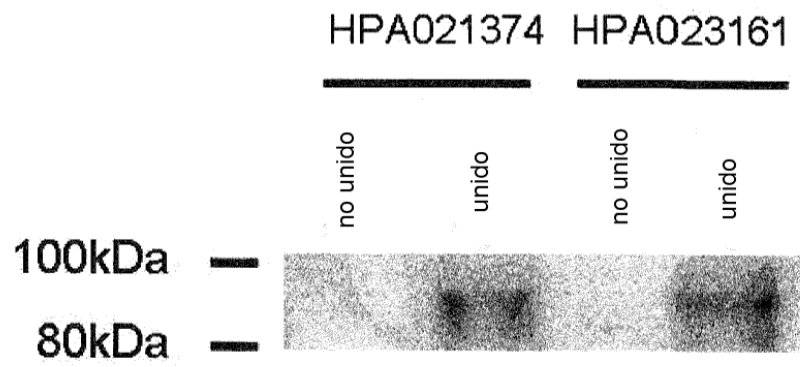


Fig. 9

