

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 615**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2014 PCT/EP2014/071766**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2014 E 14783620 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3066475**

54 Título: **Biomarcadores de la progresión de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

08.11.2013 GB 201319761

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

20.02.2020

73 Titular/es:

**NORDIC BIOSCIENCE A/S (100.0%)
Herlev Hovedgade 207
2730 Herlev, DK**

72 Inventor/es:

**KARSDAL, MORTEN y
HENRIKSEN, KIM**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 743 615 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

Biomarcadores de la progresión de la enfermedad de Alzheimer

5 La presente invención se refiere a biomarcadores que indican la propensión de un paciente a sufrir progresión de la enfermedad de Alzheimer (AD). Dichos biomarcadores son útiles para proporcionar información pronóstica al paciente y para seleccionar pacientes candidatos para ensayos clínicos, así como para evaluar intervenciones candidatas tales como tratamientos con medicamentos para determinar la efectividad en la reducción de la progresión de la AD.

10 Se estima que la enfermedad de Alzheimer (AD) comienza a desarrollarse entre 10-15 años antes de que se noten las características clínicas, un fenómeno que parece ser el principal culpable de la falta de éxito en el desarrollo de tratamientos modificadores de la enfermedad para la AD (Cummings, 2011). Esto ha llevado a una búsqueda intensa de marcadores diagnósticos y/o pronósticos tempranos basados en líquidos de la AD, y los biomarcadores del líquido cefalorraquídeo (CSF) han proporcionado un valor diagnóstico para la AD. Sin embargo, su aplicación es limitada debido a la invasividad de la punción lumbar (Cummings, 2011). Además, las técnicas de neuroimagen, tal como el análisis con florbetapir F-18, proporcionan información muy relevante, pero son costosas y requieren instalaciones especiales. Por lo tanto, se buscan nuevos procedimientos para diagnosticar los cambios neurológicos tempranos en la AD o para pronosticar la tasa de progresión de la AD con una aplicación clínica más amplia, tal como los procedimientos basados en la sangre.

15 Los biomarcadores candidatos potenciales son fragmentos de proteínas que reflejan sitios de escisión específicos en proteínas y, debido a su tamaño más pequeño, pueden pasar la barrera hematoencefálica (BBB) y, por lo tanto, se detectan en el suero (Wang et al., Reifert et al., 2011; Karsdal et al., 2010).

20 El procesamiento patológico de la proteína Tau por las proteasas ha generado un interés sustancial (De Strooper, 2010), ya que parece ser un iniciador clave de la muerte celular neuronal (Reifert et al., 2011; Reifert et al., 2011); (Gamblin et al., 2003; Garcia-Sierra et al., 2008; Goedert et al., 1989; Lasagna-Reeves et al., 2012). La escisión proteolítica de Tau está mediada por varias proteasas diferentes, tales como caspasas y calpaínas (De Strooper, 2010). La escisión de Tau mediada por caspasa lleva a la generación de una serie de fragmentos bien descritos durante el inicio de la muerte celular neuronal (De Strooper, 2010; Reifert et al., 2011). Hay sitios en Tau para la escisión de caspasa, a saber, residuos Asp²²-Asp²⁵, Asp³⁴⁵-Asp³⁴¹ y Asp⁴¹⁸-Asp⁴²¹, de los cuales Asp⁴²¹ es el sitio de escisión preferido (Hanger y Wray, 2010). La escisión en Asp⁴²¹ es generada por la caspasa -3 y -7, y curiosamente, los fragmentos de Tau generados por la escisión en el sitio Asp⁴²¹ son neurotóxicos (Lee et al., 2001; Rissman et al., 2004), y por lo tanto la medición de este epítipo (es decir, fragmentos que tienen Asp⁴²¹ en su extremo N-terminal) en suero/plasma es de gran interés. También se describieron los anticuerpos policlonales que detectan los fragmentos C-terminales de Tau que se han escindido en Asp⁴²¹ por caspasa ((Rissman et al., 2004; Basurto-Islas et al., 2008).

25 Sin embargo, varias otras proteasas también parecen desempeñar un papel en la degeneración neuronal a pesar de que principalmente se han asociado con las funciones de secretasa (De Strooper, 2010), y un estudio reciente indicó una relación entre un fragmento de Tau generado por ADAM10 y las puntuaciones cognitivas (Sorensen et al., 2012), por lo tanto, se destaca este fragmento como un biomarcador potencialmente interesante de AD en combinación con el fragmento "clásico" Tau-C.

30 El documento WO2013/004717 y Mette et al., 2012 describen un bioensayo para la cuantificación de fragmentos peptídicos relevantes para afecciones neurodegenerativas que comprende un neoepítipo formado por la escisión de una proteína Tau por una secretasa (Tau A). El documento WO2011/032155 describe procesos y materiales para la detección, diagnóstico o determinación de la gravedad de una lesión o afección neurológica. Vías bioquímicas

35 En la actualidad los autores han medido los niveles de Tau-C utilizando un ELISA recientemente desarrollado que detecta específicamente el sitio terminal Asp⁴²¹ y el ELISA previamente publicado que detecta Tau-A (Sorensen et al., 2012) en muestras de suero del estudio H6L-MC-LFAN. Se correlacionaron los niveles de biomarcadores con las puntuaciones ADAS-Cog11 y CDR-SB obtenidas al inicio y en los puntos de tiempo de seguimiento (28, 40, 52 y 64 semanas) para investigar el potencial diagnóstico y pronóstico de estos marcadores.

40 En la actualidad los autores han establecido que los niveles de Tau-A y Tau-C están correlacionados de manera opuesta a futuros cambios en los marcadores de puntuación cognitiva.

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona ahora un procedimiento de ensayo de una muestra de fluido corporal que comprende, en cualquier orden:

- 50 a) realizar un primer inmunoensayo de la muestra para determinar un primer nivel de unión en la misma de un anticuerpo que tiene especificidad por un epítipo C-terminal Tau-C presente en el extremo terminal de la secuencia de aminoácidos -SSTGSIDMVD (SEQ ID NO: 1), y
- 55 b) realizar un segundo inmunoensayo de la muestra para determinar un segundo nivel de unión en la misma

de un compañero de unión inmunológica que tiene especificidad para un epítipo N-terminal Tau-AQ presente en el término de la secuencia de aminoácidos TPRGAAPPQ- (SEQ ID NO : 2) y

c) calcular un índice que expresa el contenido de información de una relación entre dicho segundo nivel y dicho primer nivel.

- 5 Tal índice se puede calcular usando un ordenador de propósito general adecuadamente programado para recibir los niveles de unión determinados como entradas y calcular el índice.

La especificidad para los epítipos terminales mencionados implica que el primer compañero de unión inmunológica no se une a una secuencia de aminoácidos extendida -SSTGSIDMVDS (SEQ ID NO: 3) o una secuencia más larga extendida con aminoácidos que continúan la secuencia de Tau en la dirección C-terminal y que el segundo
10 compañero de unión inmunológica no se une a una secuencia de aminoácidos extendida ATPRGAAPPQ- (SEQ ID NO: 4) o una secuencia más larga que continúa la secuencia de Tau en la dirección N-terminal. Preferiblemente, los compañeros de unión inmunológica no reaccionan con péptidos que tienen las secuencias terminales - SSTGSIDMVD (SEQ ID NO: 5) y TPRGAAPPQ- (SEQ ID NO: 6).

Ninguno de los compañeros de unión inmunológica se une a la proteína Tau intacta no escindida.

- 15 Los compañeros de unión inmunológica pueden ser anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos monoclonales que retienen propiedades de unión, tales como Fab, F (ab ')₂, Fab', scFv, di-scFv, sdAb, F (ab ')₂ ligado químicamente, o fragmentos de BiTE.

Dicho índice se puede calcular preferiblemente para expresar el contenido de información de una relación (Tau-A'/Tau-C'), en la que Tau-A' se denomina primer nivel y Tau-C' se denomina segundo nivel, cada uno se expresa
20 como un coeficiente de la media de referencia normal de la medición. De esta manera, las variaciones entre los ensayos en los valores absolutos obtenidos para un nivel particular de análisis se pueden compensar de manera que los resultados obtenidos usando diferentes ensayos se puedan compararse fácilmente.

Los coeficientes respectivos se pueden calcular en un ordenador de propósito general adecuadamente programado.

El índice puede ser, obviamente, la relación (Tau-A'/Tau-C').

- 25 En general, el contenido de información de Tau-A/Tau-C (o de Tau-A'/Tau-C') se puede conservar en cualquier índice en el que dicha relación se manipule matemáticamente, tal como mediante la adopción de un logaritmo para cualquier base, tal como la base 10, de la relación o inversión de la relación, o mediante suma o resta de la relación a o de alguna constante arbitraria o mediante la elevación de la relación a alguna potencia elegida, por ejemplo, elevación al cuadrado. Muchos otros ejemplos se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica.

- 30 Dicha muestra puede ser preferiblemente una muestra de sangre, suero, plasma, CSF, saliva, esputo, tejidos, extractos de tejido o fluido de BALF.

La invención incluye un procedimiento para determinar qué pacientes deben ser inscritos en un ensayo clínico de un medicamento para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende para cada paciente
35 candidato realizar un procedimiento de ensayo como se describe anteriormente, y seleccionar para su inscripción pacientes que tengan un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos tres puntos durante 52 semanas. Alternativamente, los pacientes se seleccionan con un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos tres puntos durante 40 semanas. Alternativamente, se seleccionan los pacientes que tienen un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos tres puntos durante 28 semanas. Además, alternativamente, se seleccionan los pacientes que tienen un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos seis puntos
40 durante el número de semanas indicado.

La invención incluye además un procedimiento para determinar qué pacientes se deben inscribir en un ensayo clínico de un medicamento para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende para cada paciente candidato realizar un procedimiento de ensayo como se describe anteriormente para proporcionar un
45 índice que expresa el contenido de información de una relación (Tau-A'/Tau-C'), y seleccionar para su inscripción pacientes que tienen un índice correspondiente a una relación (Tau-A'/Tau-C') mayor que 1,5

Opcionalmente, se puede seleccionar para su inscripción pacientes que tienen dicho índice correspondiente a una relación (Tau-A'/Tau-C') mayor que 2,0 o alternativamente mayor que 2,5 o superior.

La invención incluye además un procedimiento para determinar la eficacia de una intervención candidata para el
50 tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende llevar a cabo un ensayo como se describió anteriormente en muestras obtenidas de cada paciente en un primer panel de pacientes y un segundo panel de pacientes, en que dicho se ha aplicado la intervención a dicho primer panel de pacientes y se ha aplicado una intervención de comparación a dicho segundo panel de pacientes, y comparar los valores para dicho índice obtenido para dicho primer panel de pacientes con valores para dicho índice obtenido para dicho segundo panel de pacientes y determinar si la intervención candidata muestra un efecto superior en la modulación de dichos valores de índice en

comparación con la intervención de comparación.

La intervención del comparador puede ser un placebo, una ausencia de tratamiento o un candidato alternativo o una terapia establecida, ya sea de naturaleza farmacéutica, dietética o conductual. La invención incluye además un procedimiento para seleccionar pacientes para el tratamiento con una intervención para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende realizar un procedimiento de ensayo como se describió anteriormente y seleccionar pacientes para el tratamiento que tengan un índice resultante de cualquier valor discutido anteriormente.

La invención se describirá e ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos en los que se hará referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 10 La Figura 1 muestra cambios en las puntuaciones cognitivas (ADAS-Cog11 en el Panel A y CDR-SB en el Panel B) observando en un grupo de 100 pacientes durante un período de 64 semanas.
- La Figura 2 muestra un diagrama de dispersión basado en los datos de la Figura 1 que muestra en el Panel A un diagrama de dispersión de valores iniciales de ADAS-Cog11 contra CDR-SB, y que muestra en el Panel B un diagrama de dispersión de cambios en el ADAS-Cog11 contra cambios en el CDR-SB a 64 semanas.
- 15 La Figura 3 muestra las correlaciones entre niveles de Tau-A' y el cambio en ADAS-Cog11 con el tiempo. Paneles: A) Cambio durante 28 semanas, B) Cambio durante 40 semanas, C) Cambio durante 52 semanas, D) Cambio durante 64 semanas.
- La Figura 4 muestra las correlaciones entre los niveles de Tau-C' y el cambio en ADAS-Cog11 con el tiempo. Paneles: A) Cambio durante 28 semanas, B) Cambio durante 40 semanas, C) Cambio durante 52 semanas, D) Cambio durante 64 semanas.
- 20 La Figura 5 muestra las correlaciones entre Tau-A'/Tau-C' ratios y el cambio en ADAS-Cog11 con el tiempo. Paneles: A) cambio durante 28 semanas, B) Cambio durante 40 semanas, C) Cambio durante 52 semanas, D) Cambio durante 64 semanas.
- La Figura 6 muestra las correlaciones entre niveles de Tau-A' y el cambio en CDR-SB con el tiempo. Paneles: A) cambio durante 28 5 semanas, B) Cambio durante 40 semanas, C) Cambio durante 52 semanas, D) Cambio durante 64 semanas.
- 25 La Figura 7 muestra las correlaciones entre niveles de Tau-C' y el cambio en CDR-SB con el tiempo. Paneles: A) Cambio durante 28 semanas, B) Cambio durante 40 semanas, C) Cambio durante 52 semanas, D) Cambio durante 64 semanas.
- 30 La Figura 8 muestra las correlaciones entre Tau-A'/Tau-C' ratios y el cambio en CDR-SB con el tiempo. Paneles: A) Cambio durante 28 semanas, B) Cambio durante 40 semanas, C) Cambio durante 52 semanas, D) Cambio durante 64 semanas.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

35 Generación de anticuerpos monoclonales:

Ensayo Tau-C

Reactivos y péptidos

Los péptidos sintéticos usados para la producción de anticuerpo monoclonal y validación fueron:

Péptido inmunogénico: KLH-GGC-SSTGSIDMVD (Hemocianina de lapa californiana) (SEQ ID NO:7).

40 Péptido de selección/cribado: SSTGSIDMVD

Péptido de de-selección: SSTGSIDMVDS

Desarrollo del ELISA

45 Los procedimientos utilizados para el desarrollo de anticuerpos monoclonales fueron los descritos previamente (Barascuk et al., 2010; Gefter et al., 1977). Brevemente, se inmunizaron ratones Balb/C de 4 a 6 semanas por vía subcutánea con 200 µl de antígeno emulsionado y 50 µg del péptido inmunogénico. Se realizaron inmunizaciones consecutivas a intervalos de 2 semanas en adyuvante de Freund incompleto, hasta que se alcanzaron niveles estables de titulación de suero, y se sangraron los ratones a partir de la segunda inmunización. En cada sangrado, se detectó el título de suero y se seleccionó para fusión el ratón con el título de antisuero más alto. El ratón

seleccionado descansó durante 1 mes seguido de un refuerzo intravenoso con 50 µg de péptido inmunogénico en 100 µl de solución de cloruro de sodio 0,9% 3 días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

Fusión

5 El procedimiento de fusión se ha descrito previamente (Geffer et al., 1977) y se siguió con SP2/0 como células de mieloma. Las células de fusión se clonaron en placas de cultivo celular de 35 mm mediante el procedimiento de medio semisólido y las placas se incubaron en una incubadora con CO₂. A continuación, los clones se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos y se dejaron durante tres días, seguido del análisis de los sobrenadantes de cultivo.

Cribado del anticuerpo

10 Los sobrenadantes se analizaron en un marco de ELISA competitivo. Los péptidos de cribado se usaron como péptidos de selección y se compararon con los péptidos alargados. Se seleccionaron líneas celulares específicas para el péptido de selección y sin reactividad cruzada con el péptido alargado y los anticuerpos se purificaron.

Metodología ELISA

15 En experimentos preliminares, se optimizaron los reactivos, sus concentraciones y los períodos de incubación mediante la realización de varios análisis de tablero de ajedrez (datos no mostrados).

Metodología ELISA Tau-C

20 El ELISA Tau-C final se desarrolló de la siguiente manera: una placa ELISA de 96 pocillos pre-recubierta con estreptavidina se recubrió adicionalmente con 1,25 ng/ml del péptido sintético Biotina-SSTGSIDMVD disuelto en tampón PBS-BT a 4 °C durante 30 min. por agitación constante a 300 rpm. La placa se lavó cinco veces en tampón de lavado y se añadieron 20 µl de muestra, seguido de 100 µl de solución de anti-mAb-Tau-C - humana conjugada con peroxidasa (50 ng/ml). La placa se incubó durante 1 hora a 4 °C en tampón de ensayo (PBS 10 mM, NaCl 68 mM, BSA 1%, Tween-20 0,05%, Bronidox L5 0,36% y Líquido II 10%) durante el cual se agitó a 300 rpm.

25 La placa se lavó nuevamente cinco veces seguido de la adición de 100 µl de tetrametilbencidina (TMB) (Kem En-Tec cat.438OH). La placa se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y se agitó a 300 rpm. Para detener la reacción, se añadieron 100 µl de solución de detención (H₂SO₄ 95-97%, Merck Cat. No.: 1.00731) y la placa se analizó en el lector ELISA a 450 nm con 650 nm como referencia.

Tampones usados para los ELISA

30 El tampón utilizado para disolver el péptido de recubrimiento estaba compuesto por lo siguiente: (PBS 10 mM, NaCl 68 mM, BSA 1%, Tween-20 0,05%, EDTA 0,9%, Bronidox L5 0,36% y Líquido II 10% pH = 7,4), y tampón de detención de la reacción compuesto de H₂SO₄ 0,1%.

Las placas ELISA usadas para el desarrollo del ensayo se recubrieron con estreptavidina de Roche cat.: 11940279. Todas las placas ELISA se analizaron con el lector ELISA de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA, USA).

Estándares

35 Se realizó una curva estándar por dilución en serie de los péptidos de selección. Las concentraciones estándar para Tau-C fueron 0, 0,97, 1,95, 3,9, 7,8, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 y 1000 ng/ml.

Muestras para analizar la reactividad nativa de los anticuerpos

Para el desarrollo y validación del ensayo, se usaron suero y plasma de 15 voluntarios adultos sanos de 23 a 45 años y de ambos sexos (Bioserve). También se analizaron muestras de suero de ratones y ratas para determinar el nivel de reactividad cruzada interespecie.

Muestras de animales

40 Los tejidos que incluyen cerebro, hígado, músculo, colon, riñón, pulmón, aorta, corazón, piel y páncreas aislados de 5 ratas Sprague Dawley de seis meses y 5 cerebros de cada uno de los ratones de tipo salvaje o Tg4510 se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron usando un pulverizador Bessman. El "polvo" se transfirió a un vial y se pesó. Se añadió tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, desoxicolato de sodio 0,5%, glicerol 15%, cóctel inhibidor de proteasa (Roche cat# 05056489001), pH 8,3) a 1 ml de tampón/250 mg de tejido. El lisado se eliminó por sonicación. Después de la sonicación, los restos se centrifugaron a 4 °C/5 min/10000 rpm y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a - 80 °C hasta su uso posterior.

Las concentraciones de proteína se determinaron usando el ensayo de proteína DC (Biorad).

Escisión de tejidos *in vitro*

La escisión de la proteasa se realizó mediante la mezcla de 1 µg de Tau recombinante o 50 µg de extracto de tejido y 1 µg de Caspasa en tampón Caspasa (HEPES 25 mM, CHAPS 0,1%, DTT 5 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 10%, pH 7,5) e incubación durante 6 horas, 1 día y 2 días. Finalmente, la escisión se verificó por análisis ELISA.

Experimentos con células PC12

- 5 Las células PC12 se obtuvieron de ATCC y se cultivaron en matraces o placas recubiertas con solución de colágeno 0,01%. Las células se cultivaron en RPMI-1640+10% de suero de caballo+5% de FCS+1% de P/S+Glutamato 200 mM con intercambio de medio cada 2do-3er día. Para diferenciarlas en neuronas, las células se sembraron en placas pre-recubiertas a una densidad de 10000 células/cm² y se cultivaron durante 8 días en RPMI-1640+1% de suero de caballo +1% de P/S + glutamato 200 mM con 50 ng/ml de NGF humano (R&D Systems). El día 8 se indujo la apoptosis usando A43 como se describe en (Reifert et al., 2011), y se generaron lisados usando tampón RIPA +++ en los puntos de tiempo indicados.

Transferencia Western

- 15 Se cargaron 20 µg de cada lisado en un gel SDS-PAGE, y se corrió el gel, seguido de la transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa. La tinción con rojo Ponceau posteriormente se usó para verificar la carga de proteína igual en las membranas. La proteína Tau total (MAB3420, Millipore) se detectó mediante incubación con los anticuerpos primarios diluidos a 100 ng/ml en leche descremada en polvo que contiene TBS-T (Henriksen et al., 2004). Posteriormente se añadió un anticuerpo secundario que reconoce IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, y finalmente la transferencia se visualizó usando quimioluminiscencia mejorada como se describió previamente (Henriksen et al., 2004).

20 Resultados

Selección de clon y características del ensayo

- La inmunización de ratones con la secuencia identificada generó numerosos clones que posteriormente se analizaron para determinar su capacidad para producir un anticuerpo (NB361) que reconoce la secuencia SSTGSIDMVD generada por la escisión de Caspasa 3 de Tau.
- 25 El anticuerpo era específico para el sitio de escisión, ya que la extensión de la secuencia por un aminoácido, para crear un péptido alargado, produjo la pérdida de reactividad y solo una reactividad cruzada muy modesta a la secuencia alargada. Sobre la base de la curva estándar, se determinó que el límite inferior de cribado (LDL) era de 1 ng/ml.

Caracterización del ensayo usando el material generado *in vitro*

- 30 Como se identificó el epítipo de Tau escindida por Caspasa, se investigó si la escisión *in vitro* de Tau usando Caspasa produjo la generación de una señal en el ELISA. Solo la adición de Tau escindida, Tau no intacta, produjo la generación de una señal, lo que también confirma la especificidad del ensayo. Estos datos se fortalecieron aún más al comparar el cerebro de rata escindido con caspasa con el no escindido y nuevamente en la presente solo las muestras escindidas dieron una señal.

35 Los extractos de cerebro de ratones tg4510 indican relevancia patológica del marcador

Se sabe que los ratones Tg4510 muestran una taupatía con un inicio de alrededor de dos meses, y cuando se midieron los extractos cerebrales de cerebros de ratones Tg4510 tenían niveles de Tau-C alrededor de 2-3 veces más altos que sus correspondientes controles de peso a 1½, 2½ y una tendencia hacia una separación más clara a los 9 meses.

40 La apoptosis mediada por Aβ en neuronas derivadas de células PC12 lleva a la producción de Tau-C

Se ha indicado que el fragmento Tau-C es producido por neuronas después de la inducción de apoptosis, y para evaluar si esto se puede medir usando el ELISA, se usaron las células neuronales PC12 inducidas por NGF. Al cultivar las células PC12 durante 8 días en presencia de NGF, se observó una inducción clara de neurogénesis y, en consecuencia, la inducción de la expresión total de Tau como se esperaba (Greene, 1978).

- 45 Se ha demostrado que la adición de Aβ a las neuronas induce la apoptosis neuronal y la fragmentación de Tau (Reifert et al., 2011), y se encontró que la adición de altas concentraciones (8,6 µM) conduce a la fragmentación de Tau después de 5 horas, y después de 24 horas no se observó Tau. A una dosis menor (0,86 µM) de Aβ no se observó fragmentación. Curiosamente, al medir los lisados celulares de este experimento en el ELISA Tau-C, se observó un marcado aumento en las condiciones altas de Aβ a las 5 y 24 horas, mientras que solo se observaron niveles umbral en las otras condiciones. Estos datos, aunque preliminares, indican que el fragmento Tau-C en efecto se produce en conjunto con la muerte neuronal.

50 El ELISA Tau-C detecta fragmentos de degradación de Tau en suero de seres humanos, ratas y ratones, y es

técnicamente robusto

Las pruebas de recuperación de dilución de suero y plasma humano, y suero de rata y ratón, mostraron que todas estas muestras se pueden diluir y proporcionar recuperaciones lineales al medir a las diluciones correctas. Para el suero y el plasma humanos, el rango de dilución estuvo entre 1+1 y 1+3, para el suero de rata estuvo entre 1+1 y 1+3 y finalmente en el suero de ratón del rango de dilución aceptado fue 1+1 y 1+3. El coeficiente de variación intraensayo, determinado mediante la medición de 3 muestras de suero individuales 21 veces cada una, fue 5,8%. El CV% entre ensayos, determinado mediante la medición de 8 muestras diferentes en duplicados en 11 corridas diferentes durante un total de 5 días individuales, fue 12,6%. Finalmente, una serie de tres muestras de suero expuestas a 5 ciclos consecutivos de congelación-descongelación no mostraron una pérdida de reactividad.

5

10 Ensayo Tau-A

Reactivos y péptidos

Los péptidos sintéticos usados para la producción de anticuerpo monoclonal y validación fueron:

(a) péptido inmunogénico: TPRGAAPPGQ-GGC-KLH (SEQ ID NO:8) (Hemocianina de lapa californiana),

(b) péptido de cribado TPRGAAPPGQ (SEQ ID NO:2),

15

(c) péptido de de-selección ATPRGAAPPGQ (SEQ ID NO:4) que se ha alargado con un aminoácido en el extremo N-terminal.

Tampones usados para el ELISA

El tampón utilizado para disolver el péptido de recubrimiento estaba compuesto de lo siguiente: (Trizma 150 mM, BSA 1%, Tween-20 0,05%, Bronidox L5 0,36%, pH 8,0 (Tris-BTB) y tampón de detención de reacción compuesto por H₂SO₄ 0,1%.

20

Las placas ELISA utilizadas para el desarrollo del ensayo se recubrieron con estreptavidina de Roche cat .: 11940279. Todas las placas ELISA se analizaron con el lector ELISA de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA, EE. UU.).

Desarrollo de un ELISA

25

Los procedimientos para el desarrollo de anticuerpos monoclonales se describen previamente (Barascuk et al., 2010); Gefter, 1977 1917).

Brevemente, inmunizaron por vía subcutáneamente ratones Balb/C de 4 a 6 semanas de edad con 200 µl de antígeno emulsionado y 50 µg de TPRGAAPPGQ-GGC-KLH (SEC ID N°: 2-KLH). Se realizaron inmunizaciones consecutivas a intervalos de 2 semanas en adyuvante de Freund incompleto, hasta que se alcanzaron niveles estables de títulos de suero, y se sangraron los ratones desde la segunda inmunización en adelante. En cada sangrado, se detectó el título de suero y se seleccionó para fusión el ratón con el título de antisuero más alto. El ratón seleccionado se dejó descansar durante 1 mes seguido de refuerzo intravenoso con 50 µg de TPRGAAPPGQ-GGC-KLH (SEQ ID NO: 2-KLH) en 100 µl de solución de cloruro de sodio 0,9% 3 días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

30

35 Fusión

El procedimiento de fusión descrito previamente (Gefter et al., 1977) se siguió con SP2/0 como células de mieloma. Las células de fusión se clonaron en placas de cultivo celular de 35 mm mediante el procedimiento de medio semisólido y las placas se incubaron en una incubadora con CO₂. A continuación, se clonaron los clones en dieciséis placas de microtitulación de 96 pocillos y se dejaron durante tres días, seguido del análisis de los sobrenadantes de cultivo.

40

Cribado del anticuerpo

Los sobrenadantes se analizaron en un marco de ELISA competitivo. El péptido TPRGAAPPGQ (SEQ ID NO: 2) se usó como el péptido de selección y el ATPRGAAPPGQ (SEQ ID NO: 4) como el péptido alargado. Se seleccionaron líneas celulares específicas para el péptido de selección y sin reactividad cruzada con el péptido alargado y los anticuerpos se purificaron.

45

Metodología ELISA Tau-A

En experimentos preliminares, se optimizaron los reactivos, sus concentraciones y los períodos de incubación mediante la realización de varios análisis de tablero de ajedrez. El ELISA Tau-A se desarrolló de la siguiente manera: una placa ELISA de 96 pocillos pre-recubierta con estreptavidina se recubrió adicionalmente con 6 ng/ml del péptido sintético TPRGAAPPGQ-Biotina (SEQ ID NO: 2- Biotina) disuelta en tampón Tris-BTB a 20 °C durante

50

30 min por agitación constante a 300 rpm. La placa se lavó cinco veces en tampón de lavado y se añadieron 20 µl de muestra, seguido de 100 µl de solución de anti mAb-Tau-A humana conjugada con peroxidasa (50 ng/ml). La placa se incubó durante 1 hora a 20 °C en tampón Tris-BTB 100 mM, tiempo durante el cual se agitó a 300 rpm.

- 5 La placa se lavó nuevamente cinco veces seguido de la adición de 100 µl de tetrametilbencidina (TMB) (Kem-En-Tec cat,438OH). La placa se incubó durante 15 minutos en la oscuridad y se agitó a 300 rpm. Para detener la reacción, se añadieron 100 µl de solución de detención (H₂SO₄ 95-97%, Merck Cat. No. : 1,00731) y la placa se analizó en el lector ELISA a 450 nm con 650 nm como referencia.

Estándares

- 10 Se realizó una curva estándar por dilución seriada de TPRGAAPPQ-biotina (SEQ ID NO: 2-biotina). Las concentraciones estándares fueron 0, 0,782, 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng/ml.

Muestras para analizar la reactividad nativa de los anticuerpos

- 15 Durante el desarrollo del ensayo y la validación se usó suero de sujetos adultos sanos de diferentes edades y géneros. Se obtienen muestras de suero de jóvenes voluntarios sanos de 23-45 años de edad. También se analizaron muestras de suero de diferentes especies, que incluyen ratones y ratas, para determinar el nivel de reactividad cruzada entre especies. Finalmente, también se analizaron muestras de líquido cefalorraquídeo (CSF) y plasma.

Muestras de animales

- 20 Se extrajeron cerebros ultrarrápidos de 5 ratones de tipo salvaje y 5 de tauopatía Tg4510 de 5 meses (de Calignon et al., 2009) de acuerdo con el siguiente protocolo: el tejido se pulverizó usando un pulverizador Bessman y se pesó. El tejido se extrajo utilizando 250 mg de tampón de extracción de tejido/ml (Tris-HCl 50 mM, HEPES 50 mM, glicerol 15%, EDTA 1 mM, desoxicolato de sodio 0,5%, inhibidor de proteasa Roche (cat# 05 056 489001), pH final 8,3). El lisado se eliminó por sonicación, y los sobrenadantes se recogieron después de centrifugar a 4 °C/5 min/10000 rpm. La concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína DC de BioRad.

Transferencia Western

- 25 Se cargaron 100 µg de cada extracto en un gel SDS-PAGE. Se corrió el gel y las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa como se describe en (Henriksen et al., 2004). Los niveles de fragmentos Tau-A y proteína Tau total se detectaron mediante incubación con los anticuerpos primarios diluidos a 100 ng/ml en TBS-T que contiene leche descremada en polvo (Henriksen et al., 2004). Posteriormente se usó un anticuerpo secundario que reconoce IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, y finalmente se visualizó la transferencia usando quimioluminiscencia mejorada como se describió previamente (Henriksen et al., 2004).
- 30

Muestras humanas

- Se utilizaron dos conjuntos de muestras humanas. Un conjunto (51 muestras) era una colección de muestras de suero de un estudio de osteoartritis, este estudio contenía participantes con edades entre 18-75 años, así como datos del índice de masa corporal (Bay-Jensen et al., 2011).
- 35 El segundo conjunto de muestras fue muestras de suero y CSF apareadas de pacientes con enfermedad de Alzheimer grave. Estas muestras contenían un subconjunto de muestras recogidas de los mismos individuos al inicio y durante el seguimiento (18 meses después).

Análisis estadístico

- 40 Para la validación del ensayo, se ajustó la densidad óptica contra la concentración de analito aplicando una regresión logística de cuatro parámetros a la curva de calibración. Se calcularon el promedio, las desviaciones estándar, el coeficiente de variación porcentual (% CV) y las diferencias de los valores teóricos para todos los estándares y muestras. Los datos cuantitativos se analizaron utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante la prueba t no apareada de dos colas de Student, asumiendo una distribución no gaussiana. Las correlaciones entre los valores de Tau en suero y el resto de las variables estudiadas se analizaron mediante regresión lineal. Los datos se expresaron como media ± error estándar de la media y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de p de 0,05 o inferior.
- 45

Resultados

Especificaciones técnicas del ELISA

- 50 El anticuerpo con la mejor reactividad, afinidad y estabilidad nativa en el ensayo se eligió entre los clones productores de anticuerpos generados después de la fusión de las células de bazo y mieloma. El clon elegido para la purificación de anticuerpos y el desarrollo posterior del ELISA fue NB191-3C4, producido contra TPRGAAPPQ

(SEQ ID NO: 2).

Curva estándar y recuperación

5 Se obtuvo una curva estándar típica basada en concentraciones de péptidos de 0, 0,782, 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 y 100 ng/ml. Además, se mostró la especificidad del anticuerpo en comparación con las mismas concentraciones del péptido alargado que no dio reacción alguna.

La determinación de la linealidad o recuperación por dilución en diferentes muestras dio como resultado lo siguiente. Las recuperaciones determinadas promedio calculadas de nuevo a partir de muestras diluidas 1+1, 1+2, 1+3, 1+4, 1+5, 1+6 y 1+7 a la muestra sin diluir fueron cercanas al 100% y dentro del \pm 10% recomendado (datos no mostrados).

10 Cálculo de los resultados del biomarcador

El valor a de la media de referencia normal (NRM) se estableció tanto para los ensayos Tau-A como para el Tau-C como el valor medio de cada biomarcador medido en muestras de individuos de control apareados por edad y sexo sanos ("normales").

15 Todos los datos de biomarcadores de los sujetos con AD se presentan aquí como una relación entre el valor absoluto y los valores de NRM para tener en cuenta las diferencias entre las diferentes cohortes.

En consecuencia Tau-A' se calculó como $\text{Tau-A/NRM}_{\text{Tau-A}}$

En consecuencia Tau-C' se calculó como $\text{Tau-C/NRM}_{\text{Tau-C}}$

Por lo tanto, Tau-A' y Tau-C' presentan los valores de Tau-A y Tau-C como coeficientes del respectivo NRM.

Ejemplo 1: Valor diagnóstico y pronóstico de los ensayos

20 Sujetos:

Se obtuvieron muestras de suero basales de pacientes con Alzheimer temprano (n = 100) (para las cuales se depositaron en bancos al inicio), con puntuaciones de ADAS-Cog11, CDR-SB y MMSE evaluadas al inicio (n = 100), y ADAS-Cog11 y CDR-SB evaluadas en los puntos de tiempo de seguimiento de 28, 40, 52 y 64 semanas en un subconjunto de la cohorte (brazo de placebo) (n = 35).

25 Los criterios de inclusión fueron: Años y más, Cumple con los criterios para AD leve a moderada con una puntuación de examen del estado mini-mental de 16 a 26 en la visita 1. La puntuación de la escala de isquemia de Hachinski modificado menor o igual a 4. La puntuación de la escala de depresión geriátrica menor de o igual a 6. Una resonancia magnética (MRI) o una tomografía computarizada (TC) en los últimos 2 años sin hallazgos inconsistentes con un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer. Si la mujer debe estar sin menstruación durante al menos 12 meses consecutivos o si le han extirpado ambos ovarios. Los criterios de exclusión fueron:

30 No es capaz de tragar medicamentos orales enteros. Tiene enfermedades graves o inestables. No tiene un cuidador confiable.

Abuso crónico de alcohol o drogas en los últimos 5 años. Alguna vez ha tenido una vacuna activa para AD.

Criterios de valoración:

35 Correlaciones con ADAS-Cog11 y CDR-SB iniciales. Correlaciones con el cambio en ADAS-Cog11 y/o CDR-SB durante el tiempo

Análisis estadístico

40 Se verificó la normalidad de todos los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Los datos que no se distribuyen normalmente (por ejemplo, $p < 0,05$) se transformaron por logaritmos a la normalidad. Las correlaciones entre los niveles plasmáticos de Tau y los criterios de valoración se analizaron mediante regresión lineal. Se usó un modelo MMRM para comparar el cambio en las puntuaciones cognitivas con la relación Tau-A', Tau-C' o Tau-A'/Tau-C', mientras se ajusta por edad, inicio y puntuación cognitiva inicial.

Resultados

Características del paciente:

45 Las características de la subpoblación de estudios (NCT00762411 y NCT00594568) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características iniciales de los sujetos.

Edad en años (SD)	M/F	Duración de la enfermedad (años)	ADAS- Cog11	CDR- SB	Estratificación MMSE (leve/moderado)
71,6 (7,7)	47=1/52=2	5,4 (2,6)	23,9 (9,6)	4,8 (3,2)	68/32

5 Según lo previsto, la población de 100 pacientes se encuentra en la categoría de AD leve a moderada y, por lo tanto, representa una población blanco clásica para un estudio de intervención farmacológica (Cummings, 2011) y, por lo tanto, también representa una población que es de gran interés para los estudios de biomarcadores. La Figura 1 muestra el cambio en las puntuaciones cognitivas ADAS-Cog11 y CDR-SB durante 64 semanas, mientras que la Figura 2 muestra la correlación entre las dos puntuaciones cognitivas diferentes al inicio y entre sus cambios durante las 64 semanas. En términos de cambio cognitivo durante el estudio, el cambio en ADAS-Cog11 durante el período de estudio de 64 semanas fue de 4,7 +/- 1,7 con un aumento continuo visto en todos los puntos de tiempo, lo que subraya claramente que la progresión tuvo lugar. Para CDR-SB el aumento fue 1,9 +/- 0,8. Sin embargo, la variación en el cambio de las puntuaciones cognitivas fue sustancial como se esperaba para una evaluación cognitiva.

Correlaciones del biomarcador inicial con las puntuaciones cognitivas.

15 Para investigar la relevancia clínica de los fragmentos de Tau en muestras de suero, se correlacionan con los valores de Tau-A' y Tau-C'¹ obtenidos con las evaluaciones cognitivas basales utilizando ADAS-Cog11 y CDR-SB, y no encontramos ninguna relación entre los valores de biomarcadores iniciales y puntuaciones cognitivas (datos no mostrados).

¹ Tau-A y Tau-C en relación con sus respectivos medios de referencia normales como se describió anteriormente.

Correlación del biomarcador para cambiar la puntuación de ADAS-Cog11

20 Para investigar la relación entre los niveles de biomarcadores basales y el cambio en la función cognitiva, se realizaron una serie de regresiones lineales. En la figura 3A-D se observa la correlación entre los niveles de Tau-A y ADAS-Cog11 en los diferentes puntos de tiempo de seguimiento, y una tendencia entre los niveles basales de Tau-A' y el cambio en ADAS-Cog11 es evidente en los tres puntos de tiempo tardío, pero no el punto de tiempo temprano (28 semanas).

25 Con respecto a los niveles de Tau-C' medidos al inicio, se observaron tendencias o correlaciones inversas estadísticamente significativas para cambiar en ADAS-Cog11 en los diferentes puntos de tiempo de seguimiento de 28, 40, 52 y 64 semanas (Figura 4A-D), lo que indica cierta relevancia para este marcador como indicador de la progresión de la enfermedad.

Las relaciones entre Tau-A'y el cambio en ADAS-Cog 11 y Tau-C' y el cambio en ADAS-Cog11 fueron opuestas, lo que indica claramente que Tau-A' y Tau-C' representan aspectos patológicos independientes de la enfermedad de Alzheimer.

30 Con este hallazgo en mente, se combinaron los dos marcadores en una relación para investigar si la combinación de los marcadores podría ayudar a evitar parte de la variación intrínseca en el conjunto de datos de puntuación cognitiva (el % de CV en el cambio en ADAS-Cog11 es 137%) . Con respecto a las puntuaciones cognitivas iniciales no se observaron correlaciones (datos no mostrados).

35 Como se ve en la Figura 5, una combinación de los dos biomarcadores séricos condujo a correlaciones más fuertes y estadísticamente significativas cuando se observan todos los puntos de tiempo de seguimiento individuales, e incluso al eliminar los puntos más extremos de las correlaciones, las correlaciones aún eran estadísticamente significativo (datos no mostrados).

Correlación del biomarcador al cambio en la puntuación en CDR-SB.

40 Posteriormente se investigó la relación entre los niveles basales de biomarcadores y el cambio en la suma de cuadros de clasificación de demencia clínica, nuevamente utilizando una serie de regresiones lineales. En la Figura 6, los paneles AD, se muestran las correlaciones entre los niveles de Tau-A' y CDR-SB en los diferentes puntos de tiempo de seguimiento, y se observa una tendencia general hacia una relación positiva entre los niveles de referencia de Tau-A y el cambio en CDR-SB evidente e incluso alcanza significación estadística en la semana 40.

45 Con respecto a los niveles de Tau-C', se observó una imagen ligeramente más variable con la tendencia general hacia una relación positiva entre Tau-C' y el cambio en CDR-SB (Figura 7, paneles A-D). Sin embargo, como se ve en la Figura 7, panel C, la gran variación en el cambio en CDR-SB de un punto de tiempo a punto a tiempo a otro es un problema.

Las relaciones entre Tau-A' y el cambio en CDR-SB y Tau-C' y el cambio en ADAS-CDR-SB no estaban relacionadas, lo que, como para ADAS-Cog11, indica que Tau-A' y Tau-C' representan aspectos patológicos independientes de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, nuevamente se combinaron los dos marcadores en una relación para ver si esto podría ayudar a reducir parte de la variación. Con respecto a las puntuaciones cognitivas iniciales no se observaron correlaciones (datos no mostrados).

Como se ve en la Figura 8, una combinación de los dos biomarcadores séricos mostró una mejora continua de la correlación de la relación del marcador sérico con el cambio en CDR-SB.

Como los análisis de regresión lineal se construyeron independientemente de los parámetros basales y solo muestran instantáneas de los datos, se realizó un análisis MMRM (Medida repetida del modelo de efectos mixtos), y en este modelo se ajustó la puntuación cognitiva basal y la edad en inicio, y se halló una relación muy interesante entre Tau-C y el cambio en ADAS-Cog11 ($p = 0,06$), y una relación más fuerte para la relación Tau-A/Tau-C ($p = 0,009$) (ver Tabla 2).

Tabla 2: valores p del modelo MMRM; VISID 11, 12, 13, 14. Cambio del modelo= estado inicial+ageyr+log10(Tau)

Puntuación	N	Tau A	Tau C1	Tau A/C
ADAS-Cog11	35	0,56	0,06	0,009
CDR-SB	34	0,04	0,56	0,04

Para CDR-SB, se observó que Tau-A' estaba significativamente relacionado con el cambio ($p < 0,04$), mientras que Tau-C' o la combinación no alteraron este resultado. Estos datos realmente fortalecen la idea de que los fragmentos Tau presentes en el suero pueden proporcionar la tasa de progresión de la AD, y también ilustran que los diferentes fragmentos Tau están relacionados con diferentes aspectos patológicos.

Discusión

Se han investigado ampliamente los marcadores potenciales de suero y/o plasma para la AD. Si bien se han estudiado muchos, ninguno de ellos ha sido capaz de indicar la tasa de progresión de la enfermedad, un parámetro que es de crucial importancia para el desarrollo de tratamientos modificadores de la enfermedad de la AD (Han et al., 2011; Mielke et al., 2011; Ray et al., 2007; Henriksen et al., 2013).

En relación con la progresión de la enfermedad de Alzheimer, varios estudios han indicado que la proteína Tau se procesa proteolíticamente durante la muerte neuronal, y que una de las proteasas involucradas en este proceso es la caspasa-3 (Hanger y Wray, 2010; Lee et al., 2001; Rissman et al., 2004; de et al., 2010; Gamblin et al., 2003; Park et al., 2007), y en consecuencia el control de los fragmentos de caspasa de Tau, tal como Tau-C, es de interés sustancial en la enfermedad de Alzheimer. En segundo lugar, un estudio reciente indicó la relevancia patológica de un fragmento de Tau (Tau-A) generado por ADAM 10 como marcador sérico de la función cognitiva (Sorensen et al., 2012).

Por lo tanto, se aplicó un ELISA que mide Tau-C' en suero, así como el ensayo Tau-A' descrito anteriormente a muestras de suero recolectadas al inicio de un ensayo clínico de fase III, y se correlacionaron los niveles de estos biomarcadores con la puntuación cognitiva así como los cambios en la puntuación cognitiva con el tiempo.

Los autores no hallaron ninguna relación con ADAS-Cog11 o CDR-SB iniciales para Tau-A', Tau-C' o la relación entre estos, un hallazgo que indica que estos marcadores no tienen potencial de diagnóstico en este contexto, es decir, pacientes con AD temprana. Por el contrario, se observó una indicación hacia una relación positiva entre el suero Tau-A' y el cambio en ADAS-Cog11 y una relación negativa entre el suero Tau-C' y el cambio en ADAS-Cog11. Estos datos respaldan que la medición de fragmentos de Tau en suero, que representan varias etapas de la patología, puede proporcionar la tasa de progresión de la enfermedad. Curiosamente, la combinación de los dos biomarcadores séricos en una relación proporcionó una mejor correlación con el cambio en ADAS-Cog11 y produjo una significancia estadística en todos los puntos de tiempo investigados. Es importante destacar que el análisis MMRM de los autores confirmó estos hallazgos y destacó la relación entre Tau-C', así como la relación entre Tau-A' y Tau C' y ADAS-Cog11 al ajustar por factores de confusión, tales como la edad al inicio de la enfermedad y la puntuación cognitiva inicial. La combinación de estos dos biomarcadores proporciona una forma de reducir algunas de las variaciones asociadas con una evaluación cognitiva.

Cuando se correlacionaron los niveles de Tau-A', Tau-C' y la relación entre estos dos con los cambios en CDR-SB, se halló que Tau-A' se correlacionó bien con el cambio en CDR-SB; si bien no parecía haber información adicional al medir Tau-C' o la relación, datos que también se confirmaron utilizando el modelo MMRM.

Para aclarar si la diferencia entre Tau-A' y Tau-C' y sus relaciones con CDR-SB y ADAS-Cog11 respectivamente, podría ser biológicamente significativa, se correlacionaron las puntuaciones cognitivas y el cambio en las

5 puntuaciones cognitivas respectivamente y aquí se halló que ADAS-Cog11 inicial se correlacionó con CDR-SB inicial con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,68$; sin embargo, cuando correlacionó el cambio en ADAS-Cog11 con CDR-SB, la correlación tuvo un R^2 de 0,36. Estos datos indican que los cambios en las puntuaciones cognitivas se deben en parte a diferentes aspectos de la enfermedad, como lo ilustran las diferencias en cómo se obtienen estas puntuaciones (O'Bryant et al., 2010; Rosen et al., 1984; Hughes et al., 1982).

10 En relación con los biomarcadores clásicos de AD, tales como CSF-Tau, CSF-fosfo-Tau, beta amiloide (1-40 y 1-42) tanto en CSF como en plasma, no se observó ninguna correlación de TauA, TauC o su relación con estos en el estado inicial (datos no mostrados), datos que indican que los dos fragmentos Tau proporcionan información no directamente relacionada con biomarcadores de fluidos ya existentes. Los biomarcadores existentes son principalmente relevantes para el diagnóstico de AD así como la segregación de estos de otros tipos de demencia, pero no tienen la capacidad de predecir la progresión de la enfermedad (Cummings, 2011; Frank and Hargreaves, 2003; Hampel et al., 2010; Zetterberg, 2008). Hay algunas indicaciones de que los niveles plasmáticos de Abeta pueden predecir el deterioro cognitivo en personas de edad avanzada sanos (Yaffe et al., 2011); sin embargo, publicaciones recientes sobre Abeta en plasma han indicado que se necesitan más estudios antes de que esté presente la comprensión completa (Toledo et al., 2013).

15 Es importante destacar que estos datos indican que la relación entre Tau-A y Tau-C, calculada opcionalmente como la relación entre Tau-A' y Tau-C', proporciona una herramienta para medir la tasa de progresión de la enfermedad en la AD temprana, y por lo tanto ser útil para identificar sujetos para inscribir en ensayos clínicos de fármacos modificadores de la enfermedad.

20 En la presente memoria descriptiva, a menos que se indique expresamente lo contrario, la palabra 'o' se usa en el sentido de un operador que obtiene un valor verdadero cuando se cumple una o ambas de las condiciones establecidas, en oposición al operador 'exclusivo o' que requiere que solo se cumpla una de las condiciones. La palabra "comprender" se usa en el sentido de "incluir" en lugar de significar "que consiste en".

Referencias

- 5 1. Barascuk, N., S.S.Veidal, L.Larsen, D.V.Larsen, M.R.Larsen, J.Wang, Q.Zheng, R.Xing, Y.Cao, L.M.Rasmussen, and M.A.Karsdal. 2010. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin. Biochem.* 43:899-904.
2. Bay-Jensen, A.C., Q.Liu, I.Byrjalsen, Y.Li, J.Wang, C.Pedersen, D.J.Leeming, E.B.Dam, Q.Zheng, P.Qvist, and M.A.Karsdal. 2011. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISAs) for metalloproteinase derived type II collagen neoepitope, CIIM--increased serum CIIM in subjects with severe radiographic osteoarthritis. *Clin. Biochem.* 44:423-429.
- 10 3. Cummings, J.L. 2011. Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimers. Dement.* 7:e13-e44.
4. de Calignon, A., L.M.Fox, R.Pitstick, G.A.Carlson, B.J.Bacsikai, T.L.Spires-Jones, and B.T.Hyman. 2010. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464:1201-1204.
- 15 5. de Calignon, A., T.L.Spires-Jones, R.Pitstick, G.A.Carlson, and B.T.Hyman. 2009. Tangle-bearing neurons survive 30 despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68:757-761.
6. De Strooper, B. 2010. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev.* 90:465-494.
- 20 7. Frank, R. and R.Hargreaves. 2003. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:566-580.
8. Gamblin, T.C., F.Chen, A.Zambrano, A.Abraha, S.Lagalwar, A.L.Guillozet, M.Lu, Y.Fu, F.Garcia-Sierra, N.LaPointe, R.Miller, R.W.Berry, L.I.Binder, and V.L.Cryns. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and 40 neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:10032-10037.
- 25 9. Garcia-Sierra, F., S.Mondragon-Rodriguez, and G.Basurto-Islas. 2008. Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 14:401-409.
10. Gefter, M.L., D.H.Margulies, and M.D.Scharff. 1977. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybrid-ization of mouse myeloma cells. *Somatic. Cell Genet.* 3:231-236.
- 30 11. Goedert, M., M.G.Spillantini, R.Jakes, D.Rutherford, and R.A.Crowther. 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 503:519-526.
12. Greene, L.A. 1978. Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium. *J. Cell Biol.* 78:747-755.
- 35 13. Hampel, H., R.Frank, K.Broich, S.J.Teipel, R.G.Katz, J.Hardy, K.Herholz, A.L.Bokde, F.Jessen, Y.C.Hoessler, W.R.Sanhai, H.Zetterberg, J.Woodcock, and K.Blennow. 2010. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:560-574.
- 40 14. Han, X., S.Rozen, S.H.Boyle, C.Hellegers, H.Cheng, J.R.Burke, K.A.Welsh-Bohmer, P.M.Doraiswamy, and R.Kaddurah-Daouk. 2011. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics. *PLoS. One.* 6:e21643.
15. Hanger, D.P. and S.Wray. 2010. Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. *Biochem. Soc. Trans.* 38:1016-1020.
- 45 16. Henriksen, K., J.Gram, S.Schaller, B.H.Dahl, M.H.Dziegiel, J.Bollerslev, and M.A.Karsdal. 2004. Characterization of osteoclasts from patients harboring a G215R mutation in CIC-7 causing autosomal dominant osteopetrosis type 10 II. *Am J Pathol* 164:1537-1545.
17. Henriksen,K., S.E.O'Bryant, H.Hampel, J.Q.Trojanowski, T.J.Montine, A.Jeromin, K.Blennow, A.Lonneborg, T.Wyss-Coray, H.Soaes, C.Bazenet, M.Sjogren, W.Hu, S.Lovestone, M.A.Karsdal, and M.W.Weiner. The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. 2013 [Epub ahead of print]

18. Hughes, C.P., L.Berg, W.L.Danziger, L.A.Coben, and R.L.Martin. 1982. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br. J. Psychiatry* 140:566-572.
19. Karsdal, M.A., K.Henriksen, D.J.Leeming, T.Woodworth, E.Vassiliadis, and A.C.Bay-Jensen. 2010. Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers-are they the cause or the consequence of the disease? *Clin. Biochem.* 43:793-804.
20. Lasagna-Reeves, C.A., D.L.Castillo-Carranza, U.Sengupta, J.Sarmiento, J.Troncoso, G.R.Jackson, and R.Kayed. 2012. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.*
21. Lee, S.E., W.J.Chung, H.B.Kwak, C.H.Chung, K.B.Kwack, Z.H.Lee, and H.H.Kim. 2001. Tumor necrosis factor- alpha supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK. *J Biol Chem* 276:49343-49349.
22. Mielke, M.M., N.J.Haughey, V.V.Bandaru, D.D.Weinberg, E.Darby, N.Zaidi, V.Pavlik, R.S.Doody, and C.G.Lyket sos. 2011. Plasma Sphingomyelins are Associated with Cognitive Progression in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.*
23. O'Bryant, S.E., S.C.Waring, V.Hobson, J.R.Hall, C.B.Moore, T.Bottiglieri, P.Massman, and R.az-Arrastia. 2010. Decreased C-reactive protein levels in Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23:49-53.
24. Park, S.Y., C.Tournell, R.C.Sinjoanu, and A.Ferreira. 2007. Caspase-3- and calpain-mediated tau cleavage are differentially prevented by estrogen and testosterone in beta-amyloid-treated hippocampal neurons. *Neuroscience* 144:119-127.
25. Ray, S., M.Britschgi, C.Herbert, Y.Takeda-Uchimura, A.Boxer, K.Blennow, L.F.Friedman, D.R.Galasko, M.Jutel, A.Karydas, J.A.Kaye, J.Leszek, B.L.Miller, L.Minthon, J.F.Quinn, G.D.Rabinovici, W.H.Robinson, M.N.Sabbagh, Y.T.So, D.L.Sparks, M.Tabaton, J.Tinklenberg, J.A.Yesavage, R.Tibshirani, and T.Wyss-Coray. 2007. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* 13:1359-1362.
26. Reifert, J., D.Hartung-Cranston, and S.C.Feinstein. 2011. Amyloid {beta}-Mediated Cell Death of Cultured Hippocampal Neurons Reveals Extensive Tau Fragmentation without Increased Full-length Tau Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 286:20797-20811.
27. Rissman, R.A., W.W.Poon, M.Blurton-Jones, S.Oddo, R.Torp, M.P.Vitek, F.M.LaFerla, T.T.Rohn, and C.W.Cotman. 2004. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J. Clin. Invest* 114:121-130.
28. Rosen, W.G., R.C.Mohs, and K.L.Davis. 1984. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 141:1356-1364.
29. Sorensen,M.G., Y.Wang, M.Pajak, K.Duffin, A.C.Bay-Jensen, N.Barascuk, M.A.Karsdal, and K.Henriksen. Utilization of a protease-generated fragment of tau as a biomarker of Alzheimer's disease. 8[4], Suppl. P240. 2012. *Alzheimer's & Dementia.*
30. Toledo, J.B., L.M.Shaw, and J.Q.Trojanowski. 2013. Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers. Res. Ther.* 5:8.
31. Wang,Y., M.G.Sorensen, Q.Zheng, C.Zhang, Karsdal M.A., and K.Henriksen. Will Post-translational Modifications of Brain Proteins Provide Novel Serological Markers for Dementias? *Int J Alz Disease.*
32. Yaffe, K., A.Weston, N.R.Graff-Radford, S.Satterfield, E.M.Simonsick, S.G.Younkin, L.H.Younkin, L.Kuller, H.N.Ayonayon, J.Ding, and T.B.Harris. 2011. Association of plasma beta-amyloid level and cognitive reserve with subsequent cognitive decline. *JAMA* 305:261-266.
33. Zetterberg, H. 2008. Biomarkers reflecting different facets of Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 15:1143-1144.
34. Mette Sorensen et al., "Utilization of a protease-generated fragment of tau as a biomarker of Alzheimer's disease", *Alzheimer's & Dementia*, (2012), vol. 8, no. 4, page P240
35. Basurto-Islas, G et al., "Accumulation of aspartic acid 421- and glutamic acid 391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease.", *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology* (2008), vol. 67, no. 5, pages 470.

ES 2 743 615 T3

Listado de secuencias

<110> Nordic Bioscience A/S

<120> Biomarcadores de la progresión de la enfermedad

<130> P18859WO

5 <150> GB1319761,1

<151> 2013-11-08

<160>

<170> BiSSAP 1,2

<210> 1

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
1 5 10

15 <210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

20

Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser
1 5 10

<210> 4

30 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
1 5 10

35 <210> 5

ES 2 743 615 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

5

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp

1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln
1 5 10

<210> 7

<211> 13

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Gly Cys Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp
1 5 10

20 <210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

25

Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Gly Gly Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ensayo de una muestra de fluido corporal que comprende, en cualquier orden:
 - 5 a) realizar un primer inmunoensayo de la muestra para determinar un primer nivel de unión en la misma de un anticuerpo que tiene especificidad por un epítopo C-terminal presente en el extremo terminal de la secuencia de aminoácidos -SSTGSIDM VD (SEQ ID NO: 1), y
 - b) realizar un segundo inmunoensayo de la muestra para determinar un segundo nivel de unión en la misma de un compañero de unión inmunológica que tiene especificidad por un epítopo N-terminal presente en el extremo terminal de la secuencia de aminoácidos TPRGAAPPGQ- (SEC ID NO: 2),
 - y
 - 10 c) calcular un índice que expresa el contenido de información de una relación entre dicho segundo nivel y dicho primer nivel.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho índice se calcula para expresar el contenido de información de una relación (Tau-A'/Tau-C'), en el que Tau-A' se denomina primer nivel y Tau-C' se denomina segundo nivel, estando cada uno expresado como un coeficiente de la media de referencia normal de la medición.
- 15 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha muestra es una muestra de sangre, suero, plasma, CSF, saliva, esputo, tejidos, extractos de tejido, fluido de BALF.
4. Un procedimiento para determinar qué pacientes deben ser inscritos en un ensayo clínico de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende para cada paciente candidato realizar un procedimiento de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y seleccionar para su inscripción pacientes que tienen un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos tres puntos durante 52 semanas.
- 20 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se seleccionan pacientes que tienen un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos tres puntos durante 40 semanas.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que se seleccionan pacientes que tienen un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos tres puntos durante 28 semanas.
7. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que se seleccionan pacientes que tienen un índice predictivo de un cambio en ADAS-Cog11 de al menos seis puntos durante el número de semanas indicado.
- 30 8. Un procedimiento para determinar qué pacientes deben ser inscritos en un ensayo clínico de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende para cada paciente candidato realizar un procedimiento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 2, y seleccionar para su inscripción pacientes que tienen un índice correspondiente a una relación (Tau-A'/Tau-C') mayor de 1,5.
- 35 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende seleccionar para su inscripción pacientes que tienen un índice correspondiente a una relación (Tau-A'/Tau-C') mayor de 2,0.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los pacientes seleccionados tienen una relación de (Tau-A'/Tau-C') mayor de 2,5 o superior.
11. Un procedimiento para determinar la eficacia de una intervención candidata para el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende llevar a cabo un ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en una muestra obtenida de cada paciente en un primer panel de pacientes y un segundo panel de pacientes en el que se ha aplicado dicha intervención a dicho primer panel de pacientes y se ha aplicado una intervención de comparación a dicho segundo panel de pacientes, y comparar los valores para dicho índice obtenido para dicho primer panel de pacientes con valores para dicho índice obtenido para dicho segundo panel de pacientes, y determinar si la intervención candidata muestra un efecto superior en la modulación de dichos valores de índice en comparación con la intervención de comparación.
- 40 45 12. Un procedimiento para seleccionar pacientes para el tratamiento con una intervención para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer que comprende llevar a cabo un procedimiento de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y seleccionar pacientes para el tratamiento que tengan un índice resultante como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.

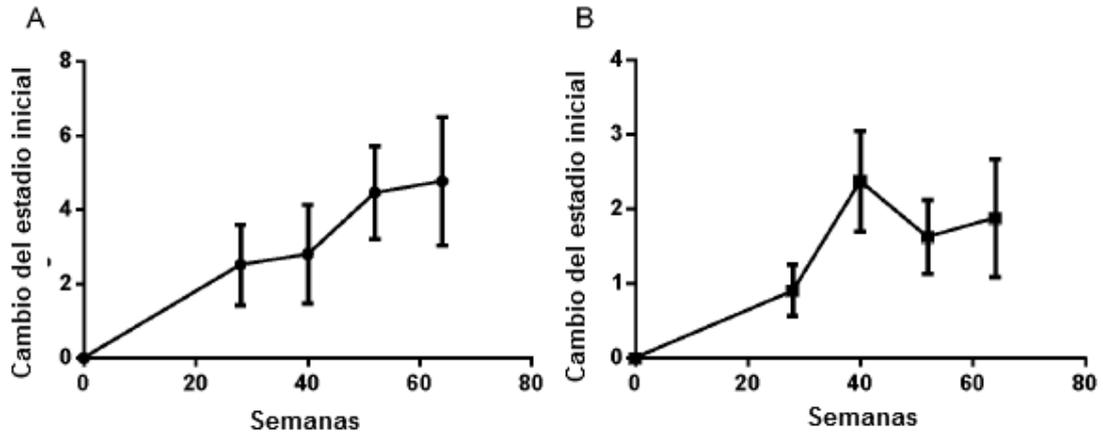


Figura 1: Cambio en las puntuaciones cognitivas con el tiempo durante el estudio. A) ADAS-Cog1 y B) CDR-SB.

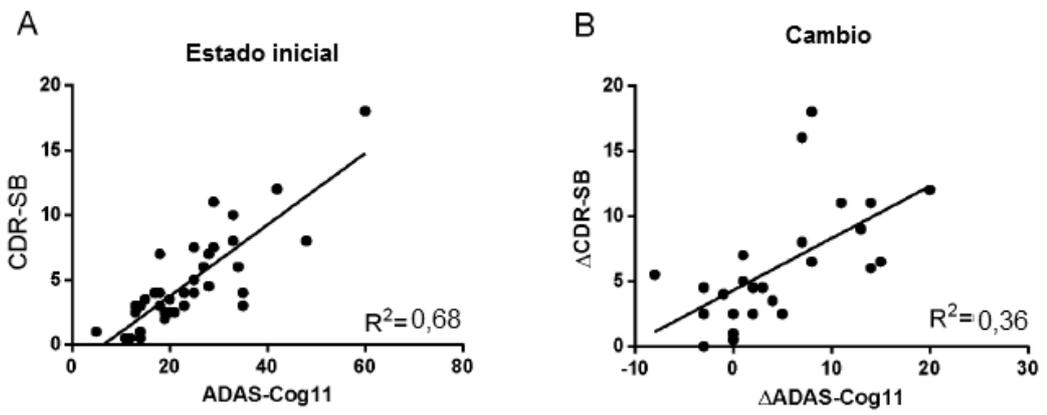


Figura 2: Diagrama de dispersión de ADAS-Cog1 y CDR-SB en estado inicial (A) y los cambios en ADAS-Cog1 y CDR-SB (B).

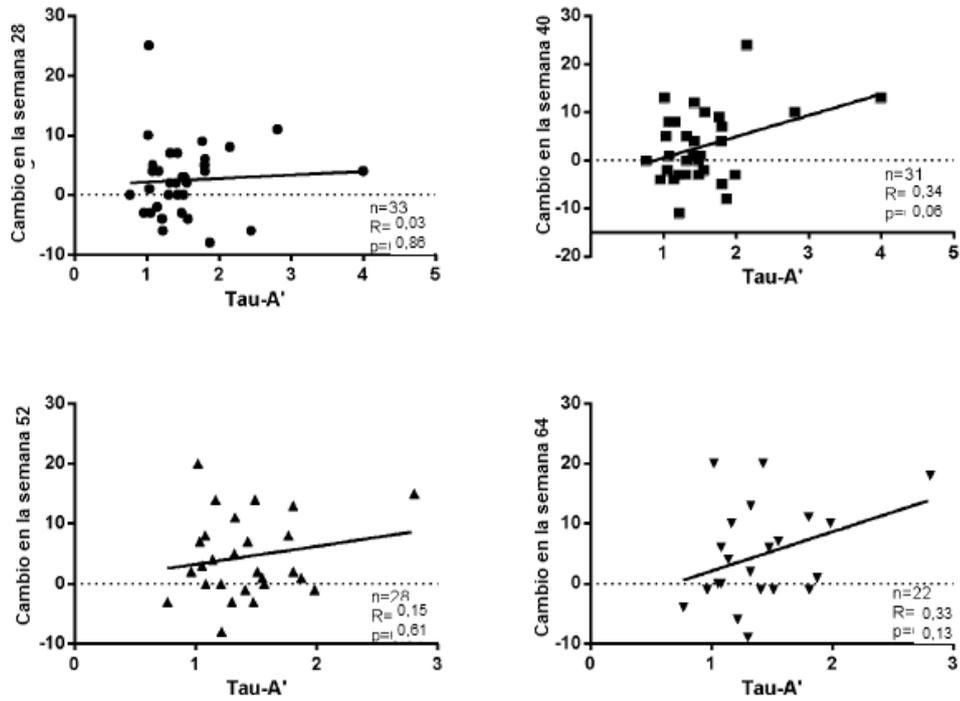


Figura 3: Correlaciones entre los niveles de Tau-A y el cambio en ADAS-Cog1 con el tiempo. A) cambio en 28 semanas, B) cambio en 40 semanas, C) cambio en 52 semanas, D) cambio en 64 semanas. MMRM p valor = 0,56

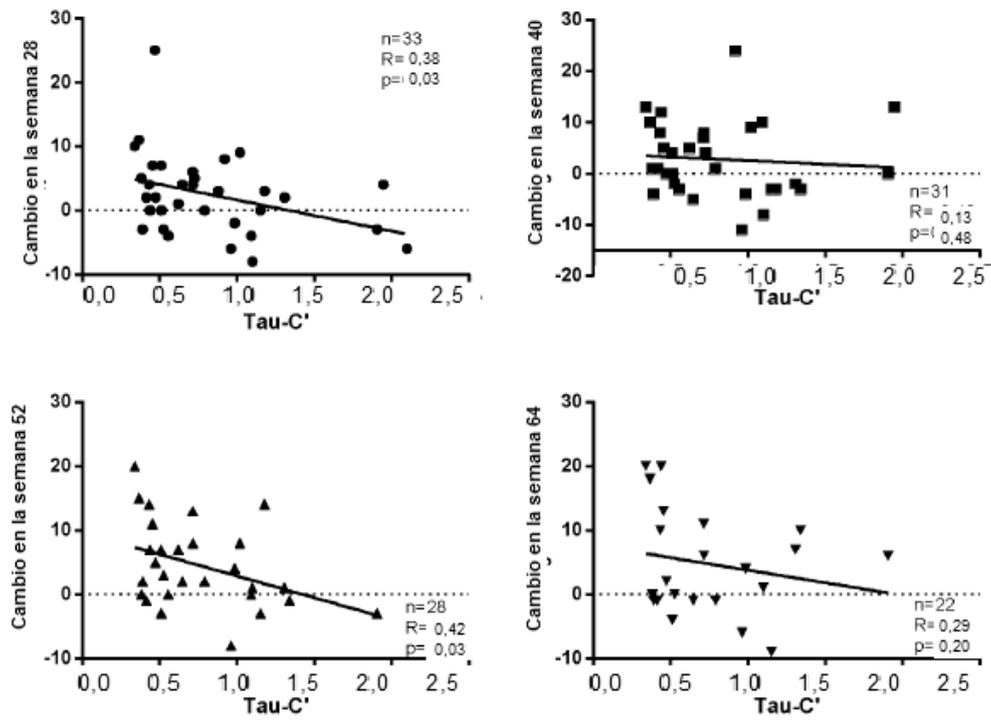


Figura 4: Correlaciones entre los niveles de Tau-C y el cambio en ADAS-Cog1 con el tiempo. A) cambio en 28 semanas, B) cambio en 40 semanas, C) cambio en 52 semanas, D) cambio en 64 semanas. MMRM p valor = 0,06

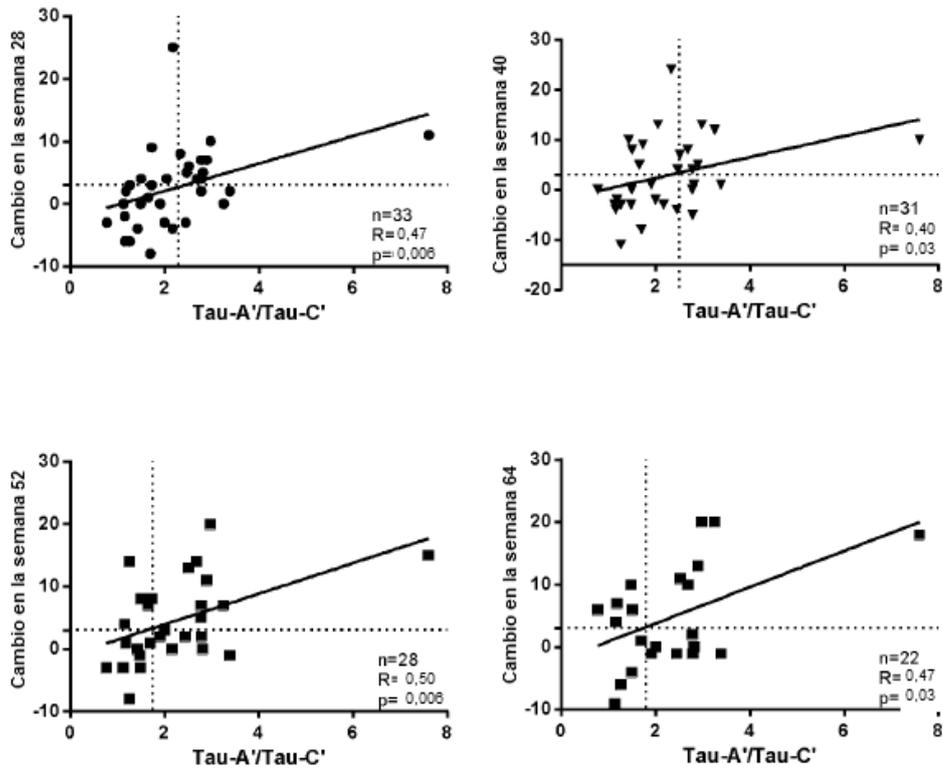


Figura 5: Correlaciones entre las relaciones Tau-A'/Tau-C' y el cambio en ADAS-Cog11 con el tiempo. A) cambio en 28 semanas, B) cambio en 40 semanas, C) cambio en 52 semanas, D) cambio en 64 semanas. Valor p MMRM = 0,009. Las líneas de puntos horizontales indican el aumento de tres puntos en la puntuación ADAS-Cog 11 considerada clínicamente significativa, y las relaciones correspondientes se pueden leer desde la intersección entre las líneas de puntos verticales y el eje X.

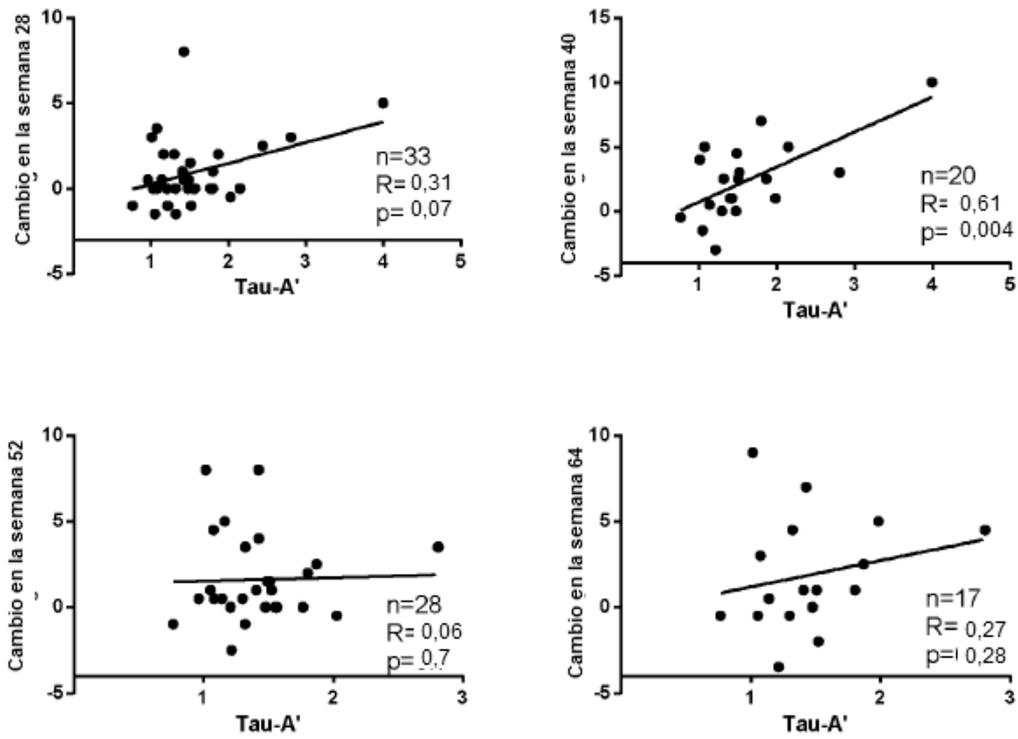


Figura 6: Correlaciones entre los niveles de Tau-A y el cambio en CDR-SB con el tiempo. A) cambio en 28 semanas, B) cambio en 40 semanas, C) cambio en 52 semanas, D) cambio en 64 semanas. MMRM p valor = 0,04.

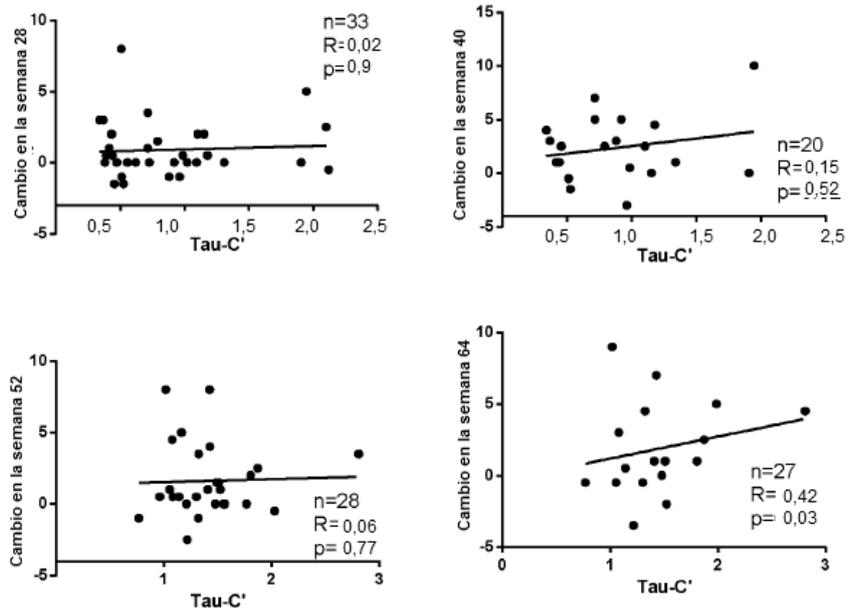


Figura 7: Correlaciones entre los niveles de Tau-C y el cambio en CDR-SB con el tiempo. A) Cambio en 28 semanas, B) Cambio en 40 semanas, C) Cambio en 52 semanas, D) Cambio en 64 semanas. MMRM valor de p = 0,56.

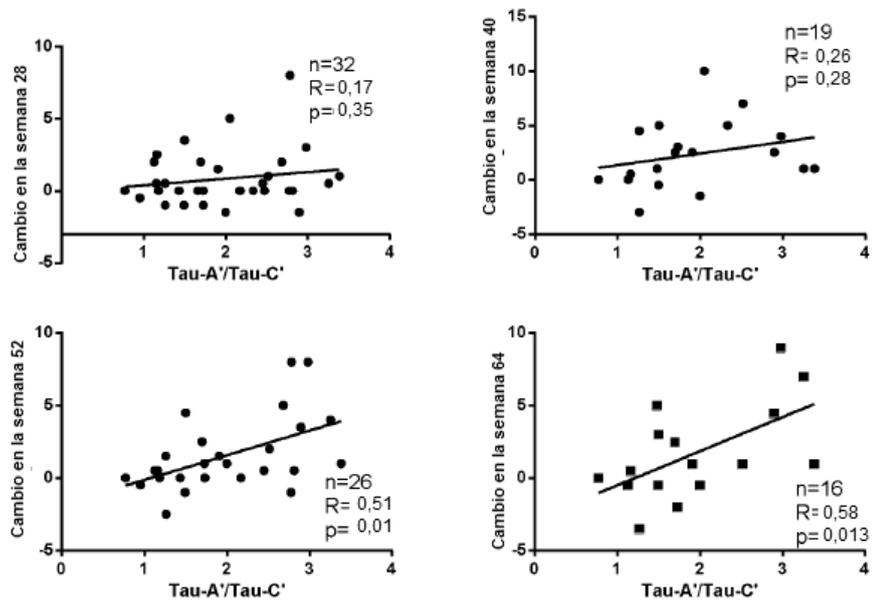


Figura 8: Correlaciones entre las relaciones Tau-A'/Tau-C' y el cambio en CDR-SB con el tiempo. A) Cambio en 28 semanas, B) Cambio en 40 semanas, C) Cambio en 52 semanas, D) Cambio en 64 semanas. MMRM p- valor = 0,04.