(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 436 318**

(51) Int. CI.:

G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/805 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2003 E 10164475 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2221620**

(54) Título: **Biomarcadores polipéptidos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer**

(30) Prioridad:

23.08.2002 EP 02018283
29.11.2002 EP 02026643

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2013

(73) Titular/es:

BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Müllerstrasse 178
13353 Berlin, DE

(72) Inventor/es:

YALKINOGLU, OEZKAN, DR.;
KÖNIG, GERHARD, DR.;
HOCHSTRASSER, DENIS FRANCOIS, PROF.DR.;
SANCHEZ, JEAN-CHARLES, DR. y
CARETTE, ODILE, DR.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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 polipéptidos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

La invención pertenece al campo de los diagnósticos. Más específicamente, la invención pertenece al campo de evaluación del estado de la enfermedad de Alzheimer en sujetos mediante la detección de polipéptidos marcadores específicos de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es una forma crecientemente prevalente de neurodegeneración que da cuenta de aproximadamente el 50-60 % de los casos generales de demencia entre la gente por encima de los 65 años de edad. Patológicamente, la neurodegeneración de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por atrofia prominente de estructuras corticolímbicas con muerte neuronal y pérdida de sinapsis neuronales, formación de marañas neurofibrilares, (NFT) y la formación de placas seniles que contienen depósitos de agregados de ß1-42 amiloide (Aß42) en el cerebro [Francis PT 1999]. La duración del declive cognitivo progresivo es aproximadamente 7 años desde la aparición de los primeros signos hasta la muerte. Se asume que la fase clínica está precedida por un periodo preclínico de 15-30 años de deposición continua de placas amiloides y marañas neurofibrilares. La edad de aparición y la progresión de la enfermedad están grandemente determinadas por las mutaciones de los genes causantes y por factores genéticos de susceptibilidad. Se pueden añadir varios factores de riesgo ambientales a los factores de riesgo genéticos individuales. Los factores genéticos conocidos por estar implicados en la forma familiar de enfermedad de Alzheimer con aparición temprana de la enfermedad son: mutaciones en genes de presenilina I (PS1), presenilina 2 (PS2) y proteína precursora amiloide (APP) y la presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E4. Sin embargo, la mayoría (95 %) de los casos de enfermedad de Alzheimer son esporádicos y heterogéneos.

Actualmente, el diagnóstico clínico de la enfermedad de Alzheimer solo puede establecerse en fases más tardías de la enfermedad, cuando la actuación cognitiva está significativamente disminuida por alteraciones estructurales del cerebro. El tratamiento diagnóstico clínico requiere un historial medico cuidadoso; examen físico y neurológico; exámenes de sangre, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR) para excluir estados morbosos metabólicos y médicos que puedan pasar por enfermedad de Alzheimer; exámenes psicométricos detallados para valorar el estado mental y la actuación cognitiva y técnicas de formación de imágenes tales como formación de imágenes de exploración tomográfica computerizada o formación de imágenes de resonancia magnética del cerebro. Las evaluaciones diagnósticas en centros de expertos alcanzan una seguridad de aproximadamente el 80-85 %.

Debido al hecho de que estas pruebas son caras y llevan mucho tiempo y son particularmente incómodas para los pacientes, existe la necesidad creciente de marcadores biomoleculares diagnósticos específicos fácilmente accesibles, que puedan medirse en fluidos corporales, tales como LCR, sangre u orina y que tengan un valor predictivo positivo alto para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, o que ayudarían a distinguir la enfermedad de Alzheimer de otras formas de demencia. Además, los marcadores fiables sensibles a la progresión de la enfermedad pueden constituir parámetros sustitutos, un prerrequisito principal para la evaluación y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas orientadas a las causas y modificadoras de la enfermedad en la enfermedad de Alzheimer.

Dado que el LCR rodea directamente el cerebro, los cambios en su composición proteica pueden reflejar con la mayor seguridad afecciones patológicas que están asociadas con alteraciones específicas de los patrones de expresión proteicos. Durante la última década, se ha comunicado un número de anormalidades biológicas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de enfermedad de Alzheimer, en particular niveles alterados del fragmento Aß1-42 de la proteína precursora amiloide y niveles alterados de la proteína tau hiperfosforilada. La sensibilidad y especificidad de estos marcadores, sin embargo, es baja o solo modesta [The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association y el National Institute on Aging Working Group, 1998, Robles A 1998, Teunissen CE y col., 2002].

Así, existe la necesidad de biomarcadores novedosos con suficiente sensibilidad y especificidad para (i) detectar enfermedad de Alzheimer tan pronto como sea posible y (ii) permitir la diferenciación de la enfermedad de otros tipos de demencia o enfermedades neurodegenerativas y (iii) realizar seguimiento de eficacia terapéutica como parámetro sustituto, por ejemplo en desarrollo de fármacos clínicos e iniciar farmacoterapia tan pronto como sea posible y posponer pérdida de memoria y progresión de la enfermedad.

Tecnología de chip proteico

Una tecnología de chip proteico llamada espectrometría de masas por desorción/ionización por matriz en superficie tiempo de vuelo (EM SELDI-TOF) se ha desarrollado recientemente para facilitar la elaboración de perfiles proteicos de mezclas biológicas completas [Davies HA 2000, Fung ET 2001, Merchant M 2000].

Varios grupos ya han usado la espectrometría de masas de chip de proteínas para detectar biomarcadores potencialmente novedosos de próstata y vejiga [Adam BL 2001] o cáncer de mama [Wulfkuhle JD 2001] en suero, plasma seminal, fluido del pezón, orina o extractos celulares. Para una revisión de la búsqueda de biomarcadores usando EM de SELDI-TOF, véase [Issaq HJ 2002].

Cistatina C

Descrita inicialmente en 1961 en el líquido cefalorraquídeo (LCR), la cistatina C (traza de γ-globulina o post-γ-globulina, nº de acceso P01034) es un inhibidor de la cisteína proteinasa pequeño presente en todos los fluidos corporales humanos a concentraciones fisiológicamente relevantes. El papel fisiológico de cistatina C es probablemente regular actividad proteasa de cisteína extracelular, que resulta de invasión microbiana o de liberación de proteinasas lisosomales a partir de células moribundas o enfermas. La cistatina C colocaliza con ß-amiloide (Aß) en las paredes de las arteriolas en los cerebros de enfermedad de Alzheimer y de angiopatía amiloide cerebral [Levy E 2001]. Hay dos haplotipos comunes del gen CST3 que codifican para cistatina C (A y B) que difieren el uno del otro en tres sitios: dos cambios de pares de bases únicos en la región promotora y uno en el dominio de péptido señal que causan una sustitución de aminoácido (alanina a treonina). Recientemente, los estudios control de casos encontraron asociaciones de CST3 con riesgo incrementado para enfermedad de Alzheimer de aparición tardía [Crawford FC 2000, Finckh U 2000, Beyer K 2001].

La hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis, tipo Islandés (HCHWA-I), también llamada angiopatía amiloide de cistatina C hereditaria (HCCAA), es una forma autosómica dominante de angiopatía amiloide cerebral (CAA). El amiloide depositado en las paredes de los vasos del cerebro está compuesto principalmente de una variante de cistatina C caracterizada por la presencia de sustitución Leu68-GIn [Cohen 1983, Ghiso 1986]. Esta patología está acoplada también a una concentración disminuida de este inhibidor de proteinasa de cisteína principal en el líquido cefalorraquídeo y conduce a su deposición amiloide en el cerebro [Grubb AO 1984].

Leung-Tack *y col.* han purificado también dos isoformas truncadas N-terminales de cistatina C en orina a partir de un paciente quien había recibido transplante renal. De acuerdo con sus datos, la cistatina C (des1-4) tiene un efecto inhibidor sobre dos funciones de células mononucleares periféricas humanas (PMN): liberación de O_2 y fagocitosis, que pueden deberse a la secuencia N-terminal 'KPPR'. Sus datos respaldan un papel potencialmente importante para cistatina C como un posible inmunomodulador durante inflamación. La evidencia que se acumulan indican que el daño mediado por radicales libres incrementado a la función celular contribuye al proceso de envejecimiento y a los trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad. El estrés oxidativo puede jugar un papel en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Aunque el daño de los radicales libres a neuronas puede no ser el evento principal que inicie estas enfermedades, parece que el daño de los radicales libres está implicado en la cascada patogenética de estos trastornos.

Beta-2-microglobulina

La beta-2-microglobulina (nº de acceso P01884) constituye el componente constante pequeño del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) de clase I y su presencia en los fluidos biológicos representa el equilibrio entre el recambio y la eliminación de proteína de membrana. Dado que este péptido parece estar incrementado en algunas enfermedades caracterizadas por una elevación de la respuesta inmune, su cuantificación en fluidos corporales ha llegado a ser un índice útil del estado inmunológico *in vivo* [Hoekman y col. 1985]. La función de esta proteína está poco claro, pero parece estar implicada en enfermedades, que implican destrucción de células gliales [Ernerudh y col. 1987].

El problema técnico que se resuelve por la presente invención es el suministro de procedimientos mejorados para diagnosticar enfermedad de Alzheimer y/o realizar seguimiento de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto.

Proteína neurosecretora (VGF)

VGF (VGF humana, nº de acceso 015240) es un precursor peptídico secretor que se expresa y procesa por las células neuronales [Cann y col. 1997]. Los estudios de hibridación *in situ* en el sistema nervioso central de la rata adulta han revelado que el mRNA de VGF está ampliamente distribuido por todo el cerebro con expresión prominente en el hipocampo, el córtex entorrinal y el neocórtex. Además, se ha mostrado que la transcripción y secreción de VGF se regula selectivamente por neurotrofinas como NGF y BDNF y por depolarización *in vitro.* La expresión de BDNF incrementada se puede observar en la circunvolución dentada y las regiones CA3 del hipocampo, que son tejidos que parecen morir pronto en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer.

Descripción de la invención

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que los polipéptidos específicos se expresan de forma diferente en sujetos que tienen enfermedad de Alzheimer cuando se comparan con un grupo control sano. Estos polipéptidos expresados de manera diferenciada pueden, por ejemplo, detectarse en muestras de líquido cefalorraquídeo del sujeto en el que se está diagnosticando la enfermedad de Alzheimer. Los polipéptidos individuales de la invención según se definen en las reivindicaciones se pueden detectar y/o cuantificar solos o en combinación con otros

polipéptidos usados en la invención como se define en las reivindicaciones.

Los marcadores polipeptídicos de la divulgación se definen por su peso molecular respectivo. Cinco marcadores identificados por el procedimiento de SAX2 como se describen en los ejemplos muestran las siguientes masas moleculares:

Marcador 1 (M1): 4824 ± 20 Da;

Marcador 2 (M2): 7691 ± 20 Da;

Marcador 3 (M3): 11787 ± 20 Da;

Marcador 4 (M4): 11988 ± 20 Da;

Marcador 5 (M5): 13416 ± 20 Da.

La tabla uno muestra el peso molecular observado de los marcadores polipeptídicos M1 a M5 como se determina por EM de SELDI-TOF, las secuencias de aminoácidos de fragmentos observados de marcadores polipeptídicos M1 a M5 y la proteína a partir de la que se originan los marcadores polipeptídicos M1 a M5.

Tabla 1:

Marcador	Peso molecular observado por SELDI	Secuencia de Aminoácidos	Nombre de la proteína
M1	4823,5 Da ± 1,7	VGEEDEEAAEAEAEAEEAER	VGF4.8
M2	7691,4 Da ± 4,9	XXAD(L/I)AGHG(Q/K)EV(L/I)(L/I)R HGTVV(L/I)TA(L/I)GG(L/I)(L/I)K	variante nueva de mioglobina humana
M3 M4	11786,9 Da ± 7,6 11988,4 Da ± 5,9	VNHVTLSQPK VEHSDLSFSK IEKVEHSDLSFSK SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK	beta-2-microglobulina humana
M5	13416,4 Da ± 9,4	ASNDMYHSR ALDFAVGEYNK RALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR QIVAGVNYFLDVELGR LVGGPMDASVEEEGVRR KQIVAGVNYFLDVELGR TQPNLDNCPFHDQPPHLK TQPNLDNCPFHDQPPHLKR SSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVR	cistatina C humana

Los polipéptidos expresados de manera diferencial de la invención y la revelación pueden, por ejemplo, detectarse en muestras de líquido cefalorraquídeo del sujeto en el que se está diagnosticando la enfermedad de Alzheimer. Además, dependiendo de la realización específica, la fuente de muestras para medir la abundancia de los marcadores polipeptídicos de la invención y revelación, puede ser también sangre, suero, u orina, pero no se limita a estos compartimentos corporales.

Como se muestra en la Figura 1, comparada con un diagnóstico negativo (controles sanos), M1 está subexpresada en el LCR de pacientes de la enfermedad de Alzheimer ($p < 0,05$), mientras que los marcadores M2 a M5 están sobreexpresándose en LCR de pacientes de la enfermedad de Alzheimer ($p < 0,05$).

Un nivel alterado de uno o varios polipéptidos de la invención y revelación, comparados con el nivel de polipéptidos de la invención y revelación en sujetos control sanos, permitirá valorar el estado y/o someter a seguimiento la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, permitirá realizar un seguimiento de la efectividad del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y será información útil para el desarrollo de fármacos. Además, estos marcadores biomoleculares son útiles para diferenciar la enfermedad de Alzheimer de otras formas de demencia y trastornos neurodegenerativos.

Los sujetos preferidos en los que la enfermedad de Alzheimer se diagnostica o somete a seguimiento son sujetos humanos. Sin embargo, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer de acuerdo con la revelación es también posible con otros mamíferos. Si es necesario, se pueden usar ortólogos de los marcadores peptídicos de la invención y la divulgación.

La invención también se refiere al uso de espectrometría de masas (EM) para detectar enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos y para evaluar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos detectando y/o cuantificando la cantidad de polipéptidos específicos en muestras extraídas de los fluidos corporales del sujeto. En una realización preferida de la invención, la muestra puede extraerse del líquido cefalorraquídeo del sujeto (LCR).

La detección y/o la cuantificación de los polipéptidos de la invención y revelación se lleva a cabo preferentemente cuantificando la señal que se detecta por EM a masa molecular específica frente a proporciones de carga (M/z) que corresponden a las proporciones M/z de los polipéptidos de la invención. Preferentemente, se miden también las proporciones M/z cercanas a uno de los polipéptidos usados en la invención.

La detección y/o cuantificación de los polipéptidos de la divulgación se puede llevar a cabo también usando un inmunoensayo usando anticuerpos específicos obtenidos contra el/los marcado(es) específico(s) o fragmentos polipeptídicos del/de los mismo(s). Los anticuerpos se pueden preparar usando el/los marcadore(s) purificador(s) o fragmentos del/de los mismo(s), o usando polipéptido(s) expresado(s) de formar sintética o recombinantemente constituidos por la secuencia aminoacídica específica del/de los marcador(es) usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica [Coligan 1991]. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores apropiados, así como preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones [Huse 1989, Ward 1989]. Después de que se proporciona el anticuerpo, se puede detectar y/o cuantificar un marcador usando cualquiera de un número de ensayos de unión inmunológica estándar [Patentes de los EE.UU. 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; y 4,837,168]. Los ensayos útiles incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, un ensayo inmune enzimático (EIA) tal como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo radioinmune (RIA), un ensayo de prueba de bandas de Western, o un ensayo de transferencia por ranuras o de transferencia por puntos. Para una revisión de los inmunoensayos generales véase [Coligan 1991]. Generalmente, una muestra obtenida a partir de un sujeto se puede poner en contacto con el anticuerpo que une específicamente el marcador. Una técnica potente para capturar el/los marcador(es) especificado(s) a partir de una muestra de fluidos corporales compleja es usar el anticuerpo fijado a soportes sólidos, tales como vidrio o plástico, por ejemplo placa de microvaloración, una barra, una perla, o microperla. Alternativamente, el/los marcadore(s) puede(n) capturarse también a partir de la muestra de fluidos corporales por el anticuerpo específico inmovilizado a un sustrato de sonda o a una matriz de ProteinChip™, como se describe por el inmunoensayo basado en SELDI [Xiao 2001]. Después de incubar la muestra con anticuerpos, el material no unido se lava en condiciones específicas y el complejo anticuerpo-marcador formado se puede detectar, usando reactivos de detección apropiados. En una realización usando la técnica de matriz de SELDI ProteinChip™ el/los marcador(es) enriquecido(s) selectivamente por el anticuerpo inmovilizado se pueden detectar y cuantificar por espectrometría de masas de desorción/ionización por matriz asistida por matriz.

La divulgación se refiere específicamente a

1. un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido comprendido en un grupo de polipéptidos que consisten en

i) un polipéptido que tiene una masa molecular de 4824 ± 20 Da,

ii) un polipéptido que tiene una masa molecular de 7691 ± 20 Da,

iii) un polipéptido que tiene una masa molecular de 11787 ± 20 Da,

iv) un polipéptido que tiene una masa molecular de 11988 ± 20 Da y

v) un polipéptido que tiene una masa molecular de 13416 ± 20 Da.

La divulgación se refiere también a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido comprendido en un grupo de polipéptidos que tienen, respectivamente masas moleculares de 4824 ± 20 Da, de 7691 ± 20 Da, de 11787 ± 20 Da, de 11988 ± 20 Da, de 13416 ± 20 Da, de 4769 ± 20 Da, de 6958 ± 20 Da, de 6991 ± 20 Da, de 13412 ± 20 Da, de 13787 ± 20 Da, de 17276 ± 20 Da, de 40437 ± 20 Da, de 6895 ± 20 Da, de 6928 ± 20 Da, de 7691 ± 20 Da, de 7769 ± 20 Da, de 7934 ± 20 Da, de 5082 ± 20 Da, de 6267± 20 Da, de 6518 ± 20 Da, de 7274 ± 20 Da, y de 8209 ± 20 Da.

Mientras que la detección de un polipéptido tal es en la mayoría de los casos suficiente para diagnosticar de forma confiable enfermedad de Alzheimer, la detección de dos o más polipéptidos de la invención o revelación puede incrementar la sensibilidad y solidez del procedimiento. Preferentemente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, y, lo más preferido, todos de dichos polipéptidos se detectarán a partir de la misma muestra. La detección se puede llevar a cabo también simultáneamente con la detección de otros polipéptidos que se expresan preferentemente también de manera diferencial en sujetos que tienen enfermedad de Alzheimer comparados con sujetos sanos. "Evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer" se entenderá como diagnosticar la presencia de enfermedad de Alzheimer en un sujeto o un paciente, como evaluar la progresión de la enfermedad en un sujeto o un paciente, y/o como evaluar la propensión de un sujeto a desarrollar enfermedad de Alzheimer.

2. La divulgación se refiere adicionalmente al procedimiento del punto 1 en el que se detectan 2, o 3, o 4 o 5 polipéptidos de dicho grupo de péptidos. La invención se refiere además a un procedimiento del punto 1 en el que se detectan 2 o 3 o 4 o 5 o 10 o todos los polipéptidos de dicho grupo de péptidos.

3. La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido que comprenda la secuencia de SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 6, SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 12, SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 15, y/o SEC ID Nº: 16. La revelación se refiere adicionalmente a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido que comprenda la secuencia de SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 4, SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 6, SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 12, SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 16, y/o SEC ID Nº: 17. Mientras que la detección de un polipéptido tal es en la mayoría de los casos suficiente para diagnosticar de forma confiable la enfermedad de Alzheimer, la detección de dos o más polipéptidos de la invención o revelación puede incrementar la sensibilidad y solidez del procedimiento. Preferentemente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, o todos de dichos polipéptidos se detectarán a partir de la misma muestra. La detección se puede llevar a cabo también simultáneamente con la detección de otros polipéptidos que preferentemente se expresan también de manera diferencial en sujetos que tienen enfermedad de Alzheimer comparados con sujetos sanos.

4. La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de valorar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido comprendido en un grupo de polipéptidos que consiste en

i) cistatina C humana,

ii) beta-2-microglobulina humana,

iii) mioglobina humana (variante nueva),

iv) un fragmento de al menos 5, 8, 10 o 20 aminoácidos de cistatina C humana,

v) un fragmento de al menos 5, 8, 10 o 20 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana, y

vi) un fragmento de al menos 5, 8, 10 o 20 aminoácidos de mioglobina humana (variante nueva).

La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido comprendido en un grupo de polipéptidos que consiste en

i) cistatina C humana,

ii) beta-2-microglobulina humana,

iii) mioglobina humana (variante nueva),

iv) proteína VGF neurosecretora humana,

v) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de cistatina C humana,

vi) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana,

vii) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de mioglobina humana (variante nueva), y

viii) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de proteína neurosecretora VGF.

Mientras que la detección de un polipéptido tal es en la mayoría de los casos suficiente para diagnosticar de forma confiable enfermedad de Alzheimer, la detección de dos o más de dichos polipéptidos puede incrementar la sensibilidad y solidez del procedimiento. Preferentemente, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de dichos polipéptidos se detectarán a partir de la misma muestra. Más preferentemente, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o todos de dichos polipéptidos se detectarán a partir de la misma muestra. La detección se puede llevar a cabo también simultáneamente con la detección de otros polipéptidos que preferentemente se expresan también de manera diferencial en sujetos que tengan enfermedad de Alzheimer comparados con sujetos sanos.

5. La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de investigar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto caracterizado porque un procedimiento de cualquiera de los puntos 1 a 4 se lleva a cabo con al menos dos muestras distintas extraídas del mismo sujeto. Para este propósito, se analizarán las muestras extraídas de un sujeto en puntos diferentes en el tiempo. Los cambios en la cantidad de el/los polipéptido(s) respectivo(s) variarán para extraer conclusiones sobre la progresión de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

6. La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que la detección de dicho(s) polipéptido(s) es por EM de SELDI-TOF. Se pueden usar alternativamente otros procedimientos espectrométricos de masas adecuados y otros procedimientos de detección. Más específicamente, la revelación se refiere a un procedimiento de cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que la detección de dicho(s) polipéptido(s) es por EM de SELDI-TOF en la que la superficie H50 hidrófoba, la superficie WCX2, o la superficie IMAC se usa como un soporte tras ionización. Los soportes diferentes para ionización proporcionan sensibilidad diferente para proteínas específicas de interés.

7. La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que los anticuerpos específicos o los anticuerpos que reconocen dicho(s) polipéptido(s) se usan para detección de dicho(s) polipéptido(s).

8. La divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento de de cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la detección es en una muestra que comprende LCR de dicho paciente. Una muestra extraída de un sujeto se puede procesar inmediatamente después de que se ha tomado, o se puede congelar y analizar después. Las muestras pueden consistir también en o contener otros fluidos corporales tales como sangre, suero, plasma, orina, plasma seminal, fluido de pezón, o extractos celulares.

9. La invención se refiere adicionalmente a un kit que comprende un polipéptido que tiene una masa molecular de 4824 ± 20 Da, un polipéptido que tiene una masa molecular de 7691 ± 20 Da, un polipéptido que tiene una masa molecular de 11787 ± 20 Da, un polipéptido que tiene una masa molecular de 11988 ± 20 Da, y/o un polipéptido que tiene una masa molecular de 13416 ± 20 Da. La revelación se refiere adicionalmente a un kit que comprende un polipéptido que tiene una masa molecular de 4824 ± 20 Da, un polipéptido que tiene una masa molecular de 7691 ± 20 Da, un polipéptido que tiene una masa molecular de 11787 ± 20 Da, un polipéptido que tiene una masa molecular de 11988 ± 20 Da, y un polipéptido que tiene una masa molecular de 13416 ± 20 Da. La revelación se refiere adicionalmente a un kit que comprende polipéptidos que tienen una masa molecular de 4824 ±± 20 Da, de 7691 ± 20 Da, de 11787 ± 20 Da, de 11988 ± 20 Da, de 13416 ± 20 Da, de 4769 ± 20 Da, de 6958 ± 20 Da, de 6991 ± 20 Da, de 13412 ± 20 Da, de 13787 ± 20 Da, de 17276 ± 20 Da, de 40437 ± 20 Da, de 6895 ± 20 Da, de 6928 ± 20 Da, de 7691 ± 20 Da, de 7769 ± 20 Da, de 7934 ± 20 Da, de 5082 ± 20 Da, de 6267 ± 20 Da, de 6518 ± 20 Da, de 7274 ± 20 Da, y/o de 8209 ± 20 Da. Un kit tal puede aplicarse para diversos propósitos, por ejemplo, para usar como un estándar en uno de los procedimientos mencionados anteriormente. Dicho kit puede comprender 2, 5, 10, o todos los polipéptidos anteriores.

10. La divulgación se refiere adicionalmente a un kit que comprende un fragmento de al menos 5 aminoácidos de cistatina C humana, un fragmento de al menos 5 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana y un fragmento de al menos 5 aminoácidos de mioglobina humana. La invención se refiere a un kit según se define en la reivindicación 8. Este kit puede aplicarse para diversos propósitos, por ejemplo, para usar como un estándar en uno de los procedimientos mencionados anteriormente. La revelación se refiere adicionalmente a un kit que comprende un fragmento de al menos 5, 10 ó 20 aminoácidos de cistatina C humana, un fragmento de al menos 5, 10 ó 20 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana, un fragmento de al menos 5, 10 ó 20 aminoácidos de mioglobina humana y un fragmento de al menos 5, 10 ó 20 aminoácidos de proteína neurosecretora VGF. Estos kits se pueden aplicar para diversos propósitos, por ejemplo, para usar como un estándar en uno de los procedimientos mencionados anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1:

Intensidades promedio de los cinco péptidos marcadores de la Tabla 1, que se expresan de manera diferencial en el

grupo que ha enfermado cuando se compara con los controles.

Ejemplos

También se describen uno o varios de los siguientes ejemplos. Cabe entender que estos ejemplos no restringen el alcance de la invención a los ejemplos de ningún modo.

Ejemplo 1: Evaluación de pacientes y obtención de muestras del LCR

El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos se hizo de acuerdo con criterios del Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y de la Asociación de Apoplejía-Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Recomendados (NINCDS-ADRDA). El grupo de la enfermedad de Alzheimer consistía en 9 pacientes con edades de 75 ± 7 años, seis hombres y tres mujeres. El grupo de sujetos control sanos consiste en 10 individuos con edades de 78 ± 14 años, dos hombres y ocho mujeres sin historia, síntomas o signos de enfermedad psiquiátrica o neurológica.

Cada paciente y los cuidadores de los pacientes otorgaron su consentimiento informado antes de la investigación. El estudio fue aprobado por el comité de ética local. Después de la punción lumbar, las muestras de LCR se congelaron en hielo inmediatamente tras la retirada en la cabecera de la cama en alícuotas de 0,5 ml y se almacenaron a -80 ºC hasta el análisis.

Ejemplo 2: análisis de SELDI de chip proteico de LCR en chip de SAX2

Se equilibró una matriz de chip proteico SAX 2 (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EE.UU.) durante 5 minutos con 5 µl de tampón de unión (acetato de Na 100 mM pH = 4,0). El tampón se retiró cuidadosamente con un pañuelo y se añadieron a los pocillos 2,5 µl de tampón de unión. Se añadieron muestras de LCR bruto (2,5 µl) a los pocillos y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad en una plataforma con balanceo. Se extrajo el LCR y los pocillos se lavaron individualmente con 10 µl de tampón de unión durante 5 minutos. Después se colocaron las matrices en un eppendorf cónico de 15 ml y se lavaron dos veces con el tampón de unión durante 5 minutos. Por último, el chip se aclaró dos veces con agua destilada.

Se eliminó el exceso de H_2O y mientras la superficie estaba aún húmeda, se llevaron a cabo dos adiciones por pocillo de 0,5 µl de ácido sinapínico (SPA) (2 mg/ml) en acetonitrilo al 50 % (volumen/volumen) y ácido trifluoroacético al 0,5 % (volumen/volumen) y se secaron. A continuación se leyeron las matrices en un sistema lector de chip proteico, serie PBS II (Ciphergen Biosystems). El haz de laser se enfocó después sobre la mezcla en el vacío. Esto causó que las proteínas absorbidas a la matriz llegasen a ionizarse y, simultáneamente a desadsorberse de la superficie de la matriz de chip proteico. Las proteínas ionizadas se detectaron y sus masas moleculares se determinaron según su tiempo de vuelo (TOF). Los espectros de masas de TOF, recogidos en la modalidad de ion positivo se generaron usando un promedio de 65 disparos de laser a través del sitio a un ajuste de energía de laser ligeramente por encima del umbral (10-15 % más alta que el umbral). La masa alta a adquirir se estableció a 40 kDa, optimizado desde 1 hasta 15 kDa. Los espectros se recogieron y analizaron usando el software de chip proteico Ciphergen (versión 3.0). La calibración externa del lector se llevó a cabo usando los estándares de peso molecular peptídicos de "todo en uno" (Ciphergen biosystems, Inc.) diluidos en la matriz de SPA (1:1, volumen/volumen) y aplicados directamente sobre un pocillo. Se llevó a cabo comparación de perfiles proteicos después de normalización en corriente iónica total de todos los espectros incluidos en el mismo experimento. La reproducibilidad se probó analizando diferentes alícuotas de la misma muestra de LCR en 4 pocillos diferentes de la misma matriz de chip proteico (reproducibilidad intrachip intraensayo), en dos chips diferentes (reproducibilidad interchip intraensayo) procesados en paralelo y reproducidos en un experimento distinto (reproducibilidad entre ensayos).

El análisis de las muestras de LCR de 9 pacientes diagnosticados con enfermedad de Alzheimer en relación a 10 controles reveló que 5 picos se expresaron de manera diferencial de forma significativa entre los dos grupos ($p < 0,05$). La masa de SELDI promedio asociada con las cinco proteínas expresadas de manera diferencial fue 4,82 kDa, 7,7 kDa, 11,8 kDa y 12,0 kDa y 13,4 Da ($p < 0,05$) (véase Tabla 1, Fig. 1).

Ejemplo 3: Purificación por cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX)

Con el fin de identificar las proteínas correspondientes a estos picos, se llevó a cabo un fraccionamiento de LCR en bruto en una columna rotatoria de SAX. Las fracciones eluidas se analizaron por EM de SELDI-TOF.

La columna rotatoria SAX, número de lote SAX2-001116-01, (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EE.UU.) se rehidrató durante toda una noche a 4 ºC en el tampón de equilibración (clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 20 mM, NaCl 5 mM, pH 9,0). La columna se calentó a temperatura ambiente y se eliminaron las burbujas de aire. El tampón de equilibración se dejó fluir a través de la matriz de columna por gravedad. El tampón de equilibrio (0,5 ml) se añadió a la columna y se hizo pasar a través de la resina dos veces. Se diluyeron dos mililitros de LCR control en el tampón de equilibración (1:1, volumen/volumen). La muestra proteica se cargo a la columna en fracción de 0,8 ml y se dejó avanzar a través de la columna por gravedad hasta que no vino ninguna gota de la columna. La columna se centrifugó después a 150 x g durante 1 minuto. La resina se lavó después con un volumen equivalente de tampón de equilibración. Esta etapa se repitió varias veces con el fin de cargar la muestra completa sobre la resina. Se llevó a cabo

la elución de las proteínas unidas disminuyendo el pH. El tampón de elución A consistió en Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM pH 8,0; tampón de elución B = fosfato de sodio 20 mM pH 7,0; tampón de elución C = fosfato de sodio 20 mM pH 6,0; tampón de elución D = fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 5,0; tampón de elución E = fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 4,0; tampón de elución F = fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 3,4; tampón de elución G = acetonitrilo al 30 % en tampón de elución F. La elución se llevó a cabo aplicando 2 x 75 µl del tampón de elución y centrifugación a 150 x g durante 1 min. Cada fracción recogida (150 µl) se concentró en un concentrador de vacío a un volumen de 10 µl. Los perfiles proteicos se analizan en EM de SELDI-TOF usando ensayos de chip proteico de SAX 2. El chip se equilibró con un tampón de unión constituido por Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH = 9,0. Una alícuota de 0,5 µl de cada fracción concentrada se aplicó directamente sobre 2,5 µl de tampón de unión por sitio y se procesó como se describe previamente. El resto de las fracciones se cargaron sobre un gel de Tris glicina como se describe más adelante.

El pico expresado de manera diferencial de 13,4 kDa se eluyó con tampón A (Tris-HCl 20 mM NaCl 5 mM pH 8,0) y B (fosfato de sodio 20 mM pH 7,0). Los picos expresados de manera diferencial de 11,8 kDa y 12,0 kDa se encontraron en la fracción eluida con tampón C (fosfato de sodio 20 mM pH 6,0) y D (fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 5,0). La agrupación de 7,7 kDa se eluyó con tampón D (fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 5,0) y E (fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 4,0).

Cada fracción eluida se cargó en un gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico de Tris Tricina al 16,5 % y se electroforetizó (SDS PAGE). Después de coloración con azul de Coomassie, las bandas vistas en el gel confirmaron los resultados obtenidos por análisis de SELDI. La banda corresponde a la agrupación de 7,7 kDa, se eliminan por corte 11,8 kDa y 12,0 kDa. Las proteínas se extrajeron como se describe en el ejemplo 6 y se identificaron por Q-TOF. El análisis de EM de pico de 7,7 kDa no correspondía con ninguna proteína humana conocida, sin embargo, puede indicar una nueva variante u homólogo de mioglobina. Las secuencias peptídicas fueron las siguientes

XXAD(L/I)AGHG(Q/K)EV(L/I)(L/I)R y

HGTVV(L/I)TA(L/I)GG(L/I)(L/I)K.

El análisis de EM de los picos de 11,8 kDa y de 12 kDa identificó beta-2-microglobulina para ambos.

Dado que la agrupación de 13,4 kDa no se puede ver sobre el gel de Tris Tricina, se llevó a cabo una electroforesis de SDS-PAGE de Tris glicina sobre muestras de LCR en bruto. La banda correspondiente a la beta-2-microglobulina se pudo encontrar fácilmente en este gel teñido. Los autores de la presente invención concluyeron que la migración proteica justamente por encima de la beta-2-microglobulina podría corresponder a la siguiente proteína abundante vista sobre el perfil de SELDI, a saber el pico de 13,4 kDa. La banda se escindió a partir del gel y se digirió por tripsina antes del análisis de MALDI. El análisis de huella dactilar de masas peptídicas permitió identificar la cistatina C. La cobertura de secuencia proporcionada por el análisis fue del 60 %.

Ejemplo 4: electroforesis monodimensional/geles de Tris Glicina

Se mezclaron veinte µl de LCR con 10 µl de tampón de Laemmli desnaturalizante [Laemmli 1970]. Las muestras se calentaron a 95 ºC durante 5 minutos y se cargaron en gel de SDS-poliacrilamida de T al 15 % (T = concentración de acrilamida total) según el procedimiento de Laemmli. Los geles se tiñeron en una solución que contenía Azul Brillante de Coomassie R-250 (0,1 % peso/volumen) y metanol (50 % v/v) durante 30 minutos. El desteñido se hizo en una solución conteniendo metanol (40 % v/v) y ácido acético (10 % v/v).

Ejemplo 5: Electroforesis monodimensional: geles de Tris Tricina

Se llevó a cabo electroforesis de SDS-PAGE de Tris tricina según Schagger y von Jagow [1987] usando geles de T al 16,5 % premoldeados (Biorad, Hercules, CA). El tampón del ánodo consistía en Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9 y el tampón de cátodo consistía en Tris-HCl 0,1M, Tricina 0,1 M, SDS al 0,1 %, pH 8,25. Las muestras se diluyeron en 10 µl de Tris-HCl 50 mM, SDS al 4 % (p/v), sacarosa al 12 % (p/v), ß-mercaptoetanol al 5 % (v/v) y vestigio de azul de bromofenol, pH 6,8. Después de desnaturalización a 95 ºC durante 5 minutos, las muestras se cargaron sobre el gel. Los geles se hicieron funcionar a 80 V durante 3 horas. Después de electroforesis, los geles se fijaron en metanol al 40 %, ácido acético al 10 % durante 30 minutos. Los geles se tiñeron después con azul de Coomassie coloidal G250 durante toda una noche y se destiñeron en metanol al 30 %. Las bandas a identificarse se cortaron inmediatamente, se situaron en un eppendorf y se guardaron a 4 ºC hasta análisis adicional. Las masas moleculares aparentes se determinaron haciendo funcionar los estándares de peso molecular (PM) polipeptídicos: PM de isomerasa de triosa fosfato 26.625; PM de mioglobina 16.950; PM de α-lactalbumina 14.437; PM de aprotinina 6.512; PM de cadena de insulina b oxidada 3.496 y PM de bacitracina 1.423 (Biorad).

Ejemplo 6: Digestión de proteínas y extracción de péptidos [Bienvenu 1999]

Los fragmentos de geles que contienen proteínas de interés se cortaron por digestión de las proteínas con tripsina usando procedimientos publicados previos [Shevchenko 1996, Hellman 1994, Rosenfeld 1992] y se modificaron como se describe a continuación. La pieza de gel se destiñó primero con 100 µl de bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo al 30 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución de desteñido se retiró y se

reemplazó por 25 µl de DL-ditiotreitol (DTT) 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM y se incubó 35 minutos a 56 ºC. La solución de DTT se reemplazó después por 25 µl de yodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las piezas de gel se lavaron durante 10 minutos con 100 µl de bicarbonato de amonio 50 mM y durante 10 minutos con 100 µl de bicarbonato de amonio 50 mM y acetonitrilo al 30 % (v/v).

Las piezas de gel se secaron después durante 30 minutos en una centrífuga de vacío Hetovac (HETO, Allerod, Dinamarca). Las piezas secadas de gel se rehidrataron durante 45 minutos a 4 ºC en 5-20 µl de una solución de bicarbonato de amonio 50 mM conteniendo tripsina a 6,25 ng/µl. Después de una incubación durante toda una noche a 37 ºC, las piezas de gel se secaron en centrífuga de alto vacío antes de rehidratarse por la adición de 20 µl de agua destilada y finalmente se secaron de nuevo en un concentrador de vacío durante 30 minutos. La extracción de los péptidos se llevó a cabo con 20 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional. La solución de TFA que contiene los péptidos se transfirió a un tubo de polipropileno. Se llevó a cabo una segunda elución con 20 µl de TFA al 0,1 % (v/v) en acetonitrilo al 50 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional. La segunda solución de TFA se almacenó con la primera. El volumen de los extractos almacenados se redujo a 1-2 µl por evaporación en el vacío. Los controles de extracción (blancos) se llevaron a cabo usando piezas de geles desprovistas de proteínas.

Ejemplo 7: Identificación de proteínas por análisis de huella dactilar de masas peptídicas

Se situaron 1,5 µl de muestra en una placa objetivo de 100 pocillos de MALDI. Se añadieron algunos volúmenes de matriz (10 mg/ml de ácido a-ciano-4-hidroxicinnámico en acetonitrilo al 50 % (v/v), TFA al 0,1 % (v/v)) al producto de digestión previamente cargado. Las muestras se secaron tan rápidamente como fue posible usando un contenedor de vacío. Se llevó a cabo la medida de masas a partir de solución líquida con un espectrómetro de masas de MALDI-TOF Voyager™ Elite y con un Super STR (PerSeptive Biosystems, Framingham MA, EE.UU.) equipado con un matriz de nitrógeno de 337 nm. El analizador se usó en la modalidad reflectrón a un voltaje de aceleración de 20 kV, un parámetro de extracción retardada de 100-140 nanosegundos y un umbral de masa baja de 850 Da. La energía matriz se fijó ligeramente por encima del umbral (10-15 % más alta que el umbral) para producción de iones moleculares. Los espectros se obtuvieron por suma de 10 a 256 disparos de matriz consecutivos. Las masas de los 60 picos más altos se extrajeron a partir de los espectros y se usaron para identificación de proteínas usando la herramienta de huella dactilar de masas peptídicas SmartIdent [Gras 1999]. La investigación se llevó a cabo frente a las bases de datos SWISS-PROT y TrEMBL. La pregunta se hizo para el ser humano, el número mínimo de masas correspondientes fue 4, la tolerancia máxima para masas fue 50 ppm después de una calibración interna usando producto de autolisis de tripsina, como máximo se permitió que faltase una escisión para péptidos de tripsina y las modificaciones aceptadas fueron carboximetilación con yodoacetamida de cisteínas y oxidación artefactual de metioninas.

Ejemplo 8: identificación de proteínas por análisis de fragmentación de péptidos

Antes de separación por nanoCL (CL = cromatografía líquida), los volúmenes de soluciones que contienen péptidos se ajustaron a 7 µl por adición de una solución de ácido fórmico al 0,1 % (v/v). Las muestras se asentaron en un automuestreador Triathlon (Spack, Emmen, Holanda). Para cada experimento, se inyectaron 5 µl de la solución conteniendo péptidos en una columna de fase reversa de C18 de diámetro interno de 75 µm (YMS-ODS-AQ200, Michrom Bioresource, Auburn, CA). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo (ACN) en presencia de ácido fórmico al 0,1 % (v/v), usando bombas SunFlow (SunChrom, Friderichsdorf, Alemania). Se usó un divisor de flujo con el fin de disminuir el caudal después de las bombas desde 200 hasta 0,4 µl/minuto. Se analizaron péptidos con un espectrómetro de masas de dispersión cuadripolar (Q-TOF) (Micromass, Wythenshawe, Inglaterra). Se aplicó una tensión de 2700 V en el capilar de nanoelectropulverización (New Objective, Woburn, MA, EE.UU.). Se usó argón como gas de colisión. La energía de colisión se estableció como una función de la masa iónica precursora. Se adquirieron espectros de EM/EM por conmutación automática entre modo EM y modo EM/EM. Los datos de EM/EM adquiridos se convirtieron en un formato compatible (archivos DTA) por software ProteinLynx (Micromass, Wythenshawe, Inglaterra) y se analizaron usando motores de búsqueda convencionales frente a bases de datos SWISS-PROT, TrEMBL, NCBInr y EST. En casos de interpretación manual de datos de EM/EM, la identificación se llevó a cabo por búsqueda sólo de secuencia.

Se encontró que el marcador M5 era un fragmento de cistatina C, los marcadores M3 y M4 eran isoformas de beta-2-microglobulina y M2 era una variante nueva o un homólogo nuevo de mioglobina. Se encontró que el marcador M1 es un fragmento de la proteína neurosecretora VGF.

Ejemplo 9: Análisis estadístico

Los valores de P se calcularon usando procedimientos estadísticos estándar conocidos por la persona experta en la técnica. Se consideró que los valores de P menores de 0,05 eran estadísticamente significativos.

Ejemplo 10: Aislamiento del fragmento de 4,8 kDa (marcador M1)

Se fraccionaron algunas muestras de LCR de pacientes control por dispositivo de filtración Centricon 30 (Millipore Corp., Bedford, MA) con el fin de eliminar la proteína con un peso molecular más alto que 30 kDa. Se eliminaron la sal

y el polipéptido con un peso molecular menor de 3 kDa usando un Centricon 3 (Millipore Corp., Bedford, MA). El Centricon 3 se lavó después con agua destilada ultrapura. En esa fracción de lavado, se encontró que el componente de 4,82 kDa es el componente principal. Esta fracción líquida se redujo primero con una solución 10 mM de 1,4-ditioeritritol durante 1 hora a 56 ºC, después se alquiló con yodoacetamida 54 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el polipéptido se digirió con 6 mg/l de tripsina durante toda una noche a 37 ºC. Esta fracción líquida se analizó por nanoCL y Q-TOF como se ha descrito previamente.

Ejemplo 11: Materiales de superficie diferentes para análisis de SELDI-TOF

Usando SELDI-TOF, se llevó a cabo un análisis de 10 muestras de LCR a partir de pacientes de EA y 10 controles en tres superficies diferentes: la superficie H50 hidrófoba, la superficie WCX2 y la superficie IMAC (Ciphergen Biosystems, Fremont, California, EE.UU., resp.). Se encontraron siete picos expresados de manera diferencial sobre la superficie H50, cinco marcadores sobre la superficie WCX2 y cinco marcadores sobre la superficie IMAC. Una prueba diagnóstica usando los marcadores en el chip de H50 reveló una especificidad y sensibilidad del 100 % y del 70 %, respectivamente. La combinación de los marcadores encontrados en H50 y WCX2 dio una especificidad del sensibilidad del 100 % y del 80 %. Finalmente, la combinación de los marcadores encontrada en H50, WCX2 e IMAC dio una especificidad y sensibilidad del 100 % y del 90 %.

Las masas promedio de los polipéptidos expresados de manera diferencial como se determinan por SELDI-TOF usando diferentes materiales de superficie fueron como sigue:

Superficie H50 hidrófoba: 7 picos

Marcador 1: 4769 ± s.d. Da

Marcador 2: 6958 ± s.d. Da

Marcador 3: 6991 ± s.d. Da

Marcador 4: 13412 ± s.d. Da

Marcador 5: 13787 ± s.d. Da

Marcador 6: 17276 ± s.d. Da

Marcador 7: 40437 ± s.d. Da

Superficie IMAC Cu: 5 picos

Marcador 1: 6895 ± s.d. Da

Marcador 2: 6928 ± s.d. Da

Marcador 3: 7691 ± s.d. Da

Marcador 4: 7769 ± s.d. Da

Marcador 5: 7934 ± s.d. Da

Superficie WCX2: 5 picos

Marcador 1: 5082 ± s.d. Da

Marcador 2: 6267 ± s.d. Da

Marcador 3: 6518 ± s.d. Da

Marcador 4: 7274 ± s.d. Da

Marcador 5: 8209 ± s.d. Da

La desviación estándar (s.d.) es 20 Da para cada marcador anterior. Sin embargo, la desviación estándar puede ser también 40 Da, o 10 Da, o 5 Da para cada marcador anterior.

Bibliografía

Adam, B.L. et al. 2001, Proteomics 1 (10): 1264-1270.

Asgeirsson B, Haebel S, Thorsteinsson L, Helgason E, Gudmundsson KO, Gudmundsson G, Roepstorff P. Angiopatía amiloide de cistatina C hereditaria: monitorización de la presencia de la variante Leu68Gln de la cistatina C en líquido cefalorraquídeo y cultivos de monocitos mediante EM . Biochem J. 1998, 329, 497-503.

Beyer K, Lao JI, Gomez M, Riutort N, Latorre P, Mate JL, Ariza A. Enfermedad de Alzheimer y polimorfismo del gen de la cistatina C: estudio de asociación. Neuroscience letters. 2001, 315, 17-20.

Canu N, Possenti R, Ricco AS, Rocchi M, Levi A. Clonación, análisis estructural y asignación cromosómica del gen humano para la proteína neurosecretora VGF. Genomics 1997, 45 (2), 443-446.

Cohen DH, Feiner H, Jensson O, Frangione B. La fibrilla amiloide en la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (HCHW A-I) está relacionada con la proteína neuroendocrina gastroentero-pancreática. J. Exp. Med. 1983, 158, 623-628.

Current Protocols in Immunology, Eds. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, and Strober W., John Wiley & Sons Inc. 1991.

Crawford U, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ. El polimorfismo en el gen de la cistatina C es un nuevo factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Neurology. 2000, 55, 763-768.

Davies, H.A. 2000. The ProteinChip(R) Sistema para Ciphergen: Nueva técnica para una rápida biología proteica a microescala. J. Molecular Medicine, 78 (7): B29 Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, Growdon JH, Rebeck GW. Aumento de cistatina C en neuronas sensibles en la enfermedad de Alzheimer. Am. J. Pathol. 2001, 159, 1061-1068.

Ernerudh J, Olsson T, Berlin G, von Schenck H. Inmunoglobulinas y beta 2-microglobulina en el líquido cefalorraquídeo en enfermedades linfoproliferativas y otras neoplásicas del sistema nervioso central. Arch Neurol. 1987, 44 (9), 915-20.

Finckh U, Von der Kammer H, Velden J, Michel T, Andresen B, Deng A, Zhang J, Muller-Thomsen T, Zuchowski K, Menzer G, Mann U, Papassotiropoulos A, Heun R, Zurdel J, Holst F, Benussi L, Stoppe G, Reiss J, Miserez AR, Staehelin HB, Rebeck W, Hyman BT, Binetti G, Hock C, Growdon JH, Nitsch RM. Asociación genética de un polimorfismo del gen de la cistatina C con enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Arch Neurol. 2000, 57, 1579-1583.

Francis, P.T. et al. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1999, 66(2): 137-147 Fung, ET et al. Biochips proteicos para perfil diferencial. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12 (1): 65-69.

Ghiso J, Jensson O, Frangione B. Las fibrillas amiloides en la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo islandés es una variante de la proteína gamma-trace básica (cistatina C). Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83 (9): 2974-8.

Ghiso J, Pons-Estel B, Frangione B. Angiopatía amiloide cerebral hereditaria: las fibrillas amiloides contienen una proteína que es una variante de la cistatina C, un inhibidor de las cisteína proteasas lisosómicas. Biochem Biophys Res Commun. 1986; 136 (2): 548-54.

Gras R, Müller M, Gasteiger E, Gay S, Binz PA, Bienvenut WV, Hoogland C, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF, Appel R. Mejora de la identificación de proteínas por huella de masa peptídica mediante un algoritmo de puntuación de varios niveles parametrizado y una detección optimizada de picos. Electrophoresis 1999, 20: 3535-3550.

Grubb AO, Jensson O, Gudmundsson G, Arnason A, Lofberg H, Malm J. Metabolismo anormal de la microproteína alcalina g-trace. El defecto básico en la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis. N. Engl. J. Med 1984, 311, 547-1549.

Hellman U, Wernstedt C, Góñez, J, Heldin CH. Mejora de un procedimiento de digestión “en gel” para la micropreparación de fragmentos proteicos internos para secuenciación de aminoácidos. Anal. Biochem. 1995, 224, 451-5.

Hoekman K, Van Nieuwkoop JA, Willemze R. El significado de la beta-2 microglobulina en la medicina clínica. Neth JMed. 1985; 28 (12): 551-7.

Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lemer RA. Generación de una biblioteca combinatoria grande del repertorio de inmunoglobulinas en el fago lambda. 1989, Science 246: 1275-1281.

Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. Abordaje mediante SELDI-TOF MS a la proteómica: perfil proteico

e identificación de biomarcadores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 292 (3): 587-592.

Kalman J, Marki-Zay J, Juhasz A, Santha A, Dux L, Janka Z. Niveles de cistatina C en suero y en líquido cefalorraquídeo en la demencia vascular y de Alzheimer. Acta Neurol. Scand. 2000, 101, 279-282.

Laemmli UK. Escisión de proteínas estructurales durante el ensamblaje de la cabeza del bacteriófago T4. Nature. 1970 Aug 15;227(259): 680-5.

Leung-Tack J, Tavera C, Gensac MC, Martinez J, Colle A. Modulación de la descarga respiratoria asociada a fagocitosis por la cistatina C humana: papel del tetrapéptido en N-terminal Lys-Pro-Pro-Arg. Exp. Cell Research. 1990, 188, 16-22.

Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Codepósito de cistatina C con proteína beta amiloide en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. J. Neuropathol Exp Neurol 2001, 60, 94-104.

Merchant M, Weinberger SR.. Recientes avances en espectrometría espectrometría de masas por desorción/ionización por matriz en superficie tiempo de vuelo. Electrophoresis, 2000, 21: 1164-1167.

Popovic T, Brzin J, Ritonja A, Turk V. Diferentes formas de cistatina C. Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990, 371, 575-580.

Raymackers J, Daniels A, DeBrabandere V, Missiaen C, Dauwe M, Verhaert P, Vanmechelen E, Meheus L. Identificación de proteínas en líquido cefalorraquídeo separadas bidimensionalmente mediante secuenciación N-termina, espectrometría de masas-desorción/ionización láser asistida por matriz, cromatografía en nanolíquidos-ionización por electropulverización-tiempo de vuelo –espectrometría de masas y espectrometría de masas tándemt Electrophoresis, 2000, 21, 2266-2283.

El Instituto Ronald y Nancy Reagan de la Asociación de Alzheimer' y el Instituto Nacional del Grupo de Trabajo sobre Envejecimiento. Informe consenso del Grupo de Trabajo sobre: "Marcadores moleculares y bioquímicos de la enfermedad de Alzheimer". Neurobiology of Aging, 1988, 19 (2): 109-116.

Robles A.. Algunas observaciones sobre marcadores biológicos en la enfermedad de Alzheimer. Neurobiology of Aging, 1998, 19 (2): 153-157.

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. Digestión en gel de proteínas para análisis de la secuencia interna tras electroforesis en gel uni o bidireccional. Anal. Biochem. 1992, 203, 173-9.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Secuenciación por espectrometría de masas de proteínas en geles de poliacrilamida teñidos con plata. Anal. Chem. 1996, 68, 850-8.

Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HWM, De Bruijn C.. Neurobiology of Aging, 2002, 23: 485-508.

Patente de EE.UU. 4,366,241.

Patente de EE.UU. 4,376,110.

Patente de EE.UU. 4,517,288.

Patente de EE.UU. 4,837,168.

Ward ES et al., Actividades de unión de un repertorio de dominios variables de inmunoglobulina sencilla secretados por Escherichia coli. Nature 1989, 341, 544-546.

Wei L, Berman Y, Castano EM, Cadene M, Beavis RC, Devi L, Levy E. Inestabilidad de una variante de la cistatina C amiloidogénica de la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis. J. Biol. Chem. 1998, 273, 11806-11814.

Wulfkuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF. Nuevos abordajes al análisis proteómico del cáncer de mama. Proteomics 2001, 1 (10): 1205-1215.

Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, Clements MA, Davis JW, Schellhammer PF, Dalmasso EA, Wright GL. La cuantificación de antígeno de membrana específico de la próstata mediante un Nuevo inmunochip proteico discrimina entre enfermedad de la próstata benigna y maligna. 2001, Cancer Research 61 (16): 6029-6033.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer AG

<120> Biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

<130> LeA 36 293

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)…(2)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> misc_característica

<222> (5)…(5)

<223> Xaa = L o I

<220>

<221> misc_característica

<222> (10)..(10)

<223> Xaa = Q o K

<220>

<221> misc_característica

<222> (13)…(13)

<223> Xaa = L o I

<220>

<221> misc_característica

<222> (14)…(14)

<223> Xaa = L o I

<400> 1

```
Xaa Xaa Ala Asp Xaa Ala Gly His Gly Xaa Glu Val Xaa Xaa Arg
1               5                  10                  15
```

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)…(14)

<223> Xaa = L o I

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)…(14)

<223> Xaa = Leu o Ile

<400> 2

His	Gly	Thr	Val	Val	Xaa	Thr	Ala	Xaa	Gly	Gly	Xaa	Xaa	Lys
1				5					10				

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val	Asn	His	Val	Thr	Leu	Ser	Gln	Pro	Lys
1				5					10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Lys
1				5					10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile
1 5 10 15
Glu Val Asp Leu Leu Lys
20

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Ala Ser Asn Asp Met Tyr His Ser Arg
1 5

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Ala Leu Asp Phe Ala Val Gly Glu Tyr Asn Lys
1 5 10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Ala Leu Asp Phe Ala Val Gly Glu Tyr Asn Lys
1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gly Val Arg
1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu Gly Arg
1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gly Val Arg
1 5 10 15
Arg

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Gln Ile Val Ala Gly Val Asn Tyr Phe Leu Asp Val Glu Leu Gly
1 5 10 15
Arg

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Gln Pro Asn Leu Asp Asn Cys Pro Phe His Asp Gln Pro Pro His
1 5 10 15
Leu Lys

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Thr Gln Pro Asn Leu Asp Asn Cys Pro Phe His Asp Gln Pro Pro His
1 5 10 15
Leu Lys Arg

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Ser Ser Pro Gly Lys Pro Pro Arg Leu Val Gly Gly Pro Met Asp Ala
1               5                  10                  15
Ser Val Glu Glu Glu Gly Val Arg
            20
```

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

```
Val Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Ala Glu Ala Glu Ala Glu Ala Glu
1               5                  10                  15
Glu Ala Glu Arg
            20
```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de SEC ID Nº: 17.

2. Un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende la detección de un polipéptido que consiste en la secuencia de SEC ID Nº: 17 en una muestra de dicho sujeto.

3. Procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 2, en el que se detecta al menos un polipéptido adicional seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos que comprende las SEC ID Nº: 1, SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº:4, SEC ID Nº:5, SEC ID Nº:6, SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 8, SEC ID Nº: 9, SEC ID Nº: 10, SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 12, SEC ID Nº: 13, SEC ID Nº: 14, SEC ID Nº: 15, SEC ID Nº: 16 o seleccionado del grupo que consiste en cistatina C humana, beta-2-microglobulina humana, el homólogo de 7,7 kD de mioglobina humana, proteína VGF neurosecretora, un fragmento de al menos 5 aminoácidos de cistatina C humana, un fragmento de al menos 5 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana, un fragmento de al menos 5 aminoácidos del homólogo de 7,7 kD de mioglobina humana y se detecta un fragmento de al menos 5 aminoácidos de proteína VGF neurosecretora.

4. Procedimiento de investigación de la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto **caracterizado porque** se lleva a cabo un procedimiento de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3 con al menos dos muestras distintas extraídas del mismo sujeto.

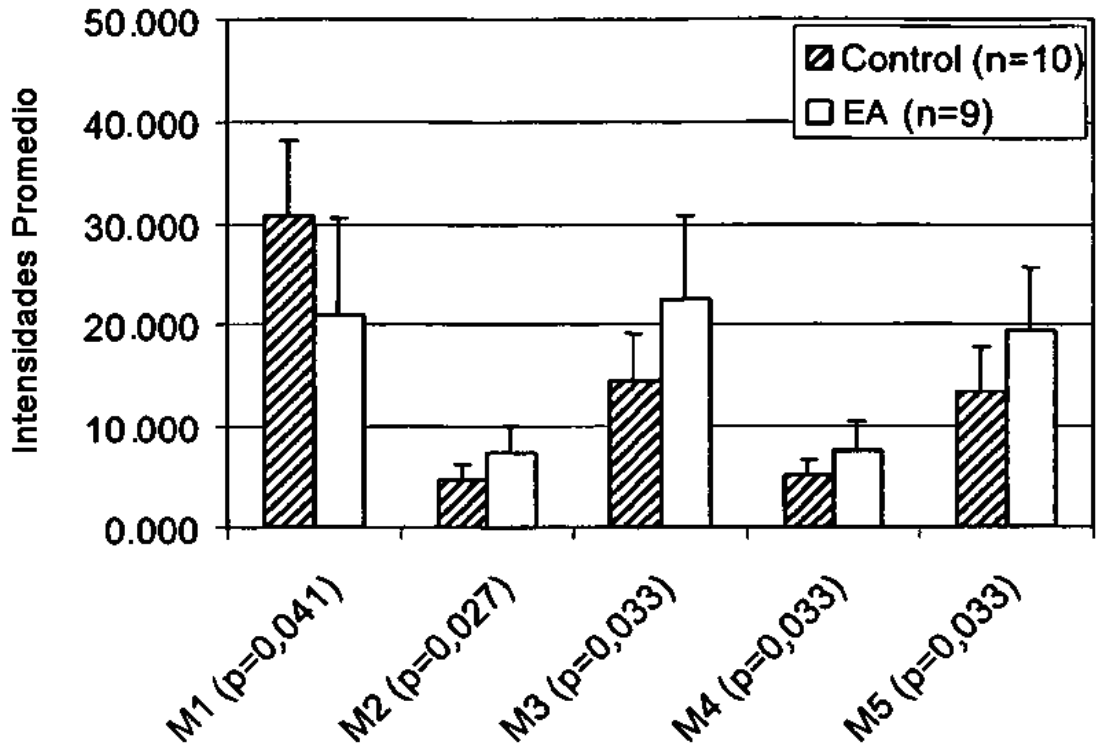
5. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la detección de dicho(s) polipéptido(s) es por EM de SELDI-TOF.

6. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que anticuerpos específicos o anticuerpos que reconocen dichos polipéptidos se usan para la detección de dicho(s) polipéptido(s).

7. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la detección es en una muestra que comprende LCR, sangre, suero, plasma, orina, plasma seminal, fluido del pezón, y/o extractos celulares de dicho paciente.

8. Un kit para evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SEC ID Nº: 17.

Figura 1:


50.000
40.000
30.000
20.000
10.000
0.000
Intensidades Promedio
Control (n=10)
EA (n=9)
M1 (p=0,041)
M2 (p=0,027)
M3 (p=0,033)
M4 (p=0,033)
M5 (p=0,033)