



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 660**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05766758 .6**
96 Fecha de presentación : **18.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1787127**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Método de diagnóstico molecular y tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy.**

30 Prioridad: **19.07.2004 ES 200401764**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.02.2010

73 Titular/es: **Oryzon Genomics S.A.**
Parc Científic de Barcelona, Edifici Helix
Baldiri i Reixac, 15-21
08028 Barcelona, ES

72 Inventor/es: **Maes, Tamara;**
Buesa Arjol, Carlos;
Barrachina, M. y
Ferrer Abizanda, Isidro

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 333 660 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

Método de diagnóstico molecular y tratamiento de la demencia con cuerpos de Lewy.

- 5 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico molecular y de tratamiento de la enfermedad conocida como demencia de cuerpos de Lewy, tanto en su forma pura como en su forma común, que puede ser utilizado como criterio de diagnóstico de dichas demencias así como en la prevención y tratamiento de las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 En las sociedades desarrolladas el envejecimiento de la población está produciendo un incremento del número de pacientes afectados de demencia. La mayoría de estos individuos padecerán la más común de entre ellas: la enfermedad de Alzheimer (AD); pero existen toda una gama de demencias de orígenes muy diversos. Entre ellas destaca por su frecuencia la demencia con cuerpos de Lewy (DLB). La DLB designa un síndrome clínico-patológico de demencia
15 asociado con la presencia cortical y subcortical de cuerpos de Lewy en diferentes grados, entre ellos podemos mencionar enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, demencia senil tipo cuerpos de Lewy y también variante con cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer. La clasificación clínico-patológica de esta disfunción, a la que se ha dado en llamar demencia con cuerpos de Lewy (DLB) (McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, *et al.* Consensus guidelines for the clinical and pathological diagnosis of Dementia with Lewy bodies (DLB): report on the Consortium on DLB International Workshop. *Neurology* 1996; 47: 1113-24.2000; 54: 1050-8) recoge también algunos rasgos que son comunes
20 con las características de la AD y de la enfermedad de Parkinson (PD). En su conjunto, los datos clínicos de la enfermedad pueden sugerir el diagnóstico de enfermedad de cuerpo de Lewy difusa, si bien no existen pruebas diagnósticas definitivas para tal diagnóstico. El examen neuropatológico es actualmente la única forma de diagnóstico al demostrar las alteraciones patognomónicas por sus características, localización y distribución propias de la enfermedad.

- 25 Los criterios neurológicos de diagnóstico atienden a los síntomas o signos nucleares. Así, en la valoración de la Demencia con Cuerpos de Lewy se consideran deficiencias atencionales, ejecutivas y visuoespaciales frecuentemente más severas; memoria a corto plazo relativamente mejor que en AD. En la valoración de Cognición fluctuante se evalúa un curso temporal variable de niveles alterados de atención y conciencia y el hecho de no observarse el síndrome crepuscular. Otro síntoma clave es la presencia de alucinaciones visuales. Típicamente estas incluyen sujetos animados con un grado variable de penetración. En DLB, los signos extrapiramidales espontáneos son: rigidez, bradiquinesia y anormalidad en la marcha; el temblor en reposo es infrecuente. La presencia de fluctuaciones clínicas de un día a otro o de una semana a otra, especialmente al inicio, son aspectos que apoyan el diagnóstico de DLB. Un aspecto
30 que podría mejorar la sensibilidad diagnóstica es la determinación de criterios para definir el umbral y la escala de los rasgos nucleares de los signos motores extra-piramidales y de las alucinaciones visuales. Otra limitación de los criterios actuales es el hecho de que las características sugestivas para el diagnóstico no se incluyen explícitamente en el algoritmo utilizado para determinar la naturaleza posible o probable de la DLB. Para conseguir una mayor precisión en el diagnóstico de la DLB, sería necesario acometer investigaciones sobre la utilidad de los rasgos sugestivos para el diagnóstico diferencial y la posible contribución de los trastornos del sueño (Kaufer DI. *Dementia and Lewy bodies* Rev Neurol. 2003 Jul 16-31;37(2):127-30. Review.).
40

- Desde el punto de vista histopatológico, los signos diferenciales para un diagnóstico de DLB es la presencia de cuerpos de Lewy en el cortex y el tronco del encéfalo, aunque en ocasiones se detectan presencia de neuritas de Lewy, placas seniles corticales, signos de taupatía o cambios espongiiformes (K.A. Jellinger, *Morphological substrates of mental dysfunction in Lewy body disease. An update. J Neurol Transm Suppl* 59 (2000), pp. 185-21). Como se ha
45 mencionado, las características de las lesiones (cuerpos y neuritas de Lewy), su localización (en neuronas procesos neuronales) y su distribución (difusa en el tronco del encéfalo, amígdala, núcleo basal de Meynert y corteza cerebral) son específicos de la enfermedad.

- 50 Pirim *et al.* (1998) *Int. J. Neuro. Res.* 95:33-42 muestra que los anticuerpos contra la hidrolasa de ubiquitina carboxiterminal muestra reactividad con cuerpos de Lewy cortical junto con las neuronas y las neuritas bulbosas de cerebros con la enfermedad de Alzheimer y con la enfermedad de cuerpos de Lewy.

- 55 Lowe *et al.* (1990) *J. Path.* 161:153-60 demostró que la hidrolasa de ubiquitina c-terminal puede ser detectada en distintas formas de cuerpos de inclusión, incluyendo los cuerpos de Lewy corticales.

- Nishikawa *et al.* (2003) *Biochem. Biophys Res. Comm.* 304:176-83 examina la cinética de las enzimas salvajes y las variantes I93M y S18Y de UCH-L1 con la finalidad de intentar descifrar una potencial relación junto con la enfermedad de Parkinson.

- 60 Un estudio reciente señala una incidencia clínica de DLB de 26/100.000 casos anuales, con una tasa máxima para el intervalo de edad 80-84 años de 68,6/100.000 casos anuales. Esto implica una tasa menor frente a la AD, que en un trabajo previo fue de 93/100.000 casos anuales pero mayor que la demencia fronto-temporal (FTD), que se estimó en 14/100.000 casos anuales. El mismo estudio detecta una predominancia masculina de la DLB descrita en la literatura, con un porcentaje de varones con DLB respecto a AD que fue de 63,2% frente a 23,1%. En este estudio
65 deben considerarse diversas limitaciones metodológicas ya que se trata de un estudio con una muestra hospitalaria de pacientes no representativos de la población general. Además, debe tenerse en cuenta que la sensibilidad insuficiente de los criterios clínicos actuales puede producir la infraestimación de las tasas reales, lo cual hace suponer que la

incidencia en la población general es ligeramente superior. (S. López-Pousa, J. Garre-Olmo, A. Turon-Estrada, E. Gelada-Batlle, M. Lozano-Gallego, M. Hernández-Ferrándiz, V. Morante- Munoz, J. Peralta-Rodríguez, M.M. Cruz-Reina Incidencia clínica de la demencia por cuerpos de Lewy. REV NEUROL 2003; 36 (8): 715-720).

- 5 La etiología de la enfermedad es desconocida y los mecanismos moleculares de su progresión también. No obstante, la característica histopatológica fundamental de esta enfermedad, la acumulación de cuerpos de Lewy han empezado por aportar algunas de las primeras pistas o indicaciones. Los cuerpos de Lewy son depósitos proteicos compuestos básicamente de depósitos proteicos insolubles cuyos componentes principales son la α -sinucleína, la ubiquitina y la presencia de proteínas ubiquitinadas. Todos ellos son componentes de un sistema subcelular llamado Sistema UPS (Ubiquitina-proteasoma) que es responsable de la degradación fisiológica de proteínas citoplasmáticas que son defectuosas o se encuentran en exceso (Herschko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 67: 425-479). El malfuncionamiento de este sistema ha sido asociado como una de las causas implicadas en el origen o desarrollo de ciertas enfermedades neuro-degenerativas como AD, PD, la enfermedad de Huntington (HD) o la esclerosis amiotrófica lateral (ALS) (Petrucelli L & Dawson TM. Mechanism of neurodegenerative disease: role of the ubiquitin proteasome system. Ann Med. 2004;36(4):315-20). (Tran PB, Miller RJ. Aggregates in neurodegenerative disease: crowds and power? Trends Neurosci. 1999 May;22(5): 194-7).

- WO 9950300 A1 describe un método de diagnóstico de sinucleopatías en pacientes, que comprende detectar sinucleínas seleccionadas en una muestra biológica obtenida de un paciente. También describe un método para el tratamiento de sinucleopatías en pacientes que sufren desórdenes neurodegenerativos, que comprende modular la producción de seleccionadas y/o la formación de inclusiones filamentosas intracitoplasmáticas glioales y neuronales de sinucleínas seleccionadas en estos pacientes.

- Uno de los elementos de este Sistema UPS (Ubiquitina-proteasoma) responsable de la degradación fisiológica de proteínas citoplasmáticas que son defectuosas es la UCHL-1 (Ubiquitina C-terminal hidrolasa -1), una tiol-proteasa responsable de hidrolizar los enlaces peptídicos de los complejos proteicos unidos a la glicina carboxiterminal de la ubiquitina que conllevan a la destrucción regulada de proteínas sobrantes en el citoplasma celular y liberando ubiquitina que queda así disponible para unirse a nuevas proteínas que deben eliminarse. La correlación entre la UCHL1 y el parkinsonismo ya había sido puesta de manifiesto con la detección de una mutación en una familia alemana con un historial de PD, esta mutación tiene características dominantes (Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 395: 451-452). También se había observado que en ratones defectivos para UCHL1 los niveles neuronales de ubiquitina *in vivo* eran menores de lo normal y que en sistemas de líneas celulares la sobreexpresión de UCHL1 producía un incremento en los niveles de ubiquitina libre. (Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K (2003) Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. Hum Mol Genet 12: 1945-1958). También se ha demostrado que la UCHL1 colocaliza con otras proteínas del sistema UPS como proteínas ubiquitinadas, HSP70, gamma-tubulina y, en menor medida, el proteasoma 20S y la chaperona BiP (Ardley HC, Scott GB, Rose SA, Tan NG, Robinson PA. UCH-L1 aggregates formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. J Neurochem. 2004 Jul;90(2):379-91). Recientemente, también se han descrito alteraciones en el estado oxidativo de UCHL1 en AD y PD esporádicas (Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, Li L (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's disease. J Biol Chem 279: 13256-13264.).

- A pesar de que las rutas de degradación y homeostasis proteica subcelular como el sistema UPS y las diferentes proteínas intervinientes en el mismo han sido propuestas como actores centrales en el desarrollo de algunas enfermedades ya mencionadas en los párrafos anteriores, como PD o AD, que comparten algunos síntomas con la DLB, lo cierto es que se sigue sin conocer las causas y los mecanismos de evolución de esta demencia que es la segunda más frecuente tras el Alzheimer.

- Las posibilidades terapéuticas que se ofrecen a los pacientes de DLB son desgraciadamente muy limitadas, a menudo se resumen en tratamiento sintomático para controlar los síntomas psiquiátricos y parkinsonianos. Sin embargo, a menudo la medicación antiparkinsoniana que produce mejoras en el temblor y en la pérdida de movilidad produce empeoramientos agudos y notables, en algunos casos fatales, de los síntomas alucinatorios y del cuadro psicótico. De la misma forma el tratamiento neuroléptico prescrito para los síntomas psiquiátricos produce un empeoramiento notable del cuadro motor. Dependiendo del cuadro que presenta el paciente, inhibidores de acetilcolinesterasa, agonistas de dopamina, benzodiazepinas de vida corta y media y antidepresivos pueden ser de ayuda limitada. (Rampello L, Cerasa S, Alvano A, Butta V V, Raffaele R, Vecchio I, Cavallaro T, Cimino E, Incognito T, Nicoletti F. Dementia with Lewy bodies: a review. Arch Gerontol Geriatr. 2004 Jul-Aug;39(1):1-14).

- Por lo tanto, existe una necesidad en el estado del arte de identificar nuevos genes y/o mutaciones responsables y/o indicadores de la demencia de cuerpos de Lewy.

- La identificación de este/estos genes permitiría un diagnóstico molecular selectivo y respecto a otras demencias y permitiría incluirlo/s en la práctica clínica habitual.

Al mismo tiempo produciría un ahorro enorme de costes sanitarios y sociales asociados a este tipo de demencias terriblemente incapacitadoras.

5 También permitiría la adopción de nuevos criterios pronósticos y de orientación terapéutica en los casos positivos ya que permitiría adaptar terapias más severas y personalizadas a aquellos casos en los que el carácter parkinsoniano del enfermo quedara establecido.

10 Finalmente la identificación de este/estos genes y de los posibles compuestos que alteran su expresión retardando o deteniendo la progresión de la enfermedad permitiría no solo un diagnóstico molecular selectivo y respecto a otras demencias sino que permitiría el diseño de terapias selectivas destinadas a inactivar estos genes.

Descripción de la invención

15 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* para la demencia de cuerpos de Lewy (DLB) en pacientes con sospecha clínica de inicio de demencia, caracterizado porque comprende analizar una muestra obtenida de un paciente para determinar el nivel de expresión del gen Ubiquitina C-terminal hidrolasa L-1 (UCHL-1), donde los niveles de expresión reducidos de UCH-L1 o de actividad enzimática en comparación con controles es diagnóstico de DLB.

20 En particular, dicha muestra puede ser ARN o proteína y puede aislarse a partir de células obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción de tejido nervioso o cualquier otro método de extracción de cualquier otro tejido a partir de fluidos biológicos como líquido cefalorraquídeo, suero u orina.

25 El método de diagnóstico de la presente invención comprende adicionalmente una detección mediante una amplificación por PCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de DNA que permita una estimación cuantitativa de los niveles de transcrito de UCH-L1.

30 Optativamente, la detección se puede llevar a cabo mediante biochips de DNA realizados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo, por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.

35 También la detección se puede llevar a cabo mediante una detección por análisis de cantidad de proteína presente realizado mediante Western-blot, análisis mediante "protein-chip" utilizando anticuerpos específicos contra UCH-L1 o mediante perfiles proteicos realizados por espectrometría de masas o por cualquier otro mecanismo que permita una estimación cuantitativa de los niveles de proteína UCH-L1.

40 Optativamente, la detección se puede llevar a cabo mediante análisis directo o indirecto de las actividad enzimáticas de UCH-L1 *in vitro* o *in vivo*, entendiendo como tales la actividad hidrolítica de los ésteres y amidas de ubiquitina como la actividad ubiquitinil-ligasa.

También la detección se puede llevar a cabo mediante una detección donde la muestra analizada y cuantificada es la proteína codificada por dicho gen o fragmentos de la misma.

45 Optativamente, la detección se puede llevar a cabo mediante análisis directo o indirecto del producto de la actividad ligasa de la UCH-L1, es decir, de la presencia de formas dimerizadas o polimerizadas de poliubiquitinina.

50 Por otra parte, la presente invención tiene también por objetivo adicional proporcionar un método de análisis de compuestos para identificar agentes terapéuticos basados en su capacidad de potenciar los niveles de la enzima UCH-L1 para detener o revertir la progresión de este tipo de demencias. Estos compuestos pueden ser promotores específicos de la transcripción del gen UCH-L1 o inhibidores específicos de la degradación de la proteína codificada por el gen UCH-L1.

55 Asimismo, es objeto de la presente invención el uso de compuestos para incrementar o acelerar la actividad hidrolítica de la enzima UCH-L1 para detener o revertir la progresión de este tipo de demencias. Estos compuestos pueden afectar la velocidad máxima o la afinidad de la UCH-L1 frente a los ésteres a o amidas de peptidilubiquitina.

La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende un gen que codifica la forma S18Y de UCH-L1 para su uso en detener o revertir la progresión de la demencia con cuerpos de Lewy.

60 Por otra parte, la presente invención describe un método de análisis de compuestos de potencialidad terapéutica en demencia de cuerpos de Lewy, basado en el análisis de la variación de la actividad hidrolítica de UCH-L1 en sistemas *in vitro* como cultivos celulares u otros.

65 También se describe un método de análisis de compuestos de potencialidad terapéutica en demencia de cuerpos de Lewy basado en el análisis de la variación de la actividad ubiquitinil-ligasa de UCH-L1 en sistemas *in vitro* como cultivos celulares u otros.

La presente invención está basada en el descubrimiento realizado a partir de análisis genómicos en DNA chips con oligonucleótidos diseñados de forma específica para representar 627 genes de especial interés realizados sobre corteza cerebral de que en una cohorte de pacientes afectos de Demencia de cuerpos de Lewy (DLB) tanto en su forma pura como en la forma denominada común, que manifiesta además algunos síntomas concomitantes de enfermedad de Alzheimer. En estos casos los niveles de ARNm del gen UCHL-1 se encontraban disminuidos respecto a los controles y respecto a una cohorte de pacientes afectos de enfermedad de Alzheimer (AD) y de Parkinson (PD). Este dato fue corroborado por técnicas independientes como la cuantificación de ARNm mediante PCR en tiempo real. La significación de este descenso en los niveles de mRNA fue además comprobada en relación a los procesos generales y específicos de degradación que sufren las diferentes especies de ARNm en los tejidos post-mortem. Experimentos en los que la misma muestra post-mortem era procesada y el ARN obtenido tras haber estado el tejido a temperatura ambiente durante diferentes tiempos mostraban que los niveles de UCHL-1 permanecían constantes comparados con los de transcritos constitutivos o poco variables como el de la β -actina.

También se comprobó que los niveles de proteína, analizados mediante experimento de Western-Blot empleando anticuerpos específicos anti-UCHL-1, se encontraban asimismo disminuidos en la corteza cerebral en la DLB, pero no en la PD.

Estas disminuciones de los niveles de ARNm y de proteína UCHL-1 eran estadísticamente significativas comparadas con los controles con unos niveles de significación de 0.99 para la forma pura de la DLB y 0.95 para la forma común.

La demencia de cuerpos de Lewy (DLB) es la segunda demencia más común después de la enfermedad de Alzheimer (AD). Histopatológicamente se caracteriza por una acumulación de cuerpos hialinos (los cuerpos o acumulos de Lewy) en ciertos núcleos del tracto cerebral, medula espinal y ganglios autónomos. En PD también se producen cuerpos de Lewy y ambas (PD y DLB) son consideradas α -sinucleopatías por el acumulo de esta proteína en los cuerpos de Lewy. Aunque DLB tiene un cierto solapamiento sintomático con PD, ambas enfermedades presentan cuadros neurológicos muy diferenciados y la afectación cerebral es también distinta. Así por ejemplo, DLB presenta afectación cortical que es inexistente en PD y un cuadro neurológico alucinatorio inexistente en PD, el tratamiento sintomático anti-PD en enfermos de DLB complica de forma muy grave el cuadro neurológico de estos pacientes. Existe un consenso clínico y neurológico bien establecido de que ambas son enfermedades claramente diferentes.

UCHL-1 es una enzima implicada en los mecanismos del Sistema UPS (Ubiquitinaproteasoma) responsable de la degradación fisiológica de proteínas citoplasmáticas que son defectuosas, mutantes o están en exceso. UCHL-1 es una tiol-proteasa responsable de hidrolizar los enlaces peptídicos de los complejos proteicos unidos a la glicina carboxiterminal de la ubiquitina que conllevan a la destrucción regulada de proteínas sobrantes en el citoplasma celular y liberando ubiquitina que queda así disponible para unirse a nuevas proteína que deben eliminarse.

En PD, una enfermedad que comparte algunos síntomas con DBL, pero que contrariamente a esta no muestra nunca afectación cortical, ya se había notado la posible importancia de estos mecanismos de regulación de las proteínas sobrantes en el citoplasma celular en el desarrollo de la enfermedad ya que la parkina una proteína que interacciona con la ubiquitina está mutada en ciertos casos de PD hereditario (McNaught KS, Olanow CW (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: S73-84). También UCHL-1 se ligó a PD al descubrirse que existe una mutación puntual (I93M) que, con un cierto grado de dominancia, confiere susceptibilidad de producir la enfermedad (Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395: 451-452); y en un estudio colaborativo donde se analizaron los 11 estudios realizados hasta la fecha en 1970 casos de PD y 2224 controles no relacionados, se determinó que existía una asociación inversa estadísticamente significativa entre el alelo S18Y y la enfermedad de Parkinson (odds ratio (OR) de 0.84 (95% intervalo de confianza [CI], 0.73-0.95) y homocigotos para la variante alélica (Y/Y vs S/S más Y/S) tenían un OR de 0.71 (95% CI, 0.57-0.88) lo que confirmaba UCHL-1 como un gen de susceptibilidad para el PD. (Maraganore, D. M.; Lesnick, T. G.; Elbaz, A.; Chartier-Harlin, M.-C.; Gasser, T.; Kruger, R.; Hattori, N.; Mellick, G. D.; Quattrone, A.; Satoh, J.; Toda, T.; Wang, J.; Ioannidis, J. P. A.; de Andrade, M.; Rocca, W. A.; UCHL1 Global Genetics Consortium: UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann. Neurol.* 55: 512-521, 2004). También recientemente se ha descrito una disminución de los niveles de UCHL-1 y la presencia de ciertas modificaciones oxidativas en Alzheimer y Parkinson idiopático (Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, Li L (2004) Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279: 13256-13264).

No obstante, la posible conexión entre los niveles de UCHL-1 y la Demencia de cuerpos de Lewy no había sido descrita hasta la fecha. Por lo tanto, la presente descripción demuestra una clara correlación entre los niveles de ARNm y de proteína UCHL-1 de la corteza cerebral en los enfermos de DLB respecto a los controles. Además los experimentos de la descripción muestran con claridad como la reducción de los niveles proteicos de UCHL-1 en pacientes afectos de DLB no muestran decrementos concomitantes de otras proteínas claves del complejo ubiquitina-proteasoma como las subunidades 20SX, 20SY, complejo 19S y la subunidad 11S α del activador PA28. Esto indica un papel específico y selectivo de la represión de los niveles de UCHL-1 en el cuadro patológico de la DLB en la corteza cerebral.

Actualmente, los enfermos con sospecha de DLB son básicamente analizados neurológicamente, el deterioro mental progresivo es detectado por síntomas tempranos como dificultades en solucionar problemas y dificultades visuales y espaciales, así como fluctuaciones en la función cognitiva y la aparición de alucinaciones bien definidas. Posteriormente, la aparición de signos motores constituyen las características centrales para un diagnóstico discriminatorio de DLB frente a otras demencias (McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47: 1113-1124 y McKeith IG, Ballard CG, Perry RH, Ince PG, O'Brien JT, Neill D, Lowery K, Jaros E, Barber R, Thompson P, Swann A, Fairbairn AF, Perry EK. Prospective validation of consensus criteria for the diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Neurology*. 2000 Mar 14;54(5):1050-8). Un diagnóstico inequívoco temprano permitiría disponer de un margen terapéutico que reduzca o detenga el avance de la enfermedad.

De acuerdo con el método de diagnóstico de la presente descripción el análisis de DLB quedaría de la siguiente forma: un paciente que tiene un cuadro de sospecha de inicio de demencia y con una apreciación clínica-familiar no definitiva sería diagnosticado por una microbiopsia y una cuantificación de los niveles de UCH-L1.

En efecto, el conocimiento de las actividades enzimáticas de UCH-L1, la actividad hidrolasa que libera la ubiquitina (Larsen CN, Krantz BA, Wilkinson KD. Substrate specificity of de-ubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*. 1998; 37: 3358-68. y Larsen CN, Price JS, Wilkinson KD. Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues. *Biochemistry*. 1996; 35: 6735-44) y la actividad ubiquitinil-ligasa (Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect α -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 111: 209-218) permite diseñar métodos de análisis de compuestos y permite comprobar la eficacia de moléculas que interfieran las actividades de UCH-L1 en la dirección deseada.

La terapia anti-DLB comienza por determinar la presencia de niveles disminuidos de UCH-L1 en tejido nervioso o en CSF o en fluidos periféricos. En ratones defectivos de UCH-L1 se ha observado un decremento de la ubiquitina libre en neuronas y en ratón transgénico sobreexpresando UCHL-1 y en sistemas de cultivos celulares la sobreexpresión de UCH-L1 implica un incremento de los niveles de ubiquitina, (Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K (2003) Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 12: 1945-1958.). Además, la colocalización de α -sinucleína y ubiquitina en los cuerpos de Lewy y en las neuritas de Lewy (McNaught KS, Olanow CW (2003) Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53: S73-84.; McNaught KS, Mytilineou C, Jnabaptiste R, Yabut J, Shashidharan P, Jennert P, Olanow CW (2002b) Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures. *J Neurochem* 81: 301-306) así como nuestras de que otros componentes importantes del complejo UPS no se encuentran disminuidas en el cuadro de DLB debido de forma principal a una disminución de la actividad UCH-L1 hacen que sea una hipótesis muy verosímil que el sistema ubiquitina-proteasoma esté implicado en la patogénesis de PD y de DLB.

Por lo tanto, el establecimiento de la clara correlación entre los niveles de UCH-L1 y la enfermedad DLB permite considerar de forma novedosa la aplicación de tecnologías y de compuestos, bien para el incremento de los niveles de enzima activo, bien de la inactivación de la actividad ubiquitinil-ligasasa o bien para la activación de la actividad hidrolasa. Esta aplicación de tecnologías y/o compuestos activos pueden suponer la contención y/o regresión de la enfermedad ya que producen el incremento de la ubiquitina libre disponible en el pool citoplasmático celular y por tanto permite a las neuronas catabolizar correctamente las proteínas que deben ser eliminadas causando la disminución en la concentración de α -sinucleína y otras proteínas que son los responsables de los cuerpos de Lewy.

Un ejemplo de aproximación de sobreexpresión de UCH-L1 sería la inserción de un cassette codificante para la forma S18Y de UCH-L1 que tiene una capacidad ubiquitinil-ligasa reducida en un vector de expresión adenoviral, retroviral o de otro tipo. Este tipo de vector podría ser introducido mediante trasplante en células madre nerviosas (neural stem cell) de procedencia embrionaria o adulta (derivadas de la zona subventricular u otra) portadoras del vector de expresión. Una aproximación similar podría ser el trasplante de células madre codificantes para un factor de transcripción que exalte la transcripción del gen UCH-L1 endógeno. Recientemente se ha demostrado que un factor de transcripción: B-Myb, que se identificó por su similaridad con v-Myb un oncogen de retrovirus de pollo y que modula la transición G1/s del ciclo celular (N. Nomura, M. Takahashi, M. Matsui *et al.*, Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, a-myb and b-myb. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988), pp. 11075-11089 published erratum appears in *Nucleic Acids Res.* 1989 February 11;17(3):1282), es capaz estimular la expresión de UCHL1 tanto *in vitro* como *in vivo* en pulmón de rata (Long EM, Long MA, Tsigotis M, Gray DA. Stimulation of the murine Uchl1 gene promoter by the B-Myb transcription factor. *Lung Cancer*. 2003 Oct;42(1):9-21.)

Otro ejemplo en esta línea podría introducir versiones mutadas de la UCHL-1 con la actividad hidrolítica exaltada.

Un ejemplo demostrativo de este efecto puede postularse con líneas celulares neuronales del mesencéfalo ventral de rata donde la inhibición de UCHL-1 produce agregados de α -sinucleína y la sobreexpresión produce incremento en la cantidad de ubiquitina libre.

Otro ejemplo experimental es el obtenido en la línea celular de neuroblastoma SHS5Y donde tratamientos con 5-100 microM de MPP+, el metabolito activo de MPTP, induce apoptosis en las células SH-SY5Y en los 4 días siguientes a tratamiento y además en este proceso reproducen la sobreexpresión de α -sinucleína que forman los agregados de Lewy propios de la DLB (Gomez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Vinals F, Barrachina M, Ambrosio S. MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Brain Res. 2002 May 10;935 (1-2):32-9.).

Una pequeña parte de las demencias puede además tener un carácter familiar, tal como se ha descrito en el caso de PD donde una mutación en UCH-L1 (la mutación alemana 193M) provoca un decremento de la actividad hidrolítica de un 50% (Lansbury PT, Brice A (2002) Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. Curr Opin Genet Dev 13: 299-306.). También algunos de los subtipos de DLB parece que podrían presentar un cierto grado de dominancia autosómica (Harding AJ, Das A, Kril JJ, Brooks WS, Duffy D, Halliday GM. Identification of families with cortical Lewy body disease. Am J Med Genet. 2004 Jul 1;128B(1):118-22). La mutación de UCH-L1 193M tiene también una cierta dominancia si bien la penetrancia de la misma no es absoluta, lo que ha llevado a postular fenómenos de compensación alélica en trans (Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect α -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell 111: 209-218).

En este contexto, tienen sentido aproximaciones de inhibiciones químicas o inmunológicas que se han probado con cierto éxito en otros campos terapéuticos como el oncológico, donde hay ejemplos como la beta-catenina en el cáncer colorrectal y con BCR-ABL en leucemia mieloide crónica. Estas observaciones sugieren que ciertos oncogenes podrían ser susceptibles de una disrupción provocando la caída del fenotipo tumoral o permitiendo la eficacia del tratamiento estándar combinado. De entre los mecanismos de disrupción génica disponibles, la interferencia por ARNs de pequeño tamaño (ARNi) es una de las aproximaciones más prometedoras, inicialmente descubierto en petunias (Napoli C, Lemieux C, and Jorgensen R. (1990) Introduction of a chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279-289) su mecanismo molecular de acción ha sido descrito (Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. (2001) Post-transcriptional Gene Silencing by Double-stranded ARN. Nature Rev Gen 2: 110-119) y ha suscitado una gran expectativa en sus aplicaciones antitumorales (Kittler R, Buchholz F. ARN interference: gene silencing in the fast lane. Semin Cancer Biol. 2003 Aug;13(4):259-65; Deveraux QL, Aza-Blanc P, Wagner KW, Bauerschlag D, Cooke MP, Hampton GM. Exposing oncogenic dependencies for cancer drug target discovery and validation using ARNi. Semin Cancer Biol. 2003 Aug;13(4):293-300; Bedford JS, Liber HL Applications of ARN interference for studies in DNA damage processing, genome stability, mutagenesis, and cancer. Semin Cancer Biol. 2003 Aug;13(4):301-8). De forma similar, una aproximación antisentido podría reducir el nivel de mensajero producido por el alelo 193M u otro que confiera un decremento de la actividad hidrolítica.

En la tabla siguiente se describen como ejemplo algunas de las dianas posibles en el cDNA para reducir la expresión de respectivamente UGH-L1 193M o de un alelo de UCH-L1 que no contiene la mutación 193M.

UCH-L1 I93M	ggcacaatGggacttattc
UCH-L1 I93M	cacaatGggacttattcac
UCH-L1	ggcacaatCggacttattc
UCH-L1	cacaatCggacttattcac

También se contempla como parte de la presente descripción el uso de sistemas *in vitro* para realizar análisis de compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas que puedan remediar el daño neuronal producido por los agregados de Lewy. Líneas celulares de tipo líneas de neuroblastoma SHS5Y donde tratamientos con 5-100 microM de MPP+, el metabolito activo de MPTP, inducen apoptosis en las células SH-SY5Y y además en este proceso reproducen la sobreexpresión de α -sinucleína que forman los agregados de Lewy propios de la DLB (Gomez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Vinals F, Barrachina M, Ambrosio S. MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Brain Res. 2002 May 10;935 (1-2):32-9). En estas líneas celulares se pueden comprobar la eficacia de los compuestos monitorizando los niveles de UCH-L1, su actividades enzimáticas, los depósitos de α -sinucleína y la propia apoptosis de las células. Estos compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas pueden unirse a la proteína UCH-L1 e inhibir de forma no competitiva la actividad ubiquitil-ligasa y restaurar la capacidad de liberación de ubiquitina normal de la misma. De forma alternativa, es-

tos compuestos terapéuticos y/o composiciones farmacéuticas pueden modificar la expresión de vías de señalización celular provocadas por la sobre-acumulación de proteínas como consecuencia de una alteración del Sistema UPS.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: A) Representación gráfica de la amplificación de UCH-L1 mediante diluciones seriadas de ARN procedente de área cortical de cerebro de 8 humanos. La línea horizontal representa el umbral ajustado manualmente en la fase exponencial. La intensidad de la fluorescencia se incrementa con los ciclos de PCR. El número de ciclos a partir del cual la intensidad de fluorescencia excede la línea umbral es definido como el valor umbral CT en el cual se basa la cuantificación. B) Curves estándar representativas para la β -actina y la UCH-L1 construidas a partir de diferentes concentraciones de ARN procedente de cerebro control humano. Los valores CT (eje y) vs log de las diferentes concentraciones de ARN de muestras control (eje x) muestran una correlación lineal inversa.

Figura 2: Niveles de expresión relativa del gen UCH-L1 en el córtex frontal de controles (C, n=6), Enfermedad de Parkinson (PO, n=6), Enfermedad de cuerpos de Lewy difusa, Demencia con cuerpos de Lewy, forma pura (DLBp, n=7) y forma común (DLBc, n=6). (A) Niveles de ARNm de UCH-L1 (promedio $\pm$ SEM) normalizados con la β -actina. B) Niveles proteicos de UCH-L1 (dos bandas de aproximadamente 25 KDa), detectados por Western Blot en los homogeneizados totales de córtex frontal (area 8). La β -actina (45 kDa) se detecta como control de carga proteica. La imagen es representativa de todas las muestras estudiadas e indicadas en la Tabla I. C) Análisis densitométrico de los niveles proteicos de UCH-L1 (promedio $\pm$ SEM) con el programa TotalLab v2.01. Los valores proteicos de UCH-L1 fueron normalizados con los de la β -actina. Los valores encontrados son estadísticamente significativos con * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ comparando con las muestras control (ANOVA con el test post-hoc LSD).

Figura 3: Estabilidad post-mortem de los niveles proteicos de UCH-L1 (dos bandas de 25 kDa aproximadamente) detectados por Western blot en homogeneizados totales de córtex frontal de una muestra individual (con 3 h de post-mortem). Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido directamente (0 h) o dejadas a temperatura ambiente durante 3, 6 o 22 h y entonces congeladas en nitrógeno líquido. La imagen no muestra una degradación aparente de UCH-L1 hasta las 22 h.

Figura 4: Niveles proteicos de UCH-L1 detectados por Western blot en suero de individuos control. La imagen muestra una banda específica correspondiente con el peso molecular aparente de UCH-L1.

Figura 5: Niveles proteicos de las subunidades del proteosoma en el córtex frontal de controles (C, n=6), Enfermedad de Parkinson (PD, n=6), Enfermedad de cuerpos de Lewy difusa, Demencia con cuerpos de Lewy, forma pura (DLBp, n=7) y forma común (DLBc, n=6): subunidades β del complejo 20S, 20SX y 20SY, complejo 19S y el activador 11S α . La β -actina es detectada para controlar la carga proteica en el gel. La imagen es representativa de todas las muestras indicadas en la Tabla I. Análisis densitométrico de los niveles proteicos de las subunidades del proteosoma (promedio $\pm$ SEM) usando el programa TotalLab v2.01. Los valores proteicos de UCH-L1 fueron normalizados con los de la β -actina. No se detectan diferencias estadísticamente significativas entre los casos control y patológicos.

Figura 6: Valores de temperatura de hibridación y de hibridación cruzada de oligonucleótidos diseñados específicamente para amplificar el alelo específico 193M de UCH-L1 comparado con los valores de los oligos que son complementarios del alelo normal o salvaje. Tm: temperatura de hibridación del oligo específico para gen UCH-L1 193M con su oligo complementario. Tm cross: temperatura de hibridación del oligo específico para gen UCH-L1 193M con el oligo complementario para el del gen UCH-L1 salvaje. Delta Tm: Tm-Tm cross.

Descripción de una realización preferente

A continuación se describe una realización preferente, aunque no limitativa, de la invención.

En la siguiente tabla se resumen los casos estudiados con los datos neuropatológicos de la presente serie: Enfermedad de Parkinson (PD), Demencia con cuerpos de Lewy en forma pura (DLBp) y en forma común (DLBc), y controles M: hombre, F: mujer. NFT: ovillos neurofibrilares (neurofibrillary tangle). Estadios Braak indica los cambios de enfermedad de Alzheimer (AD) asociados con DDLB descritos por (Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease related pathology. In: Cerebral cortex, vol 14, Neurodegenerative and age-related changes in structure and function of cerebral cortex (Peters A, Morrison JH, eds), pp 475-512. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers).

ES 2 333 660 T3

	Caso	Enfermedad	Género	Edad (Años)	Post-mortem (horas)	Estadio Braak βA4 amiloide NFT
5						
10	1	Control	M	63	17	0 0
	2	Control	M	70	13	0 0
	3	Control	M	79	7	0 II
15	4	Control	F	65	4	0 I
	5	Control	F	80	21	0 I
20	6	Control	F	82	11	A III
	7	PD	M	66	5	0 I
	8	PD	M	81	5	A II
25	9	PD	M	88	2	0 II
	10	PD	M	70	19	0 0
30	11	PD	F	60	4	A 0
	12	PD	F	70	4	0 0
35	13	DLBp	M	60	8	A I
	14	DLBp	M	68	12	B 0
	15	DLBp	M	71	6	B 0
40	16	DLBp	M	81	16	A I
	17	DLBp	M	85	7	B II
45	18	DLBp	F	70	8	0 0
	19	DLBp	F	77	5	B 0
50	20	DLBc	M	78	6	C V
	21	DLBc	M	78	7	C V
	22	DLBc	F	71	5	C V
55	23	DLBc	F	78	7	C VI
	24	DLBc	F	78	13	C IV
60	25	DLBc	F	91	5	C V

Con el correspondiente permiso ético de los pacientes se obtuvieron las muestras de ARN y de proteína de las muestras, como se describe a continuación.

Obtención de ARN de las muestras de área 8 cortical de los diferentes pacientes y controles. La obtención del ARNm se realizó en dos pasos. Se obtuvo el ARN total utilizando el reactivo TRizol (Life Technologies) y a continuación se obtuvo ARNm sin ARN de transferencia ni los ARN ribosomales 5S y 5.8S utilizando el kit RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen). El tejido cerebral humano congelado se homogenizó directamente en 1 ml del reactivo TRizol por 100 mg de tejido, y el ARN total se extrajo siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Este ARN total purificado se resuspendió en 100 μ l de agua libre de ARNsas, y la purificación del ARNm se obtuvo siguiendo las especificaciones indicadas en el RNeasy Protect Mini Kit con modificaciones menores; el tratamiento con DNasa I no se realizó ya que el ADN genómico fue eliminado durante la extracción con el reactivo TRizol. La concentración de cada muestra se obtuvo con las mediciones realizadas a una absorbancia de 260 nm, y la integridad del ARN se confirmó realizando una electroforesis con geles de agarosa-formaldehído.

DNA arrays Para los análisis transcriptómicos, las muestras de ARN se analizaron adicionalmente empleando el Agilent 2100 BioAnalyzer que calcula el tamaño de fragmentos y la concentración de la muestra así como el ratio entre los picos de los ARN 16S y 28S. Todas las muestras se marcaron mediante el Kit MessageAmp ARN de Ambion, la primera cadena de la síntesis de cDNA se cebó utilizando cebadores oligodT. Las muestras de aARN marcadas se analizaron en oligo DNA-chips representando 627 genes de específico interés, cada uno de ellos representado por dos veces cinco oligos dispuestos al azar en la superficie del DNA-chip. Los oligos se sintetizaron utilizando un instrumento Geniom I benchtop DNACHIP synthesis de la firma *FEBIT* una plataforma de microarray que integra todas las funciones en un unico instrumento (Baum M, Bielau S, Rittner N, Schmid K, Eggelbusch K, Dahms M, Schlauersbach A, Tahedl H, Beier M, Guimil R, Scheffler M, Hermann C, Funk JM, Wixmerten A, Rebscher H, Honig M, Andreae C, Buchner D, Moschel E, Glathe A, Jager E, Thom M, Greil A, Bestvater F, Obermeier F, Burgmaier J, Thome K, Weichert S, Hein S, Binnewies T, Foitzik V, Muller M, Stahler CF, Stahler PF. Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e151). Los datos crudos se normalizaron siguiendo el método no-lineal de Lowess (Workman C, Jensen LJ, Jarmer H, Berk R, Gautier L, Nielser HB, Saxild HH, Nielsen C, Brunak S, Knudsen S. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol* 2002;3:9).

En estos experimentos se estableció un límite de exclusión (cut-off) de 0.75 veces el nivel de expresión (*fold change*) para genes reprimidos un de 1.5 para genes sobreexpresados en DBL respecto a controles. Obtuvimos 1 gen sobreexpresado y 16 reprimidos, de ellos varios estaban implicados en la ruta de degradación UPS y de forma relevante el UCHL1. Para confirmar esta variación se procedió a utilizar técnicas complementarias.

Síntesis del cDNA y PCR Taqman Por cada 10 μ l de reacción de transcripción reversa, 200 ng de ARN humano (en 3.85 μ l de agua) se mezclaron con 2.5 μ M del cebador oligodT, tampón 1x RT TaqMan, 5.5 mM MgCl₂, 500 μ M de cada dATP, dTTP, dCTP y dGTP, 0.08 U inhibidor de ARNsas y 0.31 U de la transcriptasa reversa MultiScribe (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron a 25°C durante 10 minutos para maximizar la unión cebador-molde de ARN, seguido por una temperatura de 48°C durante 30 minutos, y una incubación a 95°C durante 5 minutos para desactivar la transcriptasa reversa. Se realizaron reacciones paralelas en ausencia de la transcriptasa reversa MultiScribe para asegurar la ausencia de ADN genómico contaminante. La sonda TaqMan (Applied Biosystems) se anilla a una de las cadenas del molde de ADN entre los cebadores directo e inverso de PCR. Contiene un fluoróforo, el cual es hidrolizado por la Taq polimerasa durante la fase exponencial, siendo la fluorescencia originada proporcional a la cantidad de producto acumulado generado en la reacción de PCR. Tanto los cebadores como las sondas específicas para los genes humanos UCH-L1 y β -actina fueron comprados como Assays-on-Demand a Applied Biosystems. La β -actina humana fue utilizada como control endógeno.

Los ensayos de PCR TaqMan para el UCH-L1 y el control endógeno β -actina fueron realizados por triplicado sobre muestras de cDNA en placas ópticas de 96 pocillos utilizando el termociclador ABI Prism 7700 Sequence Detection system (PE Applied Biosystems). La placa se tapó con tiras ópticas (Applied Biosystems). Por cada 20 μ l de reacción TaqMan, 9 μ l de cDNA (diluído 1/50, lo que corresponde aproximadamente a cDNA obtenido a partir de 4 ng de ARN) fue mezclado con 1 μ l de sonda TaqMan 20X y 10 μ l de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ensayos paralelos fueron realizados para cada muestra con los cebadores y la sonda de la β -actina para normalizar. La reacción se realizó siguiendo los parámetros que a continuación se indican: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto. La curva estándar para UCHL-1 y la β -actina se prepararon utilizando diluciones seriadas de ARN convertido a cDNA de cerebro humano control. Por último, todos los datos de la PCR TaqMan fueron capturados con el programa Sequence Detector Software (SDS version 1.9; Applied Biosystems).

Electroforesis y Western blotting. Para comprobar que los niveles de proteína de UCH-L1 se encontraban disminuidos, muestras de córtex frontal congelado (100 mg) se homogeneizaron directamente en 1 ml de tampón de lisis (20 mM Hepes, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DDT, 2 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinina, leupeptina y pepstatina) y posteriormente se sonicó. Los lisados fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y la concentración proteica se determinó con el método de BCA (Pierce). 50 μ g de proteína total fue hervida a 95°C durante 3 minutos y cargada en geles de SDS-poliacrilamida con tampón Tris-glicina. Las proteínas fueron separadas en el gel utilizando el sistema mini-protean (Bio-Rad) y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) con una cámara de transferencia Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) durante 45 minutos a 40 mA. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con Tween 20 TBS (TBST) conteniendo un 5% de leche desnatada durante 30 minutos. A continuación, fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente preparado en tampón TBST conteniendo un 3% de BSA. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-

ES 2 333 660 T3

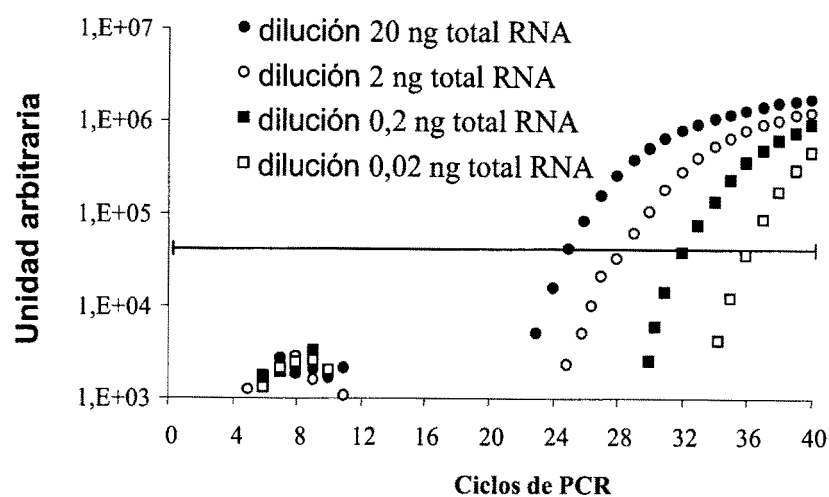
UCH-L1 (AB5937, Chemicon), anti-UCH-L1 (MCA-2084, Serotec), anti- β -actina (clone AC-74, Sigma), antiproteosoma 19S 1 β (PA1-973, Affinity BioReagents), anti-activador del proteosoma 11S α (PA1-960, Affinity BioReagents), anti-proteosoma 20SX (PA1-977, Affinity BioReagents) and anti-proteosoma 20SY (PA1-978, Affinity BioReagents). Todos los anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1:500. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas tres veces con el tampón TBST durante 5 minutos a temperatura ambiente, y entonces se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, IgG marcada con peroxidasa (Dako) a una dilución 1:1,000 (1:5,000 para la β -actina) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavaron cuatro veces durante 5 minutos cada lavado, con el tampón TBST a temperatura ambiente y reveladas con el kit quimioluminiscente ECL Western blotting system (Amersham/Pharmacia) seguido de la superposición de las membranas con una película autoradiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham). La cuantificación de los niveles de UCH-L1 se puede realizar en tejido periférico como suero o líquido cefalorraquídeo. Tal como se muestra en la figura 4 se pueden detectar los niveles endógenos de UCHL1 en estos fluidos biológicos.

Análisis cuantitativo de los datos. La cuantificación densitométrica de las bandas del Western Blot se realizó con el programa TotalLab v2.01. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Statgraphics Plus v5.

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico *in vitro* para la demencia de cuerpos de Lewy (DLB) en pacientes con sospecha clínica de inicio de demencia, **caracterizado** porque comprende analizar una muestra obtenida de un paciente para determinar el nivel de expresión del gen Ubiquitina C-terminal hidrolasa L-1 (UCHL-1), donde los niveles de expresión reducidos de UCH-L1 en comparación con controles es diagnóstico de DLB.
2. El método de diagnóstico *in vitro* según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra a analizar es ARN o proteína.
3. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque la muestra analizada y cuantificada es la proteína codificada por el gen UCH-L1.
4. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la muestra es aislada de células de tejido nervioso obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción.
5. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la muestra es aislada de células neuroendocrinas periféricas obtenidas por biopsia o cualquier otro método de extracción.
6. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la muestra es aislada a partir de fluidos biológicos como líquido cefalorraquídeo, suero u orina.
7. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque se realiza una detección mediante una amplificación por PCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de cDNA que permita una estimación cuantitativa de los niveles de transcripto de UCH-L1.
8. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicación 1 a 6, **caracterizado** porque se lleva a cabo una detección por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo.
9. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicación 1 a 6, **caracterizado** porque se lleva a cabo una detección por biochips de DNA realizados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.
10. El método de diagnóstico *in vitro* según cualquiera de las reivindicación 1 a 6, **caracterizado** porque se lleva a cabo una detección por análisis de cantidad de proteína presente realizado mediante Western-blot, análisis mediante "protein-chip" utilizando anticuerpos específicos contra UCH-L1 o mediante perfiles proteicos realizados por espectrometría de masas o por cualquier otro mecanismo que permita una estimación cuantitativa de los niveles de proteína UCH-L1.
11. Vector de expresión que comprende un gen que codifica la forma S18Y de UCH-L1 para el uso en detener o revertir la progresión de demencia de cuerpos de Lewy que producen un incremento de los niveles de la enzima UCH-L1.
12. Método de análisis de compuestos para identificar agentes terapéuticos basados en su aptitud para incrementar los niveles de UCH-L1 para detener o revertir la progresión de demencia de cuerpos de Lewy.
13. El método de la reivindicación 12, donde los compuestos son promotores específicos de la transcripción del gen de UCH-L1.

A



B

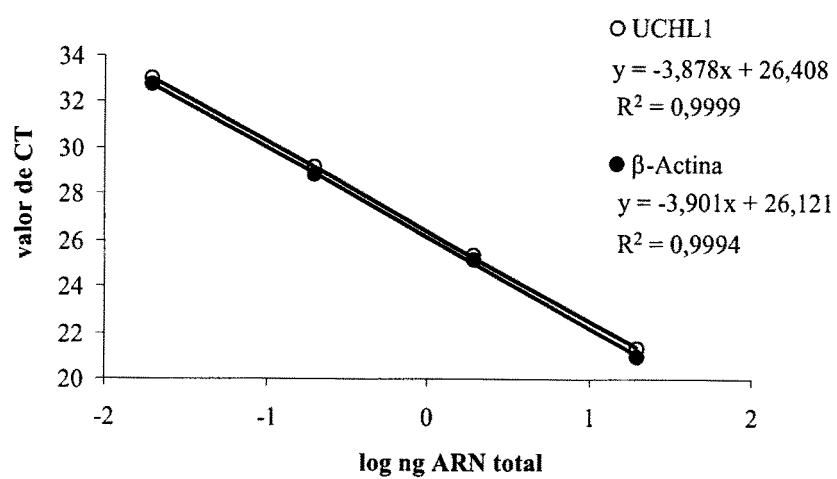
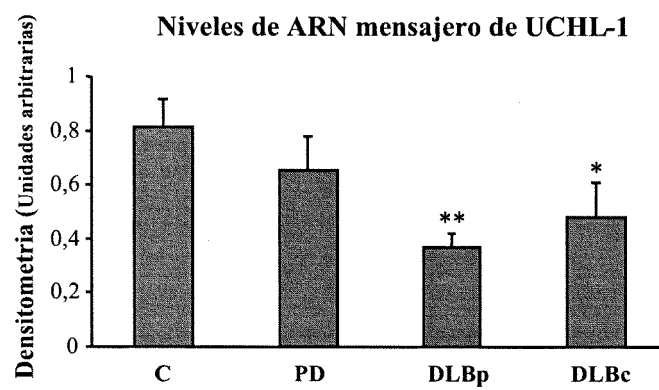
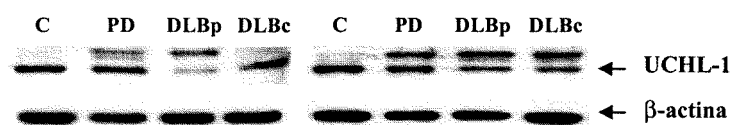


Figura 1

A



B



C

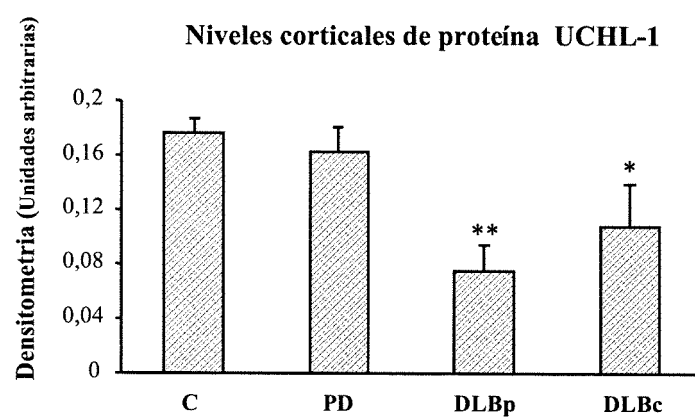


Figura 2

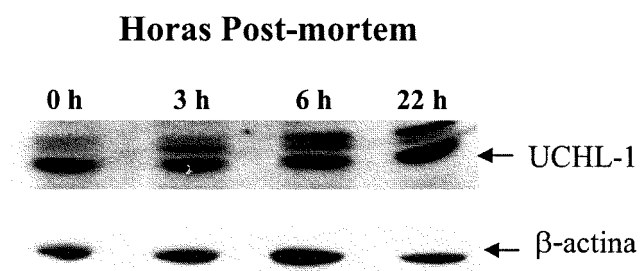


Figura 3

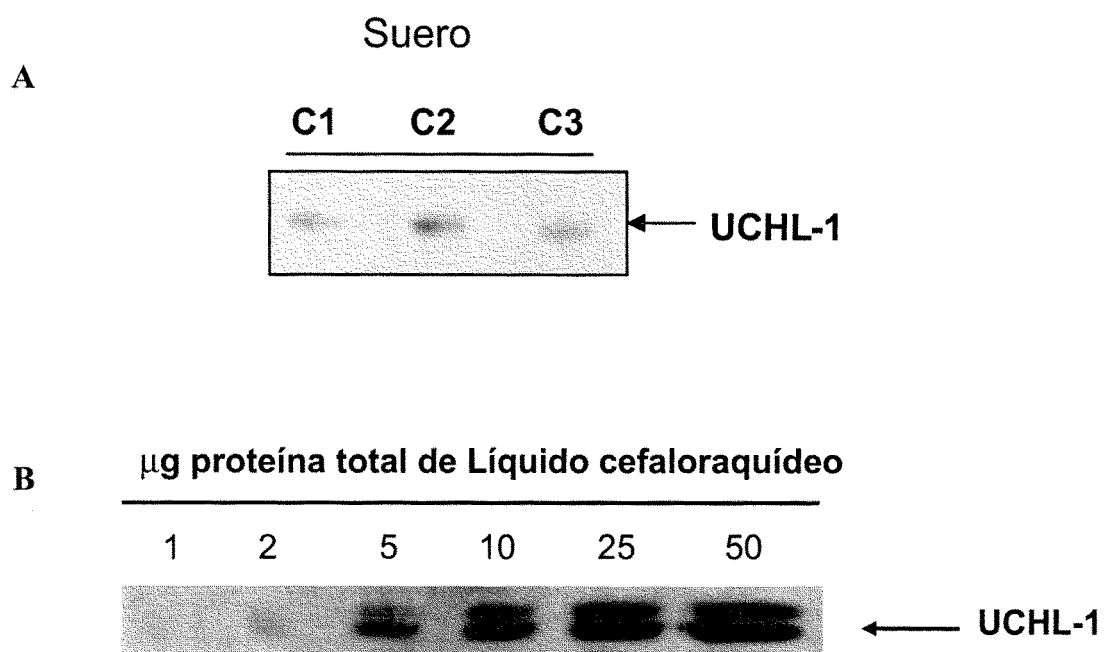


Figura 4