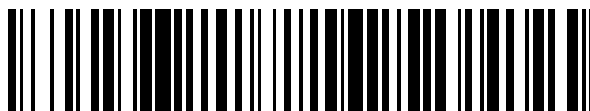


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 144**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2018** **PCT/IB2018/057261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2019** **WO19058303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2018** **E 18789217 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021** **EP 3685167**

54 Título: **Método para el diagnóstico y el pronóstico de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias**

30 Prioridad:

21.09.2017 IT 201700105483

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

07.04.2022

73 Titular/es:

BRAINDTECH S.P.A. (100.0%)
Via Ludovico Ariosto 21
20091 Bresso (Milano), IT

72 Inventor/es:

CHIERCHIA, ARMANDO y
BIANCO, FABIO

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 905 144 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 para el diagnóstico y el pronóstico de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias

- 5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y pronóstico precoces de un estado inflamatorio del cerebro, causado por enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, y/o del envejecimiento. Dicho método se basa en la evaluación cualitativa-cuantitativa de microvesículas de microglía en el plasma de un sujeto.

10 **Técnica anterior**

La identificación y validación de biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) y de otras formas de demencia y enfermedades relacionadas con la neuroinflamación y/o la neurodegeneración y el envejecimiento, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, el dolor neuropático, son cada vez más importantes.

15 Hasta la fecha, la medida cuantitativa a través del ensayo ELISA de β -amiloide (1-42), tau total y fosfo-tau-181 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es el método más avanzado y aceptado para diagnosticar la probabilidad de aparición de EA.

20 En el LCR, se ha demostrado un aumento en las microvesículas de microglía, correlacionado con la neuroinflamación y con EA (Agosta F *et al.*, *Myeloid microvesicles in cerebrospinal fluid are associated with myelin damage and neuronal loss in mild cognitive impairment and Alzheimer disease*. Ann Neurol. 2014 76(6):813-25).

25 Recientemente, se ha identificado un marcador que puede identificar selectivamente la microglía, discriminándola de otras células en el sistema mieloide. Dicho marcador es la proteína transmembránica 119 (Tmem119) (Bennett ML *et al.*, *New tools for studying microglia in the mouse and human CNS*. Proc Natl Acad Sci USA 2016 113(12):E1738-46). Bennett *et al.* describen anticuerpos monoclonales capaces de reconocer los dominios intracelulares y extracelulares de Tmem119, permitiendo una tinción inmunológica de la microglía en secciones histológicas del cerebro.

30 La identificación de nuevos biomarcadores, cuya medida sea reproducible y preferentemente posible en muestras de sangre, sigue siendo un gran desafío.

35 **Descripción de la invención**

Los autores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que las microvesículas de microglía están presentes en las muestras de sangre de pacientes afectados por enfermedades neuroinflamatorias, neurodegenerativas, y/o del envejecimiento, tales como EA y demencia frontotemporal (DFT), pero no en individuos sanos.

40 Por tanto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico precoz de un estado inflamatorio del cerebro, provocado por enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, inflamatorias, y/o del envejecimiento, en el que dicho método comprende la medida cualitativa-cuantitativa de microvesículas de microglía en muestras de plasma.

45 Dicho método comprende:

- fraccionamiento de una muestra de plasma con aislamiento de la fracción de microvesículas, en el que dicho fraccionamiento se produce centrifugando dicha muestra de plasma a alrededor de 14000 g durante un tiempo de entre 10 segundos y 40 minutos, preferentemente durante alrededor de 30 minutos, o durante 20 minutos;
- análisis de dicha fracción de microvesículas para la identificación de microvesículas de microglía;

55 en el que la presencia en dicha muestra de dichas microvesículas de microglía es indicativa de una enfermedad neuroinflamatoria, neurodegenerativa, y/o neurológica y/o del envejecimiento.

60 Dicha identificación de microvesículas de microglía se lleva a cabo mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. En una forma de realización preferida, dicho método comprende la medida en la fracción de microvesículas de microglía, aislada de dicha muestra de plasma, de uno o más marcadores de microvesículas de microglía específicos. En una forma de realización preferida, dicho por lo menos un marcador es Tmem119.

La ventaja asociada con Tmem119 está relacionada con el hecho de que sorprendentemente se ha observado aquí una estabilidad prolongada del mismo en el plasma.

En una forma de realización, dicho uno o más marcadores se miden mediante métodos inmunológicos. En una forma de realización adicional, la medida se realiza mediante análisis molecular.

El método según la presente invención ha resultado sorprendentemente ventajoso en el diagnóstico precoz de enfermedades neurodegenerativas y enfermedades neurológicas.

En una forma de realización, el análisis de dichas microvesículas de microglía es un análisis cuantitativo, en el que la concentración de dichas microvesículas de microglía en plasma se correlaciona con el grado de gravedad de la enfermedad neuroinflamatoria, neurodegenerativa, y/o neurológica.

Descripción de los dibujos

Figura 1: análisis molecular de Tmem119 en muestras de control de sangre y muestras de sangre de pacientes con EA o DFT.

Figura 2: análisis inmunológico de Tmem119 en muestras de control de sangre y muestras de sangre de pacientes con EA.

Figura 3: expresión de miARN1 en muestras procesadas según el método de la invención (A) o con un método comparativo (B).

Figura 4: imagen representativa del aislamiento de microvesículas de microglía por FACS.

Figura 5: secuencia de aminoácidos de TMEM119. La porción extracelular 29-96 está resaltada en gris.

Los ensayos moleculares e inmunológicos llevados a cabo en muestras de plasma de sujetos de control y sujetos que padecen enfermedades neuroinflamatorias y/o neurodegenerativas de los que se aislaron las microvesículas mediante métodos conocidos por los expertos en la materia muestran que la población microvesicular presente en el plasma comprende solo microvesículas de microglía en muestras afectadas por enfermedades neuroinflamatorias y/o neurodegenerativas. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han mostrado que las microvesículas de microglía no están presentes en el plasma de los sujetos control, en el que dichos sujetos de control son sujetos de edad homogénea en comparación con los sujetos patológicos analizados, teniendo todos los sujetos entre 72 y 80 años.

Las microvesículas de microglía también aumentan en plasma a medida que avanza la enfermedad, haciendo la medida de las mismas un método opcional para la monitorización de dichas enfermedades.

La disponibilidad de Tmem119 como un marcador de microvesículas de microglía específico y estable hace al método de diagnóstico y pronóstico según la presente invención un método opcional para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades neuroinflamatorias y/o neurodegenerativas y/o neurológicas.

En una forma de realización preferida, las microvesículas de microglía son aisladas centrifugando una muestra de plasma a alrededor de 14000 g durante un tiempo que oscila de 10 segundos a 40 minutos, preferentemente 20 minutos, o 2 minutos.

Alternativamente, dichas microvesículas se aíslan mediante clasificación FACS, o mediante ensayo de inmunoafinidad con perlas, o mediante cromatografía de exclusión.

Ejemplo 1: Identificación por análisis molecular de Tmem119 en muestras de plasma.

Se recogieron 500 µl de plasma de sujetos clasificados como sujetos de control, sujetos que padecían EA, sujetos que padecían DFT. Los sujetos se seleccionaron de edades homogéneas de entre 72 y 80 años. Las microvesículas se aislaron mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Específicamente, las microvesículas se aislaron de la siguiente manera:

1. Centrifugación del plasma a 300 g durante 5 minutos a +4°C;
2. Transferencia del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml;
3. Centrifugación del sobrenadante a 14000 g durante 30 minutos a +4°C, con la consiguiente precipitación de las microvesículas;
4. Transferencia del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml;
5. Extracción de ARN total del pelete obtenido mediante la centrifugación mencionada en la etapa 4.

El ARN total se extrajo usando el kit de aislamiento de ARN miRCURY (CELL & PLANT # 588711, Exiqon), usando el siguiente procedimiento: 350 µl de amortiguador de lisis, que comprende β-mercaptoetanol 10 µl/ml, se añadieron al precipitado, que entonces se sometió a vórtice durante 10 s. Se añadieron 200 µl de etanol puro al lisado resultante, y se sometió a vórtice durante 10 s. El lisado se cargó en una columna, que entonces se centrifugó a 3500 g durante 1 min. Se eliminó el eluato, y se reensambló la columna, repitiéndose la etapa de centrifugación hasta que el lisado se eluyó por completo.

Para la eliminación del ADN, se mezclaron 35 µl de amortiguador de digestión de ADN y 5 µl de ADNasa I (Zymo Research DNase I # ZYE1010), y se añadieron directamente a la matriz de la columna, y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después se aplicaron 400 µl de disolución de lavado, y se centrifugó a 14000 g durante 1 min. Después de eliminar el eluato, se volvió a montar la columna, y se aplicaron 400 µl de disolución de lavado y se centrifugó a 14000 g durante 1 min. La operación se repitió centrifugando a 14000 g durante 2 min para secar completamente la resina. El eluato se eliminó, y la columna se colocó en un nuevo tubo de elución de 1.7 ml. Después, se añadieron 5 µl de amortiguador de elución, y la columna se centrifugó a 200 g durante 2 min, y después a 14000 g durante 1 min.

La concentración de ARN total se evaluó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

La pureza, la relación A260/280 y la relación A260/230, y la concentración del ARN aislado se midieron usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Se retrotranscribieron 100 ng de extracto de ARN total con Superscript IV VILO Master MIX with ezDNase (#11766050, Invitrogen), según el protocolo del fabricante. La qRT-PCR se realizó con 20 ng de ADNc, con TaqMan Gene Expression Master Mix (#1611275, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), y el ensayo de expresión génica TaqMan para TMEM119 (Hs01938722_u1, 174 pb Thermo Fisher Scientific) y GAPDH (Hs02758991_g1, 93 pb; Thermo Fisher Scientific). Todas las muestras se analizaron por duplicado en un sistema de PCR ABI PRISM 7500 en tiempo real.

Los resultados, que se muestran en la figura 1, muestran claramente la expresión de TMEM119 en las muestras obtenidas de sujetos con EA y de sujetos con DFT. No se detectó señal en los sujetos de control.

Ejemplo 2: Análisis de Tmem119 con inmunofluorescencia

Se recogieron 500 µl de plasma de sujetos clasificados como sujetos de control y sujetos que padecían EA. El pelete que contenía las microvesículas se obtuvo como se describe en el ejemplo 1. El pelete se resuspendió en la disolución de Krebs Ringer, que entonces se cargó en un microcanal en el que las vesículas podían fluir libremente hasta alcanzar las perlas recubiertas con Anexina V. Las microvesículas exponen fosfatidilserina hacia la capa exterior de la membrana plasmática y se unen a Anexina V, por lo que son capturadas por las perlas de Anexina V. A continuación, las perlas se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10-15 min, después se lavaron con disolución salina amortiguada con fosfato que contenía Triton-X-100 al 0.1% (PBST).

Posteriormente, las microvesículas se marcaron con el anticuerpo de TMEM119 (sc244341, Santa Cruz), que se muestra con un anticuerpo fluorescente secundario (Molecular Probes). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio Motic AE31E invertido.

Los datos que se muestran en el gráfico de la figura 2 son indicativos de los recuentos realizados en 6 campos para cada una de las muestras analizadas. Como puede verse en el gráfico, la tinción con Tmem119 está presente en las muestras de EA pero no en las muestras de control.

Ejemplo 3: Procesamiento de muestras para el aislamiento de microvesículas de microglía

El plasma se recogió de 7 sujetos afectados por EA, y después se dividió en dos alícuotas.

Una primera alícuota, de 500 µl, se procesó según el protocolo detallado en el ejemplo 1 para el aislamiento de microvesículas.

Una segunda alícuota, de 500 µl, se procesó según el protocolo descrito en el documento WO2015/061634. De forma breve, se añadieron 100 µl de tromboplastina D (Fisher Scientific, Inc., Hanover Park, IL) a los 500 µl de plasma, y la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 30'. A continuación, la muestra se sometió a centrifugación a 1,500 g durante 5 minutos, y se recogió el sobrenadante. Después de mezclarlo con la disolución de precipitación de exosomas (ExoQuick, System Biosciences, Inc., Mountainview, CA) e incubar durante 1 h a 4°C, la suspensión se sometió a una centrifugación adicional a 1500 g durante 30'. El pelete así obtenido se utilizó para el siguiente análisis.

Las muestras, obtenidas con el protocolo según la invención o con el protocolo comparativo, se evaluaron entonces para determinar la presencia de un miARN específico; en este ejemplo se da la evaluación cuantitativa del miARN

hsa-miR-4662a-5p (miRNA1). Los datos obtenidos se muestran en la figura 3, y muestran la correlación de los niveles de expresión de miARN1 con respecto a la edad de aparición de la enfermedad en 7 muestras de plasma examinadas de los 7 pacientes con EA. En el gráfico de la izquierda, que muestra los datos relativos al análisis del contenido de microvesículas de microglía obtenido por el protocolo según la invención, se puede apreciar una correlación indirecta entre los niveles de expresión de miARN1 y la edad de inicio de la enfermedad, con niveles de expresión que disminuyen a medida que aumenta la edad de aparición de la enfermedad. En el gráfico de la derecha, que muestra los datos relacionados con el análisis siguiendo el protocolo descrito en el documento WO2015/061634, no se observa ninguna correlación. Además, solo están presentes los datos de 4 pacientes, debido a que no todas las muestras aisladas por el procedimiento del documento WO2015/061634 mostraron una expresión de miARN1. Esto indica que el procedimiento según la presente invención, pero no el método según la técnica anterior citada, sorprendentemente logra aislar la fracción de interés del plasma.

Ejemplo 4: Identificación y recuento de microvesículas de microglía mediante FACS

La preparación y calibración del instrumento (CitoFlex Beckman Culter) para la identificación y recuento de microvesículas de microglía se realizó siguiendo los procedimientos del manual del instrumento; en particular, se preparó una mezcla de perlas fluorescentes para FACS con diferentes tamaños, 100, 160, 200, 240, 300, 500, 900 nm (la mezcla de "disolución de Gigamix").

Después de haber agitado adecuadamente las perlas Gigamix, se registró su paso para poder crear una curva de calibración con respecto al tamaño de las microvesículas de interés, estableciendo los parámetros de Ganancia y Umbral.

La muestra que contenía las microvesículas de microglía aisladas según el procedimiento del ejemplo 1 se tiñó con un colorante citoplásmico (CSFE 2 uM), y se cuantificó posteriormente mediante análisis FACS.

Los gráficos que se muestran en la figura 4 muestran la calibración con perlas (gráfico de la izquierda), y la muestra que contiene microvesículas de microglía (gráfico central) pero no exosomas (gráfico de la derecha), lo que demuestra la capacidad de discriminar y recolectar la muestra de microvesículas con respecto a los exosomas.

Ejemplo 5: Desarrollo de anticuerpo específico de TEM119, porción extracelular

La proteína TMEM119 es una proteína transmembránica. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 1) se muestra en la Figura 5. Para el aislamiento del anticuerpo, se utilizaron dos secuencias capaces de reconocer la porción extracelular de TMEM119. La primera secuencia (SEC ID n° 2) es VAGSGEAEAGSSASS, la segunda secuencia (SEC ID n° 3) es MGPQPITLGGPSPPTN.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BrainDTech

5 <120> Método para el diagnóstico y el pronóstico de patologías neurodegenerativas y neuroinflamatorias.

<130> E0116408

<160> 3

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 283

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Val Ser Ala Ala Ala Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu Leu Leu
1          5          10          15

Leu Gly Ser Val Pro Ala Thr Asp Ala Arg Ser Val Pro Leu Lys Ala
20          25          30

Thr Phe Leu Glu Asp Val Ala Gly Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser Ser
35          40          45

Ala Ser Ser Pro Ser Leu Pro Pro Pro Trp Thr Pro Ala Leu Ser Pro
50          55          60

Thr Ser Met Gly Pro Gln Pro Ile Thr Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro
65          70          75          80

Thr Asn Phe Leu Asp Gly Ile Val Asp Phe Phe Arg Gln Tyr Val Met
85          90          95

Leu Ile Ala Val Val Gly Ser Leu Ala Phe Leu Leu Met Phe Ile Val
100         105         110

Cys Ala Ala Val Ile Thr Arg Gln Lys Gln Lys Ala Ser Ala Tyr Tyr
115         120         125

Pro Ser Ser Phe Pro Lys Lys Lys Tyr Val Asp Gln Ser Asp Arg Ala
130         135         140

Gly Gly Pro Arg Ala Phe Ser Glu Val Pro Asp Arg Ala Pro Asp Ser
145         150         155         160

Arg Pro Glu Glu Ala Leu Asp Ser Ser Arg Gln Leu Gln Ala Asp Ile
165         170         175

```

ES 2 905 144 T3

Leu Ala Ala Thr Gln Asn Leu Lys Ser Pro Thr Arg Ala Ala Leu Gly
180 185 190

Gly Gly Asp Gly Ala Arg Met Val Glu Gly Arg Gly Ala Glu Glu Glu
195 200 205

Glu Lys Gly Ser Gln Glu Gly Asp Gln Glu Val Gln Gly His Gly Val
210 215 220

Pro Val Glu Thr Pro Glu Ala Gln Glu Glu Pro Cys Ser Gly Val Leu
225 230 235 240

Glu Gly Ala Val Val Ala Gly Glu Gly Gln Gly Glu Leu Glu Gly Ser
245 250 255

Leu Leu Leu Ala Gln Glu Ala Gln Gly Pro Val Gly Pro Pro Glu Ser
260 265 270

Pro Cys Ala Cys Ser Ser Val His Pro Ser Val
275 280

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Val Ala Gly Ser Gly Glu Ala Glu Gly Ser Ser Ala Ser Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Gly Pro Gln Pro Ile Thr Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Thr Asn
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico y/o el pronóstico de enfermedades neuroinflamatorias, neurológicas, y/o neurodegenerativas y del envejecimiento, en el que dicho método comprende:
- centrifugación de una muestra de plasma a alrededor de 14000 g durante un período comprendido entre 10 segundos y 40 minutos, con la consiguiente precipitación de la fracción de microvesículas;
 - aislamiento de dicha fracción de microvesículas y análisis de la misma para la identificación de microvesículas de microglía,
- 10 en el que la presencia en dicha muestra de plasma de microvesículas de microglía es indicativa de una enfermedad neuroinflamatoria, neurodegenerativa, y/o neurológica y/o del envejecimiento.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho análisis es de tipo cuantitativo, y una mayor concentración de dichas microvesículas de microglía en el plasma corresponde a un mayor grado de gravedad de dicha enfermedad neuroinflamatoria, neurodegenerativa, y/o neurológica.
- 20 3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho análisis comprende la medida en dicha fracción de microvesículas de por lo menos un marcador de microvesículas de microglía específico.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho por lo menos un marcador específico es Tmem119.
- 25 5. Método según la reivindicación 3 o 4, en el que dicho por lo menos un marcador es medido por métodos inmunológicos, o métodos moleculares.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enfermedad es la enfermedad de Alzheimer (EA).
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha enfermedad es la demencia frontotemporal (DFT).

Fig. 1

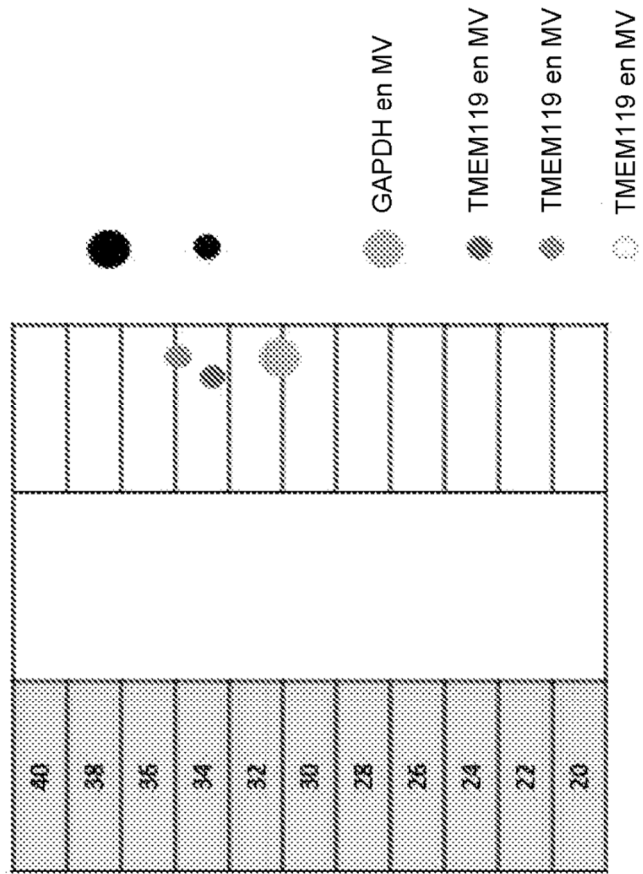


Fig. 2

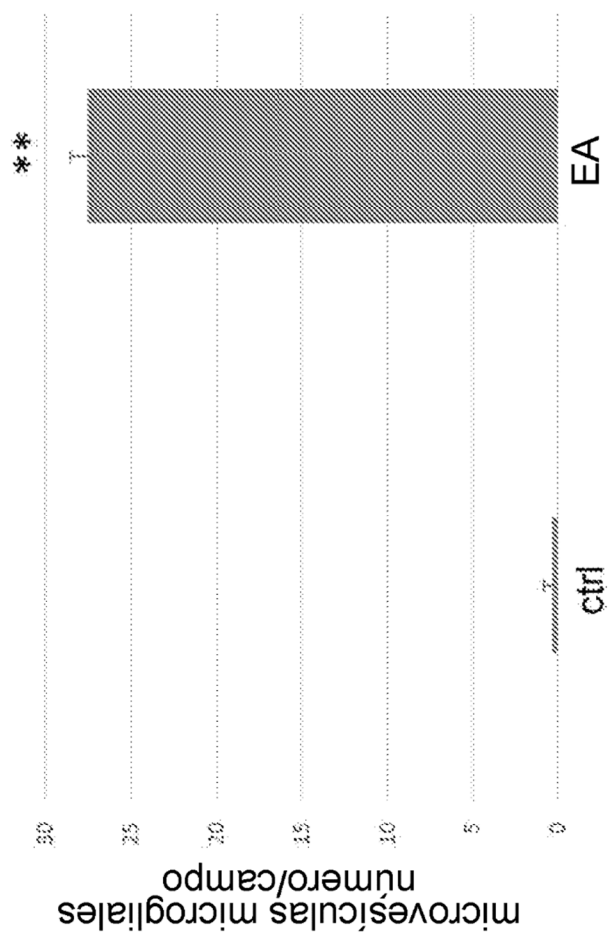
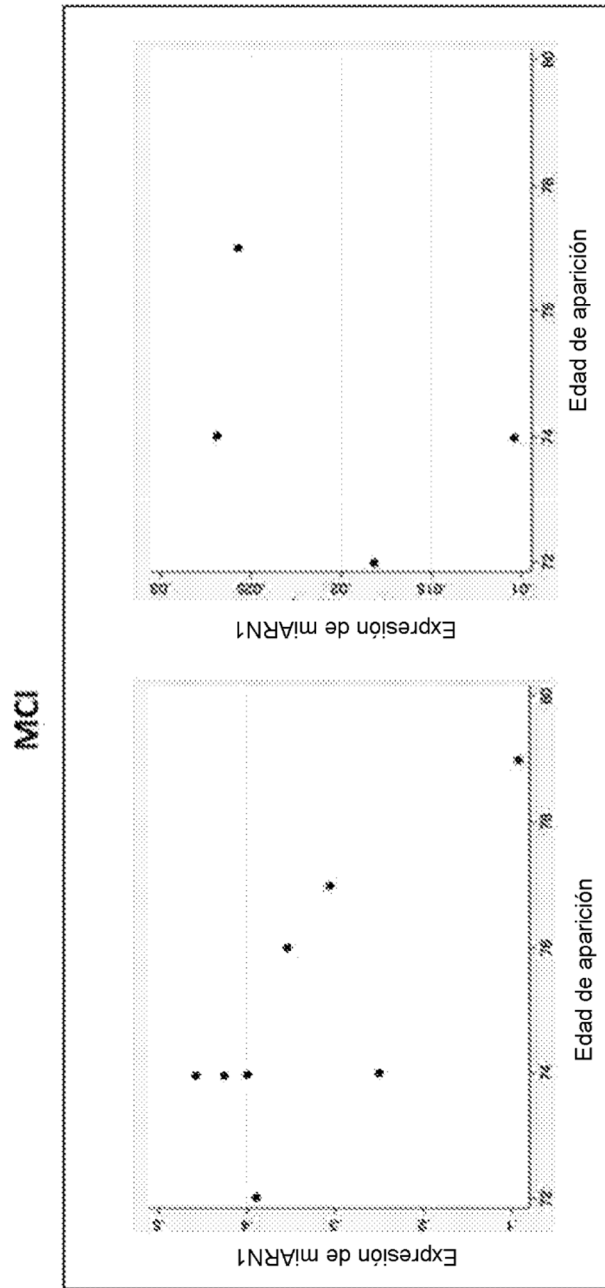
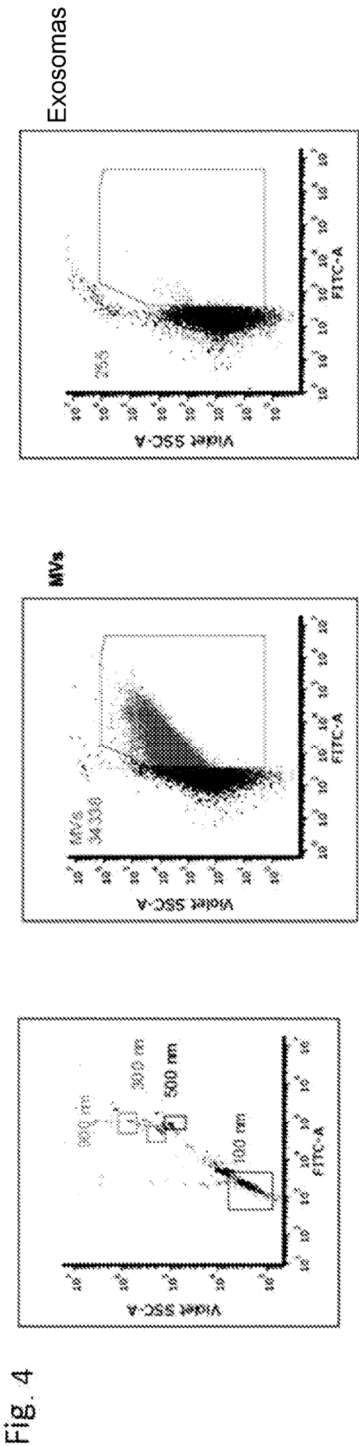


Fig. 3





10	20	30	40	50
MVSAAPSELE	ILLLLLGSV	PATARSVPL	KATFLEDVAG	SGEAEGSSAS
60	70	80	90	100
SPGLPPPTP	ALSETMGPQ	PITLGGPSP	TNFDGIVDF	FRQVYMLIAY
110	120	130	140	150
VGSLAFLLMF	IVCAAVITRQ	KOKASAYPS	SFPKKYVDQ	SDRAGGPRAF
160	170	180	190	200
SEVTRAPDS	RPEALDSR	QIQADILAT	QNLSEFTRAA	LGGDGARMV
210	220	230	240	250
EGRAEZEER	GSQEGDQVQ	GHGVVEIFE	AQEEPQSGVL	EGAVVAGEGQ
260	270	280		
GELEGSLLIA	QEAQGVGPP	ESPCACSVH	PSV	

Fig. 5