

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 998 492**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2021** **PCT/HU2021/000011**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2022** **WO22018468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2021** **E 21759376 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 4185874**

54 Título: **Un método de análisis de sangre para diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

22.07.2020 HU 2000240

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

20.02.2025

73 Titular/es:

PHARMACOIDEA KFT (100.00%)
Derkovits fasor 7-11
6726 Szeged, HU

72 Inventor/es:

HUDÁK, ANETT y
LETOHA, TAMÁS

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 998 492 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

Un método de análisis de sangre para diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico predictivo para detectar la enfermedad de Alzheimer, mediante la medición del nivel de sindecano-3 expresado por los monocitos circulantes en la sangre.

- 5 Los monocitos son tipos celulares importantes del sistema inmune innato que juegan papeles clave en la protección contra patógenos invasivos, limpiando células muertas y restos celulares por fagocitosis [Fiala et al. 2005 (J. Alzheimer's Dis. 7 (3): 255-262)]. Los monocitos también están involucrados en la patogénesis de muchas enfermedades. En la enfermedad de Alzheimer, que está asociada con una degeneración anormal del CNS, los monocitos infiltrados juegan un papel importante en la eliminación de microagregados de beta amiloide (A β) circulantes y placas de A β cerebrales. En enfermedades inflamatorias crónicas o autoinmunes, la frecuencia de monocitos en la sangre aumenta.

- 10 Los glóbulos blancos involucrados en la respuesta inflamatoria, tal como los monocitos, expresan varias moléculas de la superficie celular. Debido a sus cadenas laterales de heparán sulfato (HS) altamente diversas, los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), una de las familias más pobladas de proteínas de membrana de la superficie celular, juegan un papel importante como receptores en los procesos de señalización de muchas citocinas y factores de crecimiento [Williams y Fuki 1997 (Curr. Opin. Lipidol 8 (5), 253-262), Bishop, Schuksz et al. 2007 (Nature 446 (7139) 1030-1037), Couchman 2010 (Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 26, 89-114), Iozzo y Karamanos 2010 (FEBS J. 277 (19), 3863)]. En las células de los mamíferos se encuentran dos tipos de HSPG: los glicoproteínas expresados en el CNS que están anclados a la membrana a través del glicosilfosfatidilinositol y los sindecanos transmembrana ubicuos [Christianson y Belting 2014 (Matrix Biol. 35, 51-55)]. Se conocen cuatro isoformas de sindecanos: sindecano-1 expresado por células epiteliales y plasmáticas, sindecano-2 por células endoteliales y fibroblastos, sindecano-3 por neuronas y sindecano-4 expresado universalmente [Tkachenko, Rhodes et al. 2005 (Circ. Res. 96 (5), 488-500), Afratis, Nikitovic et al. 2017 (FEBS J. 284 (1), 27-41)].

- 25 El sindecano-3 (N-sindecano o sindecano neuronal) es una proteína transmembrana de 442 aminoácidos de longitud expresada principalmente por neuronas [Tkachenko, Rhodes et al. 2005 (Ther. Deliv. 4 (12), 1479-1481)]. El sindecano-3 tiene cuatro sitios de unión de glicosaminoglicanos conservados en el extremo N, junto con regiones únicas ricas en treonina y similares a mucina cerca de la membrana. Las cadenas de sulfato de heparán del sindecano-3 sirven como sitios de unión para varios factores de crecimiento, incluidos AgRP (proteína relacionada con Agouti), HB-GAM (molécula asociada al crecimiento que se une a la heparina), GDNF (factor de crecimiento derivado de la línea celular glial), NRTN (neurturina), artemina y NOTCH [Bespalov, Sidorova et al. 2011 (J Cell Biol. 192 (1): 153-169), Creemers, Pritchard et al. 2006 (Endocrinology. 147 (4): 1621-1631), Nolo, Kaksonen et al. 1995 (Neurosci Lett. 191 (1-2): 39-42), Pisconti, Cornelison et al. 2010 (J Cell Biol. 190 (3): 427-441), Reizes, Benoit et al. 2003 (Ann N Y Acad Sci. 994: 66-73)]. Sindecano-3 también desempeña un papel en la regulación de la memoria y el peso/metabolismo corporal [Kaksonen, Pavlov et al. 2002 (Mol. Cell. Neurosci. 21 (1), 158-172), Strader, Reizes y col. 2004 (J. Clin. Invest. 114 (9), 1354-1360), Reizes, Benoit et al. 2008 (Int. J. Biochem. Cell. Biol. 40 (1), 28-45)]. La expresión de sindecano-3, junto con sindecano-4, está elevada en los cerebros de pacientes con Alzheimer [Liu, Zhao et al. 2016 (Sci. Trans. Med. 8 (332), 332-344)].

- 40 Además de su papel en el CNS, se sabe poco sobre el papel del sindecano-3 en la periferia. Sin embargo, sabemos que el sindecano-3 desempeña un papel importante en las infecciones virales: el sindecano-3, como receptor del VIH-1, media la transmisión del VIH-1 a las células T [de Witte, Bobardt et al. 2007 (Nat. Acad. Sci. USA 10449, 19464-19469)]. También se sabe que el sindecano-3 se expresa en los monocitos circulantes [Wegrowski, Milard et al. 2006 (Clin Exp Immunol. Jun; 144 (3): 485-493)]. El sindecano-3 presente en los monocitos es un buen indicador de los procesos inflamatorios [Jackson 1997 (Biochem Soc Trans. 25 (1): 220-49)].

Nuestro objetivo fue investigar el sindecano-3 expresado en monocitos como un biomarcador pronóstico en enfermedades neurodegenerativas tal como el Alzheimer.

- 50 Nuestros experimentos examinaron los cambios en los niveles de sindecano-3 en monocitos circulantes en un modelo de ratón APPSWE-Tau de la enfermedad de Alzheimer. Los niveles de sindecano-3 de monocitos circulantes se examinaron en muestras de sangre de ratones APPSWE-Tau (Taconic Biosciences) y ratones sanos C57BL/6 con una edad mínima de 6 meses. El número de animales en los grupos de control sano y APPSWE-Tau fue de 10-10, con un número igual de machos (5-5 individuos) y hembras (5-5 individuos) en ambos grupos. La sangre de ratones anestesiados con Avertin se recogió con punción cardíaca. Después de la perfusión transcardinal con PBS helado (2 ml/min, 8 min), se extrajo el cerebro, se cortó por la mitad frontalmente y se congeló en hielo seco para exámenes microscópicos adicionales. Los monocitos derivados de la sangre se aislaron con el kit de aislamiento de monocitos de ratón EasySep™ (Stemcell Technologies, cat. no. 19861), mientras que las muestras de cerebro se tiñeron para detectar placas de la enfermedad de Alzheimer a fin de verificar la gravedad de la lesión cerebral en los animales. La evaluación de la expresión de

- sindecano-3 en la superficie celular y el contenido de sindecano-3 en los monocitos mostró que tanto la expresión de sindecano-3 en la superficie celular como el contenido de sindecano-3 en los monocitos aislados de ratones enfermos fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores que los de los controles sanos (figuras 1A-D). (La expresión de sindecano-3 en la superficie celular de los monocitos se midió con un citómetro de flujo AMNIS FlowSight usando el anticuerpo humano sindecano-3 marcado con APC [R&D Systems, catálogo n.º FAB3539A], mientras que el contenido de sindecano-3 de los lisados de monocitos completos se midió con un kit ELISA de sindecano-3 de ratón (PicoKine™, Boster Biological Technology, Pleasanton CA, EE. UU., cat. no. EK1556; la absorbancia se midió con un lector multimodo de imágenes celulares BioTek Cytation 3). Para cada medición de citometría de flujo, se examinó la expresión de 10,000 monocitos de sindecano-3. Después de la perfusión, los cerebros se aislaron, se cortaron frontalmente y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 18 h. Luego se cortaron secciones sagitales de 30 µm de grosor y las placas de Aβ se tiñeron con anticuerpo específico de Aβ (MOAB-2, NOVUS Biologicals, número de cat.: NBP2-13075) y anticuerpo secundario marcado con 488 (ThermoFischer Scientific, no. de cat. A-21141). El número y el tamaño de la deposición de placas de Aβ en las secciones cerebrales resultantes se evaluaron con un lector multimodo de imágenes celulares BioTek Cytation 3 (figuras 1E).
- Los niveles de sindecano-3 de los monocitos aislados de la sangre se correlacionaban con los grados de deposición de placa en los cerebros de ratones APPSWE-Tau: es decir, la deposición de placa Aβ en el sistema nervioso central se asociaba con una alta expresión de sindecano-3 por parte de los monocitos de la sangre (el valor del coeficiente de correlación de Pearson [r] entre la deposición de placa en el CNS y la expresión de sindecano-3 en los monocitos es 0.93 - véase la figura 2).
- La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el nivel de sindecano-3 en los monocitos circulantes en la enfermedad de Alzheimer aumenta significativamente, de modo que el nivel de sindecano-3 en los monocitos aislados de la sangre se correlaciona con la deposición de placa en el CNS.
- La presente invención se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, midiendo la expresión de sindecano-3 de monocitos aislados de la circulación sistémica con un anticuerpo o cualquier otro ligando específico para el núcleo proteico de 442 aminoácidos de sindecano-3 y se evalúa la desviación con respecto a los controles sanos.
- Los anticuerpos o ligandos específicos son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, a partir de la siguiente bibliografía Hudák, Kusz, Domonkos et al. 2019 (Sci Rep 9, 16543).
- La especificidad del método está asegurada por la unión específica del anticuerpo o ligando a cualquier parte del núcleo proteico de 442 aminoácidos de sindecano-3.
- El anticuerpo o ligando específico de sindecano-3 solo o unido a una superficie se une al sindecano-3 expresado en monocitos, por lo que puede utilizarse como método de diagnóstico en enfermedades neurodegenerativas.
- El anticuerpo o ligando específico de sindecano-3 puede ponerse en contacto con monocitos sanguíneos solo o junto con un agente fluorescente u otro agente de señalización óptica.
- Como valor de control, se midió el siguiente valor medio ($\pm$ SEM) con un lector multimodo de imágenes celulares BioTek Cytation 3: 54.70 pg ($\pm$ 12.96) de sindecano-3/mL, mientras que al medir la expresión de sindecano-3 de monocitos aislados de controles sanos con un citómetro de flujo de imágenes Amnis® FlowSight®, se obtuvo el siguiente valor medio de fluorescencia ($\pm$ SEM): 7546.71 $\pm$ 1329.47 unidad arbitraria (a.u.)/célula
- Los datos son solo informativos y dependen de las técnicas de medición, por lo que el alcance de la invención no se limita a los valores arbitrarios aquí dados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El método para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, caracterizado por medir la expresión de sindecano-3 de monocitos aislados de la circulación sistémica con un anticuerpo o cualquier otro ligando específico del núcleo proteico de 442 aminoácidos de sindecano-3 y evaluar la desviación respecto a los controles sanos.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado por, que el anticuerpo o ligando específico para cualquier porción del núcleo proteico de 442 aminoácidos de longitud de sindecano-3, está presente en forma soluble o unido a una superficie.

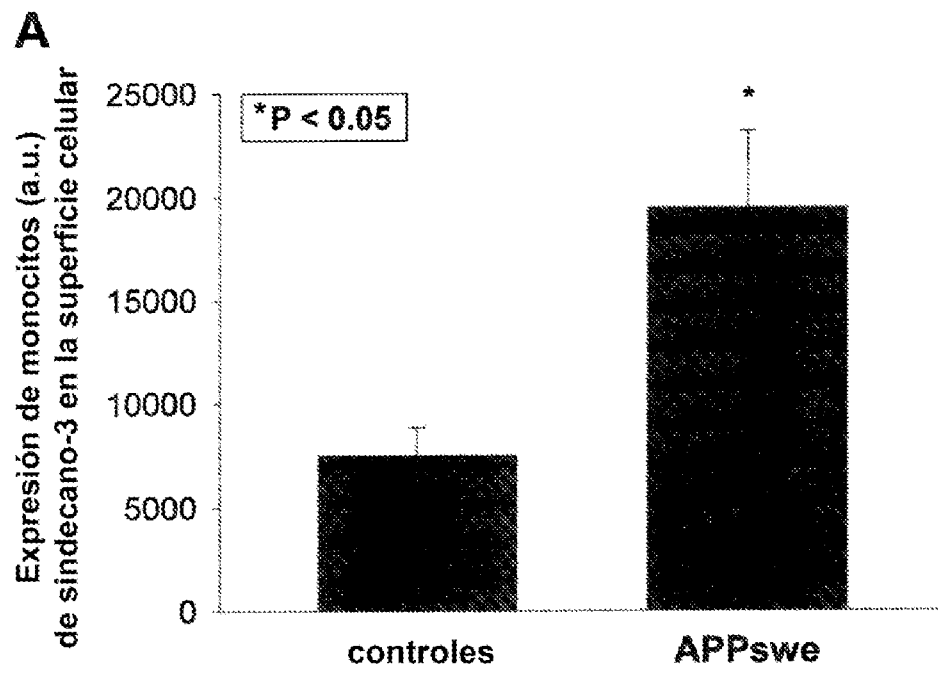


Figura 1A

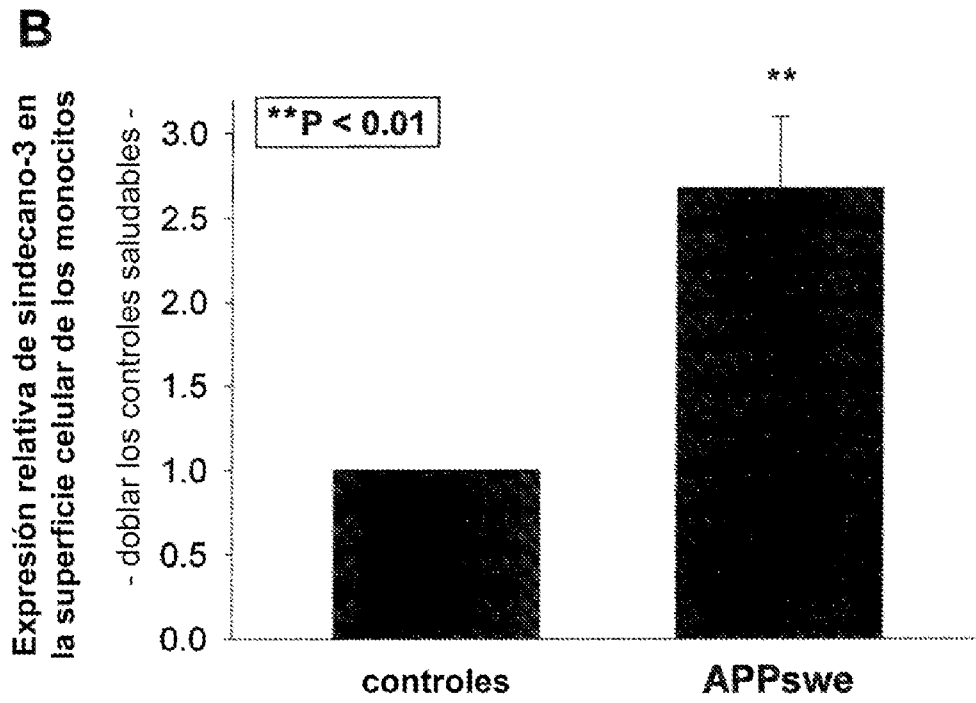


Figura 1B

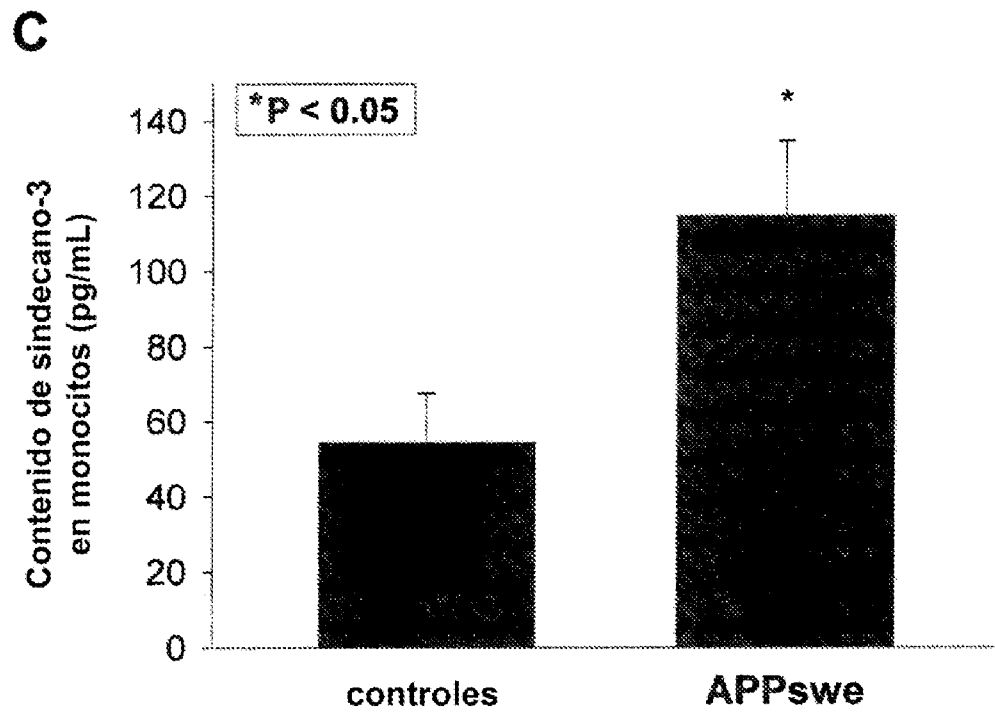


Figura 1C

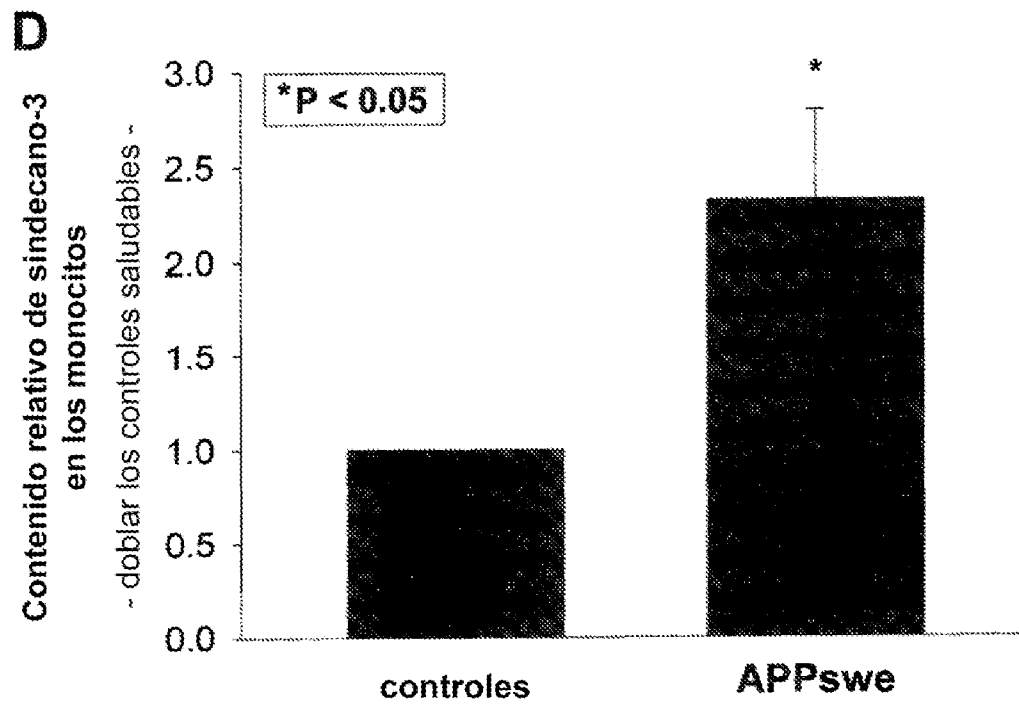


Figura 1D

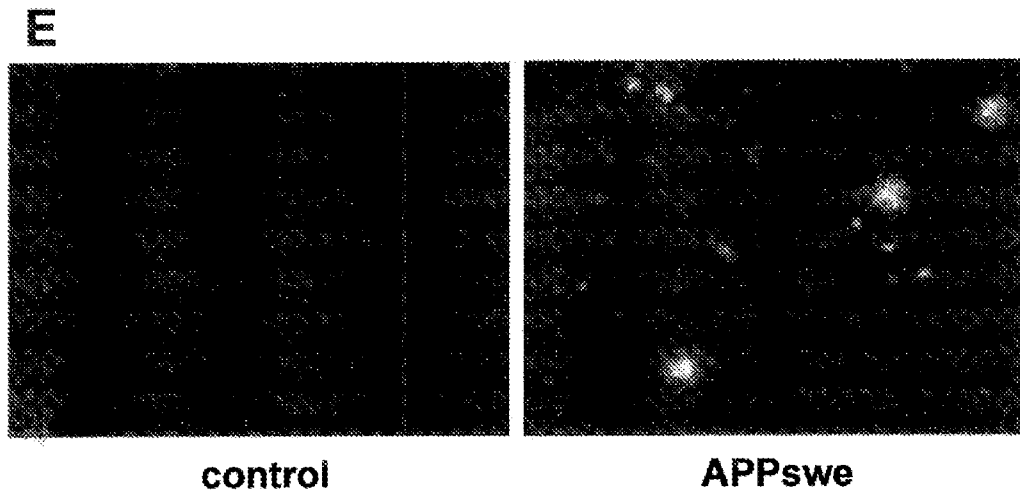


Figura 1E

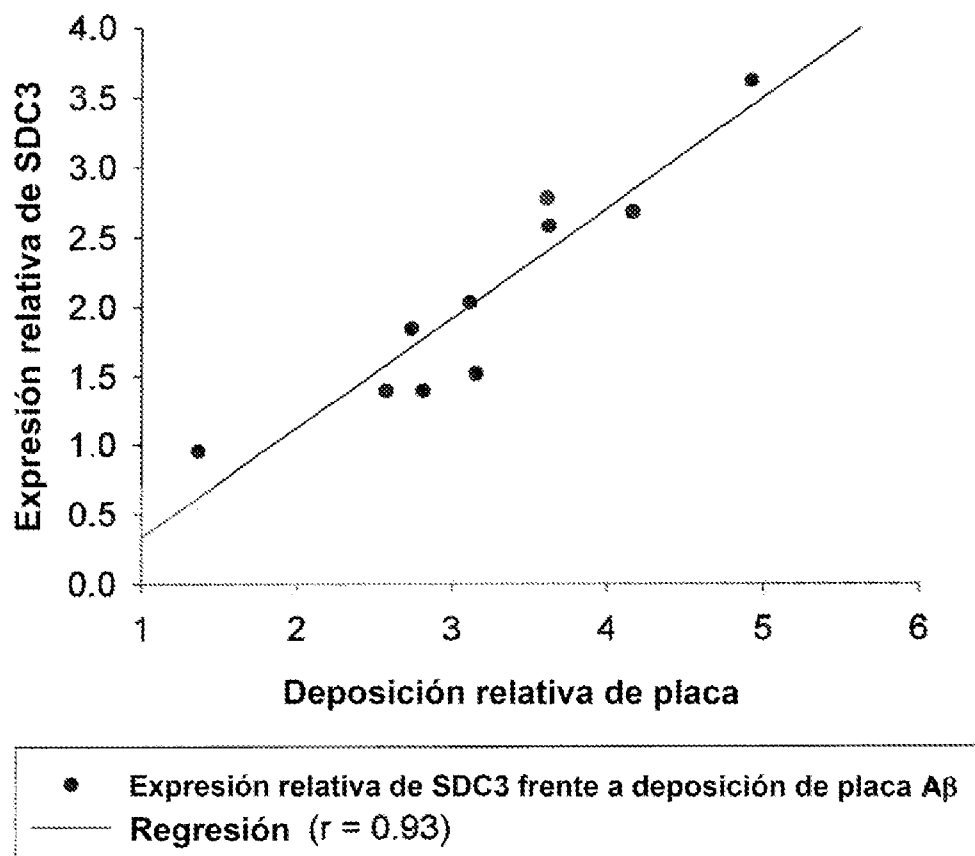


Figura 2