



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0916601-7 B1



(22) Data do Depósito: 31/07/2009

(45) Data de Concessão: 25/05/2021

(54) Título: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA), NEURODEGENERAÇÃO EM SÍNDROME DE DOWN (NSD) OU COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (MCI) EM UM INDIVÍDUO

(51) Int.Cl.: G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 31/07/2008 US 61/085,154.

(73) Titular(es): PROBIODRUG AG.

(72) Inventor(es): HANS-ULRICH DEMUTH; STEPHAN SCHILLING; MARTIN KLEINSCHMIDT; JENS-ULRICH RAHFELD; ASTRID KEHLEN; MONIQUE BORNACK.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009059951 de 31/07/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/012828 de 04/02/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/01/2011

(57) Resumo: MÉTODO E KIT DE DIAGNÓSTICO DE UMA DOENÇA NEURODEGENERATIVA, E USO DE UM ANTICORPO QUE SE LIGA A GLUTAMINIL CICLASE (QC) OU UMA ISOFORMA DA MESMA. A presente invenção refere-se a um método de predizer, diagnosticar e prognosticar uma doença neurodegenerativa, tais como doença de Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (MCI) e Neurodegeneração em Síndrome de Down (NSD) usando glutaminil ciclase (QC) como um indicador diagnóstico/prognóstico. O uso de anticorpos que se ligam a QC e kits para realização do método diagnóstico é também proporcionado.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE ALZHEIMER (DA), NEURODEGENERAÇÃO EM SÍNDROME DE DOWN (NSD) OU COMPROMETIMENTO COGNITIVO LEVE (MCI) EM UM INDIVÍDUO**".

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um método de predizer, diagnosticar e prognosticar uma doença neurodegenerativa, tal como doença de Alzheimer (DA), Comprometimento Cognitivo Leve (*Mild Cognitive Impairment* (MCI)) e Neurodegeneração em Síndrome de Down (NSD) utilizando glutaminyl ciclase (QC) como um indicador diagnóstico/prognóstico.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que causa demência. Os termos "Doença de Alzheimer) e "Doença do Alzheimer" são ambos utilizados no estado da técnica, esses termos sendo equivalentes e são usados intercambiavelmente aqui, e em outro lugar. O período de primeira detecção de DA para terminação pode variar de alguns anos a 15 anos, durante esse tempo o paciente progressivamente sofre perda de, tanto função mental quanto controle de funções corpóreas. Há variabilidade significativa no progresso da doença. Embora a maioria dos pacientes apresente uma progressão gradual, inexorável (perdendo em média 3 a 4 pontos no escore de estado minimal *Folstein* de 30 pontos, anualmente), aproximadamente, 30% de casos de DA apresentam uma fase de platô inicial estável prolongada que dura vários anos (Haxby J. V., e outros, *Individual trajectories of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type, J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 14: 575-592, 1992). Um subgrupo de pacientes apresenta um curso descendente fulminante rapidamente progressivo durante vários anos (Mann, U., e outros, *Heterogeneity in Alzheimer's disease: Progression rate segregated by distinct neuropsychological and cerebral metabolic profiles, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55:956:959, 1992). Outros pacientes (aproximadamente 10% de coortes) permanecem lentamente progressivos, mostrando apenas declínio gradual de ano a ano (Grossi, D., e outros, *Senile dementias, II International Symposium* (pp. 97-99), Paris: *John Libbey Eurotext*, 1988). As bases patológicas, químicas e

moleculares dessa heterogeneidade permanecem indeterminadas. Reconhecimento da variabilidade de progressão de DA representa uma percepção clínica importante, e poderá explicar as dificuldades diagnósticas apresentadas por casos “atípicos”. Embora em certos casos, há uma manifestação familiar da doença de Alzheimer, parece que a maioria de casos de DA são não-familiar, e até recentemente (ver abaixo), nenhum marcador biológico simples para a doença foi determinado.

Métodos correntes usados para diagnosticar DA envolve análise de fluido cerebrospinal (FCS) ou tecido cerebral obtido de pacientes pós-mortes. Desse modo, entre os marcadores, atualmente, sob consideração estão aqueles relacionados com as proteínas, os quais são responsáveis por características encontradas em cérebros com doença de Alzheimer pós-morte. O emaranhamento neurofibrilar é composto principalmente de uma proteína *tau* hiperfosforilada, uma proteína citoesquelética. A placa neurítica contém um núcleo de proteína amiloide, muito dos quais é um peptídeo de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) derivado de clivagem proteolítica de uma proteína precursora maior. Uma outra forma dessa proteína derivada do mesmo precursor contém apenas 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$). Depósitos dessa proteína são encontrados nos cérebros de vítimas de DA. Contudo, alterações em *tau* e os peptídeos beta-amiloides acima mencionados não ocorrem com frequência e magnitude suficientes a fim de proporcionar valor diagnóstico e, portanto, testes sanguíneos baseados nessas proteínas não parecem correlacionar-se bem com DA. Além da variabilidade terminal C peptídeos $A\beta$ terminalmente N-modificados são abundantes (Saido, T.C. e outros. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species $A\beta$ N3(pE) in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Russo, C. e outros. Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* 405, 531-532 (2000); Saido, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)). Parece que uma proporção maior dos peptídeos $A\beta$ sofre truncamento de término N por dois aminoácidos, expondo um resíduo de glutamato, o qual é subsequentemente ciclizado para piroglutamato

(pE), resultando em peptídeos A β 3(pE)-42 (Saido, T.C. e outros. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species A β N3(pE) in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 peptídeos beta-amiloide, A β N3(pE), em placas senis. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Saido, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T. & Kawashima, S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)). Alternativamente, pE poderá ser formado seguindo clivagem de β por BACE1, resultando em A β N1(pE)-42 (Naslund, J. e outros. Relative abundance of Alzheimer A β amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8378-8382 (1994); Liu, K. e outros. Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and Young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 112, 163-174 (2006)). Em particular, A β N3(pE)-42 mostrou ser um constituinte principal de depósitos de A β em DA esporádica e familiar (Saido, T.C. e outros., Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species A β N3(pE) in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Miravalle, L. e outros. Amino-terminally truncated A β peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry* 44, 10810-10821 (2005)).

Os peptídeos A β N3pE-42 coexistem com peptídeos A β 1-40/1-42 (Saido, T.C. e outros. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species A β N3(pE) in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466 (1995); Saido, T.C., Yamao, H., Iwatsubo, T & Kawashima, S. . Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett.* 215, 173-176 (1996)), e, baseada em várias observações podem desempenhar um papel proeminente na patogênese de DA. Por exemplo, uma neurotoxicidade particular de peptídeos A β N3pE-42 foi descrita (Russo, C. e outros, Pyroglutamato-modified amyloid beta-peptides—AbetaN3(pE)—strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* 82, 1480-1489 (2002) e a modificação de pE de peptídeos N truncados confere resistência à degradação por maior parte de aminopeptida-

ses, bem como endopeptidases que degradam A β (Russo, C. e outros, *P-yroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. J. Neurochem.* 82, 1480-1489 (2002); Saido, T.C. Alzheimer's Disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol. Aging* 19, S69-S75 (1998)). A ciclização de ácido glutâmico para pE leva a uma perda de carga de término N resultando na agregação acelerada de A β N3pE comparada com os peptídeos A β não-modificada (He, W. & Barrow, C.J. The A β 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vivo than full-length A β . *Biochemistry* 38, 10871-10877 (1999); Schilling, S., e outros. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vivo). *Biochemistry* 45, 12393-12399 (2006)). Desse modo, redução da formação de A β N3pE-42 pode desestabilizar os peptídeos, tornando-os mais acessíveis à degradação e impediria, por sua vez, a formação de agregados de A β de maior peso molecular e acentuaria sobrevivência neuronal.

No entanto, há muito tempo não se sabia como ocorre a modificação de pE de peptídeos A β . O presente requerente descobriu que glutaminil ciclase (QC) é capaz de catalisar formação de A β N3pE-42 sob condições moderadamente ácidas, que inibidores de QC impedem geração de A β N3pE-42 *in vitro* e que, portanto, inibição de glutaminil ciclase é um novo conceito terapêutico para o tratamento causativo de doença de Alzheimer (Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M. & Demuth, H.-U. Glutaminyl cyclases unfold glutaminyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* 563, 191-196 (2004); Cynis, H. e outros. Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1618-1625 (2006); Schilling e outros. Inhibition of glutaminyl cyclase – a novel therapeutic concept for the causative treatment of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 14, 1106-1111 (2008)).

Atualmente, parece ser marcador diagnóstico não satisfatório de existência de DA, ou de um indivíduo, que embora exibindo respostas cognitivas normais; inevitavelmente, ou mais provável, desenvolverá DA.

Declínio Cognitivo Associado à Idade (DCAI) e Comprometimento Cognitivo Leve (*Mild Cognitive Impairment*) (MCI) são termos usados para identificar indivíduos que sofrem um declínio cognitivo que está aquém de demência. Esses termos são equivalentes, MCI sendo um termo mais recentemente adotado, e são usados intercambiavelmente em todo este relatório descritivo. Satisfação de critérios (*World Health Organization*) para esse diagnóstico exige um relato pelo indivíduo ou família de um declínio na função cognitiva, a qual é gradual, e presente pelo menos 6 meses. Pode haver dificuldades em todos os domínios cognitivos (embora memória seja prejudicada na maioria vasta de casos), e esses devem ser suportados por desempenho anormal em avaliações cognitivas quantitativas para que idade e normas de educação sejam disponíveis para indivíduos relativamente saudáveis (isto é, o paciente é comparado com indivíduos normais seu/sua idade própria). Desempenho deve ser pelo menos DP 1 abaixo do valor médio em relação à população apropriada nesses testes. Nem demência, nem depressão significativa ou efeitos de fármaco poderão estar presentes. Nenhuma doença cerebral ou sistêmica ou condição conhecida para causar disfunção cognitiva poderão estar presentes. Na experiência do requerente todos os pacientes que foram classificados CDR.5 (“demência questionável”) na escala de classificação de Demência Clínica e que satisfizeram essas exclusões, também satisfizeram os critérios de AACD/MCI. Aproximadamente, 1/3 de pacientes com Alzheimer apresentavam um período claramente definível de *déficit* de memória isolado que precedeu seu declínio cognitivo mais global. (Haxby J. V., e outros; Individual trajectories of cognitive decline in patients with dementia of the Alzheimer type *J. Clin. Exp. Neuropsychology* 14:575-592, 1992). Usando critérios de AACD/MCI, os quais contam com outros domínios além da memória, a porcentagem com um pródromo identificável é provavelmente maior. Felizmente, nem todos os indivíduos com AACD/MCI parecem declinar. Evidencia-se que um número significativo desses indivíduos mostra um *déficit* de memória estável não-progressivo em teste.

Tentativas em prever o início de DA, MCI ou NDS, ou monitorar sua progressão são satisfeitas com sucesso limitado. Descobriu-se pelos

inventores deste pedido que uma quantidade de QC em uma amostra biológica obtida de um indivíduo que desvia de uma quantidade de referência em uma pessoa de controle pode ser positivamente correlacionada com um estado de doença neurológica. Desse modo, a correlação da presença de QC com o estado de doença representa um teste positivo e mais direto para diagnóstico em um paciente sofrendo de uma das doenças neurodegenerativas descritas acima.

Conseqüentemente, a invenção proporciona um teste de amostra biológica facilmente administrada para prever, diagnosticar ou prognosticar DA, MCI e NDS usando QC como um marcador diagnóstico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção baseia-se na descoberta de que uma quantidade de glutaminil ciclase (QC) em uma amostra biológica obtida de um indivíduo sofrendo de DA ou MCI é elevada comparada com uma quantidade de QC na amostra biológica obtida de um indivíduo de controle normal (isto é, saudável). A indicação de que a quantidade de QC difere entre essas doenças neurológicas e controle normal, forma a base para o desenvolvimento de um teste para diagnóstico de DA, MCI ou NDS em um indivíduo. Como tal, os métodos de diagnóstico de DA, MCI ou NDS da presente invenção por meio de medição da quantidade de QC em amostra de paciente grandiosamente aperfeiçoará avaliação diagnóstica clínica atual para pacientes que sofrem dessas doenças neurodegenerativas.

Com base nas diferenças recentemente descobertas na quantidade de QC presente em uma amostra biológica obtida de um paciente comparado com aquele de um controle normal, uma correlação forte da quantidade de QC pode ser feita para um diagnóstico provável de uma doença neurodegenerativa. Uma elevação estatisticamente significativa na quantidade de QC relativa às amostras de controle é razoavelmente predita que o paciente apresenta DA, NDS ou MCI. Uma quantidade normal de QC conforme determinada por uma quantidade de característica de QC de uma amostra de controle de QC isolada de uma população emparelhada com a idade normal indica que o paciente não apresenta uma doença neurodege-

nerativa, tais como DA, MCI ou NDS. Uma indicação positiva de uma doença neurodegenerativa com base em uma quantidade elevada ou reduzida de QC em uma amostra biológica relativa a um controle normal é geralmente considerada juntamente com outros fatores na produção de uma determinação definitiva de uma doença particular. Portanto, os níveis elevados ou reduzidos de QC do indivíduo que é testado usualmente serão considerados juntamente com outros sintomas clínicos aceitos de condições relacionadas com DA, MCI ou NDS na produção de um diagnóstico determinativo de uma doença neurodegenerativa.

10 Desse modo, de acordo com um primeiro aspecto da invenção, é proporcionado um método de diagnosticar Doença de Alzheimer provável (DA), Neurodegeneração em Síndrome de Down (NDS) ou Comprometimento Cognitivo Leve (MCI) em um indivíduo, método este que compreende:

15 (a) detectar a quantidade de glutaminil ciclase (QC), ou suas isoformas, em uma amostra biológica obtida desse indivíduo; e

(b) comparar a quantidade detectada de QC na amostra biológica com uma quantidade de característica de QC de um controle normal; por meio do qual uma quantidade elevada de QC nessa amostra biológica relativa ao controle normal é um indicador positivo de DA ou MCI.

20 De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a amostra

biológica é uma amostra de corpo fluido tais como fluido de soro, plasma, urina ou cerebrospinal. Mais preferencialmente, a amostra de corpo fluido é plasma.

25 De acordo com uma modalidade adicional da presente invenção, a quantidade de QC é detectada com base do nível de proteína de QC ou o nível de mRNA de QC.

30 A quantidade de QC detectada ou quantificada em uma amostra biológica de um indivíduo pode ser concluída por quaisquer meios conhecidos no estado da técnica. Tais meios poderão incluir, mas sem se limitar os mesmos, por exemplo, mediante ensaio imunoturbidimétrico, imunofluorescência, imunodifusão, ensaio imunoabsorvente enzimático (*enzyme-linked*

immunosorbent assay) (ELISA), rádio-imunoensaio (RIA), *Western Blot*, ensaio de atividade proteica ou, para a determinação do nível de mRNA de QC, *Northern Blot* ou análise de reação em cadeia de polimerase (RCP), por exemplo, RCP em tempo real. Também úteis são Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Espectrometria de Massa (EM) e Cromatografia Gasosa (CG), bem como suas várias configurações; incluindo Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-EM), Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (CL-EM) e Sistemas de Cromatografia Líquida em tandem-Espectrometria de Massa (CL-EM/EM).

10 Preferencialmente, a quantidade de QC na amostra biológica é detectada usando um anticorpo que se liga a QC em um formato imunoensaio. Desse modo, de acordo com uma modalidade preferida da invenção, é proporcionado um método de diagnosticar uma doença neurodegenerativa em um indivíduo, método este que compreende:

- 15 (a) obter uma amostra biológica do indivíduo;
- (b) contatar essa amostra biológica com um anticorpo que se liga a glutaminil ciclase (QC), ou suas isoformas;
- (c) permitir que o anticorpo e QC forme um complexo imune; e
- (d) detectar a quantidade de complexo imune formado como
- 20 uma indicação da quantidade de QC nessa amostra biológica; e
- (e) comparar a quantidade detectada com um controle normal; por meio do qual uma quantidade detectada que é elevada ou reduzida em relação ao controle normal é um indicador positivo de uma doença neurodegenerativa.

25 De acordo com ainda um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um *kit* diagnóstico para determinar se um indivíduo está sofrendo de uma doença neurodegenerativa, *kit* este que compreende um anticorpo que se liga a QC e um padrão estabelecido de uma quantidade de característica de QC de um controle normal. Reagentes e instruções para realização

30 dos ensaios poderão também ser incluídos.

DESCRIÇÃO CONCISA DAS FIGURAS

Figura 1: figura 1 (a) mostra a análise de níveis de transcritos de

QC aplicando TR-RCP quantitativa. RNA total de amostras de cérebro neocortical humano (área de Brodmann 22) foi isolado de cérebros normalmente envelhecidos e DA de diferentes estágios de Braak conforme indicado. O nível de transcrito de QC foi normalizado para concentração de transcrito infra-estrutura. Figura 1 (b) mostra a análise *Western-Blot* de QC a partir dos mesmos casos e região cerebral conforme usada para análise de mRNA de QC. A extração de proteína solúvel foi normalizada para o peso tissular. Figura 1 (c) mostra a quantificação de concentrações de A β N3(PE)-42 (indicada como A β ₁₋₄₂) a partir dos mesmos casos e região cerebral aplicando análise ELISA de extratos de SDS e ácido fórmico de amostras de cérebro neocortical humano. Nota-se o aumento robusto em concentrações peptídicas de A β N3(pE)-42. Figura 1 (d) mostra a detecção imuno-histoquímica de peptídeos A β pelo anticorpo 4G8 e de peptídeos A β N3(pE)-42 na área de *Brodman* 22 de indivíduos normalmente envelhecidos e diferentes estágios de DA. Placas esparsas A β foram detectadas em envelhecimento normal, porém esses depósitos faltaram imunorreatividade de A β N3(pE)-42. Em todos os estágios de DA, contudo, a maioria de placas A β contém peptídeos de A β N3(pE)-42.

Figura 2 mostra os resultados da determinação da taxa de expressão gênica de QC e CCL2 em células THP-1 estimuladas.

Figura 3 mostra os resultados da determinação da atividade específica de QC em meio condicionado de células THP-1.

SEQUÊNCIAS DE PEPTÍDEOS AMILOIDES E QUIMIOCINAS

A β (1-42) (ID SEQ NO: 6)	Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala
A β (1-40) (ID SEQ NO: 7)	Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val
A β (3-42) (ID SEQ NO: 8)	Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala
A β (3-40) (ID SEQ NO: 9)	Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val

Aβ (1-38) (ID SEQ NO: 10)	Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly
Aβ (3-38) (ID SEQ NO: 11)	Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly
Abri (ID SEQ NO: 12)	EASNCFAIRHFENKFAVETLICSRVTKKNIIEEN
ADan (ID SEQ NO: 13)	EASNCFAIRHFENKFAVETLICFNLFLNSQEKHY
CCL2 (citocina induzível pequena A2) (ID SEQ NO: 14) <i>Swiss-Prot:</i> P13500	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIVA KEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT
CCL7 (citocina induzível pequena A7) (ID SEQ NO: 15) <i>Swiss-Prot:</i> P80098	QPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQRLESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLD KEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL
CCL8 (citocina induzível pequena A8) (ID SEQ NO: 16) <i>Swiss-Prot:</i> P80075	QPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGK EVCADPKERWVRDMSMKHLDQIFQNLKP
CCL9/10 (citocina induzível pequena A9) (ID SEQ NO: 17) <i>Swiss-Prot:</i> P51670	QITHATETKEVQSSLKAQQLEIEMFHMFGQDSSDCCLSYNSRIQCS RFIGYFPTSGGCTRPGIIFISKRGFQVCANPSDRRVQRCIERLEQNS QPRTYKQ
CCL13 (citocina induzível pequena A13) (ID SEQ NO: 18) <i>Swiss-Prot:</i> Q99616	QPDALNVPSTCCFTFSSKKISLQRLKSYVITTSRCPQKAVIFRTKLG KEICADPKEKWVQNYMKHLGRKAHTLKT
CCL15 (citocina induzível pequena A15) (ID SEQ NO: 19) <i>Swiss-Prot:</i> Q16663	QFINDAETELMMSKLPLENPVVLSNFHFAADCCTSYSISQSIKSLMK SYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGPGVQDCMKKLPYSI

<p>CCL16 (citocina induzível pequena A16) (ID SEQ NO: 20) <i>Swiss-Prot:</i> O15467</p>	<p>QPKVPEWVNTNPSTCCCLKYYEKVLPRLVWGYRKALNCHLPAIIFVTK RNREVCTNPNDWVQEYIKDPNLPPLPTRNLSTVKIITAKNGQPQLL NSQ</p>
<p>Fractalcina (neurotactina) (ID SEQ NO: 21) <i>Swiss-Prot:</i> P78423</p>	<p>QHHGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQNQASCGKRAIILETRQ HRLFCADPKEQWVKDAMQHLDRQAAALTRNGGTFEKQIGEVKP RTTPAAGGMDESVVLEPEATGESSSLEPTPSSQEAQRALGTSP PTGVTGSSGTRLPPTPKAQDGGPVGTELFRVPPVSTAATWQSSAP HQPGPSLWAEAKTSEAPSTQDPSTQASTASSPAPEENAPSEGQR V WGQQQSPRPENSLEREEMGPVPAHTDAFQDWGPGSMAHVSVP VSSEGTSPREPVASGSWTPKAEPIHATMDPQRLGVLITPVPDAQ AATRRQAVGLLAFLGLLFCCLGVAMFTYQSLQGCPRKMAGEMAE GLRYIPRSCGSNSYVLPV</p>
<p>CCL25 (citocina induzível pequena A25) (ID SEQ NO: 22) <i>Swiss-Prot:</i> O15444</p>	<p>QGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAFYL PKRHRKVCGNPKSREVQRAMKLLDARNKVFALHHTQTFFQA GPHAVKKLSSGNSKLSKFSNPISSSKRNVSLLISANSGL</p>

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um método eficiente e rápido *in vitro* para diagnosticar uma doença neurodegenerativa por meio de, diretamente, detectar uma quantidade de QC em uma amostra biológica obtida de um indivíduo e comparando a quantidade detectada de QC com uma quantidade de característica de QC de um controle normal. Uma quantidade elevada de QC na amostra biológica do indivíduo é uma indicação positiva de DA ou MCI ou NDS. Desse modo, conforme descrito neste relatório demonstra-se que QC é consistente e significativamente elevado em uma amostra biológica de pacientes com DA, NDS ou MCI comparada com controles normais. Como tal, os métodos para diagnosticar DA, MCI ou NDS da presente invenção, detectando ou quantificando a quantidade de QC em uma amostra de paciente grandemente aperfeiçoará avaliação diagnóstica clínica atual para pacientes que sofrem dessas doenças neurodegenerativas.

Consequentemente, proporciona-se um método para avaliar se um indivíduo pode estar sofrendo de DA, MCI ou NDS usando QC como um marcador biológico.

Glutaminil ciclase ou ciclotransferase glutaminil-peptídeo (QC, EC 2.3.2.5) catalisa a ciclização intramolecular de resíduos de glutaminil de término N em ácido piroglutâmico (5-oxo-prolina, pGlu*) sob liberação de amônia e a ciclização intramolecular de resíduos de glutamil de término N em ácido piroglutâmico sob liberação de água.

Uma QC foi primeiro isolada por Messer a partir do látex da papia *Carica* planta tropical em 1963 (Messer, M. 1963 *Nature* 4874, 1299). 24 anos mais tarde, descobriu-se uma atividade enzimática correspondente em pituitária animal (Busby, W. H. J. e outros, 1987; *J. Biol. Chem.* 262, 8536; Fischer, W. H. e Spiess, J. 1987; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3628-3632). Em relação a QCs de mamíferos, a conversão de Gln em pGlu por QC pode ser mostrada para os precursores de TRH e GnRH (Busby, W. H. J. e outros, 1987; *J. Biol. Chem.* 262, 8532-8536; Fischer, W. H e Spiess, J. 1987; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3628-3632). Além disso, experimentos de localização inicial de QC revelaram uma colocalização com seus produtos putativos de catálise no hipotálamo-hipofisário adicionalmente aperfeiçoando a função sugerida em maturação hormonal peptídica (Bockers, T. M. e outros; 1995 *J. Neuroendocrinol.* 7, 445-453). Em contraste, a função fisiológica da QC vegetal é menos clara. No caso da enzima de *C.papaya*, um papel na defesa da planta contra microorganismos patogênicos foi sugerido (El Moussaoui, A. e outros, 2001, *Cell Mol. Life Sci.* 58, 556-570). QCs putativos de outros vegetais foram identificados por meio de comparações de sequências, recentemente (Dahl, S. W. e outros; 2000 *Protein Expr. Purif.* 20, 27-36). A função fisiológica dessas enzimas, contudo, é ainda ambígua.

As QCs conhecidas de vegetais e animais mostram uma especificidade precisa de L-Glutamina na posição de término N dos substratos e seu comportamento cinético verificou-se obedecer à equação de *Michaelis-Menten* (Pohl, T. e outros, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10059-10063; Consalvo, A. P. e outros, 1988, *Anal. Biochem.* 175,131-138; Gololobov, M. Y. e outros, 1996, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377, 395-398). Uma comparação das estruturas primárias dos QCs de *C. papaya* e aquela da QC altamente conservada de mamíferos, contudo, não revelou qualquer homo-

logia de sequência (Dahl, S. W. e outros (2000) *Protein Expr. Purif.* 20, 27-36). Visto que os QCs vegetais parecem pertencer a uma nova família de enzima (Dahl, S. W. e outros (2000) *Protein Expr. Purif.* 20, 27-36), os QCs de mamíferos foram verificados apresentar uma homologia de sequência pronunciada para aminopeptidase bacteriana (Bateman, R. C. e outros, 2001 *Biochemistry* 40, 11246-11250), levando à conclusão de que os QCs de vegetais e animais apresentam diferentes origens evolucionárias.

Gostranova e outros verificaram que atividade de glutaminil ciclase é um aspecto característico de fluido cerebrospinal em pacientes de esclerose múltipla e controles (Gostranova e outros, *Clin. Chim. Acta.* 2008 389 (1-2), pp. 152-159).

Isoformas diferentes de QC, as proteínas semelhantes à ciclo-transferase glutaminil-peptídica (QPCTLs) são observadas (WO 2008/034891). Essas novas proteínas apresentam similaridade significativa de sequência a glutaminil ciclase, por exemplo, a QPCTL de humano (adicionalmente denominada como isoQC) (acesso *GenBank* no. NM_017659).

Isoformas múltiplas de uma proteína, tais como QC ou isoQC humano, podem também ser produzidas de um único gene por meio de uma variedade de mecanismos, incluindo processamento alternativo (*splicing*) de RNA, processamento proteolítico pós-translacional e glicosilação específica ao tipo celular. Desse modo, os termos “glutaminil ciclase”, “QC” e “isoQC” conforme usados neste relatório referem-se a QC em sua forma nativa, bem como qualquer uma de suas isoformas.

Preferidas para o uso da presente invenção são QC humana ou suas isoformas, apresentando uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo de ID SEQ Nos: 1, 2, 3, 4 e 5.

Mais preferido, para uso nos métodos da presente invenção é a QPCTL humana apresentando uma sequência de aminoácidos de ID SEQ NO. 2 ou ainda preferida de ID SEQ NO: 3.

Ainda preferida para uso nos métodos da presente invenção são formas de junção de QPCTL humana apresentando uma sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 4 ou de ID SEQ NO: 5.

Mais preferido para uso nos métodos da presente invenção é QC humana apresentando a sequência de aminoácidos de ID SEQ NO: 1.

Desse modo, de acordo com um primeiro aspecto da presente invenção, é proporcionado um método de diagnóstico de Doença de Alzheimer provável (DA), Neurodegeneração em Síndrome de Down (NDS) ou Comprometimento Cognitivo Leve (MCI) em um indivíduo, método este que compreende:

- (a) detectar a quantidade de glutaminil ciclase (QC), ou uma isoforma desta, em uma amostra biológica obtida do indivíduo; e
- 10 (b) comparar a quantidade detectada de QC na amostra biológica com uma quantidade de característica de QC de um controle normal por meio do qual uma quantidade elevada de QC nessa amostra biológica relativa ao controle normal é um indicador positivo de DA, NDS ou MCI.

Tem sido demonstrado por inventores da presente invenção que uma quantidade elevada de QC em uma amostra biológica poderá correlacionar-se com uma quantidade elevada de peptídeos beta-amiloide N-terminalmente truncados e piroglutamatados, tais como, por exemplo, A β N3pE-42 e/ou A β N3pE-40 e/ou A β N3pE-38.

Desse modo, de acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionado um método de diagnóstico de Doença de Alzheimer provável (DA), Neurodegeneração em Síndrome de Down (NDS) ou Comprometimento Cognitivo Leve (*Mild Cognitive Impairment*) (MCI) em um indivíduo, método este que compreende:

- 25 (a) detectar a quantidade de glutaminil ciclase (QC), ou uma isoforma da mesma, em uma amostra biológica obtida do indivíduo; e
 - (b) adicionalmente, detectar a quantidade de A β N3pE-X,
 - (c) comparar a quantidade detectada de QC e A β N3pE-X na amostra biológica com uma quantidade de característica de QC e A β N3pE-X de um controle normal.
- 30 por meio do qual uma quantidade elevada de QC e A β N3pE-X na amostra biológica relativa ao controle normal é um indicador positivo de DA, NDS ou MCI, e

em que X é um número inteiro selecionado de 38, 40 e 42.

Em uma modalidade preferida, X é 42.

Em uma modalidade adicionalmente preferida, X é 40.

Em uma modalidade ainda preferida, X é 38.

5 Adicionalmente preferidos são métodos, em que não apenas uma única forma dos peptídeos beta-amiloide N-terminalmente truncados e piroglutamados, mas uma combinação de A β N3pE-42 e/ou A β N3pE-40 e/ou A β N3pE-38 é detectada juntamente com QC.

10 Adicionalmente preferidos são métodos, em que não apenas uma única forma dos peptídeos beta-amiloide N-terminalmente truncados e piroglutamados, mas uma combinação de A β N3pE-42 e/ou A β N3pE-40 e/ou A β N3pE-38 e/ou peptídeos que ocorrem em demências de Alzheimer familiar, tal como pGluABri ou pGluADan, é detectada juntamente com QC.

15 “pGlu-A β ” ou “A β N3pE” refere-se a formas N-terminalmente truncadas de A β , que começa no resíduo de ácido glutâmico sob posição 3 na sequência de aminoácidos de A β , e em que o resíduo de ácido glutâmico é ciclizado para formar um resíduo de ácido piroglutâmico. Em particular, por pGlu-A β conforme usado neste relatório entende-se aqueles fragmentos que são envolvidos em, ou associados às patologias de amiloide, incluindo, mas
20 sem se limitar os mesmos, pGlu-A β 3-38, pGlu-A β 3-40, p-Glu-A β 3-42.

 Tem sido adicionalmente demonstrado pelos inventores da presente invenção que uma quantidade elevada de QC em uma amostra biológica poderá correlacionar-se com uma quantidade elevada de uma quimiocina, tais como, por exemplo, CCL2, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCL13, CCL15,
25 CCL16, CCL25 e Fractalcina.

 Desse modo, de acordo com um aspecto adicional da presente invenção, é proporcionado um método de diagnóstico de Doença de Alzheimer (DA), Neurodegeneração em Síndrome de Down (NDS) ou Comprometimento Cognitivo Leve (*Mild Cognitive Impairment*) (MCI) em um indivíduo,
30 método este que compreende:

 (a) detectar a quantidade de glutaminil ciclase (QC), ou uma isoforma da mesma, em uma amostra biológica obtida do indivíduo; e

(b) adicionalmente detectar a quantidade de uma quimiocina,

(c) comparar a quantidade detectada de QC e a quimiocina na amostra biológica com uma quantidade de QC e a característica de quimiocina de um controle normal;

5 por meio do qual uma quantidade elevada de QC e quimiocina na amostra biológica relativa ao controle normal é um indicador positivo de DA, NDS ou MCI.

Em uma modalidade preferida, a quimiocina é de origem mamífera. Mais preferencialmente, a quimiocina é uma quimiocina humana. Mais
10 preferencialmente, essa quimiocina é CCL2 humana.

Em uma modalidade adicionalmente preferida, qualquer um dos métodos acima mencionados para diagnóstico de Doença de Alzheimer (DA), Neurodegeneração em Síndrome de Down (NDS) ou Comprometimento Cognitivo Leve (*Mild Cognitive Impairment*) (MCI) poderão também ser
15 realizados *in vitro* em uma amostra biológica de um indivíduo.

O termo “indivíduo” refere-se a um mamífero que sofre de, ou suspeito de uma doença neurodegenerativa tais como DA, MCI ou NDS. Preferencialmente, “indivíduo” refere-se a um ser humano.

O termo “amostra biológica” refere-se a qualquer fonte de material biológico, incluindo, mas sem se limitar a mesma, sangue periférico,
20 plasma, linfócitos, fluido cerebrospinal, urina, saliva, epitélio, fibroblastos, ou qualquer outra amostra compreendendo proteína QC.

Em uma modalidade preferida, a quantidade de QC é detectada em uma amostra de fluido corpóreo obtido de um mamífero, mais preferen-
25 cialmente, um humano. O termo “fluido corpóreo” refere-se a todos os fluidos que estão presentes no corpo humano, incluindo, mas sem se limitar aos mesmos, sangue, linfa, urina e fluido cerebrospinal (CSF) compreendendo QC. A amostra sanguínea poderá incluir uma amostra plasmática ou uma amostra sérica, ou frações derivadas dessas amostras. A amostra pode ser
30 tratada antes de uso, tais como preparação de plasma de sangue, diluição de fluidos viscosos, e similares. Preferencialmente, a amostra de plasma é tratada com um anticoagulante, tal como EDTA.

De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, a quantidade de QC é detectada em uma amostra sanguínea tomada do indivíduo, mais preferencialmente, uma amostra plasmática. Desse modo, a presente invenção preferencialmente refere-se a um método conforme descrito acima, método este que compreende as etapas de: obter uma amostra plasmática do indivíduo; detectar a quantidade de QC na amostra plasmática; comparar a quantidade detectada de QC na amostra plasmática com a quantidade de QC em uma amostra plasmática de um controle normal, por meio do qual uma quantidade elevada de QC relativa ao controle normal é uma indicação positiva

De DA, NDS ou MCI. Quantidades elevadas de QC mostram correlacionar-se com, e são úteis em auxiliar a diagnose de DA, NDS e MCI.

Uma “quantidade elevada” de QC (ou uma isoforma desta) significa que a quantidade de QC detectada nas amostras dos indivíduos é maior que a quantidade média de característica de QC de uma pessoa de controle normal além da faixa de erro experimental, conforme conhecida no estado da técnica. Preferencialmente, a quantidade de QC detectada nas amostras dos indivíduos é 10% maior que a quantidade média de característica de QC de uma pessoa de controle normal. Mais preferencialmente, a quantidade de QC (ou uma isoforma da mesma) detectada nas amostras dos indivíduos é 25% maior, ou, ainda mais preferida 50% ou 75% maior que a quantidade média de característica de QC de uma pessoa de controle normal. Mais preferencialmente, a quantidade de QC (ou uma isoforma da mesma) detectada nas amostras dos indivíduos é diversas vezes maior que a quantidade média de característica de QC de uma pessoa de controle normal, por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais vezes maior.

Um “controle normal” é uma amostra biológica do mesmo tipo obtida do indivíduo, por exemplo, aquela que é obtida de pelo menos uma pessoa de controle normal emparelhado à idade ou do paciente em outro tempo. Em uma modalidade, o controle normal é tomado do paciente em um tempo mais prematuro. Uma amostra de controle normal de uma população emparelhada à idade deve ser isolada de uma amostra de população ade-

quada de controles saudáveis emparelhados à idade com nenhuma história de DA, MCI ou NDS em sua família. À guisa de exemplo, um nível plasmático de QC maior que os níveis de controle de QC, conforme determinado por um tamanho de amostra de população de controle adequada, é indicativo de DA, NDS ou MCI. Aquele versado no estado da técnica considerará que a amostra do indivíduo que deve ser diagnosticado é avaliada contra um controle normal emparelhado à idade e que uma elevação ou redução significativa na quantidade de QC na amostra de proteína do indivíduo é determinada com base na comparação com os controles usados no ensaio fornecido.

5 De acordo com uma modalidade adicional da presente invenção, a quantidade de QC, ou uma isoforma da mesma, é detectada com a base do nível de proteína ou o nível de mRNA do QC ou isoforma da mesma.

A quantidade de QC detectada ou quantificada em uma amostra biológica do indivíduo pode ser realizada por quaisquer meios conhecido no estado da técnica. Tais meios poderão incluir, mas sem se limitar aos mesmos, por exemplo, por meio de ensaio imunoturbidimétrico, imunofluorescência, imunodifusão, ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA), rádio-imunoensaio (RIA), *Western Blot*, ensaio de atividade proteica, ou, para a determinação do nível de mRNA de QC. Análise *Northern Blot* ou reação em cadeia de polimerase (RCP), por exemplo, RCP em tempo real. Também úteis são cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa (EM) e cromatografia gasosa (CG), bem como suas várias configurações, incluindo sistemas de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM), cromatografia líquida-espectrometria de massa (CL-EM) e cromatografia líquida em tandem-espectrometria de massa (CL-EM/EM), para citar alguns.

Embora detecção de QC possa ser realizada por métodos conhecidos no estado da técnica para detecção de peptídeos, o uso de técnicas de detecção imunológica usando anticorpos, fragmentos de anticorpos, anticorpos recombinantes, e similares, é preferido. Portanto, tal detecção de QC inclui, mas não se limita ao mesmo, o uso de anticorpos que se ligam especificamente a QC, ou suas isoformas, para formar um complexo imune,

bem como reagentes para detecção da formação do complexo imune. Técnicas de detecção particularmente adequadas empregando um ou mais anticorpos incluem ensaios imunoturbidimétrico, imunofluorescência, imunodifusão, ELISA, RIA e similares.

5 Tais anticorpos poderão ser policlonais ou monoclonais. Métodos para produzir anticorpos policlonais ou monoclonais são bem conhecidos no estado da técnica. Para uma revisão, ver Harlow e Lane (Harlow, E. e Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NI, 1988) e Yelton e outros (Yelton D. E. e Scharff M. D. *Monoclonal Antibodies: a powerful new tool in biology and medicine*. *Ann. Rev. Biochem.* 50:657-680, 1981), ambas as quais são neste relatório incorporadas como referência. Em relação a anticorpos monoclonais, ver Kohler e Milstein (Kohler G. e Milstein C., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature* 256: 495-497; 10 1975), neste relatório incorporado como referência. Os anticorpos da invenção são de qualquer isótopo, por exemplo, IgG ou IgA, e anticorpos policlonais são de um único isótopo ou uma mistura de isótopos.

De acordo com uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-QC é um anticorpo monoclonal. Embora anticorpos anti-QC sejam ampla e comercialmente disponíveis, anticorpos para uso nos vários imunoenaios descritos neste relatório, podem ser produzidos de acordo com métodos padrões. 20

Adicionalmente, o anticorpo monoclonal anti-QC é capaz de reconhecer QC em sua forma nativa, bem como qualquer uma de suas isoformas. Desse modo, qualquer anticorpo monoclonal que especificamente reconhece QC, incluindo suas isoformas, pode ser usado no método para a quantificação de QC. 25

Preferidos são anticorpos monoclonais, os quais especificamente reconhecem QC, mas mostram baixa reatividade cruzada, ou mais preferencialmente, nenhuma reatividade cruzada com isoformas de QC. Alternativamente preferidos são anticorpos monoclonais que especificamente reconhecem uma isoforma particular de QC, porém mostram baixa ou mais pre- 30

ferencialmente, nenhuma reatividade cruzada com QC.

Anticorpos anti-QC adequados são, por exemplo, aqueles que são comercialmente disponíveis de *Abnova (Taipei City, Taiwan)*, por exemplo, um anticorpo policlonal de camundongo (No. de Cat. H00025797-B01P) e um anticorpo policlonal de coelho (No. de Cat. H00025797-D01P).

Um anticorpo anti-QPCTL adequado é, por exemplo, o anticorpo policlonal de camundongo comercialmente disponível de *Abnova (Taipei City, Taiwan)*, No. de Cat. H00054814-B01P).

Também fragmentos derivados desses anticorpos monoclonais tais como Fab, F(ab)₂/ssFv (fragmento variável de cadeia única) e outros constructos semelhantes a anticorpos que retêm a região variável do anticorpo, proporcionando-os ter retido as propriedades de ligação originais, podem ser usados em um método da presente invenção. Tais fragmentos são comumente gerados mediante, por exemplo, digestão enzimática dos anticorpos com papaína, pepsina, ou outras proteases. Sabe-se bem aquele versado no estado da técnica que anticorpos monoclonais, ou fragmentos destes, podem ser modificados para várias utilizações. Desse modo, anticorpos da invenção, podem ser recombinantes, por exemplo, quiméricos (por exemplo, constituídos por uma região variável de origem murina associada a uma região constante humana), humanizados (uma coluna dorsal de imunoglobulina constante humana juntamente com região hipervariável de animal, por exemplo, origem murina) e/ou cadeia única.

Um anticorpo específico de QC, ou suas isoformas, usado em um método da presente invenção poderá ser marcado por uma marca apropriada e identificado na amostra biológica com base na presença da marca. A marca permite a detecção do anticorpo quando este é ligado a QC. Exemplos de marcas incluem, mas sem se limitar os mesmos, os seguintes: radioisótopos (por exemplo, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcas fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos lantanídeos, marcas luminescentes, marcas enzimáticas (por exemplo, peroxidase de rábano-silvestre, beta-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimiluminescente, e grupos biotinila.

Métodos de conjugação ou marcação dos anticorpos discutidos acima poderão ser prontamente realizados por aquele versado no estado da técnica (ver, por exemplo, Inman, "*Methods in Enzymology*", Vol. 34, *Affinity Techniques, Enzyme Purification*: Parte B, Jakoby e Wichek (eds), *Academic Press*, Nova Iorque, p. 30, 1974; e Wilchek e Bayer, "*The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications*", *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988).

Para aplicações diagnósticas, o anticorpo anti-QC é em um estado livre ou imobilizado em um suporte sólido tais como um tubo, uma conta, ou qualquer outro suporte convencional usado no campo.

10 Imobilização é obtida usando meios diretos ou indiretos. "Meios diretos" incluem adsorção passiva (ligação não-covalente) ou ligação covalente entre o suporte e o reagente. Por "meios indiretos" entende-se que um composto antirreagente que interage com um reagente é primeiro ligado ao suporte sólido. Meios indiretos poderão também empregar um sistema de
15 receptor ligante, por exemplo, em que uma molécula tal como uma vitamina é enxertada no reagente e o receptor correspondente imobilizado na fase sólida. Isso é ilustrado pelo sistema biotina-estreptavidina.

Aqueles versados no estado da técnica prontamente entenderão que um complexo imune é formado entre QC na amostra biológica e o anti-
20 corpo, e que qualquer material não-ligado é removido antes de detectar o complexo. Entende-se que um anticorpo da invenção é utilizado para quantificar uma quantidade de QC na amostra biológica, tais como, por exemplo, sangue, plasma, linfócitos, fluido cerebrospinal, urina, saliva, epitélio e fibroblastos.

25 Conforme é conhecido no estado da técnica, a determinação de tal ligação de anticorpos pode ser realizada usando uma grande variedade de formatos de imunoenaios, incluindo, mas sem se limitar os mesmos, ensaio imunoturbidimétrico (aglutinação), ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA) e rádio-imunoensaio (RIA) (ver, por exemplo, "*Principles and Practice of Immunoassay*" (1991) Christopher P. Price e David J. Neoman (eds.), *Stockton Press*, Nova Iorque, N.I. e Ausubel e outros (eds.) (1987) in "*Current Protocols in Molecular Biology*" John Wiley and Sons, Nova Iorque, N. I.,
30

ambos os quais são incorporados neste relatório como referência). Detecção poderá ser por meio de métodos colorimétricos ou radioativos ou quaisquer outros métodos convencionais conhecidos daquele versado no estado da técnica. Outras técnicas padrão conhecidas no estado da técnica são descritas in “*Methods in Immunodiagnosis*”, 2ª. Edição, Rose e Bigazzi, eds., *John Wiley and Sons*, Nova Iorque, 1980 e Campbell e outros, “*Methods of Immunology*”, W. A. Benjamin, Inc., 1964; Patente dos Estados Unidos Nos. 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288 e 4.837.168, cujas descrições são incorporadas neste relatório como referência. Para uma revisão dos imunoenaios gerais, ver também “*Methods In Cell Biology*”, Vol. 37, Asai, Ed. *Academic Press*, Inc. Nova Iorque (1993); “*Basic and Clinical Immunology*”, 7ª. Edição, *Stites & Terr*, eds. (1991).

Tais ensaios de detecção de QC poderão ser um imunoenasiao direto, indireto, competitivo ou não-competitivo conforme descrito no estado da técnica (ver, por exemplo, “*Principles and Practice of Immunoassay*” (1991) Christopher P. Price e David J. Neoman (eds.), *Stockton Press*, Nova Iorque, N.I.; Ausubel e outros (eds.) (1987) in “*Current Protocols in Molecular Biology*” *John Wiley and Sons*, Nova Iorque, N. I.; e Oellirich, M. 1984, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22: 895-904, incorporados neste relatório como referência.

Imunoenaios não-competitivos são ensaios em que a quantidade de QC é diretamente detectada. No ensaio intercalado, por exemplo, os anticorpos anti-QC podem ser ligados diretamente a um substrato sólido onde são imobilizados. Esses anticorpos imobilizados em seguida capturam o QC presente na amostra biológica. O QC desse modo imobilizado é então ligado por um agente de marcação, tal como um segundo anticorpo QC humano que leva uma marca.

Em um imunoenasiao competitivo, a quantidade de antígeno presente na amostra biológica é determinada indiretamente seguindo adição de uma quantidade conhecida de antígeno marcado para a amostra e detecção da quantidade de antígeno marcado ligado com anticorpos. Por exemplo, uma quantidade conhecida de, nesse caso, QC marcado é adicionada à a-

mostra biológica e a amostra é em seguida contactada com anticorpos anti-QC. A quantidade de QC marcado ligado ao anticorpo anti-QC é inversamente proporcional à concentração de QC na amostra biológica. Isso é porque quanto maior a quantidade de QC marcado detectada, menor a quantidade de QC que foi disponível na amostra biológica para competir com o QC marcado.

Kits diagnósticos para realização dos ensaios para diagnosticar DA, MCI ou NDS em um indivíduo são também proporcionados. Desse modo, a presente invenção pode ser praticada usando um *kit* diagnóstico que inclui pelo menos um anticorpo específico para QC, e suas isoformas, conforme descrito neste relatório, bem como quaisquer reagentes necessários para a detecção de complexos imunes de ligação a anticorpo-QC. Geralmente, o *kit* poderá incluir um anticorpo único que especificamente reconhece QC, e suas isoformas. Por outro lado, o kit poderá incluir um anticorpo primário que especificamente reconhece QC, e suas isoformas, bem como um anticorpo secundário que é conjugado com uma marca que produz sinal e é capaz de ligar-se ao anticorpo primário, ou sob um sítio diferente do sítio onde o anticorpo primário liga-se. A marca produzindo sinal que se liga ao anticorpo secundário poderá ser, mas sem se limitar a mesma, uma enzima, tal como peroxidase de rábano-silvestre ou fosfatase alcalina. Os kits poderão adicionalmente compreender outros reagentes para realização do ensaio tais como tampões, um suporte sólido, soluções e similares. O kit poderá também conter instruções para realização do método da invenção usando um ou mais anticorpos em ensaios diagnósticos.

25 EXEMPLOS DA INVENÇÃO

Exemplo 1: Formação de A β N3pE-42 e expressão de QC in vivo

Uma distribuição muito difundida de QC foi detectada em cérebro de mamífero com expressão considerável no hipocampo e córtex. A fim de avaliar se expressão de QC em DA pode ser correlacionada com geração de A β N3pE-42, mRNA de QC e proteína, concentrações foram analisadas em amostras cerebrais neocorticais humanas pós-morte (figura 1a, b). Curiosamente, os inventores verificaram uma indução de mRNA de QC e proteí-

na em amostras cerebrais de DA, comparada com envelhecimento normal. Além disso, concentrações significativas de A β N3pE-42 foram detectadas em amostras de pacientes com DA em contraste com indivíduos não-dementes suportando um papel de QC na geração de A β N3pE-42 (figura 1c). Por outro lado, análise ELISA revelou altas concentrações de A β x-42 em indivíduos de controle normalmente envelhecidos e um aumento muito menor em estágios prematuros de DA (figura 1c). Essa observação foi corroborada por meio de imuno-histoquímica aplicando anticorpos que detectam A β (4G8) ou especificamente A β N3pE-42 (figura 1d). Imunorreatividade conspícua de A β foi detectada em seções cerebrais de todos os grupos. Em contraste, coloração de A β N3pE-42 foi ausente no envelhecimento normal, mas específico em relação a tecido cerebral de DA, em que carga de placa imunorreativa de A β N3pE-42 foi quase tão alta quanto o total de densidade de placa de A β .

15 Material e métodos

Tecido Cerebral Humano

A diagnose definida de DA para todos os casos usados nesse estudo foi baseada na presença de emaranhamento neurofibrilar e placas neuríticas na formação hipocampal e áreas neocorticais e satisfaz os critérios do Instituto Nacional de Transtornos Neurológicos e Comunicativos e Acidente Vascular (NINDS) e a Doença de Alzheimer e Associação de Transtornos Relacionados (*Related Disorders Association* (ADRDA). Tecido cortical (área Brodmann 22) dos mesmos casos foi utilizado para a quantificação de concentrações de mRNA de QC, proteína de QC e A β N3pE-42. No total, 10 casos de controle e 10 casos de DA, cada um, de estadiamento de Braak I-II e V-VI foram analisados. Os grupos foram emparelhados em relação a gênero e idade (controle: média 72 anos \pm 6,6 anos; DA I-II: média 73 anos \pm 3,1 anos; DA V-VI: média 77 anos \pm 6,6 anos). O intervalo médio pós-morte (IMP) foi similar entre os grupos e variou de 26 a 96 horas. A duração de IMP foi nem relacionada com a detecção de QC por análise *Western blot* nem para quantificação de A β por ELISA. Para detecção de mRNA de QC por meio de qRT-RCP, apenas amostras tissulares com um IMP a-

baixo de 48 horas foram incluídas.

Quantificação de mRNA de QC e análise *Western blot* de QC

Amostras tissulares foram homogeneizadas por meio do homogeneizador *Precellys* com contas de cerâmica de 1,4 mm (5.000 rpm, 30 segundos, *peqlab*). RNA foi isolado usando o kit *NucleoSpin* de RNA II (*Macherey Nagel*) de acordo com as instruções do fabricante. 100 ng de RNA constante foram transcritos inversos para cDNA usando iniciadores aleatórios (Roche) e *Superscript II* (*Invitrogen*). RCP quantitativa em tempo real foi realizada em um *Rotorgene3000* (*Cobertt Research*) usando o Ensaio *Primer QuantiTect* para QPCT (QT00013881, *Qiagen*), bem como o kit *QuantiTect SYBR Green RT-RCP* (*Qiagen*). Quantidades absolutas de QC foram determinadas usando seis diluições do DNA padrão externo de QC (QC de comprimento total clonado no vetor pcDNA3) em duplicata. Para verificação da RCP, curvas de fusão do produto foram geradas e *amplicons* simples foram confirmados por meio de eletroforese em gel de agarose. Quantidades absolutas foram determinadas com o *software Rotorgene* versão 4.6 no modo quantificação. Fez-se normalização contra os dois genes de infra-estrutura mais estavelmente expressos HPRT e GAPDH (geNorm). Para análise *Western-Blot*, as amostras cerebrais (50 mg) foram homogeneizadas em tampão (1 ml) contendo Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM e Triton X-100 a 0,5% e glicerol a 10%. O tecido foi homogeneizado por diversos acidentes vasculares cerebrais no homogeneizador *Downs* e submetido a 3 x/10 s de choque ultrassônico. O homogenato resultante foi depurado por meio de centrifugação sob 20.000xg por 25 minutos. Um total de 12 µg de proteína de cada amostra foi separada em Tris-Glicina SDS-PAGE. QC foi detectada usando anticorpos policlonais de coelho purificados elevada contra QC humana recombinante. Para visualização, membranas *blot* foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano-silvestre (Sinalização Celular) em TBS-T contendo 5% (p/v) de leite em pó e, subsequentemente, desenvolvidas usando o Sistema *SuperSignal West Pico* (*Pierce*) de acordo com o protocolo do fabricante.

Exemplo 2: Determinação de taxa de expressão gênica de QC e

CCL2 em células THP-1 estimuladas

Células THP-1 de linhagem celular de leucemia monocítica humana foram cultivadas em suspensão (meio 5×10^5 células por ml) em RPMI-1640 (*Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640 (Invitrogen)*) contendo FCS a 10% (=FBS (*Fetal Bovine Serum*), Soro Fetal Bovino (*Invitrogen*)) e 60 µg/ml de gentamicina (*Invitrogen*) a 37°C em CO₂ a 5% e 95% de atmosfera de ar umidificado.

Para investigar efeitos de estimulação de QC e CCL2, células 2×10^6 foram semeadas em placas de 24 poços (*Greiner*) para meio de cultura de 1 ml sem FCS contendo diferentes concentrações de lipopolissacarídeos (LPS; *Sigma*). Após 24 horas de incubação, o meio foi removido das células por meio de centrifugação (5 minutos 300 x g).

Isolamento de RNA foi realizado com o *Kit Nucleo-Spin[®] RNA II (Macherey & Nagel)* seguido pela determinação da concentração de RNA. Usando o *Kit de Transcriptase Reversa SuperScript[®] II de Invitrogen*, 1 µg de RNA foi transcrito para cDNA.

A taxa de expressão gênica de QC e CCL2 foi determinada via RCP quantitativa com o ciclador *Rotor-Gene[®] 3000* em tempo real. Usando o método comparativo do *software* de operação, a alteração da taxa de expressão gênica das sondas estimuladas comparada com o controle não-estimulado pode ser mostrada. A normalização foi realizada contra o gene de referência YWHAZ (proteína de ativação tirosina 3-mono-oxigenase/triptofano 5-mono-oxigenase). Os resultados são mostrados na figura 2.

Exemplo 3: Determinação da atividade específica de QC em meio condicionado de células THP-1

Células THP-1 5×10^6 foram semeadas em 5 ml de RPMI-1640 (*Invitrogen*) sem vermelho de fenol e sem FCS para frascos de suspensão de 25 cm² (*Greiner*) e estimuladas com diferentes concentrações de LPS (*Sigma*). Após incubação de 24 horas a 37°C e CO₂ a 5%, as células foram separadas do meio, o qual foi reduzido por centrifugação (4.000 x g) usando *Concentradores U-Tube[®]6-10 (Merck, Novagen)* com um MWCO (*Molecula-*

re *Weight Cut Off*) Corte de Peso Molecular de 10 kDa para um volume final de 250 μ l. Seguiu-se a análise da concentração proteica via método *Bradford*. A determinação da atividade específica de QC foi realizada usando um método de HPLC estabelecido *in-house*. Os resultados são mostrados na figura 3.

Exemplo 4: Determinação de atividade de QC

Ensaio fluorométrico

Todas as medições foram realizadas com um *BioAssay Reader HTS-7000Plus* para microplacas (*Perkin Elmer*) a 30°C. Atividade de QC foi avaliada fluorometricamente usando H-Gln-bNA. As amostras consistiram de substrato fluorogênico 0,2 mM, piroglutamil aminopeptidase 0,25 U (*Unizyme, Hørsholm, Dinamarca*) em Tris 0,2 M/HCl, pH 8,0 contendo EDTA 20 mM e uma alíquota de QC apropriadamente diluída em um volume final de 250 μ l. Comprimentos de ondas de excitação/emissão foram de 320/410 nm. As reações de ensaio foram iniciadas por meio de adição de glutaminil ciclase. Atividade de QC foi determinada a partir de uma curva padrão de b-naftilamina sob condições de ensaio. Uma unidade é definida como a quantidade de QC que catalisa a formação de 1 μ mol de pGlu-bNA a partir de H-Gln-bNA por minuto sob as condições descritas.

Em um segundo ensaio fluorométrico, QC foi atividade determinada usando H-Gln-AMC como substrato. Reações foram realizadas a 30°C utilizando o leitor de microplacas *NOVOStar (BMG Labtechnologies)*. As amostras consistiram de concentrações variáveis do substrato fluorogênico, piroglutamil aminopeptidase 0,1 U (*Qiagen*) em Tris 0,05 M/HCl, pH 8,0 contendo EDTA 5 mM e uma alíquota de QC apropriadamente diluída em um volume final de 250 μ l. Comprimentos de ondas de excitação/emissão foram de 380/460 nm. As reações de ensaio foram iniciadas por meio de adição de glutaminil ciclase. Atividade de QC foi determinada a partir de uma curva padrão de 7-amino-4-metilcumarina sob condições de ensaio. Os dados cinéticos foram avaliados usando *software GraFit*.

Ensaio espectrofotométrico de QC

Nesse ensaio, atividade de QC foi analisada espectrofotometri-

camente usando um método contínuo que foi derivado adaptando um ensaio descontínuo anterior (Bateman, R. C. J. 1989; *J. Neurosci. Methods* 30, 23-28) utilizando glutamato desidrogenase como enzima auxiliar. Amostras consistiram do substrato QC respectivo. NADH 0,3 mM, ácido α -cetoglutárico
5 14 mM e 30U/ml de glutamato desidrogenase em um volume final de 250 μ l. Reações foram iniciadas por meio de adição de QC e prosseguidas por meio de monitoração da diminuição na absorbância a 340 nm por 8-15 minutos.

As velocidades iniciais foram avaliadas e a atividade enzimática foi determinada a partir de uma curva padrão de amônia sob condições de
10 ensaio. Todas as amostras foram medidas a 30°C, usando o leitor de microplacas *SPECTRAFluor Plus* ou o *Sunrise* (ambos de TECAN). Dados cinéticos foram avaliados usando *software GraFit*.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de diagnóstico de Doença de Alzheimer (DA), Neurodegeneração em Síndrome de Down (NSD) ou Comprometimento Cognitivo Leve (MCI) em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) detectar a quantidade de glutaminil ciclase (QC), ou uma isoforma da mesma, em uma amostra biológica obtida do indivíduo; e

(b) comparar a quantidade detectada de QC na amostra biológica com uma quantidade de característica de QC de um controle normal;

em que uma quantidade elevada de QC na amostra biológica relativa ao controle normal é um indicador positivo de DA, NSD ou MCI.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) detectar a quantidade de glutaminil ciclase (QC), ou uma isoforma da mesma, em uma amostra biológica obtida do indivíduo; e

(b) adicionalmente detectar a quantidade de A β N3pE-X;

(c) comparar a quantidade detectada de QC e A β N3pE-X na amostra biológica com uma quantidade de QC e característica de A β N3pE-X de um controle normal;

de forma que uma quantidade elevada de QC e A β N3pE-X na amostra biológica relativa ao controle normal é um indicador positivo de DA, NSD ou MCI, e

X é um número inteiro selecionado de 38, 40 e 42.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a amostra biológica é soro, plasma, urina ou fluido cerebrospinal.

4. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a quantidade de QC é detectada por meio de ensaio imunoturbidimétrico, imunofluorescência, imunodifusão, ensaio imunoadsorvente enzimático (ELISA), rádio-imunoensaio (RIA), *Western Blot*, ensaio de atividade proteica, *Northern Blot*, RCP, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa (EM), cromatografia gasosa (CG), CG-EM,

CL-EM ou CL-EM/EM.

5 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a quantidade de QC, ou uma isoforma da mesma, é detectada com base do nível de proteína ou do nível de RNAm da referida QC ou isoforma da mesma.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a quantidade de QC é detectada usando um anticorpo que especificamente se liga a QC, ou uma isoforma da mesma.

10 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a quantidade de QC é detectada medindo a atividade enzimática de QC, ou uma isoforma da mesma.

15 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que não apenas uma única forma dos peptídeos beta-amiloide N-terminalmente truncados e piroglutamatados, mas uma combinação de A β N3pE-42 e/ou A β N3pE-40 e/ou A β N3pE-38, e pGluABri e/ou pGluADan é detectada juntamente com QC.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

20 (a) contatar a amostra biológica com um anticorpo que se liga a glutaminil ciclase (QC), ou suas isoformas;

(b) permitir que o anticorpo e QC formem um complexo imune;

(c) detectar a quantidade de complexo imune formado como uma indicação da quantidade de QC na amostra biológica; e

25 (d) comparar a quantidade detectada com uma amostra de indivíduo de controle normal;

de forma que uma quantidade detectada que é elevada ou reduzida relativa ao controle normal é um indicador positivo de uma doença neurodegenerativa.

FIG. 1

Expressão de QC e formação de $A\beta_{3(pE)-42}$ na prevenção de DA por meio de inibição de QC *in vitro* e *in vivo*

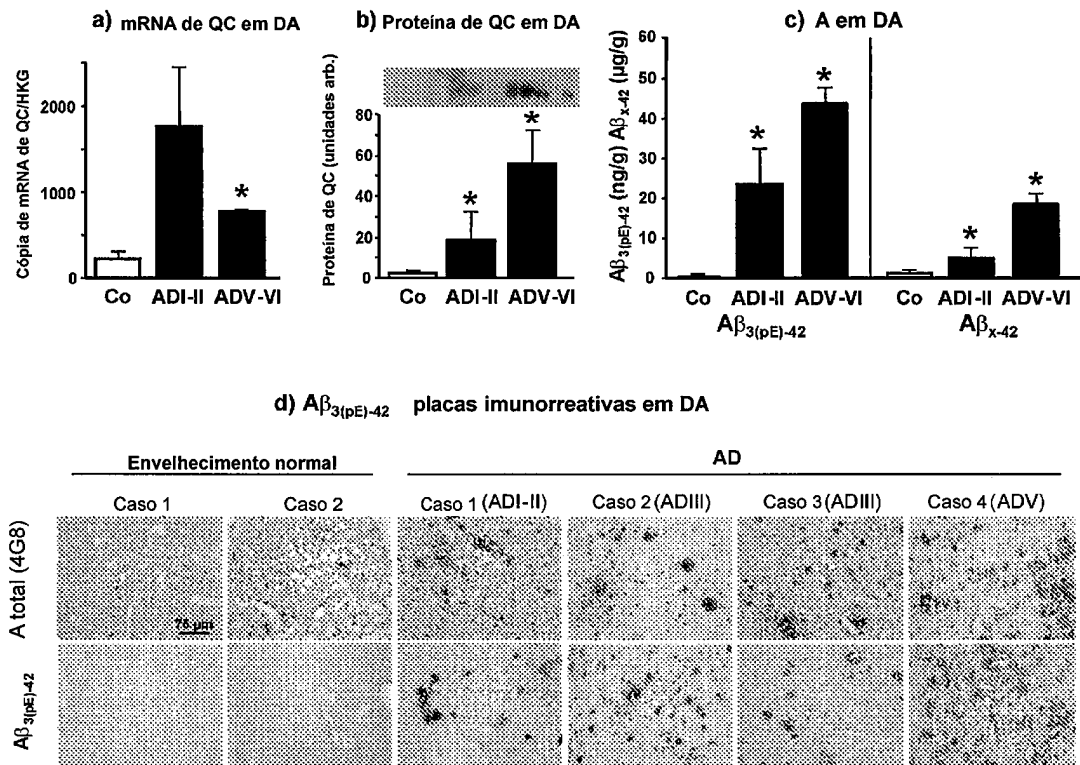


FIG. 2

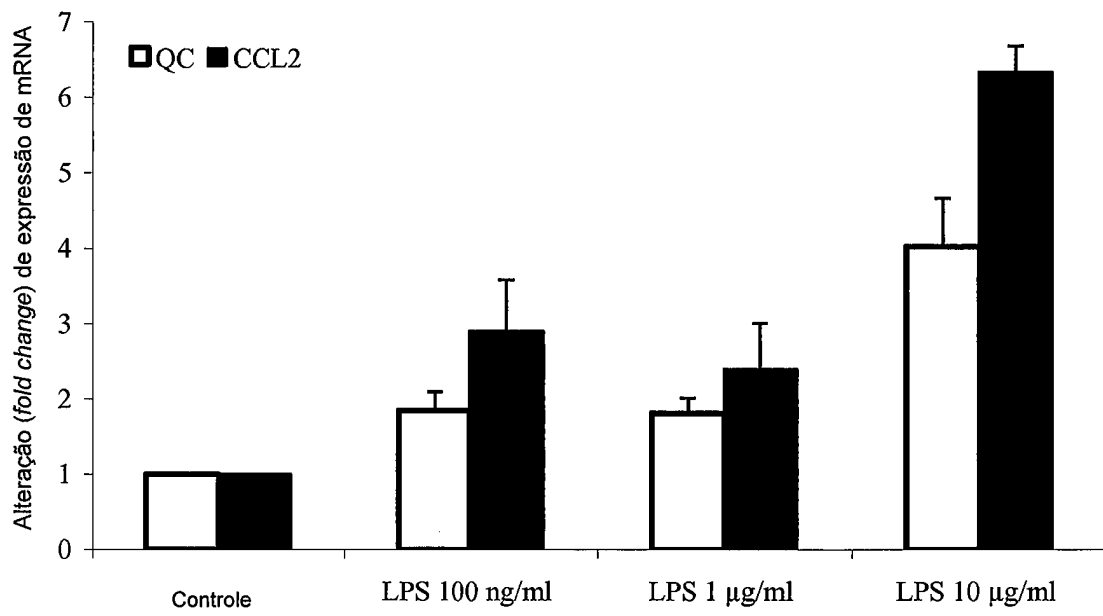


FIG. 3

