



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 924**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08002793 .1**

96 Fecha de presentación : **11.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1953556**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Biomarcadores polipeptídicos para diagnosticar enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **23.08.2002 EP 02018283**
29.11.2002 EP 02026643

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.11.2010

73 Titular/es: **BAYER SCHERING PHARMA**
AKTIENGESELLSCHAFT
Mullerstrasse 178
13353 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Konig, Gerhard;**
Hochstrasser, Denis Francois;
Sánchez, Jean-Charles;
Yalkinoglu, Ozkan A. y
Carrette, Odile

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 347 924 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**Campo de la invención**

La invención está en el campo de los diagnósticos. Más específicamente, la invención está en el campo de evaluar el estrado de la enfermedad de Alzheimer en sujetos por detección de polipéptidos marcadores específicos de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención**Enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer es una forma crecientemente prevalente de neurodegeneración que da cuenta de aproximadamente el 50-60 % de los casos generales de demencia entre la gente por encima de los 65 años de edad. Patológicamente, la neurodegeneración de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por atrofia prominente de estructuras corticolímbicas con muerte neuronal y pérdida de sinapsis neuronales, formación de marañas neurofibrilares, (NFT) y la formación de placas seniles que contienen depósitos de agregados de β 1-42 amiloide (A β 42) en el cerebro [Francis PT 1999]. La duración del declive cognitivo progresivo es aproximadamente 7 años desde la aparición de los primeros signos hasta la muerte. Se asume que la fase clínica está precedida por un periodo preclínico de 15-30 años de deposición continua de placas amiloides y marañas neurofibrilares. La edad de aparición y la progresión de la enfermedad están grandemente determinadas por las mutaciones de los genes causantes y por factores genéticos de susceptibilidad. Se pueden añadir varios factores de riesgo ambientales a los factores de riesgo genéticos individuales. Los factores genéticos conocidos por estar implicados en la forma familiar de enfermedad de Alzheimer con aparición temprana de la enfermedad son: mutaciones en genes de presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2) y proteína precursora amiloide (APP) y la presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E4. Sin embargo, la mayoría (95 %) de los casos de enfermedad de Alzheimer son esporádicos y heterogéneos.

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

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

Dado que el CSF rodea directamente el cerebro, los cambios en su composición proteica pueden reflejar con la mayor seguridad afecciones patológicas que están asociadas con alteraciones específicas de los patrones de expresión proteicos. Durante la última década, se ha comunicado un número de anormalidades biológicas en el fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes de enfermedad de Alzheimer, en particular niveles alterados del fragmento A β 1-42 de la proteína precursora amiloide y niveles alterados de la proteína tau hiperfosforilada. La sensibilidad y especificidad de estos marcadores, sin embargo, es baja o solo modesta [El Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association y el National Institute on Aging Working Group, 1998, Robles A 1998, Teunissen CE y col., 2002].

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

Tecnología de Chip Proteico

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

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

Cistatina C

Descrita inicialmente en 1961 en el fluido cerebroespinal (CSF), la cistatina C (traza de γ -

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

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

Leung-Tack y *col.* han purificado también dos isoformas truncadas N-terminales de cistatina C en orina a partir de un paciente quien había recibido transplante renal. De acuerdo con sus datos, la cistatina C (des1-4) tiene un efecto inhibidor sobre dos funciones de células mononucleares periféricas humanas (PMN): liberación de O₂ y fagocitosis, que pueden deberse a la secuencia N-terminal 'KPPR'. Sus datos respaldan un papel potencialmente importante para cistatina C como un posible inmunomodulador durante inflamación. La evidencia que se acumulan indican que el daño mediado por radicales libres incrementado a la función celular contribuye al proceso de envejecimiento y a los trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad. El estrés oxidativo puede jugar un papel en la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). Aunque el daño de los radicales libres a neuronas puede no ser el evento principal que inicie estas enfermedades, parece que el daño de los radicales libres está implicado en la cascada patogenética de estos trastornos.

Beta-2-microglobulina

La beta-2-microglobulina (nº de acceso P01884) constituye el componente constante pequeño del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) de clase I y su presencia en los fluidos biológicos representa el equilibrio entre el recambio y la eliminación de proteína de membrana.

Dado que este péptido parece estar incrementado en algunas enfermedades caracterizadas por una elevación de la respuesta inmune, su cuantificación en fluidos corporales ha llegado a ser un índice útil del estado inmunológico *in vivo* [Hoekman y col. 1985]. La función de esta proteína está poco claro, pero parece estar implicada en enfermedades, que implican

5 destrucción de células gliales [Ernerudh y col. 1987].

Se ha descrito un fragmento de este péptido en el documento WO0171357 A.

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

10 **Proteína Neurosecretora (VGF)**

VGF (VGF humana, nº de acceso 015240) es un precursor peptídico secretor que se expresa y procesa por las células neuronales [Cann y col. 1997]. Los estudios de hibridación *in situ* en el sistema nervioso central de la rata adulta han revelado que el mRNA de VGF está ampliamente distribuido por todo el cerebro con expresión prominente en el hipocampo, el córtex entorrinal y

15 el neocórtex. Además, se ha mostrado que la transcripción y secreción de VGF se regula selectivamente por neurotrofinas como NGF y BDNF y por depolarización *in vitro*. La expresión de BDNF incrementada se puede observar en la circunvolución dentada y las regiones CA3 del hipocampo, que son tejidos que parecen morir pronto en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

20 **Descripción de la invención**

La invención se basa en el hallazgo sorprendente de que los polipéptidos específicos se expresan de forma diferente en sujetos que tienen enfermedad de Alzheimer cuando se comparan con un grupo control sano. Estos polipéptidos expresados de manera diferenciada pueden, por ejemplo, detectarse en muestras de fluido cerebroespinal del sujeto en el que se

25 está diagnosticando la enfermedad de Alzheimer. Los polipéptidos individuales de la invención según se definen en las reivindicaciones se pueden detectar y/o cuantificar solos o en combinación con otros polipéptidos de la revelación.

Los marcadores polipeptídicos de la revelación se definen por su peso molecular respectivo. Cinco marcadores identificados por el procedimiento de SAX2 como se describen en los

30 ejemplos muestran las siguientes masas moleculares:

Marcador 1 (M1): 4824 ± 20 Da;

Marcador 2 (M2): 7691 ± 20 Da;

Marcador 3 (M3): 11787 ± 20 Da;

Marcador 4 (M4): 11988 ± 20 Da;

35 Marcador 5 (M5): 13416 ± 20 Da.

En la presente invención se reivindican los polipéptidos que tienen la secuencia de SEQ ID N°: 4-6 y el uso de la misma en un procedimiento de evaluar la enfermedad de Alzheimer. El procedimiento puede usar también: SEQ ID N°: 3. La SEQ ID N°: 3-6 se origina a partir de los marcadores M3 o M4.

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

10

Tabla 1:

Marca-dor	Peso molecular observado por SELDI	Secuencia de Aminoácidos	Nombre de la Proteína
M1	4823,5 Da $\pm$ 1,7	VGEEDEEEAAEAEAEAAER	VGF4.8
M2	7691,4 Da $\pm$ 4,9	XXAD(L/I)AGHG(Q/K)EV(L/I)(L/I)R HGTVV(L/I)TA(L/I)GG(L/I) (L/I)K	variante nueva de mioglobina humana
M3 M4	11786,9 Da $\pm$ 7,6 11988,4 Da $\pm$ 5,9	VNHVTLSQPK VEHSDLSFSK IEKVEHSDLSFSK SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK	beta-2-microglobulina humana

M5	13416,4 Da $\pm$ 9,4	ASNDMYHSR ALDFAVGEYNK RALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVRR QIVAGVNYFLDVELGR LVGGPMDASVEEEGVRR KQIVAGVNYFLDVELGR TQPNLDNCPFHDQPPHLK TQPNLDNCPFHDQPPHLKR SSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVRR	cistatina humana	C
----	----------------------	---	---------------------	---

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

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

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

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

La invención también se refiere al uso de espectrometría de masas (EM) para detectar enfermedad de Alzheimer en sujetos humanos y para evaluar la progresión de la enfermedad

de Alzheimer en sujetos humanos detectando y/o cuantificando la cantidad de polipéptidos específicos en muestras extraídas de los fluidos corporales del sujeto. En una realización preferida de la invención, la muestra puede extraerse del fluido cerebroespinal del sujeto (CSF). La detección y/o la cuantificación de los polipéptidos de la invención y revelación se lleva a cabo preferentemente cuantificando la señal que se detecta por EM a masa molecular específica frente a proporciones de carga (M/z) que corresponden a las proporciones M/z de los polipéptidos de la invención y revelación. Preferentemente, se miden también las proporciones M/z cercanas a uno de los polipéptidos de la invención y revelación.

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

SELDI ProteinChip™ el/los marcador(es) enriquecido(s) selectivamente por el anticuerpo inmovilizado se pueden detectar y cuantificar por espectrometría de masas de ionización por desorción por láser ayudada por matriz.

La invención se refiere específicamente a SEQ ID N°: 4-6 un kit que comprende estas secuencias y un procedimiento que usa SEQ ID N°: 3-6 según se define en las reivindicaciones.

La revelación también se refiere a

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

- 10 i) un polipéptido que tiene una masa molecular de 4824 ± 20 Da,
- ii) un polipéptido que tiene una masa molecular de 7691 ± 20 Da,
- iii) un polipéptido que tiene una masa molecular de 11787 ± 20 Da,
- iv) un polipéptido que tiene una masa molecular de 11988 ± 20 Da y
- v) un polipéptido que tiene una masa molecular de 13416 ± 20 Da.

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

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

25 diagnosticar la presencia de enfermedad de Alzheimer en un sujeto o un paciente, como evaluar la progresión de la enfermedad en un sujeto o un paciente, y/o como evaluar la propensión de un sujeto a desarrollar enfermedad de Alzheimer.

2. La invención se refiere adicionalmente al procedimiento según se define en las reivindicaciones en el que se detectan 2, o 3, o 4, o 5 polipéptidos de dicho grupo de péptidos.

- 35 La invención se refiere también a un procedimiento del punto 1 en el que se detectan 2, o 3, o 4,

o 5, o 10 o todos los polipéptidos de dicho grupo de péptidos.

3. La revelación se refiere adicionalmente a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido que comprenda la secuencia de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ

5 ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 15, y/o SEQ ID N°: 16. La

revelación se refiere adicionalmente a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido que comprenda la secuencia de SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID

10 N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, y/o SEQ ID N°: 17.

Mientras que la detección de un polipéptido tal es en la mayoría de los casos suficiente para diagnosticar de forma confiable la enfermedad de Alzheimer, la detección de dos o más polipéptidos de la invención o revelación puede incrementar la sensibilidad y solidez del

15 procedimiento. Preferentemente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, o todos de dichos polipéptidos se detectarán a partir de la misma muestra. La detección se puede llevar a cabo también simultáneamente con la detección de otros polipéptidos que preferentemente se expresan también de manera diferencial en sujetos que tienen enfermedad de Alzheimer comparados con sujetos sanos.

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

i) cistatina C humana,

ii) beta-2-microglobulina humana,

iii) mioglobina humana (variante nueva),

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

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

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

La revelación se refiere adicionalmente a un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que comprende detección de al menos un polipéptido

30 comprendido en un grupo de polipéptidos constituido por

i) cistatina C humana,

ii) beta-2-microglobulina humana,

iii) mioglobina humana (variante nueva),

iv) proteína VGF neurosecretora humana,

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

- vi) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana,
- vii) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de mioglobina humana (variante nueva),
y
- viii) un fragmento de al menos 5, 8, 10, o 20 aminoácidos de proteína neurosecretora VGF.

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

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

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

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

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

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

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

30 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1:

Intensidades promedio de los cinco péptidos marcadores de la Tabla 1, que se expresan de manera diferencial en el grupo que ha enfermado cuando se compara con los controles.

Ejemplos

35 La revelación se describe adicionalmente por uno o varios de los siguientes ejemplos. Estos

ejemplos no se entienden como que restringen el alcance de la invención a los ejemplos por cualesquiera medios.

Ejemplo 1: Evaluación de pacientes y muestreo de CSF

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

Se dio por cada paciente y por los cuidadores de los pacientes consentimiento informado antes de la investigación. El estudio se aprobó por el comité de ética local. Después de punción lumbar, las muestras de CSF se congelaron en hielo inmediatamente tras la retirada en la cabecera de la cama en alícuotas de 0,5 ml y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta análisis.

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

Se equilibró una disposición de chip proteico de SAX 2 (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EE.UU.) durante 5 minutos con 5 μl de tampón de unión (acetato de Na 100 mM pH = 4,0). El tampón se retiró cuidadosamente con un pañuelo y se añadieron 2,5 μl de tampón de unión a los pocillos. Se añadieron muestras de CSF en bruto (2,5 μl) a los pocillos y se incubaron durante 20
20 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad en una plataforma de balanceo. Se eliminó CSF y los pocillos se lavaron individualmente con 10 μl de tampón de unión durante 5 minutos. Las disposiciones se situaron después en un eppendorf cónico de 15 ml y se lavaron dos veces con el tampón de unión durante 5 minutos. Finalmente, el chip se aclaró dos veces con agua destilada. Se eliminó el exceso de H_2O y mientras la superficie estaba aún húmeda, se
25 llevaron a cabo dos adiciones por pocillo de 0,5 μl de ácido sinapínico (SPA) (2 mg/ml) en acetonitrilo al 50 % (volumen/volumen) y ácido trifluoroacético al 0,5 % (volumen/volumen) y se secaron. Los ensayos se leyeron después en un sistema lector de chip proteico, serie PBS II (Ciphergen Biosystems). El haz de láser se enfocó después sobre la mezcla en el vacío. Esto causó que las proteínas absorbidas a la matriz llegasen a ionizarse y, simultáneamente a
30 desadsorberse de la superficie de la disposición de chip proteico.

Las proteínas ionizadas se detectaron y sus masas moleculares se determinaron según su dispersión (TOF). Los espectros de masas de TOF, recogidos en la modalidad de ion positivo se generaron usando un promedio de 65 disparos láser a través del sitio a un ajuste de energía de láser ligeramente por encima del umbral (10-15 % más alta que el umbral). La masa alta a
35 adquirir se estableció a 40 kDa, optimizado desde 1 hasta 15 kDa. Los espectros se recogieron

y analizaron usando el software de chip proteico Ciphergen (versión 3.0). La calibración externa del lector se llevó a cabo usando los estándares de peso molecular peptídicos de "todo en uno" (Ciphergen biosystems, Inc.) diluidos en la matriz de SPA (1:1, volumen/volumen) y aplicados directamente sobre un pocillo. Se llevó a cabo comparación de perfiles proteicos después de normalización en corriente iónica total de todos los espectros incluidos en el mismo experimento. La reproducibilidad se probó analizando diferentes alícuotas de la misma muestra de CSF en 4 pocillos diferentes de la misma disposición de chip proteico (reproducibilidad intrachip intraensayo), en dos chips diferentes (reproducibilidad interchip intraensayo) procesados en paralelo y reproducidos en un experimento distinto (reproducibilidad interensayo).

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

Ejemplo 3: Cromatografía de intercambio aniónico fuerte. Purificación de (SAX)

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

La columna rotatoria SAX, número de lote SAX2-001116-01, (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EE.UU.) se rehidrató durante toda una noche a 4 °C en el tampón de equilibración (clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) 20 mM, NaCl 5 mM, pH 9,0). La columna se calentó a temperatura ambiente y se eliminaron las burbujas de aire. El tampón de equilibración se dejó fluir a través de la matriz de columna por gravedad. El tampón de equilibrio (0,5 ml) se añadió a la columna y se hizo pasar a través de la resina dos veces. Se diluyeron dos mililitros de CSF control en el tampón de equilibración (1:1, volumen/volumen). La muestra proteica se cargo a la columna en fracción de 0,8 ml y se dejó avanzar a través de la columna por gravedad hasta que no vino ninguna gota de la columna. La columna se centrifugó después a 150 x g durante 1 minuto. La resina se lavó después con un volumen equivalente de tampón de equilibración. Esta etapa se repitió varias veces con el fin de cargar la muestra completa sobre la resina. Se llevó a cabo la elución de las proteínas unidas disminuyendo el pH. El tampón de elución A consistió en Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM pH 8,0; tampón de elución B = fosfato de sodio 20 mM pH 7,0; tampón de elución C = fosfato de sodio 20 mM pH 6,0; tampón de elución D = fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 5,0; tampón de elución E = fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 4,0; tampón de elución F = fosfato de sodio y citrato de sodio 20 mM pH 3,4; tampón de elución G = acetonitrilo al 30 % en tampón de elución F. La elución se llevó a

cabo aplicando 2 x 75 µl del tampón de elución y centrifugación a 150 x g durante 1 min. Cada fracción recogida (150 µl) se concentró en un concentrador de vacío a un volumen de 10 µl. Los perfiles proteicos se analizan en EM de SELDI-TOF usando ensayos de chip proteico de SAX 2. El chip se equilibró con un tampón de unión constituido por Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH = 9,0. Una alícuota de 0,5 µl de cada fracción concentrada se aplicó directamente sobre 2,5 µl de tampón de unión por sitio y se procesó como se describe previamente. El resto de las fracciones se cargaron sobre un gel de Tris glicina como se describe más adelante.

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 4: electroforesis monodimensional/geles de Tris Glicina

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

Ejemplo 5: electroforesis monodimensional: geles de Tris Tricina

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

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

Los fragmentos de geles que contienen proteínas de interés se cortaron por digestión de las proteínas con tripsina usando procedimientos publicados previos [Shevchenko 1996, Hellman 1994, Rosenfeld 1992] y se modificaron como se describe a continuación.

La pieza de gel se destiñó primero con 100 μl de bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo al 30 % (v/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución de desteñido se retiró y se reemplazó por 25 μl de DL-ditiotreitol (DTT) 10 mM en bicarbonato de amonio 50 mM y se incubó 35 minutos a 56 °C. La solución de DTT se reemplazó después por 25 μl de yodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 50 mM y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Las piezas de gel se lavaron durante 10 minutos con 100 μl de bicarbonato de amonio 50 mM y durante 10 minutos con 100 μl de bicarbonato de amonio 50 mM y acetonitrilo al 30 % (v/v).

Las piezas de gel se secaron después durante 30 minutos en una centrífuga de vacío Hetovac

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

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

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

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

Antes de separación por nanoCL (CL = cromatografía líquida), los volúmenes de soluciones que contienen péptidos se ajustaron a 7 µl por adición de una solución de ácido fórmico al 0,1 % (v/v).

Las muestras se asentaron en un automuestreador Triathlon (Spack, Emmen, Holanda). Para cada experimento, se inyectaron 5 µl de la solución conteniendo péptidos en una columna de fase reversa de C18 de diámetro interno de 75 µm (YMS-ODS-AQ200, Michrom Bioresource, Auburn, CA). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo (ACN) en presencia de
5 ácido fórmico al 0,1 % (v/v), usando bombas SunFlow (SunChrom, Friderichsdorf, Alemania). Se usó un divisor de flujo con el fin de disminuir el caudal después de las bombas desde 200 hasta 0,4 µl/minuto. Se analizaron péptidos con un espectrómetro de masas de dispersión cuádrupolar (Q-TOF) (Micromass, Wythenshawe, Inglaterra). Se aplicó una tensión de 2700 V en el capilar de nanoelectropulverización (New Objective, Woburn, MA, EE.UU.). Se usó argón como gas de
10 colisión. La energía de colisión se estableció como una función de la masa iónica precursora. Se adquirieron espectros de EM/EM por conmutación automática entre modo EM y modo EM/EM. Los datos de EM/EM adquiridos se convirtieron en un formato compatible (archivos DTA) por software ProteinLynx (Micromass, Wythenshawe, Inglaterra) y se analizaron usando motores de búsqueda convencionales frente a bases de datos SWISS-PROT, TrEMBL, NCBIInr y EST.
15 En casos de interpretación manual de datos de EM/EM, la identificación se llevó a cabo por búsqueda sólo de secuencia.
Se encontró que el marcador M5 era un fragmento de cistatina C, los marcadores M3 y M4 eran isoformas de beta-2-microglobulina y M2 era una variante nueva o un homólogo nuevo de mioglobina. Se encontró que el marcador M1 es un fragmento de la proteína neurosecretora
20 VGF.

Ejemplo 9: Análisis Estadístico

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

Ejemplo 10: Aislamiento del Fragmento de 4,8 kDa (Marcador M1)

Se fraccionaron algunas muestras de CSF de pacientes control por dispositivo de filtración Centricon 30 (Millipore Corp., Bedford, MA) con el fin de eliminar la proteína con un peso molecular más alto que 30 kDa. Se eliminaron la sal y el polipéptido con un peso molecular menor de 3 kDa usando un Centricon 3 (Millipore Corp., Bedford, MA). El Centricon 3 se lavó
30 después con agua destilada ultrapura. En esa fracción de lavado, se encontró que el componente de 4,82 kDa es el componente principal. Esta fracción líquida se redujo primero con una solución 10 mM de 1,4-ditioeritritol durante 1 hora a 56 °C, después se alquiló con yodoacetamida 54 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el polipéptido se digirió con 6 mg/l de tripsina durante toda una noche a 37 °C. Esta fracción líquida se analizó por nanoCL y Q-TOF
35 como se describe previamente.

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

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

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

Superficie H50 hidrófoba: 7 picos

Marcador 1: $4769 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 2: $6958 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 3: $6991 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 4: $13412 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 5: $13787 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 6: $17276 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 7: $40437 \pm \text{s.d. Da}$

Superficie IMAC Cu: 5 picos

Marcador 1: $6895 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 2: $6928 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 3: $7691 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 4: $7769 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 5: $7934 \pm \text{s.d. Da}$

Superficie WCX2: 5 picos

Marcador 1: $5082 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 2: $6267 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 3: $6518 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 4: $7274 \pm \text{s.d. Da}$

Marcador 5: $8209 \pm \text{s.d. Da}$

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

Bibliografía

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

Asgeirsson B, Haebel S, Thorsteinsson L, Helgason E, Gudmundsson KO, Gudmundsson G, Roepstorff P. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: monitoring the presence of the
 5 Leu68Gln cystatin C variant in cerebrospinal fluid and monocyte cultures by MS. *Biochem J.* 1998, 329, 497-503.

Beyer K, Lao JI, Gomez M, Riutort N, Latorre P, Mate JL, Ariza A. Alzheimer's disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neuroscience letters.* 2001, 315, 17-20.

Canu N, Possenti R, Ricco AS, Rocchi M, Levi A. Cloning, structural organization analysis, and
 10 chromosomal assignment of the human gene for the neurosecretory protein VGF. *Genomics* 1997, 45 (2), 443-446.

Cohen DH, Feiner H, Jensson O, Frangione B. Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHW A-I) is related to the gastroentero-pancreatic neuroendocrine protein. *J. Exp. Med.* 1983, 158, 623-628.

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

Crawford U, Freeman MJ, Schinka JA, Abdullah LI, Gold M, Hartman R, Krivian K, Morris MD, Richards D, Duara R, Anand R, Mullan MJ. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology.* 2000, 55, 763-768.

20 Davies, H.A. 2000. The ProteinChip(R) System from Ciphergen: A new technique for rapid, micro-scale protein biology. *J. Molecular Medicine*, 78 (7): B29 Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, Growdon JH, Rebeck GW. Elevation of Cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 2001, 159, 1061-1068.

Ernerudh J, Olsson T, Berlin G, von Schenck H. Cerebrospinal fluid immunoglobulins and beta 2-
 25 microglobulin in lymphoproliferative and other neoplastic diseases of the central nervous system. *Arch Neurol.* 1987, 44 (9), 915-20.

Finckh U, Von der Kammer H, Velden J, Michel T, Andresen B, Deng A, Zhang J, Muller-Thomsen T, Zuchowski K, Menzer G, Mann U, Papassotiropoulos A, Heun R, Zurdell J, Holst F, Benussi L, Stoppe G, Reiss J, Miserez AR, Staehelin HB, Rebeck W, Hyman BT, Binetti G, Hock
 30 C, Growdon JH, Nitsch RM. Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer's disease. *Arch Neurol.* 2000, 57, 1579-1583.

Francis, P.T. et al. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1999, 66(2): 137-147 Fung, ET et al. Protein biochips for differential profiling. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12 (1): 65-69.

Ghiso J, Jensson O, Frangione B. Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with
 35 amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proc Natl*

Acad Sci USA. 1986; 83 (9): 2974-8.

Ghiso J, Pons-Estel B, Frangione B. Hereditary cerebral amyloid angiopathy: the amyloid fibrils contain a protein which is a variant of cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; 136 (2): 548-54.

- 5 Gras R, Müller M, Gasteiger E, Gay S, Binz PA, Bienvenut WV, Hoogland C, Sanchez JC, Bairoch A, Hochstrasser DF, Appel R. Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterised multi-level scoring algorithm and an optimised peak detection. *Electrophoresis* 1999, 20: 3535-3550.

- 10 Grubb AO, Jensson O, Gudmundsson G, Arnason A, Lofberg H, Malm J. Abnormal metabolism of g-trace alkaline microprotein. The basic defect in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *N. Engl. J. Med* 1984, 311, 547-1549.

Hellman U, Wernstedt C, Góñez, J, Heldin CH. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem*. 1995, 224, 451-5.

- 15 Hoekman K, Van Nieuwkoop JA, Willemze R. The significance of beta-2 microglobulin in clinical medicine. *Neth JMed*. 1985; 28 (12): 551-7.

Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, Benkovic SJ, Lemer RA. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. 1989, *Science* 246: 1275-1281.

- 20 Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002, 292 (3): 587-592.

- 25 Kalman J, Marki-Zay J, Juhasz A, Santha A, Dux L, Janka Z. Serum and Cerebrospinal fluid cystatin C levels in vascular and Alzheimer's dementia. *Acta Neurol. Scand*. 2000, 101, 279-282.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(259): 680-5.

- 30 Leung-Tack J, Tavera C, Gensac MC, Martinez J, Colle A. Modulation of phagocytosis-associated respiratory burst by human cystatin C: role of the N-terminal tetrapeptide Lys-Pro-Pro-Arg. *Exp. Cell Research*. 1990, 188, 16-22.

Levy E, Sastre M, Kumar A, Gallo G, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Codeposition of cystatin C with amyloid-beta protein in the brain of Alzheimer's disease patients. *J. Neuropathol Exp Neurol* 2001, 60, 94-104.

- 35 Merchant M, Weinberger SR.. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1164-1167.

Popovic T, Brzin J, Ritonja A, Turk V. Different forms of human Cystatin C. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1990, 371, 575-580.

Raymackers J, Daniels A, DeBrabandere V, Missiaen C, Dauwe M, Verhaert P, Vanmechelen E, Meheus L. Identification of two dimensionally separated human cerebrospinal fluid proteins by N-terminal sequencing, matrix-assisted laser-desorption/ionization-mass spectrometry, nanoliquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry, and tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, 21, 2266-2283.

The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and the National Institute on Aging Working Group. Consensus Report of the Working Group on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". *Neurobiology of Aging*, 1988, 19 (2): 109-116.

Robles A.. Some Remarks on biological markers of Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, 1998, 19 (2): 153-157.

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem*. 1992, 203, 173-9.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem*. 1996, 68, 850-8.

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

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

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

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

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

Ward ES et al., Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 1989, 341, 544-546.

Wei L, Berman Y, Castano EM, Cadene M, Beavis RC, Devi L, Levy E. Instability of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *J. Biol. Chem*. 1998, 273, 11806-11814.

Wulfkuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 2001, 1 (10): 1205-1215.

Xiao Z, Adam BL, Cazares LH, Clements MA, Davis JW, Schellhammer PF, Dalmasso EA, Wright GL. Quantitation of serum prostate-specific membrane antigen by a novel protein biochip immunoassay discriminates benign from malignant prostate disease. 2001, *Cancer Research* 61

(16): 6029-6033.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Bayer AG
 <120> Biomarcadores para la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer
 5 <130> LeA 36 293
 <160> 17
 <170> PatentIn version 3.1

 <210> 1
 10 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_característica
 15 <222> (1)...(2)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (5)...(5)
 20 <223> Xaa = L o I
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Q o K
 25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (13)...(13)
 <223> Xaa = L o I
 <220>
 30 <221> misc_característica
 <222> (14)...(14)
 <223> Xaa = L o I

 <400> 1
 35

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

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)...(14)

<223> Xaa = L o I

10 <220>

<221> misc_característica

<222> (1)...(14)

<223> Xaa = Leu o Ile

15 <400> 2

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

<210> 3

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

25

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

5

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

<210> 5

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

15

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

25

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala	Ser	Asn	Asp	Met	Tyr	His	Ser	Arg
1				5				

5 <210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 8

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

<210> 9

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

20

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

<210> 10

<211> 16

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

30

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

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

10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 12

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

20 <210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 13

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

<210> 14

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 14

```

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

<210> 15
 10 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 15

```

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

<210> 16
 <211> 24
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

```

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

25

<210> 17

<213> Homo sapiens

5 <400> 17

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene la secuencia de SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 6.

5 2. Un procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende la detección de un polipéptido seleccionado del grupo constituido por la secuencia de SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 6 en una muestra del sujeto.

10 3. Procedimiento de evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 2, en el que se detecta al menos un polipéptido adicional seleccionado del grupo constituido por polipéptidos que comprenden SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17 o seleccionado del grupo constituido por cistatina C humana, beta-2-microglobulina humana, el homólogo de 7,7 kD de mioglobina humana, proteína VGF neurosecretora, un fragmento de al menos 5 aminoácidos de cistatina C
15 humana, un fragmento de al menos 5 aminoácidos de beta-2-microglobulina humana, un fragmento de al menos 5 aminoácidos del homólogo de 7,7 kD de mioglobina humana y un fragmento de al menos 5 aminoácidos de proteína VGF neurosecretora.

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

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

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

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

30 8. Un kit para evaluar el estado de la enfermedad de Alzheimer que comprende un polipéptido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 6.

Figura 1:

