

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.08.11	(73) Titular(es): BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT MÜLLERSTRASSE 178 13353 BERLIN DE
(30) Prioridade(s): 2002.08.23 EP 02018283 2002.11.29 EP 02026643	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.06.01	(72) Inventor(es): ÖZKAN YALKINOGLU DE GERHARD KÖNIG US DENIS FRANCOIS HOCHSTRASSER CH JEAN-CHARLES SANCHEZ CH ODILE CARRETTE FR
(45) Data e BPI da concessão: 2008.08.06 215/2008	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MARCADORES BIOLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

(57) Resumo:

RESUMO**"MARCADORES BIOLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE
ALZHEIMER"**

A invenção descreve um método para a avaliação do estado da doença de Alzheimer em pacientes, bem como um método para a monitorização da evolução desta doença nos referidos pacientes. O método utiliza a detecção de marcadores peptídicos específicos, p. ex., recorrendo à análise por espectrometria de massa.

DESCRIÇÃO

"MARCADORES BIOLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE ALZHEIMER"

Campo da invenção

A presente invenção situa-se na área do diagnóstico. Mais especificamente, a invenção situa-se na área de avaliação do estado da doença de Alzheimer em indivíduos através da detecção de marcadores polipeptídicos específicos desta doença.

Antecedentes da invenção

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma forma de neurodegeneração cada vez mais comum, e que corresponde a aproximadamente 50 a 60% dos casos de demência nas pessoas com mais de 65 anos de idade. Patologicamente, a neurodegeneração associada à doença de Alzheimer é caracterizada pela atrofia significativa das estruturas límbicas corticais, com morte neuronal e perda de sinapses neuronais, formação de tranças neurofibrilares (NFT) e de placas senis que contêm depósitos de agregados amilóides β 1-42 (A β 42) no cérebro [Francis PT 1999]. A duração do declínio cognitivo progressivo é de aproximadamente 7 anos a contar da ocorrência dos primeiros sinais até à morte. Assume-se que a fase clínica é precedida por um período pré-clínico de 15 a 30 anos de deposição contínua de placas amilóides e

tranças neurofibrilares. A idade de aparecimento dos primeiros sintomas e a progressão da doença são predominantemente determinadas pelas mutações do gene causador da doença e por factores de susceptibilidade genética. Para além dos factores de risco genéticos individuais, dos podem existir também vários factores de risco ambientais. Os factores genéticos que se sabe que estão envolvidos na forma familiar da doença de Alzheimer com o aparecimento precoce dos primeiros sintomas incluem: mutações nos genes da presenilina 1 (PS1), presenilina 2 (PS2) e proteína precursora da amilóide (APP), bem como a presença do alelo E4 da apolipoproteína. No entanto, a maioria (95%) dos casos de doença de Alzheimer é esporádica e heterogénea.

Actualmente, o diagnóstico clínico da doença de Alzheimer pode apenas ser feito nas fases finais da doença, quando o desempenho cognitivo já se encontra significativamente diminuído, em paralelo com alterações estruturais do cérebro. Os procedimentos de diagnóstico clínico requerem um historial médico cuidadoso, exames físicos e neurológicos, análises ao sangue, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR), de forma a excluir estados de doenças metabólicas e médicas que possam estar a mascarar a doença de Alzheimer. Incluem também exames psicométricos detalhados para avaliar o estado mental e o desempenho cognitivo, bem como técnicas de imagiologia, como a tomografia axial computadorizada ou a imagem por ressonância magnética do cérebro. As avaliações de testes de diagnóstico por centros especializados apresentam uma precisão de cerca de 80 a 85%. Devido ao facto de estes testes serem dispendiosos, bastante morosos e

particularmente inconvenientes para os pacientes, existe uma necessidade crescente da descoberta de marcadores biomoleculares específicos de fácil acesso para o diagnóstico da doença, podendo estes serem medidos em fluidos corporais, como LCR, sangue ou urina, tendo ao mesmo tempo, um elevado valor de diagnóstico da doença de Alzheimer, ou que possam ajudar a distinguir a doença de Alzheimer de outras formas de demência. Mais ainda, os marcadores fiáveis sensíveis à progressão da doença podem constituir parâmetros de substituição, um pré-requisito maior para a avaliação e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas causais e modificadoras da doença, no que diz respeito à doença de Alzheimer.

Já que o LCR se encontra directamente em volta do cérebro, quaisquer alterações na sua composição proteica pode reflectir de forma objectiva as condições patológicas associadas às alterações específicas dos padrões de expressão das proteínas. Durante a última década, foram relatadas várias anomalias biológicas relacionadas com o líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes com doença de Alzheimer, em particular, níveis alterados do fragmento A β 1-42 da proteína precursora amilóide, e níveis alterados de proteína tau hiperfosforilada. No entanto, a sensibilidade e especificidade destes marcadores é baixa ou modesta [*The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association e National Institute on Aging Working Group, 1998, Robles A 1998, Teunissen CE et al., 2002*].

Deste modo, existe a necessidade de se conhecerem novos biomarcadores com suficiente sensibilidade e especificidade para (i) detectar a doença de Alzheimer o mais precocemente

possível, e (ii) permitir a diferenciação da doença de outros tipos de demência ou doenças neurodegenerativas, e (iii) vigiar a eficácia terapêutica do parâmetro de substituição, p. ex., no desenvolvimento clínico de fármacos, e iniciar a farmacoterapia o mais cedo possível, adiando a perda de memória e a evolução da doença.

Tecnologia de ProteinChip (chip de proteínas)

Foi recentemente desenvolvida a tecnologia de chip de proteínas chamada *Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation time of flight mass spectrometry* (espectrometria de massa em "tempo de voo" mediante dessorção/ionização por laser de superfície melhorado) (SELDI-TOF MS) para facilitar a elaboração do perfil proteico de misturas biológicas complexas [Davies HA 2000, Fung ET 2001, Merchant M 2000].

A espectrometria de massa por chip de proteínas foi utilizada por vários grupos para detectar potenciais biomarcadores dos cancros da próstata e bexiga [Adam BL 2001] ou do cancro da mama [Wulfschlegel JD 2001] em amostras de soro, plasma seminal, fluido mamário, urina ou células. Para uma perspectiva da pesquisa de biomarcadores através de SELDI-TOF MS, consulte [Issaq HJ 2002].

Cistatina C

Descrita pela primeira vez em 1961 no líquido cefalorraquidiano (LCR), a cistatina C (globulina traço γ ou pós- γ , Ac. n.º P01034) é uma proteína de baixo peso molecular inibidora da protease da cistina em todos os

fluidos corporais humanos e em concentrações fisiologicamente relevantes. É provável que o papel fisiológico da cistatina C regule a actividade extracelular da protease da cisteína, que resulta da invasão ou libertação microbiana de proteinases lisosomais das células mortas ou doentes. Nos cérebros de pacientes com doença de Alzheimer e nos casos de angiopatia amilóide cerebral [Levy E 2001], a cistatina C coloca-se com β -amilóide (A β) no interior das paredes arteriais. Existem dois tipos de haplotipos comuns do gene CST3 que codifica a cistatina C (A e B), que diferem entre si em três pormenores: duas alterações do par de uma só base na região promotora e uma no domínio do sinal peptídeo que provoca uma substituição de aminoácido (de alanina por treonina). Estudos de controlo recentes descobriram associações de CST3 com elevado risco para os primeiros sintomas da doença de Alzheimer [Crawford FC 2000, Finckh U 2000, Beyer K 2001]. A hemorragia cerebral hereditária com amiloidose, do tipo islandês (HCHWA-I), também designada por angiopatia amilóide hereditária da cistatina C (HCCAA), é uma forma autossomática dominante da angiopatia amilóide cerebral (CAA). A proteína amilóide depositada nas paredes dos vasos cerebrais é essencialmente composta por uma variante de cistatina C caracterizada pela presença da substituição Leu68-GIn [Cohen 1983, Ghiso 1986]. Esta patologia é também associada a uma menor concentração deste inibidor da proteinase da cisteína no fluido cerebrospinal e conduz à sua deposição amilóide no cérebro [Grubb AO 1984].

Leung-Tack *et al.* também purificaram duas isoformas truncadas N-terminais da cistatina C na urina de um paciente que havia sido sujeito a um transplante renal. De

acordo com os dados, a cistatina C (desl-4) apresentou um efeito inibidor em duas funções das células mononucleares periféricas humanas (PMN): libertação e fagocitose de O_2 , que pode dever-se à sequência N-terminal "KPPR". Os dados por eles recolhidos corroboram uma função potencialmente importante da cistatina C, enquanto possível imunomoduladora durante a inflamação. Indícios sugerem que os crescentes danos mediados por radicais livres à função celular contribuem para o processo de envelhecimento e doenças neurodegenerativas associadas à idade. A pressão oxidativa pode desempenhar um papel na doença de Alzheimer, na doença de Parkinson, na esclerose lateral amiotrófica (ALS). Ainda que os danos dos radicais livres sobre os neurónios possam não ser o evento primário a despoletar estas doenças, parece que o dano causado por radicais livres está envolvido na cadeia patogenética destas perturbações.

Beta-2 microglobulina

A beta-2 microglobulina (Ac. n.º P01884) constitui o componente constante do principal complexo de histocompatibilidade de classe I (CMH) e a sua presença nos fluidos biológicos representa o equilíbrio entre a renovação e a eliminação de proteínas membranares. Visto que a presença deste peptídeo parece aumentar em algumas doenças através da elevação da resposta imune, a sua quantificação nos fluidos corporais tornou-se num útil índice do estado imunológico *in vivo* [Hoekman *et al.* 1985]. A função desta proteína é ainda desconhecida, mas

aparentemente, estará implicada em doenças que implicam a destruição das células gliais [Ernerudh et al. 1987].

O problema técnico solucionado pela presente invenção diz respeito à provisão de métodos de diagnóstico otimizados. Especialmente no que diz respeito à doença de Alzheimer e/ou monitorização da evolução da doença de Alzheimer num indivíduo.

Proteína neurosecretora (VGF)

A VGF (VGF humana, Ac. n.º 015240) é uma precursora peptídica secretora que é expressa e processada pelas células neuronais [Canu et al. 1997]. Estudos de hibridização *in situ* realizados no sistema nervoso central de ratos adultos revelaram que o mRNA da VGF é amplamente distribuído pelo cérebro com especial expressão no hipocampo, córtex entorinal e neocórtex. Mais ainda, ficou demonstrado que a transcrição e secreção da VGF é selectivamente regulada por neurotrofinas, como NGF e BDNF, e pela despolarização *in vitro*. A expressão crescente de BDNF pode ser observada circunvolução dentada e regiões CA3 do hipocampo, que são tecidos que aparentemente morrem na patogénese precoce da doença de Alzheimer.

A Patente de invenção WO00/25138 descreve polipeptídeos como marcadores específicos da doença de Alzheimer, sendo estes expressos de forma distinta no tecido doente e no tecido saudável.

A Patente de invenção WO01/63294 descreve a expressão distinta de SEQ ID NO:7 como um marcador do transtorno afectivo bipolar (BAD).

Descrição da invenção

A invenção baseia-se na surpreendente descoberta de que determinados polipeptídeos são expressos de forma distinta nos indivíduos com doença de Alzheimer, quando comparados com um grupo de controlo saudável. Estes polipeptídeos expressos de forma distinta podem, p. ex., ser detectados nas amostras de líquido cefalorraquidiano do indivíduo a ser diagnosticado. O polipeptídeo individual utilizado na invenção com a sequência SEQ ID NO:7 pode ser detectado e/ou quantificado sozinho ou em combinação com outros polipeptídeos.

Os marcadores polipeptídicos são definidos pelo seu peso molecular. Os cinco marcadores identificados pelo método SAX2, conforme descrito nos Exemplos, apresentam as seguintes massas 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;

Marcador 5 (M5): 13416 ± 20 Da.

O Quadro 1 apresenta o peso molecular observado dos marcadores polipeptídicos M1 a M5, conforme determinado pelo SELDI-TOF MS, bem como as sequências de aminoácidos dos fragmentos de marcadores polipeptídicos M1 a M5 observados e a proteína a partir da qual originaram os marcadores polipeptídicos M1 a M5.

Quadro 1

Marcador	Peso molecular observado por SELDI	Sequência de aminoácido	Nome da proteína
M1	4823,5 Da \pm 1,7	VGEEDEEEAAEAEAEAEAER	VGf4,8
M2	7691 Da \pm 4,9	XXAD (L/I) AGHG (Q/K) EV (L/I) (L/I) R humana HGTVV (L/I) TA (L/I) GG (L/I) (L/I) K	nova variante de mioglobina
M3 M4	11786,9 Da \pm 7,6 11988,4 Da \pm 5,9	VNHVTLSPK VEHSDFSFSK IEKVEHSDFSFSK SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK	beta-2 microglobulina humana
M5	13416,4 Da \pm 9,4	ASNDMYHSR ALDFAVGEYNK RALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR QIVAGVNYFLDVELGR LVGGPMDASVEEEGVRR KQIVAGVNYFLDVELGR TQPNLDNCPFDQPPHLK TQPNLDNCPFDQPPHLKR SSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVR	cistatina C humana

Os polipeptídeos distintamente expressos podem, p. ex., ser detectados no fluido cerebrospinal do indivíduo a ser diagnosticado. Além disso, dependendo da formulação específica, a fonte de amostras para medição da abundância de marcadores polipeptídicos podem igualmente ser sangue, soro ou urina, mas não se limita a estes fluidos.

Conforme se mostra na Figura 1, comparado com um diagnóstico negativo (controlos saudáveis), o M1 estava sub-expresso no LCR dos pacientes com doença de Alzheimer ($p < 0,05$), enquanto que os marcadores M2 a M5 se

apresentavam sobre-expressos no LCR dos pacientes com doença de Alzheimer ($p < 0,05$).

Um nível alterado de um ou vários polipeptídeos, comparado com o nível de polipeptídeos nos indivíduos saudáveis do grupo de controlo, permitirá a avaliação do estado de e/ou monitorização da evolução da doença de Alzheimer num determinado indivíduo, permitindo a vigilância da eficácia do tratamento da mesma doença, sendo igualmente útil para o posterior desenvolvimento de um fármaco. Mais ainda, estes marcadores de biomoléculas são úteis na diferenciação da doença de Alzheimer de outras formas de demência e perturbações neurodegenerativas.

Os indivíduos nos quais se pretende diagnosticar ou monitorizar a doença de Alzheimer são, preferencialmente, humanos. No entanto, o diagnóstico da doença de Alzheimer de acordo com a presente invenção, é também possível com outros mamíferos. Se necessário, podem ser utilizados ortólogos dos marcadores peptídicos.

A presente invenção relaciona-se igualmente com o uso da espectrometria de massa (MS) na detecção da doença de Alzheimer em indivíduos da raça humana e na avaliação da progressão da doença de Alzheimer nos mesmos indivíduos através da quantificação e/ou detecção da quantidade de polipeptídeos específicos em amostras recolhidas dos fluidos corporais do indivíduo em questão. Numa variante preferida da presente invenção, é recolhida uma amostra de fluido cerebrospinal (LCR) do indivíduo.

A detecção e/ou quantificação dos polipeptídeos é preferencialmente obtida pela quantificação do sinal detectado por MS em determinadas relações massa molecular-

carga (M/z), que correspondem à relação M/z dos polipeptídeos.

Preferencialmente, as relações M/z mais próximas de um dos polipeptídeos são também medidas.

A detecção e/ou quantificação dos polipeptídeos pode também ser conseguida pelo recurso a um imunoensaio com determinados anticorpos colocados contra o(s) determinado(s) marcador(es) ou fragmentos polipeptídicos derivados. Os anticorpos podem ser preparados com recurso aos marcador(es) purificado(s) ou fragmentos derivados, ou ainda com utilizando polipeptídeo(s) sintéticos ou recombinantes que consistam na sequência de aminoácidos do(s) marcador(es) através de qualquer método já conhecido na área [Coligan 1991]. Tais técnicas incluem, mas não se limitam, a preparação de anticorpos através da selecção de anticorpos em bibliotecas de anticorpos recombinantes no fago ou vectores apropriados, bem como a preparação de anticorpos poli e monoclonais através da imunização de coelhos ou ratos [Huse 1989, Ward, 1989]. Depois da produção dos anticorpos, poderá ser detectado e/ou quantificado um marcador através de inúmeros ensaios imunológicos de ligação padronizados [Patentes de invenção norte-americanas n.^{os} 4366241, 4376110, 4517288 e 4837168]. Ensaios úteis incluem, mas não se limitam, por exemplo, a um imunoensaio enzimático (EIA) tais como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), radioimunoensaio (RIA), o método de *Western blot* ou o ensaio de *slot* ou *dot blot*. Para uma perspectiva geral dos ensaios imunológicos, consulte [Coligan 1991]. De uma forma geral, uma amostra recolhida de um indivíduo pode ser posta em contacto com um anticorpo que especificamente une o marcador. Uma boa

técnica para capturar o(s) marcador(es) especificado(s) de uma amostra complexa de fluido corporal envolve a utilização do anticorpo fixado a suportes sólidos, como vidro ou plástico, p. ex., placa de microtitulação, vareta, conta ou microconta. Em alternativa, os marcadores podem também ser capturados na amostra de fluido corporal pelo anticorpo específico imobilizado num substrato de detecção ou a um vector tipo Protein Chip™, conforme descrito em relação ao imunoensaio baseado em SELDI [Xiao 2001]. Após a incubação da amostra com anticorpos, o material não ligado é lavado sob condições específicas e o complexo anticorpo-marcador formado poderá ser detectado, através dos reagentes de detecção apropriados. Numa variante em que foi utilizada a técnica vectorial SELDI tipo Protein Chip™, o(s) marcador(es) selectivamente enriquecido(s) pelo anticorpo imobilizado pode(m) ser detectado(s) e quantificado(s) através de espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz.

É descrito:

1. Um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método esse que compreende a detecção de, pelo menos, um polipeptídeo inserido num grupo de polipeptídeos que inclui:

- i) um polipeptídeo com uma massa molecular de 4824 ± 20 Da,
- ii) um polipeptídeo com uma massa molecular de 7691 ± 20 Da,
- iii) um polipeptídeo com uma massa molecular de 11787 ± 20 Da,

- iv) um polipeptídeo com uma massa molecular de 11988 ± 20 Da, e
- v) um polipeptídeo com uma massa molecular de 13416 ± 20 Da.

É ainda descrito um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método esse que compreende a detecção de, pelo menos, um polipeptídeo inserido num grupo de polipeptídeos que apresentam, respectivamente, as massas 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 5028 ± 20 Da, de 6267 ± 20 Da, de 6518 ± 20 Da, de 7274 ± 20 Da e de 8209 ± 20 Da.

Visto que a detecção de um destes polipeptídeos é, na maioria dos casos, suficiente para um diagnóstico fiável da doença de Alzheimer, a detecção de dois ou mais polipeptídeos da invenção pode aumentar a sensibilidade e eficácia do método.

Preferencialmente, serão detectados 1, 2, 3, 4, 5, 10, e mais preferencialmente todos os polipeptídeos mencionados, a partir da mesma amostra. A detecção pode igualmente ser realizada em simultâneo com a detecção de outros polipeptídeos preferencialmente expressos nos indivíduos com doença de Alzheimer, em comparação com indivíduos saudáveis. A expressão "avaliação do estado da doença de Alzheimer", conforme aqui utilizada, deverá ser entendida como o diagnosticar da presença da doença de Alzheimer num indivíduo ou paciente, a avaliação da evolução da doença

num indivíduo ou paciente, e/ou a avaliação da predisposição de um determinado indivíduo para desenvolver esta doença.

2. É descrito o método do ponto 1, em que são detectados 2, ou 3, ou 4 ou 5 polipeptídeos do referido grupo de peptídeos. A invenção relaciona-se ainda com um método do ponto 1 em que são detectados 2, ou 3, ou 4, ou 5 ou 10, ou todos os polipeptídeos do referido grupo de peptídeos.

3. É descrito um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método este que compreende a detecção de, pelo menos, um polipeptídeo que inclua a sequência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 e/ou SEQ ID NO:16. A invenção diz ainda respeito a um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método esse que inclui a detecção de, pelo menos, um polipeptídeo que inclua a sequência de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 e/ou SEQ ID NO:17. Visto que a detecção de um destes polipeptídeos é, na maioria dos casos, suficiente para um diagnóstico fiável da doença de Alzheimer, a detecção de dois ou mais polipeptídeos da invenção pode aumentar a sensibilidade e eficácia do método. Preferencialmente, serão detectados 1, 2, 3, 4, 5, 10, ou todos os polipeptídeos mencionados, a partir da mesma amostra. A

detecção pode igualmente ser realizada em simultâneo com a detecção de outros polipeptídeos preferencialmente expressos nos indivíduos com doença de Alzheimer, em comparação com indivíduos saudáveis.

4. É descrito um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método este que compreende a detecção de, pelo menos, um polipeptídeo inserido num grupo de polipeptídeos que inclui

- i) cistatina C humana,
- ii) beta-2 microglobulina humana,
- iii) mioglobina humana (nova variante),
- iv) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de cistatina C humana,
- v) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de beta-2 microglobulina humana,
- vi) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de mioglobina humana (nova variante).

É também revelado um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método esse que compreende a detecção de, pelo menos, um polipeptídeo inserido num grupo de polipeptídeos que inclui

- i) cistatina C humana,
- ii) beta-2 microglobulina humana,
- iii) mioglobina humana (nova variante)
- iv) proteína neurosecretora (VGF) humana,
- v) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de cistatina C humana,

- vi) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de beta-2 microglobulina humana,
- vii) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de mioglobina humana (nova variante), e
- viii) um fragmento de, pelo menos, 5, 8, 10 ou 20 aminoácidos de proteína neurosecretora (VGF).

Visto que a detecção de um destes polipeptídeos é, na maioria dos casos, suficiente para um diagnóstico fiável da doença de Alzheimer, a detecção de dois ou mais polipeptídeos da invenção pode aumentar a sensibilidade e eficácia do método. Preferencialmente, serão detectados 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 dos polipeptídeos mencionados, a partir da mesma amostra. Mais preferencialmente, serão detectados 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou todos os polipeptídeos mencionados, a partir da mesma amostra. A detecção pode igualmente ser realizada em simultâneo com a detecção de outros polipeptídeos preferencialmente expressos nos indivíduos com doença de Alzheimer, em comparação com indivíduos saudáveis.

5. É também descrito um método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, sendo que um método dos pontos 1 a 4 é realizado com, pelo menos, duas amostras distintas recolhidas do mesmo indivíduo. Para tal, serão analisadas amostras recolhidas do mesmo indivíduo em diferentes pontos temporais. As alterações na quantidade do(s) respectivo(s) polipeptídeo(s) permitirão retirar conclusões relativamente à evolução da doença de Alzheimer no indivíduo em questão.

6. É também descrito um método de qualquer um dos pontos 1 a 5, em que a detecção do(s) referido(s) polipeptídeo(s) é realizada por SELDI-TOF MS. Podem, em alternativa, ser utilizados outros métodos de espectrometria de massa e outros métodos de detecção adequados. Mais especificamente, a presente invenção diz respeito ao método de qualquer um dos pontos 1 a 5, em que a detecção do(s) referido(s) polipeptídeo(s) é realizada por SELDI-TOF MS, no qual é usada a superfície hidrófoba H50, a superfície WCX2 ou a superfície IMAX para fornecer apoio após a ionização.

Os diferentes apoios à ionização fornecem diferentes graus de sensibilidade às proteínas de interesse.

7. É também descrito um método de qualquer um dos pontos 1 a 5, em que os anticorpos específicos ou anticorpos que reconhecem o(s) referido(s) polipeptídeo(s) são usados na detecção do(s) polipeptídeo(s) mencionado(s).

8. É também descrito um método de qualquer um dos pontos 1 a 7, em que a detecção se realiza numa amostra que inclui LCR do referido paciente. A amostra recolhida de um indivíduo pode ser processada imediatamente após a sua colheita, ou pode ser congelada e analisada mais tarde. As amostras podem também ser constituídas ou conter outros fluidos corporais, tais como sangue, soro, plasma, urina, plasma seminal, fluido mamário ou extractos celulares.

9. É igualmente descrito um kit que inclui um polipeptídeo com uma massa molecular de 4824 ± 20 Da, um polipeptídeo com uma massa molecular de 7691 ± 20 Da, um polipeptídeo com uma massa molecular de 11787 ± 20 Da, um polipeptídeo com uma massa molecular de 11988 ± 20 Da e/ou um

polipeptídeo com uma massa molecular de 13416 ± 20 Da. A invenção diz ainda respeito a um kit que inclui um polipeptídeo com uma massa molecular de 4824 ± 20 Da, um polipeptídeo com uma massa molecular de 7691 ± 20 Da, um polipeptídeo com uma massa molecular de 11787 ± 20 Da, um polipeptídeo com uma massa molecular de 11988 ± 20 Da e/ou um polipeptídeo com uma massa molecular de 13416 ± 20 Da. A invenção também diz respeito a um kit que inclui polipeptídeos com uma massa 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 e/ou 8209 ± 20 Da. Tal kit pode ser aplicado com vários propósitos, p. ex., para utilização como referência num dos métodos acima mencionados. O referido kit pode incluir 2, 5, 10 ou todos os polipeptídeos citados.

10. É também revelado um kit que inclui um fragmento de, pelo menos, 5 aminoácidos de cistatina C humana, um fragmento de, pelo menos, 5 aminoácidos de beta-2 microglobulina humana e um fragmento de, pelo menos, 5 aminoácidos de mioglobina humana. Este kit pode ser aplicado para diversos fins, p. ex., como referência num dos métodos acima mencionados. É também revelado um kit que inclui um fragmento de, pelo menos, 5, 10 ou 20 aminoácidos de cistatina C humana, um fragmento de, pelo menos, 5, 10 ou 20 aminoácidos de beta-2 microglobulina humana, um fragmento de, pelo menos, 5, 10 ou 20 aminoácidos de

mioglobina humana e um fragmento de, pelo menos, 5, 10 ou 20 aminoácidos de proteína neurosecretora (VGF). Estes kits poderão ser aplicados com vários propósitos, p. ex., para utilização como referência num dos métodos acima mencionados.

Breve descrição das figuras

Figura 1:

Intensidades médias dos cinco marcadores peptídicos do Quadro 1, expressos de forma distinta no grupo enfermo quando comparados com os grupos de controlo.

Exemplos

A presente invenção é adicionalmente descrita por um ou vários dos seguintes exemplos. Estes não deverão ser tidos como limitadores do campo de aplicação da mesma.

Exemplo 1: Avaliação dos pacientes e colheita de amostras de LCR

O diagnóstico da doença de Alzheimer em indivíduos da raça humana foi efectuado de acordo com os critérios do *National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's disease and Related Disorders Association* (Instituto nacional para as perturbações neurológicas e comunicacionais, para o AVC, doença de Alzheimer e doenças associadas) (NINCDS- ADRDA). O grupo relativo à doença de Alzheimer era constituído por 9

pacientes, com 75 ± 7 anos, seis deles do sexo masculino e três do sexo feminino. O grupo de controlo era constituído por 10 indivíduos saudáveis, dos 78 ± 14 anos, dois do sexo masculino e oito do sexo feminino, todos eles sem qualquer historial, sintomas ou sinais de doença psiquiátrica ou neurológica.

Foi obtido o consentimento por parte de cada um dos pacientes e seus prestadores de cuidados antes da investigação. O estudo foi aprovado pelo comité de ética local. Após a punção lombar, as amostras de LCR foram congeladas em gelo seco imediatamente após a sua colheita em aliquotas de 0,5 ml e guardados a uma temperatura de -80°C até à sua análise.

Exemplo 2: Análise do LCR por SELDI tipo ProteinChip em chip SAX2

O ensaio por sistema ProteinChip SAX 2 (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EUA) foi equilibrado durante 5 minutos com 5 μl de tampão de ligação (100 mM acetato de Na pH=4,0). O tampão foi cuidadosamente removido com um lenço de papel e foram adicionados 2,5 μl de tampão de ligação às cavidades. Amostras cruas de LCR (2,5 μl) foram adicionadas às cavidades e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente numa câmara de atmosfera húmida de uma plataforma basculante. O LCR foi removido e as cavidades lavadas individualmente com 10 μl de tampão durante 5 minutos. Os vectores foram então colocados num tubo cónico Eppendorf de 15 ml e lavados duas vezes com o tampão durante 5 minutos. Finalmente, o chip foi limpo por duas vezes com água destilada. O excesso de H_2O foi removido e, com a

superfície ainda húmida, foram realizadas e secas duas adições por cavidade de 0,5 µl de ácido sinapínico (SPA) (2mg/ml) em acetonitrilo 50% (vol./vol.) e ácido trifluoroacético 0,5% (vol./vol.). Os vectores foram então lidos num sistema de leitura tipo ProteinChip, PBS II Series (Ciphergen Biosystems). O feixe de laser foi centrado na amostra *in vacuo*, o que fez com que as proteínas absorvidas pela matriz se tornassem ionizadas ao mesmo tempo que eram desorvidas pela superfície do vector ProteinChip. As proteínas ionizadas foram detectadas e as suas massas moleculares foram determinadas de acordo com o seu "tempo de voo" (*time-of-flight*, TOF). Os espectros de massa TOF, recolhidos no modo de ião positivo, foram gerados recorrendo a 65 feixes de laser ao longo do ponto, com uma potência ligeiramente acima do limiar (10-15% superior ao limiar). A massa foi programada a 40 kDa, otimizada de 1 a 15 kDa. Os espectros foram recolhidos e analisados através do software (versão 3.0) do ProteinChip da Ciphergen. A calibração externa do leitor foi realizada com recurso às referências de peso molecular de peptídeos tipo "tudo-em-1" (Ciphergen Biosystems, Inc.) diluídos na matriz SPA (1:1, vol./vol.) e directamente aplicados numa cavidade. A comparação dos perfis proteicos foi realizada após a normalização em corrente total de iões de todos os espectros incluídos na experiência. A reprodutibilidade foi testada através da análise de diferentes aliquotas da mesma amostra de LCR nas 4 cavidades distintas do mesmo ensaio ProteinChip (reprodutibilidade intra-ensaio intra-chip), em dois chips diferentes (reprodutibilidade intra-ensaio inter-chip) processadas em paralelo e reproduzidas numa outra experiência (reprodutibilidade inter-ensaio).

A análise das amostras de LCR dos 9 pacientes com diagnóstico de doença de Alzheimer em relação com os 10 controlos revelou que foram significativamente expressos 5 picos entre os dois grupos ($p < 0,05$). A massa SELDI média aproximada associada às cinco proteínas expressas de forma distinta foi de 4,28 kDa, 7,7 kDa, 11,8 kDa e 12,0 kDa e 13,4 kDa ($p < 0,05$) (ver Quadro 1, Fig. 1).

Exemplo 3: Purificação por cromatografia de forte troca aniónica (SAX)

Para identificar as proteínas que correspondiam a esses picos, foi realizado um fraccionamento de LCR cru numa coluna de rotação SAX. As fracções eluídas foram analisadas por espectrometria SELDI-TOF MS.

A coluna de rotação SAX, número de lote SAX2-001116-01 (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EUA) foi rehidratada durante a noite a 4°C no tampão de equilíbrio (20mM tris(hidroximetil)cloridrato de aminometano (Tris-HCl), 5mM NaCl, pH 9,0). A coluna foi aquecida a temperatura ambiente e foram removidas as bolhas de ar. O tampão de equilíbrio pôde fluir pela matriz da coluna consoante a gravidade. O tampão de equilíbrio (0,5 ml) foi adicionado à coluna, tendo passado duas vezes pela resina. 2 ml de LCR de controlo foram diluídos no tampão de equilíbrio (1:1, vol./vol.). A amostra de proteína foi carregada para a coluna por fracção de 0,8 ml e pôde fluir pela coluna consoante a gravidade, até não existir mais gotejar na coluna. A coluna foi, então, centrifugada a 150 x g durante 1 minuto. A resina foi lavada com um volume equivalente de tampão de equilíbrio. Este passo foi diversas vezes

repetido de forma a carregar toda a amostra na resina. A eluição das proteínas ligadas foi realizada através da diminuição do pH. O tampão de eluição A consistiu em 20 mM de Tris-HCl, 5 mM de NaCl pH: 8,0; tampão de eluição B = 20 mM de fosfato de sódio pH 7,0; tampão de eluição C = 20 mM de fosfato de sódio pH 6,0; tampão de eluição D = 20 mM de fosfato e citrato de sódio pH 5,0; tampão de eluição E = 20 mM de fosfato e citrato de sódio pH 4,0; tampão de eluição F = 20 mM de fosfato e citrato de sódio pH 3,4; tampão de eluição G = 30% acetonitrilo em tampão de equilíbrio F. A eluição foi realizada aplicando 2 x 75 µl do tampão de eluição com centrifugação a 150 x g durante 1 minuto. Cada fracção recolhida (150 µl) foi concentrada em concentrador tipo *Speed-vac* a um volume de 10 µl. Os perfis das proteínas foram analisados por espectrometria SELDI-TOF MS com ensaio tipo SAX ProteinChip. O chip foi equilibrado com um tampão de equilíbrio constituído por 20 mM de Tris-HCl, 5 mM de NaCl, pH=9,0. Uma aliqota de 0,5 µl de cada uma das fracções concentradas foi directamente aplicada em 2,5 µl de tampão de ligação por ponto e processada conforme descrito anteriormente. As restantes fracções foram carregadas num gel Tris-tricina, conforme descrito adiante. O pico expresso de forma distinta de 13,4 kDa foi eluído com tampão A (20 mM de Tris-HCl 5mM NaCl pH 8,0) e tampão B (20 mM de fosfato de sódio pH 7,0). Os picos expressos de forma distinta de 11,8 kDa e 12,0 kDa foram verificados na fracção eluída com tampão C (20 mM de fosfato de sódio pH 6,0) e tampão D (20 mM de fosfato e citrato de sódio pH 5,0). O grupo com 7,7 kDa foi eluído com tampão D (20 mM de fosfato e citrato de sódio pH 5,0) e tampão E (20 mM de fosfato e citrato de sódio pH 4,0).

Cada fracção eluída foi carregada num gel tris-tricina de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio e sujeitos a electroforese (SDS PAGE). Após coloração com azul de Coomassie, as bandas verificadas no gel confirmaram os resultados obtidos pela análise SELDI. A banda correspondente ao grupo de 7,7 kDa, 11,8 kDa e 12,0 kDa foi retirada. As proteínas foram extraídas conforme descrito no Exemplo 6 e identificadas por Q-TOF. A análise por espectrometria de massa do pico de 7,7 kDa não coincidiu com nenhuma proteína humana conhecida; no entanto, poderá indiciar uma nova variante ou um homólogo de mioglobina. As sequências peptídicas foram as seguintes:

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

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

A análise por espectrometria de massa dos picos de 11,8 kDa e 12,0 kDa identificou beta-2 microglobulina em ambos.

Dado que o grupo de 13,4 dKa não foi verificado neste gel de tris-tricina, foi realizada uma electroforese tipo SDS-PAGE em gel de tris-glicina com amostras cruas de LCR. A banda correspondente à beta-2 microglobulina não foi facilmente encontrada neste gel. Concluiu-se, então, que a migração da proteína acima da beta-2 microglobulina poderia corresponder à abundante proteína seguinte verificada no perfil SELDI, nomeadamente o pico de 13,4 dKa. A banda foi extirpada do gel e digerida por tripsina antes da análise MALDI. A análise da "impressão digital" da massa peptídica permitiu a identificação da cistatina C. A cobertura da sequência fornecida pela análise foi de 60%.

Exemplo 4: Electroforese monodimensional / géis de tris-glicina

20 µl de LCR foram misturados com 10 µl de tampão de Laemmli [Laemmli 1970]. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos, e carregadas em SDS-gel poliacrilamida com T 15% (T= concentração total de acrilamida) de acordo com o método de Laemmli. Os géis foram corados numa solução com azul de Coomassie brilhante R-250 (0,1% p/v) e metanol (50% v/v) durante 30 minutos. A descoloração foi realizada numa solução com metanol (40% v/v) e ácido acético (10% v/v).

Exemplo 5: Electroforese monodimensional: géis de tris-tricina

A electroforese tipo SDS-PAGE de tris-tricina foi realizada de acordo com Schagger e Von Jagow [1987], recorrendo a géis T pré-fundidos de 16,5% (Biorad, Hercules, CA). O tampão anódico consistiu em 0,2 M de tris-HCl, pH 8,9 e o tampão catódico consistiu em 0,1 M de tris-HCl, 0,1 M de tricina, 0,1% SDS, pH 8,25. As amostras foram diluídas em 10 µl de 50 mM de tris-HCl, 4% (p/v) SDS, 12% (p/v) de sacarose, 5% (v/v) de mercaptoetanol, e traços de azul de bromofenol, pH 6,8. Após denaturação a 95°C durante 5 minutos, as amostras foram carregadas no gel. Os géis foram testados a 80 V durante 3 horas. Após a electroforese, os géis foram fixados em 40% metanol e 10% ácido acético durante 30 minutos. Os géis foram, então, corados com azul de Coomassie coloidal G250 durante a noite e descorados em 30% metanol. As bandas a serem identificadas foram imediatamente cortadas, colocadas num tubo cónico Eppendorf e mantidas a 4°C até posteriores análises. As massas

moleculares aparentes foram determinadas pelo estabelecimento do peso molecular de referência (MW) dos polipeptídeos: triosefosfato isomerase MW: 26,625; mioglobina MW: 16,950; α -lactalbumina MW: 14,437; aprotinina MW: 6,512; cadeia b da insulina, oxidada MW: 3,496 e bacitracina MW: 1,423 (Biorad).

Exemplo 6: Digestão da proteína e extracção dos peptídeos
[Bienvenu 1999]

Foram cortados fragmentos de géis contendo proteínas de interesse, para digestão das proteínas com tripsina, através dos procedimentos previamente publicados [Shevchenko 1996, Hellman 1994, Rosenfeld 1992] e modificadas conforme descrito adiante. O pedaço de gel foi descorado com 100 μ l de 50 mM de bicarbonato de amónio, 30% (v/v) de acetonitrilo durante 15 minutos, a temperatura ambiente. A solução descorante foi retirada e substituída por 25 μ l de 10 mM de DL-ditiotreitol (DTT) em 50 mM de bicarbonato de amónio e incubada durante 35 minutos a 56°C. A solução DTT foi, então, substituída por 25 μ l de 55 mM de iodoacetamida em 50 mM de bicarbonato de amónio e incubada durante 45 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Os pedaços de gel foram lavados durante 10 minutos com 100 μ l de 50 mM de bicarbonato de amónio e, durante 10 minutos, com 100 μ l de 50 mM de bicarbonato de amónio e 30% (v/v) de acetonitrilo.

Os pedaços de gel foram, então, secos durante 30 minutos em centrífuga de vácuo Hetovac (HETO, Allerod, Dinamarca). Os pedaços secos de gel foram novamente hidratados durante 45 minutos a 4°C em 5-20 μ l de uma solução de 50 mM de

bicarbonato de amónio contendo tripsina em 6,25 ng/ μ l. Após uma incubação nocturna a 37°C, os pedaços de gel foram secos em centrífuga de vácuo antes de serem novamente hidratados pela adição de 20 μ l de água destilada e, finalmente, secos novamente em concentrador tipo Speed-vac durante 30 minutos. A extracção dos peptídeos foi realizada com 20 μ l de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) durante 20 minutos, a temperatura ambiente, com agitação ocasional. A solução de TFA contendo os peptídeos foi transferida para um tubo de polipropileno. Foi realizada uma segunda eluição com 20 μ l de 0,1% (v/v) de TFA em 50% (v/v) de acetonitrilo durante 20 minutos, a temperatura ambiente, com agitação ocasional. A segunda solução de TFA foi adicionada à primeira. O volume dos extractos adicionados foi reduzido a 1-2 μ l por evaporação sob vácuo. Foram levadas a cabo extracções de controlo com recurso a pedaços de gel vazios de proteínas.

Exemplo 7: Identificação de proteínas por análise da "impressão digital" da massa peptídica

1,5 μ l da amostra foram colocados numa placa alvo de espectrómetro tipo MALDI. Foram adicionados volumes idênticos de matriz (10 mg/ml de α -ciano-4-ácido hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrilo, 0,1% (v/v) de TFA) à digestão previamente carregada. As amostras foram secas o mais rapidamente possível, usando um recipiente em vácuo. As medições mássicas da solução líquida foram levadas a cabo com um espectrómetro de massa MALDI-TOF *Voyager™ Elite and Super STR* (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, EUA), equipado com um laser de nitrogénio

de 337 nm. O analisador foi utilizado no modo reflector (tipo *reflectron*) em voltagem ascendente de 20kV, com um parâmetro de extracção retardada de 100-140 ns e uma porta de massa baixa de 850 Da. A potência do laser foi programada ligeiramente acima do limiar (10-15% acima do limiar) para produção molecular iónica. Os espectros foram obtidos pela soma de 10 a 256 raios laser consecutivos. As massas dos 60 picos mais elevados foram extraídas a partir dos espectros e usadas na identificação das proteínas através de ferramenta de análise da "impressão digital" da massa peptídica SmartIdent [Gras 1999]. A pesquisa foi elaborada com recurso a bases de dados SWISS-PROT e TrEMBL. A pesquisa foi direccionada apenas para seres humanos, o número mínimo de massas coincidentes foi de 4, a tolerância máxima das massas foi de 50 ppm após calibração interna com produto de autólise de tripsina, foi tolerada no máximo uma clivagem para os peptídeos tripticos, e as alterações aceites foram a carboximetilação de cisteínas com iodoacetamida e oxidação artefactual de metioninas.

Exemplo 8: Identificação de proteínas por análise de fragmentação de peptídeos

Antes da separação por nano-cromatografia líquida, os volumes de peptídeos com soluções foram ajustados a 7 µl pela adição de uma solução de ácido fórmico de 0,1% (v/v). As amostras foram colocadas num sistema automático (*autosampler*) Triathlon (Spack, Emmen, Holanda). Para cada experiência, foram injectados 5 µl de peptídeos contendo solução numa coluna C18 de fase inversa de 75 µm de diâmetro interno (YMS-ODS-AQ200, Michrom Bioresource,

Auburn, CA). Os peptídeos foram eluídos com um gradiente de acetonitrilo (ACN) na presença de ácido fórmico 0,1% (v/v), e recorrendo a bombas SunFlow (SunChrom, Friederichsdorf, Alemanha). Utilizou-se um separador de fluxo para diminuir a velocidade do fluido após as bombas, de 200 para 0,4 µl/min. Os peptídeos foram analisados com um espectrómetro de massa de tempo de voo com quatro pólos (Q-TOF) (Micromass, Wythenshawe, Inglaterra). Aplicou-se uma tensão de 2700 V no capilar do nano-electrospray (New Objective, Woburn, MA, EUA). Utilizou-se argão como gás de colisão. A energia de colisão foi definida como uma função da massa do ião precursor. Os espectros MS/MS foram obtidos por troca automática entre os modos MS e MS/MS. Os dados obtidos no modo MS/MS foram convertidos num formato compatível (ficheiros DTA) por software ProteinLynx (Micromass, Wythenshawe, Inglaterra) e analisados através de motores de busca convencionais em comparação com as bases de dados SWISS-PROT, TrEMBL, NCBIInr e EST. Nos casos de interpretação manual dos dados obtidos por MS/MS, a identificação foi realizada por mera pesquisa de sequência. Verificou-se que o marcador M5 era um fragmento de cistatina C, que os marcadores M3 e M4 eram isoformas de beta-2 microglobulina e que M2 era uma nova variante ou homólogo de mioglobina. Verificou-se que o marcador M1 era um fragmento da proteína neurosecretora VGF.

Exemplo 9: Análise estatística

Calcularam-se os valores-p através de métodos estatísticos padrão já conhecidos dos especialistas. Os valores-p

inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente relevantes.

Exemplo 10: Isolamento do fragmento de 4,8 kDa (Marcador M1)

Algumas amostras de LCR de pacientes de controlo foram fraccionadas por um dispositivo de filtragem Centricon 30 (Millipore Corp., Bedford, MA), de forma a remover a proteína com peso molecular superior a 30 kDa. O sal e o polipeptídeo com peso molecular inferior a 3kDa foram removidos recorrendo a um Centricon 3 (Millipore Corp., Bedford, MA). O Centricon 3 foi, então, lavado com água destilada ultra pura. Nessa fracção lavada, concluiu-se que o fragmento de 4,82 kDa era o maior componente. Esta fracção líquida foi reduzida com uma solução de 10 mM de 1,4-ditioeritritol durante 1 hora, a 56°C, e de seguida, foi alquilada com 54 mM de iodoacetamida durante 45 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, o polipeptídeo foi digerido com 6 mg/ml de tripsina, durante a noite e a 37°C. Esta fracção líquida foi analisada por nano-cromatografia líquida e Q-TOF, conforme descrito anteriormente.

Exemplo 11: Materiais de diferentes superfícies para análise por SELDI-TOF

Através de SELDI-TOF, realizou-se uma análise de 10 amostras de LCR de 10 pacientes com doença de Alzheimer e 10 pacientes do grupo de controlo, em três superfícies diferentes: a superfície hidrófoba H50, a superfície WCX2 e

a superfície IMAC (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA, EUA, resp.). Foram observados sete picos expressos de forma distinta na superfície H50, cinco marcadores na WCX2 e cinco marcadores na superfície IMAC. Um teste diagnóstico que utilizou os marcadores do chip H50 revelou uma especificidade e uma sensibilidade de 100 e 70%, respectivamente. A combinação dos marcadores encontrados na H50 e na WCX2 apresentaram uma especificidade e uma sensibilidade de 100 e 80%. Finalmente, a combinação dos marcadores presentes na H50, WCX2 e IMAC apresentaram uma especificidade e uma sensibilidade de 100 e 90%.

As massas médias dos polipeptídeos expressos de forma distinta, conforme determinado por SELDI-TOF utilizando diferentes materiais de superfície, foram as seguintes:

Superfície hidrófoba H50: 7 picos

Marcador 1: 4769 ± s.d. Da

Marcador 2: 6958 ± s.d. Da

Marcador 3: 6991 ± s.d. Da

Marcador 4: 13412 ± s.d. Da

Marcador 5: 13787 ± s.d. Da

Marcador 6: 17276 ± s.d. Da

Marcador 7: 40437 ± s.d. Da

Superfície IMAC Cu: 5 picos

Marcador 1: 6895 ± s.d. Da

Marcador 2: 6928 ± s.d. Da

Marcador 3: 7691 ± s.d. Da

Marcador 4: 7769 ± s.d. Da

Marcador 5: 7934 ± s.d. Da

Superfície WCX2: 5 picos

Marcador 1: 5082 \pm s.d. Da

Marcador 2: 6267 \pm s.d. Da

Marcador 3: 6518 \pm s.d. Da

Marcador 4: 7274 \pm s.d. Da

Marcador 5: 8209 \pm s.d. Da

O desvio padrão (s.d.) é de 20 Da para cada um dos marcadores. No entanto, o desvio padrão pode também ser de 40 Da, ou 10 Da, ou 5 Da para cada marcador referido em cima.

Bibliografia

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 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 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 (HCHWA-I) is related to the gastroentero-pancreatic neuroendocrine protein*. *J. Exp. Med.* 1983, 153, 623-628.

Current Protocols in Immunology, Eds. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, 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.

Davies, H.A. 2000. *The ProteinChip® System from Ciphergen: A new technique for rapid, micro-scale protein biology*. *J. Molecular Medicine*, 78 (7):B29 Deng A, Irizarry

MC, Growdon JH, Rebeck GW. *Elevation of Cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease*. Am. J. Pathol. 2001, 159, 1061-1068.

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

Finck 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, Zurdel J, Holst F, Benussi L, Stoppe G, Reiss J, Miserez AR, Staehelin HB, Rebeck W, Hyman BT, Binetti G, Hock 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 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.

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 multilevel scoring algorithm and an optimised peak detection.* Electrophoresis 1999, 20:3535-3550.

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, 1547-1549.

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.

Hoekman K, Van Nieuwkoop JA, Willemze R. *The significance of beta-2 microglobulin in clinical medicine.* Neth J. Med. 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.

Isaaq 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

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 disease 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 Agosto 15;227(259):680-5.

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.

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. *Relatório de consenso do Grupo de trabalho relativamente a: "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 invenção norte-americana 4366241

Patente de invenção norte-americana 4376110

Patente de invenção norte-americana 4517288

Patente de invenção norte-americana 4837168

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, Schelhammer PF, Dalmaso 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.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Bayer AG

<120> Biomarcadores para o diagnóstico da doença de Alzheimer

<130> LeA 36 293

<160> 17

<170> Patente em versão 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_caract

<221>

<222> (1)..(2)

<223> Xaa = qualquer aminoácido

<220>

<221> misc_caract

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = L ou I

<220>

<221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa = Q ou K
 <220>

<221> misc_caract
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa = L ou I
 <220>

<221> Misc_caract
 <222> (14)..(14)
 <223> Xaa = L ou I

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<221> misc_caract
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa = L ou I
 <220>

<221> misc_caract
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa = Leu ou Ile

<400> 2

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Ile Val Ala Gli Val Asn Tir Fe Leu Asp Val Glu Leu Gli

1 5 10 15

Arg

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Leu Val Gli Gli Pro Met Asp Ala Ser Val Glu Glu Glu Gli Val

1 5 10 15

Arg Arg

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Lis Gln Ile Val Ala Gli Val Asn Tir Fe Leu Asp Val Glu Leu

1 5 10 15

Gli Arg

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Thr	Gln	Pro	Asn	Leu	Asp	Asn	Cis	Pro	Fe	His	Asp	Gln	Pro	Pro
1				5					10					15

His Leu Lis

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Thr	Gln	Pro	Asn	Leu	Asp	Asn	Cis	Pro	Fe	His	Asp	Gln	Pro	Pro
1				5					10					15

His Leu Lis Arg

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente lista de referências citadas pelo requerente é apresentada meramente para informação do leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume qualquer responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 0025138 A [0014]
- WO 0163294 A [0015]
- US 4366241 A [0025][0081]
- US 4376110 A [0025][0081]
- US 4517288 A [0025][0081]
- US 4837168 A [0025][0081]

Literatura não relacionada com patentes citada na descrição

- **ADAM, B.L. et al.** *Proteomics*, 2001, vol. 1 (10), 1264-1270 [0051]
- **ASGEIRSSON B; HAEBEL S; THORSTEINSSON L; HELGASON E; GUDMUNDSSON KO; GUDMUNDSSON G; ROEPSTORFF P.** *Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: monitoring the presence of the Leu68G In cystatin C variant in cerebrospinal fluid and monocyte cultures by MS.* *Biochem J.*, 1998, vol. 329, 497-503 [0052]
- **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, vol. 315, 17-20 [0053]
- **CANU N; POSSENTI R; RICCO AS; ROCCHI M; LEVI A.** *Cloning, structural analysis, and chromosomal assignment of the human gene for the neurosecretory protein VGF.* *Genomics*, 1997, vol. 45 (2), 443-446 [0054]
 - **COHEN DH; FEINER H; JENSSON O; FRANGIONE B.** *Amyloid fibril in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (HCHWA-I) is related to the gastroentero-pancreatic neuroendocrine protein.* *J. Exp. Med.*, 1983, vol. 158, 623-628 [0055]
 - *Current Protocols in Immunology.* John Wiley & Sons Inc., 1991 [0056]
 - **CRAWFORD U; FREEMAN MJ; SCHINKA JA; ABDULLAH LI; GOLD M; HARTMAN R; KRIVIAN K; MORRIS MD; RICHARDS D; DUARA R.** *A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease.* *Neurology*, 2000, vol. 55, 763-768 [0057]
 - **DAVIES, H.A.** *The ProteinChip® System from Ciphergen: A new technique for rapid, micro-scale protein biology.* *J. Molecular Medicine*, 2000, vol.78 (7), B29 [0058]
 - **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, vol. 159, 1061-1068 [0058]
 - **ERNERUDH J, OLSSON T, BERLIN G, VON SCHENK H.** *Cerebrospinal fluid immunoglobulins and beta 2-microglobulin in lymphoproliferative and other neoplastic diseases of the central nervous system.* *Arch Neurol.* 1987, vol. 44(9), 915-20 [0059]

- **FINCKH U, VON DER KAMMER H, VELDEN J, MICHEL T, ADRESEN B, DENG A, ZHANG J, MULLER-THOMSEN T, ZUCHOWSKI K, MENZER G.** *Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer's disease.* Arch. Neurol. 2000, vol. 57, 1579-1583 [0060]
- **FRANCIS P.T. et al.** *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1999, vol. 66(2): 137-147 [0061]
- **FUNG, ET et al.** *Protein biochips for differential profiling.* Current Opinion in Biotechnology, 2001, vol. 12(1): 65-69 [0061]
- **GHISO J, JENSSON O, FRANGIONE B.** *Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C).* Proc Natl Acad Sci USA. 1986, vol.83(9), 2974-8 [0062]
- **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, vol. 136(2), 548-54 [0063]
- **GRAS R, MÜLLER M, GASTEIGER E, GAY S, BINZ PA, BIENVENUT WV, HOOGLAND C, SANCHEZ JC, BAIROCH A, HOCHSTRASSER DF.** *Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterised multilevel scoring algorithm and an optimised peak detection.* Electrophoresis 1999, vol. 20, 3535-3550 [0064]
- **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, vol. 311, 1547-1549 [0065]

- **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, vol. 224, 451-5 [0066]
- **HOEKMAN K, VAN NIEUWKOOP JA, WILLEMZE R.** *The significance of beta-2 microglobulin in clinical medicine.* Neth J. Med. 1995, vol. 28 (12), 551-7 [0067]
- **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.* Science. 1989, vol. 246, 1275-1281 [0068]
- **ISAAQ HJ, VEENSTRA TD, CONRADS TP, FELSCHOW D.** *The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, vol. 292 (3) 587-592 [0069]
- **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 disease dementia.* Acta Neurol. Scand. 2000, vol. 101, 279-282 [0070]
- **LAEMMLI UK.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 15 Agosto vol. 227(259), 680-5 [0071]
- **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, vol. 188, 16-22 [0072]
- **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, vol. 60, 94-104 [0073]

- **MERCHANT M, WEINBERGER SR.** *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry.* Electrophoresis, 2000, vol. 21, 1164-1167 [0074]
- **POPOVIC T, BRZIN J, RITONJA A, TURK V.** *Different forms of human Cystatin C.* Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990, vol. 371, 575-580 [0075]
- **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, vol. 21, 2266-2283 [0076]
- *Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease.* Neurobiology of aging, 1988, vol. 19 (2), 109-116 [0077]
- **ROBLES A.** *Some Remarks on biological markers of Alzheimer's disease.* Neurobiology of aging, 1998, vol. 19(2), 153-157 [0078]
- **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, vol. 203, 173-9 [0079]
- **SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M.** *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.* Anal. Chem. 1996, vol. 68, 850-8 [0080]
- **TEUNISSEN CE, DE VENTE J, STEINBUSCH HWM, DE BRUIJIN C.** *Neurobiology of Aging,* 2002, vol. 23, 485-508 [0081]

- **WARD ES et al.**, *Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli*. Nature 1989, vol. 341, 544-546 [0082]
- **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, vol. 273, 11806-11814 [0083]
- **WULFKUHLE JD, MCLEAN KC, PAWELETZ CP, SGROI DC, TROCK BJ, STEEG PS, PETRICOIN EF.** *New approaches to proteomic analysis of breast cancer*. Proteomics 2001, vol. 1 (10), 1205-1215 [0084]
- **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*. Cancer Research 2001, vol. 61 (16), 6029-6033 [0085]

REIVINDICAÇÕES

1. Método de avaliação do estado da doença de Alzheimer num indivíduo, método este que compreende a detecção de um polipeptídeo constituído pela sequência de SEQ ID NO:7 numa amostra proveniente do indivíduo.

2. Método de avaliação do estado da doença de Alzheimer de acordo com a reivindicação n.º 1, método este que compreende a detecção de, pelo menos, mais um polipeptídeo seleccionado de um grupo constituído por polipeptídeos compreendendo as SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, , SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, ou seleccionado de um grupo constituído por cistatina C humana, beta-2 microglobulina humana, o homólogo de 7,7 kD da mioglobina humana, proteína neurosecretora VGF, um fragmento de pelo menos 5 aminoácidos de cistatina C humana, um fragmento de pelo menos 5 aminoácidos de beta-2 microglobulina humana, um fragmento de pelo menos 5 aminoácidos do homólogo de 7,7 kD da mioglobina humana e um fragmento de pelo menos 5 aminoácidos da proteína neurosecretora VGF.

3. Método de investigação da evolução da doença de Alzheimer num indivíduo **caracterizado por** um método da reivindicação n.º 1 ou 2 ser realizado com pelo menos duas amostras distintas colhidas de um mesmo indivíduo.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações n.º 1 a 3, em que a detecção do(s) referido(s) polipeptídeo(s) é realizada por SELDI-TOF MS.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações n.º 1 a 3, em que anticorpos específicos ou anticorpos que reconhecem os referidos polipeptídeos são utilizados na detecção do(s) polipeptídeo(s) mencionado(s).

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações n.º 1 a 5, em que a detecção é feita numa amostra que inclui LCR, sangue, soro, plasma, urina, plasma seminal, líquido aspirado do mamilo e/ou extractos celulares do referido paciente.

Lisboa, 24/10/2008

Fig 1:

