

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 063**

21 Número de solicitud: 201130290

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.03.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.02.2013

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

14.03.2013

Fecha de la concesión:

31.01.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.02.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
(100.0%)**

**Avenida de la Universidad s/n Edificio Rectorado
y Consejo Social
03202 Elche (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**SAEZ VALERO, Javier y
GARCIA AYLLON, Mª Salud**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Método para determinar la enfermedad de Alzheimer mediante la detección de glicoproteínas portadoras del glicopéptido HNK-1**

57 Resumen:

Método para determinar la enfermedad de Alzheimer mediante la detección de glicoproteínas portadoras del glicopéptido HNK-1.

La presente invención se refiere a un método para determinar la enfermedad de Alzheimer mediante la detección de glicoproteínas portadoras del glicopéptido HNK-1, a un método para determinar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y al uso de un kit para llevar a cabo dichos métodos.

ES 2 395 063 B1

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la enfermedad de Alzheimer mediante la detección de glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1.

- 5 La presente invención se enmarca dentro del campo de la neurobiología y de la biomedicina. Específicamente, se refiere a un método para determinar la enfermedad de Alzheimer (EA) mediante la detección de glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1, a un método para determinar la progresión de la enfermedad de Alzheimer y al uso de un kit para llevar a cabo dichos métodos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

- 10 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa de carácter progresivo, de origen todavía desconocido. Dicha enfermedad es la causa de invalidez y dependencia más frecuente en la actualidad, entre las personas de edad avanzada. Se estima que 8 millones de europeos están afectados por la enfermedad de Alzheimer y, teniendo en cuenta el envejecimiento de la población, se prevé que el número de enfermos se duplique en 2020 y triplique en 2050. Pese a estos datos, todavía no existen tratamientos capaces de curar la enfermedad y, la no existencia de marcadores bioquímicos capaces de
- 15 distinguir a la EA de otro tipo de demencias, hace que el diagnóstico de la misma no sea del todo concluyente.

- Esta enfermedad está caracterizada por una progresiva pérdida de memoria y de otras capacidades mentales a medida que las neuronas degeneran y diferentes zonas del cerebro se atrofian. A nivel neuropatológico la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos estructuras anormales
- 20 que se acumulan en el cerebro, los depósitos amiloides (fibras insolubles localizadas extracelularmente formadas por el péptido β -amiloide (β A)) y los ovillos neurofibrilares (conglomerados de la proteína citoesquelética tau hiperfosforilada). Por otro lado, también se ha descrito glicosilación alterada para diversas glicoproteínas tanto en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como en el cerebro de pacientes con EA (Sáez-Valero et al., Lancet 1997, 350, 929; Guevara J et al., Exp. Neurol. 1998, 57, 905-914; Fodero LR. et al., J. Neurochem. 2001, 79, 1022-1026; Kanninen K et al., Neurosci Lett. 2004, 367, 235-240; Botella-López A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 5573-5578), por lo que se piensa que las alteraciones patológicas que acontecen en el cerebro de Alzheimer pueden ser consecuencia o determinante de cambios en la pauta de glicosilación.

- Las glicoproteínas consisten en una mezcla de variantes glicosiladas, denominadas glicoformas, en las que la misma secuencia peptídica está asociada a la unión de uno o más oligosacáridos al mismo punto de glicosilación. En una misma especie, los restos oligosacáridicos dependen del tipo celular y su equipamiento enzimático, pero también de su estado de desarrollo, nutricional y patológico. Una misma proteína puede presentar incluso en el mismo tipo celular alternativas en su glicosilación que marquen diferentes localizaciones subcelulares (o secreción) y determinen su función y funcionalidad.

- 35 Un glicoepítipo (porción glucídica de una glicoproteína) abundante en el sistema nervioso central es el llamado HNK-1, un carbohidrato inusual que contiene el azúcar ácido 3-sulfo-glucurónico en la siguiente secuencia: GlcA(3-sulfato)(β 1 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc (Voshol H et al., J. Biol. Chem. 1996, 271, 22957-22960). El glicano HNK-1 es un marcador de adhesión celular, presente en glicolípidos (SGGL-1 y SGGL-2) y glicoproteínas.

- 40 La expresión del glicoepítipo HNK-1 está temporalmente y espacialmente regulada durante el desarrollo. Y lo que resulta potencialmente más interesante, el determinante HNK-1 sólo aparece en algunas variantes (glicoformas) de la misma proteína y sólo en determinados tejidos, posiblemente revelando funciones fisiológicas distintas para dichas variantes. Así, podemos suponer que dicho azúcar determina y participa en las funciones y/o localización específica de unas variantes de glicoproteínas frente a otras,
- 45 variantes que pueden estar específicamente afectadas en ciertas condiciones patológicas; aunque hasta el momento no es conocido como se regula el glicoepítipo HNK-1 durante la patogénesis neurodegenerativa en general y en la EA en particular.

- Por tanto, aunque el hallazgo de patrones específicos de expresión de determinadas glicoproteínas y su identificación en el LCR o plasma, podría ser de gran interés como marcador biológico, aún no se han encontrado marcadores bioquímicos que diferencien la EA de otro tipo de demencias, por lo que persiste el problema del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.
- 50

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- La presente invención se refiere a un método para determinar la enfermedad de Alzheimer mediante la detección de glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1, a un método para determinar la
- 55 progresión de la enfermedad de Alzheimer y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

Es de destacar que la presente invención demuestra que el glicoepítipo HNK-1, asociado a diversas proteínas, presenta manifiesta alteración en la inmunoreactividad (cantidad relativa) de las bandas HNK-1 detectadas en cerebro de Alzheimer al comparar éstos con controles no patológicos, indicando que la patología afecta específicamente a glicoformas asociadas con el epítipo HNK-1 en el cerebro de Alzheimer.

Debido a que la expresión de proteínas portadoras del epítipo HNK-1 se muestra específicamente afectada en la enfermedad de Alzheimer, el objeto de la presente invención es proporcionar un método para determinar la enfermedad de Alzheimer y más específicamente, para determinar la presencia o ausencia de dicha enfermedad neurodegenerativa basado en la determinación de glicoproteínas asociadas con el epítipo HNK-1.

Por tanto, la presente invención resuelve el problema técnico que plantea el diagnóstico de la EA, para la cual actualmente no existe ninguna prueba que pueda diagnosticar dicha enfermedad con precisión recurriéndose a la evaluación sistemática que elimina otras posibles causas.

La presente invención proporciona un nuevo biomarcador de alta especificidad y sensibilidad, con potencial diagnóstico para la EA donde, a partir de una muestra biológica de un sujeto, se detectan y/o cuantifican glicoformas de glicoproteínas mediante anticuerpos frente al glicoepítipo HNK-1.

Así, en la presente invención se muestra, que a partir de una muestra cerebral de un sujeto se detectan patrones que permiten diagnosticar dicha enfermedad con una sensibilidad mayor de un 80%, preferentemente entre el 83 y el 100%, y una especificidad mayor de un 65%, preferentemente entre el 67 y el 83%, valores acordes a los señalados como necesarios según el *Consensus Report of the Working Group on "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease"* (1998; estudio patrocinado por *The Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and The National Institute on Aging*). De igual forma, la presente invención provee de un método de diagnóstico altamente eficaz para descartar dicha enfermedad.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método, en adelante primer método de la invención, para determinar la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica aislada de un individuo, que comprende:

- a. detectar y/o cuantificar las glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1 en dicha muestra biológica aislada, y
- b. comparar los datos obtenidos en el apartado (a) con valores de referencia, para encontrar una desviación significativa.

El término "glicoproteína portadora del glicoepítipo HNK-1", tal y como se utiliza en la descripción se refiere a una proteína unida a una o varias moléculas de glicoepítipo HNK-1.

Son muchas las glicoproteínas cerebrales portadoras de dicho glicoepítipo. Así, pero sin limitarse, se ha descrito HNK-1 en las moléculas de adhesión celular NCAM (*neural cell adhesion molecule*), telencefalina y tenascina-R [Yoshihara Y et al., *Neurosci Res.* 1991, 10,83-105], en CD-24 (Lieberoth A et al., *J Neurosci.* 2009, 29, 6677-6690), en la molécula periférica P0 (Bollensen E et al., *Neurosci Lett* 1987, 82, 77-82), en la molécula de reconocimiento neural L1 (Hall H et al., *J Neurochem.* 1997, 68, 544-553), las moléculas TAG-1 (Dodd et al., *Neuron* 1988, 1, 105-116) y F3/F11 (Rathjen FG et al., *J Cell Biol.* 1987, 104, 343-353), y en otros muchos glicanos como neuroglicano C (Shuo T et al., *Glycoconj J.* 2004, 20, 267-278), agrecano (Domowicz MS et al., *Dev Dyn* 2003, 226, 42-50), distroglicano (Smalheiser NR et al., *J Biol Chem.* 1995, 270, 15425-15433), MAG (Bartoszewicz ZP et al., *J Neurosci Res.* 1995, 41, 27-38), somataglicano-S (Williams C et al., *Neurochem.* 1994, 62, 1615-1630), fosfocano y neurocano (Preobrazhensky AA et al., *Neurochem Res.* 1997, 22, 133-140) entre otros.

También se ha descrito la presencia de HNK-1 en las enzimas acetilcolinesterasa (Bon S et al., *J Neurochem.* 1987, 49, 1720-1731), butirilcolinesterasa (Weikert T et al., *Neurosci Lett* 1994, 176, 9-12) y 5'-nucleotidasa (Vogel M et al., *Eur J Neurosci* 1993, 5, 1423-1425), y en otras proteínas neurales como la priónica (Chen S et al., *Mol Cell Neurosci* 2003, 22, 227-233), la reelina (Botella-López A et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103, 5573-5578), la subunidad del receptor de glutamato GluR2 (Morita I et al., *J Biol Chem* 2009, 284, 30209-30217), o el receptor RPTPβ (Abbott KL et al., *J Biol Chem* 2008, 283, 33026-33035) entre otras.

De aquí en adelante, para hacer referencia a las glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1 descritas en párrafos anteriores, se puede emplear el término "glicoproteínas de la invención".

El término "muestra biológica aislada", tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a plasma o a una muestra cerebral, donde la muestra cerebral es preferentemente un fluido biológico, y

más preferentemente líquido cefalorraquídeo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a mamíferos, preferentemente humanos o animales.

5 La expresión "detectar y/o cuantificar" tal y como se emplea en la descripción del método de la invención, hace referencia a la detección de la presencia y/o a la medida de la cantidad o la concentración, preferentemente de manera semicuantitativa o cuantitativa.

10 De acuerdo con la presente invención, la detección y/o cuantificación de las glicoproteínas de la invención puede ser llevada a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica. En una realización preferida la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante electroforesis, preferentemente mediante electroforesis de dos dimensiones o electroforesis bidimensional.

15 El término "electroforesis", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier técnica analítica, basada en la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (por ejemplo pero sin limitarse, electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Ejemplos de electroforesis conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: electroforesis capilar, electroforesis en gel, electroforesis proteica o electroforesis bidimensional.

20 La electroforesis bidimensional permite la separación de mezclas complejas de las glicoproteínas de la invención. La separación se hace en dos etapas consecutivas. En la primera de ellas ("primera dimensión") las glicoproteínas son separadas en función de su carga a lo largo de un gel con gradiente de pH. Cada glicoproteína avanza en el campo eléctrico hasta alcanzar un valor de pH igual a su punto isoelectrico. En una segunda etapa ("segunda dimensión"), estas glicoproteínas son separadas entre sí en función de su masa molecular. La visualización del resultado de estas dos electroforesis muestra el conjunto de las glicoproteínas presentes en la mezcla inicial.

25 En otra realización preferida la detección y/o cuantificación se lleva a cabo mediante inmunoensayo, preferentemente mediante ensayo ELISA.

30 El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier técnica analítica, basada en la reacción de conjugación de la secuencia aminoacídica de las glicoproteínas de la invención, de sus variantes o de un fragmento de las mismas con un anticuerpo que las reconoce.

Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o microarrays de proteínas.

35 El inmunoensayo puede ser un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo (la muestra biológica se pega a un soporte sólido y el antígeno se detecta con un anticuerpo reportador), ELISA indirecto (igual que el anterior salvo que se emplean dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario, lo que permite amplificar la señal), ELISA sándwich (la variante consiste en que se captura el antígeno mediante un primer anticuerpo, resolviéndose con un segundo anticuerpo contra una región distinta, epítipo, del antígeno) u otras variantes de ELISA.

Preferentemente el ensayo ELISA se lleva a cabo:

- 45
- mediante la fijación al soporte sólido de anticuerpos anti-HNK-1, para fijar y medir la proteína total HNK-1 (ligada a la placa de medida por una Ig-M que permita amplificar la fijación de anticuerpo), revelando la misma por un método convencional de medida de proteínas como por ejemplo pero sin limitarse, el del ácido bicínico (accesible comercialmente y de uso rutinario en nuestro laboratorio) o,
- 50
- mediante la fijación al soporte sólido de anticuerpos contra la porción aminoacídica de una glicoproteína dada, para fijar y medir el contenido en sus glicofórmos HNK-1, revelando con anticuerpos anti-HNK-1 y anticuerpos secundarios contra los mismos o,
 - mediante el uso de lectinas fijando las lectinas a los pocillos (las lectinas fijan exclusivamente glicoproteínas portadoras de ciertos azúcares selectivos, entre ellas a las glicoproteínas de la

invención) y tras incubación con extractos, identificando las glicofórmulas HNK-1 (glicoproteínas de la invención) con anticuerpos anti-HNK-1 como molécula reportera. Las lectinas PHA, aglutininas de *Phaseolus vulgaris* presentan un patrón de reconocimiento semejante al propio del HNK-1. Esta última aproximación permite mejorar la sensibilidad del análisis, de forma que el uso de otras lectinas podría servir para refinar la especificidad del método.

Estos métodos pueden requerir de una etapa previa de separación de proteínas de bajo peso molecular (por debajo de 100 KDa) mediante filtros.

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y/o cuantificación de la cantidad del anticuerpo frente a la secuencia aminoacídica de la glicoproteína de la invención. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ³²P o ³⁵S, fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa por colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía, respectivamente.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende atribuir la desviación significativa a la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer en el individuo.

El término "desviación significativa" tal y como se emplea en la presente invención hace referencia a la diferencia de concentración de las glicoproteínas de la invención en la muestra biológica aislada con respecto a una muestra de un individuo sano, es decir, un individuo que presente dichas glicoproteínas a niveles normales. Así, para encontrar una desviación significativa, se compara la desviación de los resultados obtenidos en el apartado (a) con respecto a unos valores de referencia. Preferentemente los valores de referencia son, pero sin limitarse, valores control, es decir, aquellas muestras que presentan las glicoproteínas de la invención en niveles normales.

En la presente invención se muestra que los valores patológicos se desvían un 48-64% de los promedios determinados en un individuo sano. Dicha desviación es una desviación significativa de las normas estadísticas establecidas, como por ejemplo, pero sin limitarse, la desviación de la media o mediana con respecto al control. No obstante, la desviación estadísticamente significativa puede determinarse mediante cualquier técnica estadística conocida por el experto en la materia.

El epítipo HNK-1 determina y participa en las funciones y/o localización específica de unas variantes de glicoproteínas frente a otras, así, por ejemplo, el HNK-1 se encuentra unido a la reelina o a la acetilcolinesterasa (AChE) sólo en ciertas condiciones (Botella-López A et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 5573-5578 y Johnson G, et al., Int J Dev Neurosci 2001, 19, 439-45, respectivamente). En la presente invención se demuestra que el epítipo HNK-1 puede actuar como un indicador de la EA.

Por tanto, en una realización más preferida del método de la invención se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoeptipo HNK-1 (glicoproteínas de la invención) que se seleccionan de la lista que comprende, pero sin limitarse, reelina, acetilcolinesterasa, cualquiera de sus subunidades o isoformas o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización más preferida se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoeptipo HNK-1 (glicoproteínas de la invención) de un tamaño menor de 200 KDa. Preferentemente de un tamaño menor de 100 KDa y aún más preferentemente de un tamaño menor de 60 KDa.

En la presente invención se optimizaron las zonas o áreas inmunoreactivas para HNK-1 agrupando bandas cercanas por su peso molecular e inmunoreactividad, usando distintos tiempos de exposición y contrastes. De este modo, se definieron hasta 6 áreas. La inmunoreactividad de estas áreas se cuantificó y sometió a análisis estadístico mediante el test *Mann-Whitney*, definiendo las áreas con un tamaño menor de 100 KDa, preferentemente con un tamaño menor de 70 KDa, más preferentemente las áreas con un tamaño de entre 40 y 60 KDa y aún más preferentemente las áreas con un tamaño de entre 40 y 55 KDa como áreas con significancia estadística (ejemplo 2.2).

Otra realización preferida del primer método de la invención se refiere a un método donde, según el apartado (b), se comparan los datos obtenidos en la detección y/o cuantificación de una glicoproteína portadora del glicoeptipo HNK-1 (glicoproteína de la invención) con los valores de referencia que consisten en datos de detección y/o cuantificación de la proteína total. En una realización más preferida, se lleva a cabo el marcaje simultáneo y distinguible de la proteína total y de la glicoproteína portadora del glicoeptipo HNK-1 (glicoproteína de la invención).

Así por ejemplo, para la acetilcolinesterasa (AChE, Figura 5) se compara la cantidad total de proteína y la glicoproforma HNK-1 mediante ELISA utilizando como anticuerpo de captura un anticuerpo contra la parte aminoacídica (para la proteína total) y como anticuerpo reportador un anticuerpo anti-HNK-1 (para la glicoproforma HNK-1).

- 5 El uso de ELISA con doble anticuerpo (contra la proteína total X y contra la glicoproforma HNK-1 de esa proteína X), permite optimizar la sensibilidad del método, para proteínas que, al igual que la acetilcolinesterasa, en situaciones patológicas de EA disminuye la cantidad total de proteína y disminuye la glicoproforma HNK-1.

10 En una realización aún más preferida dicha comparación se lleva a cabo mediante el cociente entre la concentración de proteína total y la concentración de la glicoproforma portadora del glicoeptopo HNK-1 (glicoproteína de la invención).

15 Por ejemplo, en la presente invención se ha comprobado que en la reelina (Figura 5), se ve una manifiesta diferencia entre la muestra control y la muestra patológica donde se observa un aumento de la proteína total y una disminución de su glicoproforma HNK-1 (glicoproteína de la invención), de forma que el uso de cocientes: "nivel total de proteína X"/ "nivel total de glicoproforma HNK-1 de esa proteína X (glicoproteína de la invención)" para al menos una de las glicoproteínas de la invención, permite una mayor discriminación de las muestras patológicas.

20 El uso de este tipo de cocientes entre isoformas o variantes de proteínas se ha demostrado eficaz para discriminar más eficazmente potenciales biomarcadores diagnósticos. En concreto para Alzheimer y otro tipo de demencias, se han reportado cocientes de péptidos A β (especies de diferente longitud) (Kanai M et al. Ann Neurol. 1998, 44, 17-26; Schupf N et al. Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105, 14052-14057), cocientes de isoformas de la proteína tau (isoformas con diferente grado de fosforilación) (Buerger K et al. Neurobiol Aging 2006, 27, 10-15.; Borroni B et al. Neurology 2008, 71, 1796-1803), y también para otras proteínas que sufren modificación post-traducciona, incluyendo glicosilación (Sáez-Valero et al. Lancet 1997, 350, 929; Biroccio A et al. Proteomics 2006, 6, 2305-2313; Botella-López A et al.. Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103, 5573-5578).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método, en adelante segundo método de la invención, para determinar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un individuo, que comprende:

- 30 a. obtener datos de una primera comparación de la detección y/o cuantificación de una glicoproteína portadora del glicoeptopo HNK-1 (glicoproteína de la invención) con valores de referencia, en una muestra biológica aislada de un individuo,
- b. obtener datos de una segunda comparación según se describe en el apartado (a) en una muestra biológica aislada del individuo después de determinar la primera comparación, y
- c. comparar los datos obtenidos según el apartado (b) con los datos obtenidos según el apartado (a) para buscar alguna desviación significativa.

35 Preferentemente la muestra biológica aislada del individuo es plasma o una muestra cerebral. Más preferentemente la muestra cerebral es un fluido biológico, y aún más preferentemente líquido cefalorraquídeo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

40 En una realización preferida del segundo método de la invención, la detección y/o cuantificación se realiza por inmunoensayo, preferentemente ensayo ELISA. Y en otra realización preferida, la detección y/o cuantificación se realiza por electroforesis, preferentemente electroforesis de dos dimensiones.

En otra realización preferida del segundo método de la invención se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoeptopo HNK-1 (glicoproteína de la invención) que se seleccionan de la lista que comprende, pero sin limitarse: reelina, acetilcolinesterasa, cualquiera de sus subunidades o isoformas o cualquiera de sus combinaciones.

45 Y en otra realización preferida se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoeptopo HNK-1 (glicoproteínas de la invención) de un tamaño menor de 200 KDa. Preferentemente de un tamaño menor de 100 KDa y aún más preferentemente de un tamaño menor de 60 KDa.

50 En una realización más preferida del segundo método de la invención, los datos de los valores de referencia con los que se compara la detección y/o cuantificación de una glicoproteína portadora del glicoeptopo HNK-1 (glicoproteína de la invención) según los apartados (a) y (b), consisten en datos de detección y/o cuantificación de dicha proteína total.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una glicoproteína portadora del glicoeptopo HNK-1 (glicoproteína de la invención) como biomarcador para determinar la presencia o ausencia de la

enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica aislada de un individuo.

El término "biomarcador" o, de forma alternativa, "marcador molecular", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula o al producto de expresión de un gen o fragmentos y variantes del mismo que muestran cambios sustanciales en una enfermedad determinada y que se pueden usar tanto para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad como para determinar dicha enfermedad detectando la aparición de dichos cambios en el biomarcador.

Adicionalmente, el biomarcador también puede ser usado para seguir la eficacia de un tratamiento para esa enfermedad detectando cambios en el biomarcador en oposición a aquellos que se dan en la enfermedad o situación clínica.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende al menos una molécula indicadora de la presencia o ausencia del glicoepítipo HNK-1 que porta una glicoproteína (glicoproteína de la invención), para determinar la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica aislada de un individuo o para determinar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un individuo.

En una realización preferida la glicoproteína que porta el glicoepítipo HNK-1 (glicoproteína de la invención) se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende: reelina, acetilcolinesterasa, cualquiera de sus subunidades o isoformas o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida la glicoproteína que porta el glicoepítipo HNK-1 (glicoproteína de la invención) tiene un tamaño menor de 200 KDa. Preferentemente un tamaño menor de 100 KDa y aún más preferentemente un tamaño menor de 60 KDa.

En otra realización preferida la molécula indicadora es, al menos, un anticuerpo específico de dicho glicoepítipo.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la glicoproteína de la invención. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

En otra realización preferida la muestra biológica aislada del individuo es plasma o una muestra cerebral, donde la muestra cerebral es preferentemente un fluido biológico, y más preferentemente líquido cefalorraquídeo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Muestra un azúcar reconocido por la proteína receptora HNK-1.

El azúcar epítipo (en gris y a la izquierda) es el 3-sulfo-glucurónico.

FIG. 2. Muestra valores densitométricos de extractos de cerebro humano con la enfermedad de Alzheimer y de controles no dementes.

2A. Muestra un *Dot blot* ilustrativo donde los pocillos con alícuotas de extractos de cerebro humano con la enfermedad de Alzheimer y de controles no dementes se han teñido mediante anticuerpos anti-HNK-1.

AD, enfermedad de Alzheimer. NCD, controles no dementes.

2B. Muestra la representación en nube de puntos de los valores densitométricos determinados para cada una de estas muestras.

Los parámetros de sensibilidad y especificidad, así como el valor estadístico (p) alcanzado con el test *Mann-Whitney* son: sensibilidad: 75%; especificidad: 70%; p= 0,016.

En el eje de ordenadas se representa la inmunorreactividad frente a HNK-1 (unidades arbitrarias). AD, enfermedad de Alzheimer. NCD, controles no dementes.

FIG. 3. Muestra un Western blot de bandas inmunoreactivas para HNK-1.

3A. Western blot representativo de bandas inmunoreactivas para HNK-1 tras separación electroforética por SDS-PAGE de extractos de cerebro humano con la enfermedad de Alzheimer y de controles no dementes.

5 1, área 1; 2, área 2; 3, área 3; 4, área 4; 5, área 5; 6, área 6. AD, enfermedad de Alzheimer. NCD, controles no dementes.

3B. El mismo blot que en 3A pero a exposiciones más largas.

1, área 1; 2, área 2; 3, área 3; 4, área 4; 5, área 5; 6, área 6. AD, enfermedad de Alzheimer. NCD, controles no dementes.

10 **FIG. 4. Muestra una representación en nube de puntos de los valores de inmunorreactividad de las áreas con significancia estadística.**

Muestra una representación en nube de puntos de la determinación de las muestras de casos Alzheimer y control. Los valores de inmunoreactividad de las áreas determinadas, reflejados en la Tabla 1, se han dividido por un factor para mostrarlas en números más pequeños y manejables.

15 Área 6: sensibilidad: 83%, especificidad: 83%; Área 5: sensibilidad: 100%, especificidad: 75%; Área 4: sensibilidad: 83%, especificidad: 75%; Área 3: sensibilidad: 92%, especificidad: 67%.

En el eje de ordenadas se representa la inmunorreactividad frente a HNK-1 (unidades arbitrarias). 6, área 6; 5, área 5; 4, área 4; 3, área 3. AD, enfermedad de Alzheimer. NCD, controles no dementes.

20 **FIG. 5. Muestra un Western blot de extractos de corteza frontal de cerebros no dementes (ND) y Alzheimer (AD) revelados con un anticuerpo anti-HNK-1, un anticuerpo anti-Reelina y un anticuerpo anti-acetilcolinesterasa.**

25 Tras resolver la membrana con un anticuerpo anti-HNK-1 (parte izquierda de la figura; en la parte de abajo se muestra la imagen con mayor contraste) se realizó *stripping* a la membrana y se re-incubó con un anticuerpo anti-reelina (parte superior derecha de la figura) o con un anticuerpo anti-acetilcolinesterasa (parte inferior derecha de la figura). Las diferentes bandas observadas para reelina se corresponden con la proteína total (~400 kDa) y con los fragmentos N-terminales de ~300 y 180 kDa, donde se ha identificado el epítipo HNK-1 (Botella-López A et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 5573-5578). Los niveles totales de Reelina son más elevados en las muestras AD. Las diferentes bandas observadas para acetilcolinesterasa (AChE) se corresponden a variantes o isoformas de la glicoproteína presentes en todo tipo de tejidos (al menos 3 bandas entre 55 y 77 kDa). Los niveles de acetilcolinesterasa son menores en las muestras AD.

AChE, acetilcolinesterasa; AD, enfermedad de Alzheimer; NCD, controles no dementes.

EJEMPLOS

35 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y sensibilidad del método de diagnóstico de la EA basado en la detección, en muestras de tejido cerebral de los pacientes, de anticuerpos frente al glicopéptido HNK-1.

EJEMPLO 1. Muestras de tejido cerebral de pacientes y extracción de proteínas de las muestras.

1.1 Muestras de cerebro humano.

40 Para los experimentos recogidos en esta memoria se obtuvieron muestras de cerebro del Banco de Tejidos del Hospital Clínico de Barcelona, pequeños fragmentos de alrededor de 0,1-0,2 g de un área especialmente afectada por la patología, el córtex prefrontal y en concreto la *pars opercularis* del giro inferior frontal (12 casos; 76 ±3 años (media ±SEM)). Las muestras de casos esporádicos de EA correspondieron a la categoría VI de Braak and Braak (clasificación de los estadios de la enfermedad de Alzheimer). Los casos control no patológicos no tenían historial clínico de demencia ni mostraron evidencia de patología cerebral en el examen histopatológico (12 casos; 68 ±4 años (media ±SEM)). Las muestras tanto de EA como control se mantuvieron congeladas a -70° C hasta su uso.

1.2 Extracción de proteínas del tejido cerebral.

Para la solubilización del tejido, las muestras fueron descongeladas gradualmente hasta los 4°C, temperatura a la que se mantuvieron durante todo el proceso. Se homogeneizó (10% peso/volumen) en un tampón frío conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.4/ 150 mM NaCl/ 0.5% (p/v) Triton X-100/ 0.5% Nonidet P-40 (p/v) y

suplementado con una mezcla de inhibidores de proteinasas (Botella-López A et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 5573-5578). Los tejidos se procesaron mediante sonicación y se incubaron unos 30 minutos, tras los cuales se centrifugó a 20.000×g durante 20 minutos. Tras la centrifugación se recogieron los sobrendantes, se alicuotaron y conservaron a -70°C hasta su ulterior uso. Una alícuota se usó para la determinación del contenido total de proteínas, que se realizó por el método del ácido bicinónico, según el protocolo del fabricante (Pierce).

EJEMPLO 2. Detección y cuantificación de glicoproteínas HNK-1 en las muestras.

2.1 Detección de glicoproteínas HNK-1.

Para esclarecer si la expresión de HNK-1 aparecía alterada en la EA, se analizó mediante *Dot blot* extractos de cerebro humano (corteza frontal) de Alzheimer y controles no patológicos. Esta técnica es más elemental que la de *Western blot*, ya que tiñe las proteínas portadoras del epítipo HNK-1 sin separar y sin necesidad de desnaturizar las mismas durante su preparación. En base a esta técnica se comprobaron diferencias significativas entre extractos de corteza EA y controles (Figura 2A).

Para la determinación de glicoproteínas HNK-1, en el mercado existen gran variedad de anticuerpos monoclonales comerciales; para este estudio se utilizó el denominado *CD57 de Sigma-Aldrich Co.* a una dilución 1:2000.

En primer lugar los extractos cerebrales se sometieron a análisis por *Dot blot* sin que la muestra se desnaturizara mediante el aparato de microfiltración *Bio-Dot SF* de *BioRad*, mediante siembra en una membrana de nitrocelulosa, resolviéndose la inmunoreactividad tras incubación con el anticuerpo anti-HNK-1 tal cual se detalla a continuación para el Western blot.

En base a estos resultados se inició un estudio mediante separación electroforética de las diversas proteínas en base a su tamaño (peso molecular), SDS-PAGE y posterior análisis por *Western blot* con anticuerpos anti-HNK-1. Mediante esta aproximación, se identificaron en extractos de corteza frontal más de una decena de bandas de entre 30 y 180 kDa (Figura 3).

Para el análisis electroforético por SDS-PAGE y resolución por *Western blot*, las muestras fueron desnaturizadas y cargadas en geles de acrilamida-bisacrilamida del 7,5%. Tras transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa y bloqueo en 5% de leche desnatada las membranas se incubaron con el citado anticuerpo CD57 y posteriormente con un anticuerpo secundario reportador conjugado a HRP. Como control de carga se usó un anticuerpo anti- α -tubulina (1:1000; *Sigma-Aldrich Co.*). Las bandas inmunoreactivas para HNK-1 se detectaron mediante el kit *ECL-Plus (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL)* en un Analizador de Imagen Luminescente (*LAS-1000 Plus (FUJIFILM)*). Para el análisis semicuantitativo la intensidad de las bandas inmunoreactivas se determinó mediante un *Science Lab Image Gauge v4.0* con software de *FUJIFILM*.

Se optimizó la cuantificación de las bandas más o menos inmunoreactivas para HNK-1 usando distintos tiempos de exposición y contrastes (para poder cuantificar las bandas más tenues). Así, se cuantificó un *Western blot* a exposiciones más largas (Figura 3B) porque aunque se pierde resolución en las bandas más inmunoreactivas, que resultan sobre-expuestas, se definieron más bandas inmunoreactivas para HNK-1 para más proteínas, agrupadas en principio en la zona baja del gel (menor peso molecular). Con el grado de resolución (separación) de proteínas alcanzado se definieron zonas o áreas inmunoreactivas, de este modo, se definieron hasta 6 áreas agrupando bandas cercanas por su peso molecular e inmunoreactividad HNK-1 (Figuras 3A y 3B).

2.2 Análisis estadístico.

Sobre estas áreas se estimó cuantitativamente la inmunoreactividad positiva para HNK-1 por determinación densitométrica. Las cuantificaciones de cada área se realizaron optimizando los tiempos de exposición por separado. La inmunoreactividad de estas áreas se cuantificó y sometió a análisis estadístico. El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa *SigmaStat 2.03*. Dado que la distribución de los datos no se ajustaba a la normalidad, para la comparación entre el grupo control y el EA, se usó el test *Mann-Whitney U* (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis estadístico de de las áreas de inmunorreactividad.

	ÁREA 1 ~205KDa	ÁREA 2 ~100KDa	ÁREA 3 ~66KDa	ÁREA 4 ~60KDa	ÁREA 5 ~55KDa	ÁREA 6 ~40KDa
n NCD	12	12	12	12	12	12
NCD Media	793561	1162122	121322	128786	119269	125311

NCD Error	92438	137768	14907	18934	22644	27517
n AD	12	12	12	12	12	12
AD Media	900715	828512	62846	61179	52887	45154
AD Error	81510	94010	4787	4879	2407	3704
p	0,394	0,058	0,010	0,007	0,01	0,006
% AD/NCD	114	71	52	48	44	36
			Mann W	Mann W	Mann W	Mann W

AD, enfermedad de Alzheimer. NCD, controles no dementes. p, probabilidad. *Mann W*, test *Mann-Whitney*.

En la Tabla 1 se muestra que las áreas 3, 4, 5 y 6 mostraron diferencias estadísticas, mientras que el área 2 se mostró cercana a la significancia estadística, y el área 1 no mostró tendencia alguna.

5 En las áreas con significancia estadística (áreas 3-6 Tabla 1) se estimó la sensibilidad (probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo; también por ello conocida como “fracción de verdaderos positivos”) y especificidad (probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo; o “fracción de verdaderos negativos”) para definir los grupos EA y controles en base a los marcadores utilizados.

10 Para balancear los puntos de corte que optimizan la discriminación entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción verdaderos negativos (especificidad), dado el número de muestras analizadas, éstos se pudieron realizar por una estimación sencilla y arbitraria. Para el análisis de un número mayor de muestras se requiere el apoyo del “análisis ROC” o curva ROC (acrónimo de *Receiver Operating Characteristic*, o Característica Operativa del Receptor), que permite optimizar el umbral de discriminación (valor a partir del cual decidimos que un caso es un positivo).

15 Los valores concretos de los puntos de corte están formulados en unidades arbitrarias. El análisis de las variables por métodos ELISA permite estimar el contenido en glicoproteína en términos objetivos de ng/mL o pg/mL, y subsecuentemente el de los puntos de corte en dichas unidades.

20 Debido a que el actual diagnóstico clínico muestra valores de sensibilidad entorno al 80% y de especificidad entorno al 70%, valores que se superan en la mayoría de las bandas HNK-1 agrupadas en áreas (Figura 4), la estimación de la sensibilidad y especificidad resultaron prometedoras para su aplicabilidad diagnóstica.

25 Cabe señalar que esta agrupación en áreas es funcional para su análisis, pero se optimiza mediante separación por electroforesis bidimensional, donde las proteínas se separan no sólo en base a su tamaño, sino también a su carga. Ello permite resolver proteínas individuales en *spots*, aunque cuenta con el inconveniente de que no permite resolver proteínas de gran tamaño molecular (por encima de 100 kDa).

30 En resumen, los resultados obtenidos indican manifiesta alteración en la inmunoreactividad (cantidad relativa) de gran parte de las bandas HNK-1 detectadas en cerebro de Alzheimer, al comparar con controles no patológicos, lo que es indicativo de que la patología afecta específicamente a glicoformas portadoras del HNK-1 (glicoproteínas de la invención) en el cerebro de Alzheimer, presunción coherente en una patología que se caracteriza por pérdida sináptica en mayor medida que celular y por la directa implicación de las moléculas de adhesión en la formación y mantenimiento de la memoria.

EJEMPLO 3. Comparación de los niveles totales de proteínas cerebrales y de la inmunoreactividad HNK-1 atribuible a sus glicoformas portadoras del epítipo (glicoproteínas de la invención).

35 Para esta comparación se hace un análisis por *Western blot* de manera simultánea de los niveles totales de proteínas específicas portadoras del epítipo HNK-1 (con anticuerpos específicos contra un dominio aminoacídico de la proteína; detección de los niveles totales de proteína) y de los niveles de las glicoformas HNK-1 (glicoproteínas de la invención) de cada una de las mismas (con anticuerpos dirigidos contra el azúcar, anticuerpos anti-HNK-1; detección de los niveles de las glicoformas HNK-1 en cuestión, es decir, de las glicoproteínas de la invención).

En la presente invención se realizaron análisis de la proteína reelina y la proteína acetilcolinesterasa por técnicas de revelado clásico, primero con un anticuerpo anti-HNK-1, y tras *stripping* y lavado, re-incubando con anticuerpos contra la proteína reelina o contra la proteína acetilcolinesterasa respectivamente (Figura 5).

5 Para proteínas, como la reelina, que aumenta la cantidad total de proteína y disminuye la glicofoma HNK-1 se resuelve simultáneamente por electroforesis y de forma óptima con distintos anticuerpos secundarios fluorescentes (para la proteína total (IgG) y para las glicofomas HNK-1 (glicoproteína de la invención, IgM)) y se revela sobre el mismo blot ambos, resolviendo por separado, usando un escáner de fluorescencia que además permite co-localizar las bandas.

10 El uso de cocientes del tipo “nivel total de proteína X”/ “nivel total de glicofoma HNK-1 de esa proteína X (glicoproteína de la invención)”, permite una mayor discriminación de las muestras patológicas, es especial como se observa en la figura para la reelina (Figura 5), en los casos en que para muestras patológicas haya un aumento de la proteína en cuestión y disminución de su glicofoma HNK-1 (glicoproteína de la invención).

15 Para proteínas, como la acetilcolinesterasa, que disminuye la cantidad total de proteína y disminuye la glicofoma HNK-1 se resuelve por ELISA utilizando como anticuerpo de captura un anticuerpo contra la parte aminoacídica (para la proteína total) y como anticuerpo reportador un anticuerpo anti-HNK-1 (para la glicofoma HNK-1).

El uso de ELISA con doble anticuerpo (contra la proteína total X y contra la glicofoma HNK-1 de esa proteína X), permite optimizar la sensibilidad del método.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica aislada de un individuo, que comprende:
 - 5 a. detectar y/o cuantificar las glicoproteínas portadoras del glicopeptido HNK-1 en dicha muestra biológica aislada, y
 - b. comparar los datos obtenidos en el apartado (a) con valores de referencia, para encontrar una desviación significativa.
2. Método según la reivindicación 1, que además comprende atribuir la desviación significativa a la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer en el individuo.
- 10 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicopeptido HNK-1 de un tamaño menor de 200 KDa.
4. Método según la reivindicación 3, donde se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicopeptido HNK-1 de un tamaño menor de 100 KDa.
- 15 5. Método según la reivindicación 4, donde se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicopeptido HNK-1 de un tamaño menor de 60 KDa.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las glicoproteínas del paso (a) son detectadas y/o cuantificadas por electroforesis.
7. Método según la reivindicación 6, donde la electroforesis se lleva a cabo mediante electroforesis de dos dimensiones.
- 20 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las glicoproteínas del paso (a) son detectadas y/o cuantificadas por inmunoensayo.
9. Método según la reivindicación 8, donde el inmunoensayo se lleva a cabo mediante ensayo ELISA.
10. Método según la reivindicación 9, donde el ensayo ELISA se lleva a cabo mediante la fijación al soporte sólido de anticuerpos anti-HNK-1, anticuerpos contra la porción aminoacídica de la glicoproteína portadora del glicopeptido HNK-1, o de lectinas.
- 25 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde se comparan los datos obtenidos en la detección y/o cuantificación de una glicoproteína portadora del glicopeptido HNK-1 con los valores de referencia que consisten en datos de detección y/o cuantificación de la proteína total.
12. Método según la reivindicación 11, donde se lleva a cabo el marcaje simultáneo y distinguible de proteína total y de dicha glicoproteína portadora del glicopeptido HNK-1.
- 30 Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, donde dicha comparación se lleva a cabo mediante el cociente entre la concentración de proteína total y la concentración de la glicoproteína portadora del glicopeptido HNK-1.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la muestra biológica del paso (a) es una muestra cerebral.
- 35 14. Método según la reivindicación 14, donde la muestra cerebral es un fluido biológico.
15. Método según la reivindicación 15, donde el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la muestra biológica del paso (a) es plasma.
- 40 17. Método para determinar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un individuo, que comprende:
 - a. obtener datos de una primera comparación de la detección y/o cuantificación de una glicoproteína portadora del glicopeptido HNK-1 con valores de referencia, en una muestra biológica aislada de un individuo,
 - 45 b. obtener datos de una segunda comparación según se describe en el apartado (a) en una muestra biológica aislada del individuo después de determinar la primera comparación, y

- c. comparar los datos obtenidos según el apartado (b) con los datos obtenidos según el apartado (a) para buscar alguna desviación significativa.
18. Método según la reivindicación 18, donde se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1 de un tamaño menor de 200 KDa.
 - 5 19. Método según la reivindicación 19, donde se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1 de un tamaño menor de 100 KDa.
 20. Método según la reivindicación 20, donde se detectan y/o cuantifican las glicoproteínas portadoras del glicoepítipo HNK-1 de un tamaño menor de 60 KDa.
 - 10 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde las glicoproteínas son detectadas y/o cuantificadas por electroforesis.
 22. Método según la reivindicación 22 donde la electroforesis se lleva a cabo mediante electroforesis de dos dimensiones.
 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde las glicoproteínas son detectadas y/o cuantificadas por inmunoensayo.
 - 15 24. Método según la reivindicación 24, donde el inmunoensayo se lleva a cabo mediante ensayo ELISA.
 25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, donde los datos de los valores de referencia con los que se compara la detección y/o cuantificación de una glicoproteína portadora del glicoepítipo HNK-1 consisten en datos de detección y/o cuantificación de la proteína total.
 - 20 26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, donde la muestra biológica aislada del individuo es una muestra cerebral.
 27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, donde la muestra biológica aislada del individuo es plasma.
 28. Uso del glicoepítipo HNK-1 como biomarcador para determinar la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica aislada de un individuo.
 - 25 29. Uso de un kit que comprende al menos una molécula indicadora de la presencia o ausencia del glicoepítipo HNK-1 que porta una glicoproteína, para determinar la presencia o ausencia de la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica aislada de un individuo o para determinar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en un individuo.
 - 30 30. Uso de un kit según la reivindicación 30, donde la glicoproteína que porta el glicoepítipo HNK-1 tiene un tamaño menor de 200 KDa.
 31. Uso de un kit según la reivindicación 31, donde la glicoproteína que porta el glicoepítipo HNK-1 tiene un tamaño menor de 100 KDa.
 32. Uso de un kit según la reivindicación 32, donde la glicoproteína que porta el glicoepítipo HNK-1 tiene un tamaño menor de 60 KDa.
 - 35 33. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, donde la molécula indicadora es, al menos, un anticuerpo específico de dicho glicoepítipo.
 34. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, donde la muestra biológica aislada del individuo es una muestra cerebral.
 - 40 35. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, donde la muestra biológica aislada del individuo es plasma.

FIG. 1

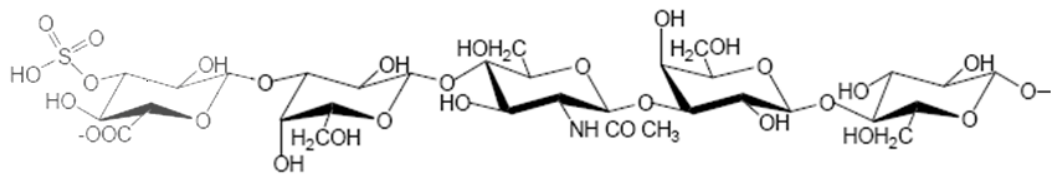
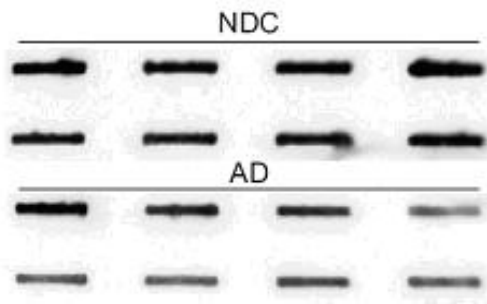


FIG. 2

A.



B.

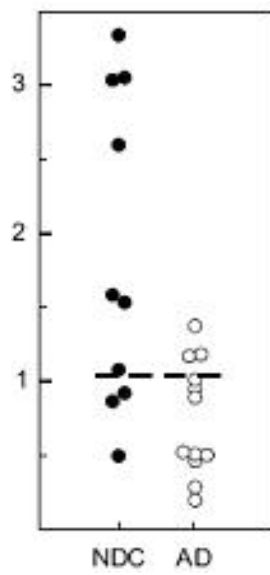
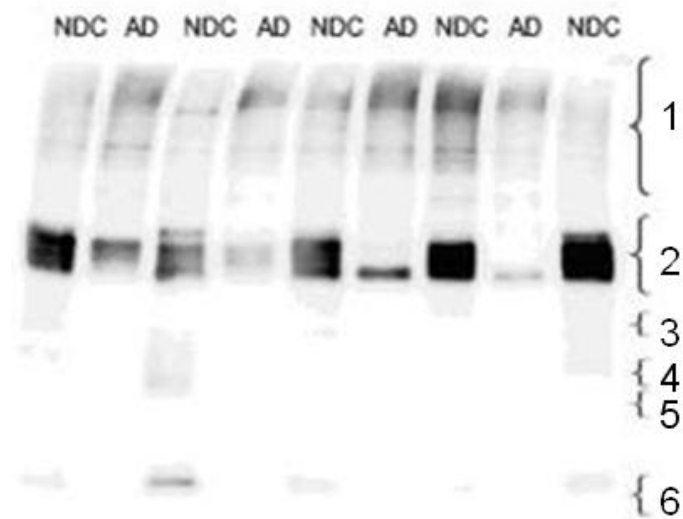


FIG. 3

A.



B.

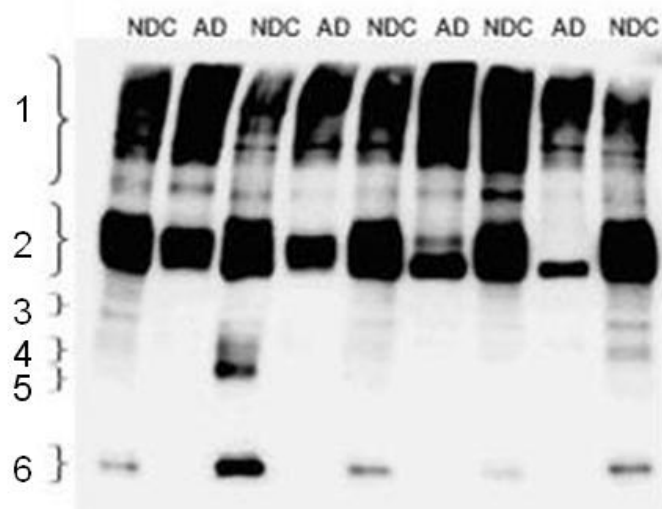


FIG. 4

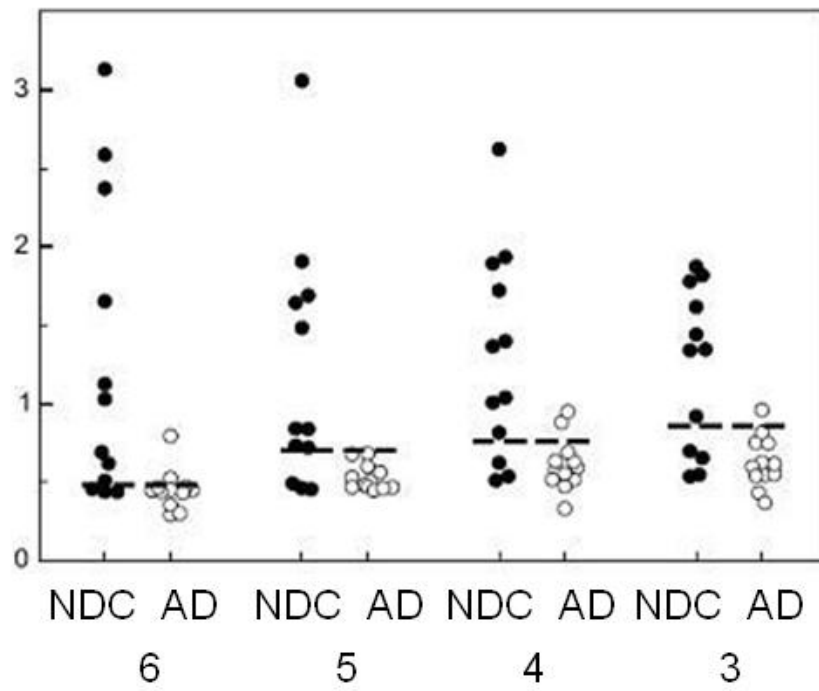
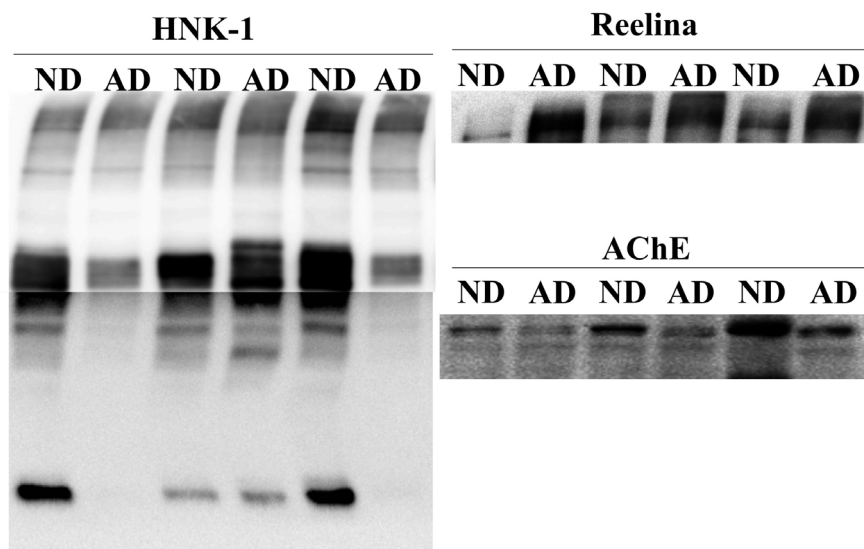


FIG. 5





- ②① N.º solicitud: 201130290
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.03.2011
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BOTELLA-LÓPEZ, A. et al. "Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease". PNAS. 04.04.2006. Vol. 103, N.º. 14, páginas 5573-5578, todo el documento.	1-36
X	WO 9915695 A1 (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE) 01.04.1999, todo el documento.	1-36
A	JOHNSON, G. et al. "Association of the HNK-1 epitope with detergent-soluble G4 isoform of acetylcholinesterase from human neuroblastoma cells". INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTALNEUROSCIENCE. 01.07.2001. Vol. 19, N.º. 4, páginas 439-445, todo el documento, especialmente apartado 3.2.	1-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.02.2013

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, WPI, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones

Reivindicaciones 1-36

SI**NO****Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

Reivindicaciones 1-36

SI**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer, en el que se identifican en extractos obtenidos de tejidos cerebrales de enfermos, proteínas portadoras del glicopeptido HNK-1 cuya presencia en las muestras, presenta un patrón diferente respecto a las proteínas extraídas de tejidos obtenidos de personas no enfermas.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BOTELLA-LÓPEZ, A. et al. "Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease". PNAS. 04.04.2006. Vol. 103, N°. 14, páginas 5573-5578, todo el documento.	
D02	WO 9915695 A1 (THE UNIVERSITY OF MELBOURNE)	01.04.1999
D03	JOHNSON, G. et al. "Association of the HNK-1 epitope with detergent-soluble G4 isoform of acetylcholinesterase from human neuroblastoma cells". INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTALNEUROSCIENCE. 01.07.2001. Vol. 19, N°. 4, páginas 439-445, todo el documento, especialmente apartado 3.2.	

El documento D01, presenta resultados sobre la expresión de reelina en líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de enfermedad de Alzheimer. La reelina de 420 kDa, se rompe in vivo en 2 sitios lo que provoca que se identifiquen por electroforesis tres bandas de proteínas: la nativa de 420 kDa, y dos de 320 y 180 kDa respectivamente. En la enfermedad de Alzheimer, el fragmento de 180 kDa aumenta un 40% en LCR; también describe el documento, que la reelina de enfermos de Alzheimer está glicosilada con el epítipo HNK-1 en LCR pero no en plasma lo que indica que la reelina identificada en ambos medios tiene un origen celular distinto.

El documento D02, describe un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el que se identifica acetilcolinesterasa con un patrón de glicosilación anormal. No se identifica el glicoepítipo HNK-1 como responsable de la glicosilación anormal.

El documento D03, describe la presencia del epítipo HNK-1 en la isoforma G4 de la acetilcolinesterasa de células de neuroblastoma humano. El epítipo es identificado utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HNK-1.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA****Reivindicaciones 1-36**

La relación entre la enfermedad de Alzheimer y la detección de proteínas en el líquido cefalorraquídeo que presentan un patrón de glicosilación anormal, se ha descrito previamente en el estado de la técnica. El documento D01, describe la presencia de reelina portadora del epítipo HNK-1 y sus fragmentos en LCR de enfermos de Alzheimer. Uno de los fragmentos de 180 kDa aumenta un 40% respecto a los resultados obtenidos de personas no enfermas. El documento D02, también describe el método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el que se detecta AChE que presenta glicosilación anormal. Aunque no se ha identificado el glicoepítipo, parece evidente por la metodología utilizada en los ensayos, que se trata del glicoepítipo descrito en la presente solicitud descrito ya anteriormente en el documento D03 en la isoforma G4 de la AChE. Las reivindicaciones 1-36 no son nuevas y no tienen actividad inventiva y por tanto no cumplen los requisitos de los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.