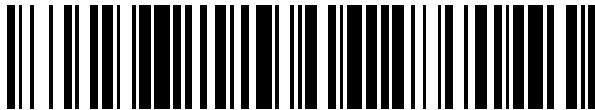


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 498 465**

(21) Número de solicitud: 201330230

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

(12)

## PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

**20.02.2013**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**24.09.2014**

Fecha de la concesión:

**10.09.2015**

(45) Fecha de publicación de la concesión:

**17.09.2015**

(56) Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070123**

(73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE (25.0%)**  
Avenida de la Universidad s/n Edificio Rectorado y Consejo Social  
03202 Elche (Alicante) ES;  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS (CIBERNED) (25.0%)**;  
**UNIVERSITY OF GOTHENBURG (25.0%) y FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE LA COMUNITAT VALENCIANA (25.0%)**

(72) Inventor/es:

**SÁEZ VALERO, Javier;**  
**GARCÍA AYLLÓN, María Salud y**  
**BLENNOW, Kaj**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

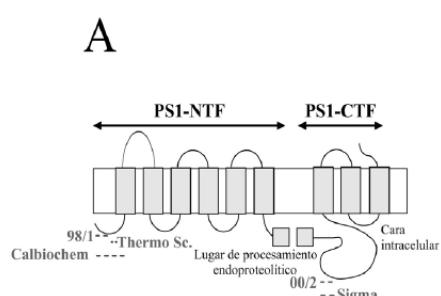
(54) Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

(57) Resumen:

Método de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se refiere al uso del complejo heterodimérico de presenilina 1 que comprende los fragmentos N- y C-terminal de la misma como biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, así como a un método y a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de dicha enfermedad mediante el uso de dicho biomarcador.

FIG. 1



**MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se encuadra en el campo de la enfermedad de Alzheimer, concretamente dentro de los métodos de diagnóstico y/o pronóstico de este tipo de enfermedad, que se basa en la detección de complejos de presenilina 1 en muestras biológicas aisladas.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza a nivel cerebral por dos estructuras anormales o depósitos proteináceos, las placas amiloïdes y los ovillos neurofibrilares.

15 Las placas están compuestas por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), mientras que los ovillos consisten en acúmulos de la proteína tau anormalmente hiperfosforilada (P-tau).  $A\beta$  y tau / P-tau son biomarcadores reconocidos para la EA y se han investigado extensamente. El análisis en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los niveles de especies de  $A\beta$ 1-42 ( $A\beta$ 42) y de tau (niveles totales, T-tau, y formas P-tau) ha  
20 demostrado una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la EA (Blennow *et al.*, 2006, *Lancet*, 368: 387-403). Sin embargo, existe una continua búsqueda de nuevos biomarcadores en el LCR para su uso en apoyo del diagnóstico clínico, especialmente para las etapas iniciales de la EA, así como para su uso en ensayos clínicos.

25

El contar con un diagnóstico temprano y preciso de la EA es esencial en el avance del tratamiento de esta demencia. Numerosos laboratorios han reportado incrementos en los niveles de T-tau y P-tau en el LCR, pero estos marcadores también aumentan en otros procesos que cursan con demencia, luego hay una falta de especificidad.

30

Respecto al otro marcador clásico de la EA, el  $A\beta$ 42, su generación se incrementa en el cerebro EA, sin embargo, y debido a la deposición creciente del péptido, se da la paradoja de que sus niveles en LCR se reducen (Blennow *et al.*, 2010, *Nat Rev Neurol.*, 6: 131-144).

Estos biomarcadores clásicos han mostrado valor en el diagnóstico de EA a nivel temprano, pero la necesidad de identificar otros marcadores bioquímicos específicos que permitan refinar el diagnóstico persiste. Además, en el campo de los biomarcadores de la EA uno de los mayores déficits es el seguimiento de terapias.

5

A fecha de hoy se conocen la mayoría de las proteínas implicadas en el procesamiento patológico de la proteína precursora de amiloide (APP), procesamiento que genera el péptido  $\beta$ -amiloide. El A $\beta$  es generado a través de la acción sucesiva de dos enzimas que actúan sobre el APP, las enzimas  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa  
10 (Thinakaran y Koo, 2008, *J Biol Chem.*, 283:29615-29619).

La actividad  $\beta$ -secretasa se debe fundamentalmente a una proteína denominada BACE1 (de “beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1”; Vassar *et al.*, 2009, *J Neurosci.*, 29: 12787-12794). BACE1 está presente en el LCR como una forma  
15 truncada soluble (Holsinger *et al.*, 2004; *Ann. Neurol.*, 55: 898-899). Como BACE1 contiene un único dominio transmembrana, su presencia en el LCR no fue sorprendente y se caracterizó ya hace casi una década. En este contexto, se ha propuesto que un aumento de los niveles de BACE1 en el LCR de EA reflejaría la elevación de los niveles de proteína y actividad BACE1 en el cerebro patológico;  
20 aunque no existe consenso sobre si esta enzima estaría igualmente afectada en distintos estadios de la enfermedad (Rosen *et al.*, 2012, *Neuromolecular Med.*, 14: 65-73).

En contraste, la actividad  $\gamma$ -secretasa se debe a un complejo formado por cuatro  
25 subunidades: la presenilina-1 (PS1) (o presenilina-2), la nicastrina, APH-1 (“anterior pharynx-defective 1”) y la PEN-2 (“presenilin enhancer 2”). Presenilina-1 (PS1) es la subunidad catalítica del complejo, es una aspartil proteasa con nueve dominios de transmembrana.

### 30 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención propone el uso del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal (CTF) y N-terminal (NTF) de presenilina 1 para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA), y por tanto proporciona un método

alternativo de diagnóstico y/o pronóstico de la EA basado en el uso de dicho complejo heterodimérico.

Presenilina-1 (PS1) es el componente activo del complejo  $\gamma$ -secretasa encargado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide o APP, generándose el péptido A $\beta$  cuya expresión anómala es uno de los desencadenantes de la enfermedad de Alzheimer. PS1 es una proteína transmembrana que contiene múltiples regiones hidrófobas, por lo que su presencia en el líquido cefalorraquídeo (LCR) no se ha medido hasta la fecha.

10

La maduración de la PS1 a su forma activa conlleva una escisión endoproteolítica que escinde la proteína en dos partes o fragmentos N- y C-terminales. De este modo al extraer la enzima de cerebro o células en cultivo en presencia de detergentes, sólo una pequeña proporción de PS1 se extrae como su forma entera.

15

Los inventores de la presente invención han detectado que la PS1 está presente en el LCR humano como hetero-complejos de aproximadamente 100 – 150 kDa de masa molecular compuestos por los fragmentos C-terminal y N-terminal de dicha proteína. Asimismo, han demostrado que el nivel de estabilidad de dichos complejos es significativamente más elevado en el LCR de pacientes que padecen EA frente a sujetos cognitivamente normales.

20

Así, la presente invención supone una solución a la necesidad de aportar un método alternativo de diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer, detectable en una muestra biológica.

25

Además, el método descrito en la presente invención aporta la ventaja de que permite llevar a cabo un diagnóstico y/o pronóstico de la EA útil en el seguimiento de terapias para dicha enfermedad. El potencial de que secretasas sean dianas de nuevos tratamientos de EA hace particularmente interesante que la detección de la estabilidad de los complejos heterodiméricos de PS1, como se propone en la presente invención, represente un biomarcador en ensayos clínicos, en la monitorización del tratamiento y la progresión de la enfermedad, donde el uso de los actuales biomarcadores es más discutido.

Por ello, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de PS1 para el diagnóstico y/o pronóstico de la EA.

- 5    Se entiende por “complejo heterodimérico” un complejo que está formado por dos subunidades proteicas distintas. En la presente invención el complejo heterodimérico lo componen los monómeros del fragmento N-terminal y del fragmento C-terminal de la proteína PS1.
- 10   La “presenilina 1” o “PS1”, como se ha explicado anteriormente, es el componente activo o subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa encargado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del  $\beta$ -amiloide o APP, generándose el péptido A $\beta$  cuya expresión anómala es uno de los desencadenantes de la EA. PS1 es una aspartil proteasa con nueve dominios transmembrana que contiene múltiples regiones hidrófobas. Preferiblemente, la PS1 a la que se refiere la presente invención es la proteína de SEQ ID NO: 1 o referencia P49768.1 en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. El fragmento N-terminal o NTF de PS1 es el fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 1 a 298 de la SEQ ID NO: 1. El fragmento C-terminal o CTF de PS1 es el fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 299 a 467 de la SEQ ID NO: 1.
- 15
- 20

El término “enfermedad de Alzheimer” o “EA”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las células nerviosas degeneran y/o mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian.

Se entiende por “diagnóstico” el procedimiento mediante el cual se identifica la presencia o ausencia de EA en un sujeto. El término “pronóstico” se refiere al procedimiento mediante el cual se establece una predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo o curso de la EA, incluyendo aumento de la gravedad de la enfermedad y la capacidad de respuesta a un determinado tratamiento en un sujeto enfermo que padece EA.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de la EA, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende las siguientes etapas:

- 5        a) detectar los complejos heterodiméricos de presenilina 1 que comprenden los fragmentos C-terminal y N-terminal de la misma en una muestra biológica aislada de un sujeto,  
            b) determinar la estabilidad de los complejos detectados en el paso (a),  
            c) comparar el valor obtenido en la etapa (b) con un valor control, y  
10        d) asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes que padecen la EA o al grupo de pacientes con un mal pronóstico de la EA cuando el valor obtenido en la etapa (b) es significativamente mayor que el valor control.

- La expresión “detectar los complejos heterodiméricos de presenilina 1” en una muestra biológica aislada de un sujeto, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la medida de la presencia de los fragmentos C-terminal y N-terminal del complejo heterodimérico de presenilina 1 en una muestra biológica. Estos complejos presentan una masa molecular de 100 – 150 kDa.
- 20        La detección del paso (a) se puede realizar mediante técnicas de detección de proteínas o de fragmentos de las mismas conocidas por los expertos en la materia, como por ejemplo aunque sin limitarnos, mediante la incubación con un anticuerpo específico que reconozca el complejo heterodimérico de PS1 que comprende los fragmentos N-terminal y C-terminal de la misma, o mediante la incubación con un  
25        anticuerpo que reconozca el fragmento N-terminal, o mediante la incubación con un anticuerpo que reconozca el fragmento C-terminal, o mediante la incubación simultánea con un anticuerpo específico frente al fragmento C-terminal de PS1 y un anticuerpo específico frente al fragmento N-terminal de PS1, en ensayos como *Western blot*, geles de electroforesis, inmunoprecipitación, arrays de proteína,  
30        inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método de detección de proteínas; mediante la incubación con un ligando específico; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen; o, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

La electroforesis puede ser, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional. La electroforesis puede realizarse en condiciones desnaturalizantes o nativas.

5

Las técnicas cromatográficas pueden basarse en separación de las moléculas por su carga, tamaño, masa molecular, mediante su hidrofobicidad, su polaridad o mediante su potencial redox. La técnica de cromatografía puede ser, pero sin limitarse, cromatografía de líquidos (cromatografía de partición, cromatografía de adsorción, 10 cromatografía de exclusión o cromatografía de intercambio iónico), cromatografía de gases o cromatografía de fluidos supercríticos.

La tecnología de arrays de proteínas está basada, por ejemplo, en la fijación en un soporte sólido de una molécula que reconoce los complejos heterodiméricos de PS1 a 15 los que se refiere la presente invención. El microarray basado en anticuerpos es el microarray de proteínas más común. En este caso, los anticuerpos se fijan en el soporte sólido (también se puede emplear el término chip para referirse a microarray). Estos anticuerpos son utilizados para capturar moléculas que permiten la detección de 20 proteínas procedentes de muestras biológicas. El término "soporte sólido" tal como se emplea en la presente invención se refiere a una gran variedad de materiales, por ejemplo, pero sin limitarse, intercambio de iones o resina de adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres de celulosa, esferas paramagnéticas o la combinación de algunos de ellos.

25 La detección del paso (a) del método de la invención puede llevarse a cabo por medio de cualquiera de las técnicas mencionadas o por cualquier combinación de las mismas. Los complejos pueden ser detectados evaluando su presencia o ausencia. La detección puede llevarse a cabo por medio del reconocimiento específico de los complejos por medio de cualquier sonda y/o cualquier anticuerpo.

30

En una realización preferida, la etapa (a) del método de la invención se lleva a cabo mediante Western blot. Como se mostrará más adelante en los ejemplos, bajo determinadas condiciones de manipulación de la muestra biológica y/o de las condiciones del ensayo la estabilidad y detección de los complejos heterodiméricos de

PS1 se puede ver influenciada. Por ello, en una realización más preferida, la muestra biológica aislada se procesa a una temperatura no superior a 50 °C para su posterior análisis por Western blot en el paso (a) del método de la invención. Estas condiciones evitan la desestabilización de los complejos, aún en presencia de un agente  
5 desnaturizante para electroforesis como SDS, de manera que los resultados de estabilidad de los mismos que se obtendrán posteriormente en la etapa (b) no se verán alterados por las condiciones del ensayo y de manipulación de la muestra. En una realización aun más preferida, la muestra biológica aislada se procesa en presencia de SDS y a una temperatura no superior a 50 °C para su posterior análisis  
10 por Western blot en el paso (a) del método de la invención.

En la presente descripción, se entiende por “Western blot” una técnica analítica usada para detectar el complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1 en una muestra mediante su unión antígeno-anticuerpo,  
15 por quimioluminiscencia, fluorescencia, o actividad enzimática entre otros métodos.

La proteína PS1 se expresa en muchos órganos periféricos, además de en el cerebro. Por ello, la expresión “muestra biológica aislada”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a una muestra aislada de un organismo que puede provenir de un  
20 fluido fisiológico y/o de cualquier célula o tejido de un organismo. En una realización preferida, la muestra biológica aislada de la etapa (a) del método de la invención es líquido cefalorraquídeo (LCR). En una realización más preferida, la muestra biológica es líquido cefalorraquídeo lumbar. En otra realización preferida, la muestra biológica es líquido cefalorraquídeo ventricular. En otra realización preferida, la muestra  
25 biológica aislada no es plasma.

El término “líquido cefalorraquídeo”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a un líquido de color transparente, que baña el encéfalo y la médula espinal. Numerosas enfermedades alteran su composición y su estudio es importante, y con  
30 frecuencia determinante, en las enfermedades del sistema nervioso central o periférico. Dentro de esas enfermedades se incluyen las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Existen diferentes formas de obtener una muestra de líquido cefalorraquídeo. La punción cisternal o suboccipital implica colocar una aguja debajo del hueso occipital (parte posterior del cráneo). Para la obtención de

LCR lumbar, una punción lumbar, comúnmente llamada punción raquídea, es el método más común. Para la obtención de LCR ventricular, se puede emplear la punción ventricular en la que se perfora un orificio en el cráneo y se introduce una aguja directamente en uno de los ventrículos del cerebro, o bien se puede recoger el

5 LCR ventricular desde una sonda, como una derivación o un drenaje ventricular.

La estabilidad de los complejos heterodiméricos de PS1 en el paso (b) del método de la presente invención puede ser determinada, sirviendo estos datos como referencia para compararlos con los datos obtenidos en una muestra control y buscar alguna

10 desviación significativa. Esta desviación significativa puede ser asignada al diagnóstico y/o pronóstico de EA en el individuo del que procede la muestra problema.

El término “determinar la estabilidad” tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la definición de cómo de estable es el complejo heterodimérico formado

15 por los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1. La estabilidad de dicho complejo se determina mediante técnicas que implican la exposición de la muestra biológica a condiciones desnaturalizantes y posterior evaluación de cómo dichas condiciones han contribuido a producir cambios en la estabilidad de los complejos. La determinación de la estabilidad se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo aunque

20 sin limitarnos, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, electroforesis nativa o cromatografía de exclusión molecular. El uso de, por ejemplo, pero sin limitarse, cambios en la fuerza iónica, la viscosidad, la temperatura, el pH, o la presencia de agentes desestabilizantes tales como detergentes, enzimas e inhibidores enzimáticos, o agentes reductores, puede incidir directamente en la estabilidad y detectabilidad de

25 los complejos de PS1.

En una realización preferida del método, la determinación de la estabilidad de los complejos en la etapa (b) se lleva a cabo mediante un primer paso de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en presencia de detergentes y un

30 segundo paso de Western blot. Los complejos de 100-150 kDa identificados por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa que contienen, preferiblemente, el detergente Brij97, son más estables durante el posterior análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes. Mientras que complejos más pesados, como por ejemplo aquellos de unos 200 y 250 kDa, resultan ser más inestables y se resuelven

en el análisis electroforético como componentes de 50 kDa.

La expresión “ultracentrifugación en gradiente de sacarosa” tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a la separación de las partículas en función de su  
5 densidad de flotación, la cual está directamente relacionada con el tamaño y la masa de las partículas. La muestra se dispone por encima (o debajo) de un gradiente de densidad lineal o continuo, y preparado a partir de una concentración muy elevada de sacarosa. Al centrifugar cada partícula se desplazará hacia abajo (o hacia arriba, si la muestra se ha depositado al fondo) hasta que alcance una posición en la que su  
10 densidad sea igual a la de su entorno (situación de flotabilidad neutra). Una vez fraccionado el gradiente se examina en qué fracciones se localiza la partícula en cuestión y se determina la posición de la misma por su coeficiente de sedimentación (S) cuya determinación, según el método de Martin y Ames (1961, J. Biol. Chem., 236:  
15 1372-1379) se realiza comparando la distancia recorrida por la partícula objeto de análisis con la migración de una proteína estándar de coeficiente de sedimentación conocido.

El efecto desestabilizante de los detergentes empleados en el paso de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa permitirá determinar posteriormente la  
20 estabilidad de los complejos heterodiméricos, de manera que aquellos complejos más estables resistirán mejor la desestabilización mediada por detergentes. Ejemplos de detergentes útiles en este paso del método de la invención son, aunque sin limitarnos, Tween 20, CHAPS, Triton X-100 o Brij 97. En una realización preferida, el detergente es Brij 97.  
25

El paso posterior de Western blot permitirá identificar los distintos complejos de PS1 en base a su masa molecular. La realización de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras [en presencia de SDS y β-mercaptoetanol, u otros agentes como la urea o el DTT (ditiotreitol)] permitirá además analizar la estabilidad de  
30 los componentes o subunidades de dichos complejos.

En otra realización preferida el valor control del método de la invención es el valor de la estabilidad del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1 en una muestra biológica aislada de un sujeto sano.

Se entiende por “valor control” cualquier valor o rango de valores derivado de la determinación de la estabilidad de los complejos heterodiméricos que comprenden los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1 en una muestra biológica control procedente de un individuo sano o en una mezcla de muestras biológicas derivadas de 5 un grupo control.

- En la presente descripción, se entiende por “grupo control”, un grupo de individuos sanos, de la misma o similar edad que el sujeto estudiado, del cual se han obtenido 10 valores o rangos de valores de estabilidad de complejos heterodiméricos que comprenden los fragmentos C-terminal y N-terminal de PS1 derivados de la determinación de estabilidad de dichos complejos en una colección de muestras biológicas procedente de dichos individuos sanos, y que son representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la invención. La determinación de 15 estabilidad de los complejos heterodiméricos que comprenden los fragmentos C-terminal y N-terminal de PS1 se ha de realizar de la misma forma que la realizada en el sujeto a estudiar, y será obtenida a partir del mismo tipo de muestra biológica aislada que la procedente del sujeto a estudiar en el paso (a) del método de la invención.
- 20 Se entiende por “sano”, “individuo sano” o “sujeto sano” en la presente invención aquel sujeto o individuo que no padece la EA.

Se entiende por “población sana” en la presente invención, un conjunto de individuos o sujetos que no presentan la EA.

25 Se entiende por “individuos sanos representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la invención” aquellos sujetos que no padecen EA, en el momento de la extracción de la muestra biológica aislada a analizar y que como grupo tienen un patrón similar en cuanto a por ejemplo, aunque sin limitarnos, raza, edad o distribución 30 por género, que la población de pacientes o sujetos a los que se va a aplicar el método de la invención.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la comparación de la estabilidad de los complejos determinada en el paso (b) con un

valor control. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

Una cantidad “significativamente mayor” que un valor control puede ser establecida 5 por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student de dos colas, test U de Mann-Whitney, funciones discriminantes de Fisher, utilizando los análisis de Kruskal-Wallis con la prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Dunn, ANOVA de una vía con la 10 prueba de comparaciones múltiples post-hoc de Bonferroni, pruebas U de Kursal-Wallis, o análisis ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic).

La muestra biológica aislada puede ser tomada de un humano, pero también de mamíferos no humanos, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, 15 felinos o cánidos. En otra realización preferida del método de la invención, el sujeto es un humano.

El método de la invención también puede ser de utilidad para determinar la eficacia de un determinado tratamiento que le está siendo administrado a un sujeto que padece 20 EA, y así establecer un pronóstico que ayude a la toma de decisiones clínicas. Por ello, en una realización más preferida del método, el humano está siendo sometido a un tratamiento terapéutico frente a la EA.

El término “tratamiento terapéutico” se refiere al conjunto de medios de cualquier clase 25 cuya finalidad es la curación o el alivio de la enfermedad o de los síntomas de la EA, que puede ser aunque sin limitarnos, el tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa (tales como la tacrina, la rivastigmina, la galantamina o el donepezilo), y/o con antagonistas de los receptores de NMDA (como la memantina); o de terapias en desarrollo (por ejemplo, pero sin limitarse, inmunización activa o pasiva 30 contra el A $\beta$ , inhibidores de la  $\beta$ -secretasa, inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa, o inhibidores de la quinasa GSK-3 $\beta$ ).

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o pronóstico de la EA que comprende las siguientes etapas:

- 5        a) detectar los complejos heterodiméricos de presenilina 1 que comprenden los fragmentos C-terminal y N-terminal de la misma en una muestra biológica aislada de un sujeto,  
          b) determinar la estabilidad de los complejos detectados en el paso (a), y  
          c) comparar el valor obtenido en la etapa (b) con un valor control.

10

Los métodos incluidos en la presente invención pueden incluir adicionalmente un paso en el cual, si se determina que el sujeto presenta EA o un mal pronóstico de EA, se determine el tratamiento para el sujeto.

- 15      En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de la EA que comprende anticuerpos para la detección del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1, de ahora en adelante "kit de la invención".
- 20      El término "anticuerpo para la detección del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1" 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 los complejos heterodiméricos de
- 25      PS1, o con los fragmentos C-terminal y/o N-terminal de presenilina 1 componentes de dichos complejos. Los anticuerpos frente al fragmento N-terminal o NTF de PS1 y los anticuerpos frente al fragmento C-terminal o CTF de PS1 son capaces de reconocer, mediante su empleo individual o conjunto, el complejo heterodimérico de PS1 al que se refiere la presente invención. Por ello, una realización preferida, el kit de la
- 30      invención comprende anticuerpos específicos frente al fragmento N-terminal o NTF de PS1 y/o anticuerpos específicos frente al fragmento C-terminal o CTF de PS1.

Anticuerpos frente al fragmento N-terminal o NTF de PS1 pueden ser anticuerpos frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 1 a 298 de la SEQ

- ID NO: 1 o frente a fragmentos comprendidos dentro de este fragmento. En una realización preferida, el anticuerpo frente al fragmento N-terminal o NTF de PS1 es un anticuerpo frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 1 a 65 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida, el anticuerpo frente al fragmento N-  
5 terminal o NTF de PS1 es un anticuerpo frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 21 a 34 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida, el anticuerpo frente al fragmento N-terminal o NTF de PS1 es un anticuerpo frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 1 y 20 de la SEQ ID NO: 1.
- 10 Anticuerpos frente al fragmento C-terminal o CTF de PS1 pueden ser anticuerpos frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 299 a 467 de la SEQ ID NO: 1 o frente a fragmentos comprendidos dentro de este fragmento. En una realización preferida, el anticuerpo frente al fragmento C-terminal o CTF de PS1 es un anticuerpo frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 301 a  
15 317 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización preferida, el anticuerpo frente al fragmento C-terminal o CTF de PS1 es un anticuerpo frente al fragmento comprendido entre los residuos aminoacídicos 303 a 316 de la SEQ ID NO: 1.
- En otra realización preferida, el kit de la invención comprende un anticuerpo específico  
20 frente al fragmento C-terminal de presenilina 1 y un anticuerpo específico frente al fragmento N-terminal de presenilina 1. En una realización más preferida, el kit de la invención además comprende detergentes, agentes reductores, agentes desnaturalizantes y/o compuestos reguladores del pH.
- 25 Ejemplos de detergentes que puede comprender el kit de la invención son, aunque sin limitarnos, Tween 20, CHAPS, Triton X-100 o Brij 97. En una realización preferida, el detergente es Brij 97.
- Se entiende por "compuestos reguladores del pH" sustancias que regulan y ajustan el  
30 pH, esencialmente ácidos y bases. Entendemos por "agentes reductores" de manera general aquel que cede electrones a un agente oxidante y por lo tanto participa de reacciones de oxidación-reducción, y de manera más específica el agente que rompe los enlaces di-sulfuro, separando a la proteína en sus sub-unidades. Ejemplos de agentes reductores que puede comprender el kit de la invención son, aunque sin

limitarnos, el  $\beta$ -mercaptoetanol o el DTT (ditiotreitol). Estos agentes se suelen usar en combinación con agentes desnaturalizantes como la urea o el detergente SDS, entre otros; agentes que desestabilizan la formación de enlaces por puentes de hidrógeno entre aminoácidos, desplegado la estructura nativa de las proteínas.

5

El kit de la invención pueden comprender, sin ningún tipo de limitación, cebadores marcados o sin marcar, sondas marcadas o sin marcar, tampones, agentes para prevenir la contaminación, compuestos marcadores como por ejemplo, aunque sin limitarnos, fluorocromos, etc. Por otro lado, el kit de la invención puede incluir todos los 10 soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. El kit de la invención puede contener controles positivos y negativos. Preferiblemente, este kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo la detección y la determinación de la estabilidad del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1 según se describe en la invención.

15

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la invención para llevar a cabo el método de la invención.

20

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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. Representa la detección de complejos de PS1 en LCR humano mediante anticuerpos alternativos.** (A) Representación esquemática de la holoproteína PS1

30

con el detalle de los epítopes para los anticuerpos anti-PS1 usados en este estudio. (B) Muestra de LCR ventricular post-mortem resuelto con los anticuerpos anti-PS1 indicados.

**Fig. 2. Muestra que PS1 está presente en LCR de humanos y que altas**

**temperaturas durante la preparación de muestra para su análisis electroforético afectan a la estabilidad de los complejos de PS1.** (A) Muestras de LCR ventricular humano obtenidas post-mortem de individuos sin demencia (controles no dementes, ND) y con EA se analizaron por Western blot con un anticuerpo anti-NTF-PS1 (Calbiochem) y un anticuerpo anti-CTF-PS1 (00/2). (B) Muestras de LCR humano se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-NTF 98/1 y las proteínas precipitadas (IP) se analizaron por Western blot con anticuerpos anti NTF y CTF de PS1. Muestras incubadas con proteína A-Sepharosa con la omisión del anticuerpo 98/1 se analizaron en paralelo como controles negativos. (C) Se determinó el efecto sobre los complejos de PS1 del calentamiento durante diferentes períodos de tiempo, a 98°C y a 50°C. Los Western blot se resolvieron con el anticuerpo anti-NTF de PS1 de Calbiochem.

**Fig. 3. Muestra que los complejos estables PS1 están aumentados en el LCR ventricular y post-mortem de enfermos con EA.** La inmunoreactividad total de los complejos de PS1 de 100 y 150 kDa determinada mediante el anticuerpo de Calbiochem anti-NTF (A) o el anticuerpo 00/2 anti-CTF (B) mostró valores más altos en muestras de LCR ventricular de EA (10 casos representados en círculos blancos) que en muestras de controles ND (5 casos, en círculos negros). (C) Ocho de los 10 casos disponibles para el grupo EA y 4 de los 5 casos para el grupo ND contaron con volumen suficiente para su fraccionamiento por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa 5-20% (p/v), en presencia del detergente Brij 97. Las alícuotas obtenidas se analizaron por Western blot en condiciones desnaturalizantes para examinar los complejos de PS1 (anticuerpo anti NTF de Calbiochem). Los marcadores internos fueron β-galactosidasa (G), catalasa (C) y la fosfatasa alcalina (P). En el panel de abajo (EA) se muestran los valores individuales para el cociente entre complejos estables (resueltos como agregados de 100 y 150 kDa en las fracciones 2-7, cercanas a la catalasa) y complejos inestables (agregados más pesados que sedimentan en las fracciones 8-12, pero se resuelven como agregados de sólo 50 kDa). \* Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo ND, según la evaluación del test de la U de Mann-Whitney.

**Fig. 4. Muestra la inmunoprecipitación de PS1 en las muestras de LCR lumbar.** Muestras de LCR no patológico se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti NTF-PS1 llamado 98/1, y las proteínas precipitadas (IP) se analizaron por Western blot con el

anticuerpo anti NTF-PS1 de Calbiochem. Los controles negativos de muestras de LCR incubadas con proteína A-Sepharosa, con omisión del anticuerpo también se muestran.

- 5 **Fig. 5. Muestra que los complejos estables PS1 están aumentados en el LCR lumbar y ante-mortem de enfermos con probable EA.** (A) La inmunoreactividad total de los complejos de PS1 de 100 y 150 kDa determinada mediante el anticuerpo de Calbiochem anti-NTF mostró valores similares en muestras de LCR lumbar de EA (12 casos representados en círculos blancos) y de controles ND (12 casos, en círculos negros). (B) Ocho de los 12 casos disponibles para ambos grupos contaron con volumen suficiente para su fraccionamiento por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa y se analizaron tal cual se describe en la Fig. 3.  
10 \* Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo ND, según la evaluación del test de la U de Mann-Whitney.

15

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que demuestran la eficacia del uso del complejo heterodimérico de presenilina 1 para el diagnóstico y/o pronóstico de la EA. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante muestran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25

### Ejemplo 1. Muestras y métodos.

A continuación se describen el origen de las muestras estudiadas en la presente invención y todos los métodos utilizados para llevar a cabo los ejemplos descritos 30 posteriormente.

#### Muestras:

LCR post-mortem: estos LCR ventriculares se obtuvieron post-mortem en el Banco de Tejidos, Fundación CIEN (Madrid, España), Fundación Hospital de Alcorcón (Madrid,

España) y Fundación Alzheimer (Murcia, España). Las muestras contaminadas con sangre fueron excluidas del análisis. El LCR se centrifugó a  $1.000\times g$  durante 15 min para eliminar las células y el material insoluble, antes de los análisis bioquímicos. Los casos de EA [n = 10 (5 mujeres y 5 hombres), con una edad de  $77\pm 2$  años (media ± error estándar de la media; SEM)] fueron seleccionados en base a la historia clínica de la demencia y diagnóstico neuropatológico en base al criterio CERAD (Mirra *et al.*, 1994, *J Neuropath Exp Neurol.*, 53: 303-315). Las muestras de los casos control sin demencia (ND) y de edad semejantes no presentaron características clínicas o patológicas de demencia [n = 5 (1 mujer y 4 hombres),  $74\pm 3$  años]. Se usaron sólo muestras de un intervalo post-mortem inferior a 14 horas, sin diferencias entre los grupos.

LCR ante-mortem: las muestras de LCR lumbar se obtuvieron de 12 pacientes en fase leve o moderada de EA probable (5 hombres y 7 mujeres,  $71\pm 5$  años) y 12 voluntarios sanos (5 hombres y 7 mujeres,  $66\pm 9$  años) con procedencia del Huddinge University Hospital (Estocolmo, Suecia). Todos los pacientes con EA cumplían los criterios NINCDS-ADRDA para "probable" EA (McKhann *et al.*, 1984, *Neurology*, 34: 939-944). Los controles no tenían antecedentes o síntomas de trastornos neurológicos o psiquiátricos, o quejas subjetivas de memoria, y tuvieron una puntuación MMSE de 28 o superior. Las muestras de LCR se alícuotaron y congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Western blotting y ensayos de inmunoprecipitación:

Las muestras de LCR (30 µl) se desnaturizaron a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 15 min para el análisis de PS1. Las muestras fueron resueltas por electroforesis en geles de 25 poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato-sódico (SDS-PAGE).

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell Bioscience GmbH) y se analizaron con anticuerpos de PS1 contra aminoácidos (aa) del N-terminal: los aa 1-65 (anticuerpo de 30 Calbiochem), los aa 21-34 (de Thermo Scientific), o los aa 1-20 (anticuerpo 98/1, Evin *et al.*, 2001, *Biochemistry*, 40: 8359-8368); o con anticuerpos contra la región del bucle de la C-terminal: aa 303-316 (Sigma), o aa 301-317 (anticuerpo 00/2; Evin *et al.*, 2001, *Biochemistry*, 40: 8359-8368) de la SEQ ID NO: 1. Todos los Western blots ensayados con los diferentes anticuerpos se realizaron por separado, evitando el *striping* de las

membranas. Las transferencias se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano y la señal se detectó usando un reactivo de detección ECL Plus, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare) en un aparato Luminescent Image Analyzer LAS-1000 Plus (FUJIFILM).

- 5 La señal detectada en una muestra de LCR control se utilizó para normalizar la señal inmunorreactiva de cada anticuerpo. Para estimar semi-cuantitativamente la intensidad de las bandas inmunorreactivas se midió por densitometría usando el software Science Lab Image Gauge v 4.0 suministrado por FUJIFILM.
- 10 Las inmunoprecipitaciones se realizaron a 4°C mediante la incubación durante la noche de 150 µl de LCR con el anticuerpo primario anti N-terminal de PS1 98/1, previamente acoplado a proteína A-Sepharosa por dihidrocloruro pimelimidato de dimetilo (Sigma-Aldrich Co). Las proteínas precipitadas se lavaron con tampón fosfato-salino (PBS) y se eluyeron con tampón de glicina 0,1 M a pH 2,5. Después de la  
15 neutralización del pH, los sobrenadantes se desnaturizaron para su análisis electroforético en tampón de Laemmli a 50°C durante 15 min y se sometieron a SDS-PAGE; las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti N-terminal (Calbiochem) y anti C-terminal (00/2) de PS1.

20

Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa:

- Los complejos de PS1 fueron analizados mediante ultracentrifugación a 250.000×g en un gradiente continuo de sacarosa (5-20% p/v) centrifugado 4 horas a 4°C en un rotor Beckman TLS 55. Alícuotas de LCR (50 µl) se cargaron cuidadosamente sobre la  
25 parte superior del gradiente que contiene 2 ml del tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), conteniendo 0,15 M de NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,5% (p/v) del detergente Brij 97. Después de la centrifugación se recogieron manualmente ~14 fracciones desde la parte superior de los tubos de gradiente. Como marcadores internos se usaron enzimas de fácil determinación y coeficiente de sedimentación conocidos, β-galactosidasa, catalasa y fosfatasa alcalina.

Determinación de T-tau, P-tau y Aβ42 por ELISA:

Los niveles de la tau total (T-tau), tau fosforilada (P-tau) y Aβ42 en LCR se determinaron utilizando kits comerciales de ELISA (Innogenetics, Gante, Bélgica),

siguiendo los protocolos de los fabricantes (Blennow *et al.*, 1995, *Mol. Chem. Neuropathology*, 26: 231-245; Andreasen *et al.*, 1999, *Arch. Neurol.*, 56: 673-680; Vanmechelen *et al.*, 2000, *Neurosci Lett.*, 285: 49-52).

5    **Análisis estadístico:**

Todos los datos se analizaron con el paquete del programa SigmaStat (Versión 2.0, SPSS Inc.) mediante la prueba *t* de Student o del test U de Mann-Whitney test, para la determinación de los valores exactos del valor *p* que refleja la significancia estadística (valores de *p* <0,05 se consideró significativos para marcar diferencias entre grupos).

10   La correlación entre variables se evaluó mediante análisis de regresión lineal. Todos los resultados se presentan como media ± SEM (error estándar de la media).

**Ejemplo 2. NTF y CTF PS1 están presentes como complejos de alto peso molecular en el LCR.**

15

La maduración de la PS1 a su forma activa conlleva una escisión endoproteolítica que escinde la proteína en dos partes o fragmentos N-y C-terminales (NTF y CTF). De este modo al extraer la enzima de cerebro o células en cultivo en presencia de detergentes sólo una pequeña proporción de PS1 se extrae como su forma entera. De este modo, 20 cuando se ensayó por Western blot la presencia de PS1 en LCR humano (primero en LCR ventricular post-mortem), se usaron diferentes anticuerpos anti-PS1 NTF y CTF. En la Fig. 1A, se puede observar una representación esquemática de la estructura de PS1 y de los epítopos para anticuerpos empleados en este estudio. Los resultados de Western blot utilizando un anticuerpo anti-PS1 NTF (Calbiochem), revelaron la 25 presencia de una débil banda de 29 kDa correspondiente al tamaño esperado para PS1-NTF, pero también, sorprendentemente, la mayoría de la inmunoreactividad se correspondió con bandas de aproximadamente 100 y 150 kDa (Fig. 2). El revelado con el anticuerpo PS1-CTF denominado 00/2 detecta también los complejos de 100 a 150 kDa, y una débil banda de aproximadamente 20 kDa, correspondiente al PS1-CTF 30 (Fig. 2A).

Para confirmar aún más la identidad de los complejos de PS1 en LCR humano, se realizaron experimentos de immunoprecipitación seguidos de Western blot (Fig. 2B). Muestras de LCR post-mortem se inmunoprecipitaron utilizando el anticuerpo 98/1, un

anticuerpo contra la PS1-NTF que se ha demostrado eficaz en la inmunoprecipitación de la PS1 humana. El análisis por Western blot de la fracción ligada, tanto con anticuerpo anti NTF (Calbiochem) como anti CTF (00/2), corroboró la identidad de los complejos de 100-150 kDa de PS1, revelando también especies de 50 kDa, probablemente agregados de un NTF y un CTF de PS1, y no la holoproteína completa de PS1 en su forma nativa. Los complejos no se observaron en los controles negativos de inmunoprecipitación, donde el anticuerpo anti-PS1 se omitió (Fig. 2B). El uso de anticuerpos alternativos contra los NTF y CTF confirmó la especificidad de la señal de PS1 en muestras de LCR (Fig. 1B).

10

Las diferentes condiciones experimentales y el protocolo de ensayo, especialmente factores como el uso de detergentes, pueden afectar a las interacciones moleculares necesarias para la formación de los complejos de PS1 y su posterior detección. Como la temperatura de desnaturalización antes de la electroforesis no está estandarizada, se determinó el efecto de distintas temperaturas y tiempo de calentamiento en la preparación de muestras para electroforesis, y cómo ello afecta a la estabilidad / detectabilidad de complejos de PS1. La alta temperatura utilizada durante la preparación de muestras para electroforesis (98°C en comparación con 50°C), se reflejó en una pérdida total de la inmunoreactividad PS1, particularmente la de los complejos de alto peso molecular (Fig. 2C). Estos experimentos demuestran que la manipulación de las muestras y variables en la condición del ensayo pueden influir en la estabilidad y la detección de los complejos de PS1. Así, gran parte de estudios previos realizados con muestras desnaturadas a 98°C pueden subestimar y no lograr detectar los complejos PS1. En este estudio, todos los análisis se realizaron en muestras previamente congeladas a -80°C; evitando ciclos de congelación-descongelación y controlando durante la desnaturalización preparativa de la electroforesis la temperatura a 50°C.

30

En las muestras de LCR ventricular post-mortem se analizaron los niveles de PS1 mediante anticuerpos para el NTF y para el CTF. La inmunoreactividad PS1 para los complejos de 100+150 kDa (inmunoreactividad sumada de ambas bandas y detectada con cualquiera de los dos anticuerpos, Fig. 3A-B) es significativamente más alta en el grupo EA en comparación con sujetos NDC. Además, el fraccionamiento por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa demostró que en los casos EA los

complejos de PS1 altamente estables son más abundantes en comparación con la situación en sujetos sanos (analizados éstos en 8 de los 10 casos EA y en 4 de los 5 ND de los que se contó con volumen suficiente; Fig. 3C).

**5 Ejemplo 3. Los niveles de los complejos de PS1 altamente estables están incrementados en el LCR lumbar ante-mortem de EA.**

También en el LCR lumbar se detectaron abundantes bandas de PS1 de aproximadamente 100 y 150 kDa. Las especies de PS1 de 50 kDa se detectaron sólo 10 en inmunoprecipitados de NTF-PS1 y corresponden probablemente a heterodímeros de NTF y CTF PS1 (probablemente agregados de un NTF y un CTF de PS1) que se originan de los complejos de 100 y 150 tras la elución a pH ácido de la fracción ligada: ver protocolo de inmunoprecipitación y resultado en Fig. 4. En el LCR no se detectaron 15 niveles apreciables de monómeros NTF de 29 kDa (correspondiente al tamaño esperado para PS1-NTF). Resultados en LCR de muestras post-mortem de LCR ventricular, demostraron que los niveles de complejos de PS1 están aumentados en 20 casos con EA, particularmente los de los complejos más estables. Por tanto, se procedió a realizar un estudio similar en muestras de LCR lumbar de casos probables EA y de sujetos control. En el LCR lumbar no se observaron cambios importantes en 25 los niveles totales de PS1 entre casos de EA probable y sujetos ND (Fig. 5A). No obstante, el fraccionamiento por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa sí ofreció diferencias significativas entre los casos EA probable y control respecto a los niveles de los complejos de PS1 altamente estables (analizados éstos en 8 de los 12 casos EA y NDC de los que se contó con volumen suficiente; Fig. 5B).

25

Los LCR lumbares se caracterizaron determinando biomarcadores clásicos de Alzheimer, mostrando el grupo de EA probable elevados niveles de T-tau ( $692 \pm 115$  pg/mL respecto al ND:  $311 \pm 27$  pg/mL) y P-tau ( $126 \pm 21$  pg/mL respecto al ND:  $57 \pm 4$  pg/mL) y bajos niveles de A $\beta$ 42 ( $335 \pm 18$  pg/mL respecto al ND:  $911 \pm 76$  pg/mL). El 30 cociente de los complejos de PS1 altamente estable mostró correlación positiva con los marcadores más específicos de la EA, el A $\beta$ 42 ( $r = 0,51$ ,  $p = 0,04$ ) y el P-tau ( $r = 0,57$ ,  $p = 0,02$ ).

Por tanto, los resultados en LCR lumbar sugieren que un fenómeno precoz y

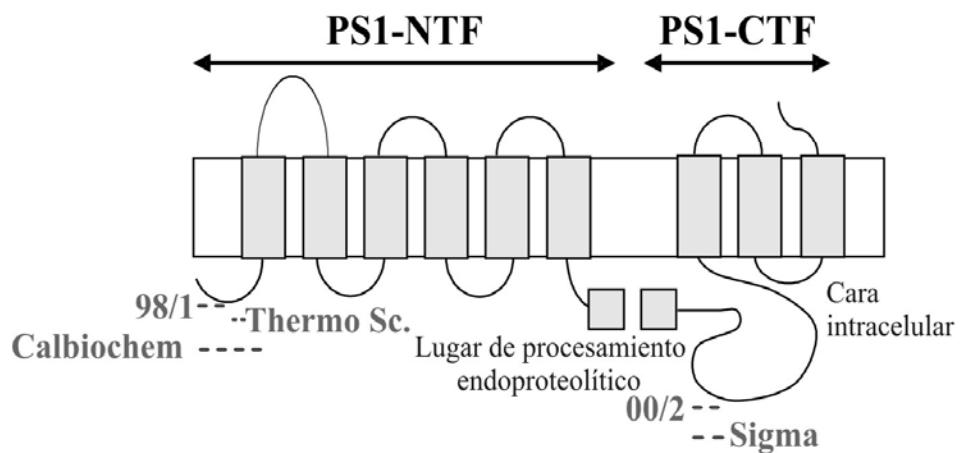
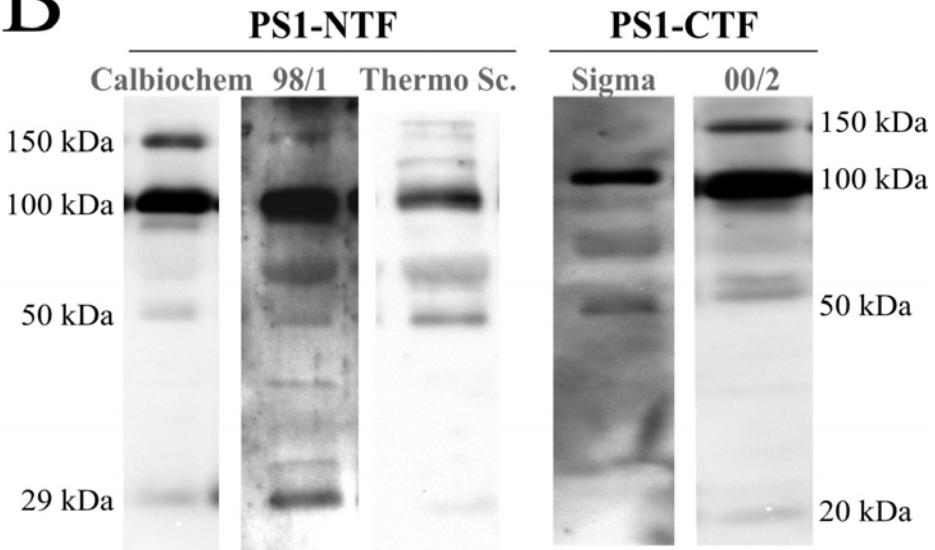
significativo es el cambio en la dinámica de formación de los complejos heterodiméricos de PS1, lo que se revelaría en su estabilidad, y este cambio parece ser un mejor marcador para discriminar muestras patológicas que el mero uso de los niveles totales de complejos heterodiméricos de PS1.

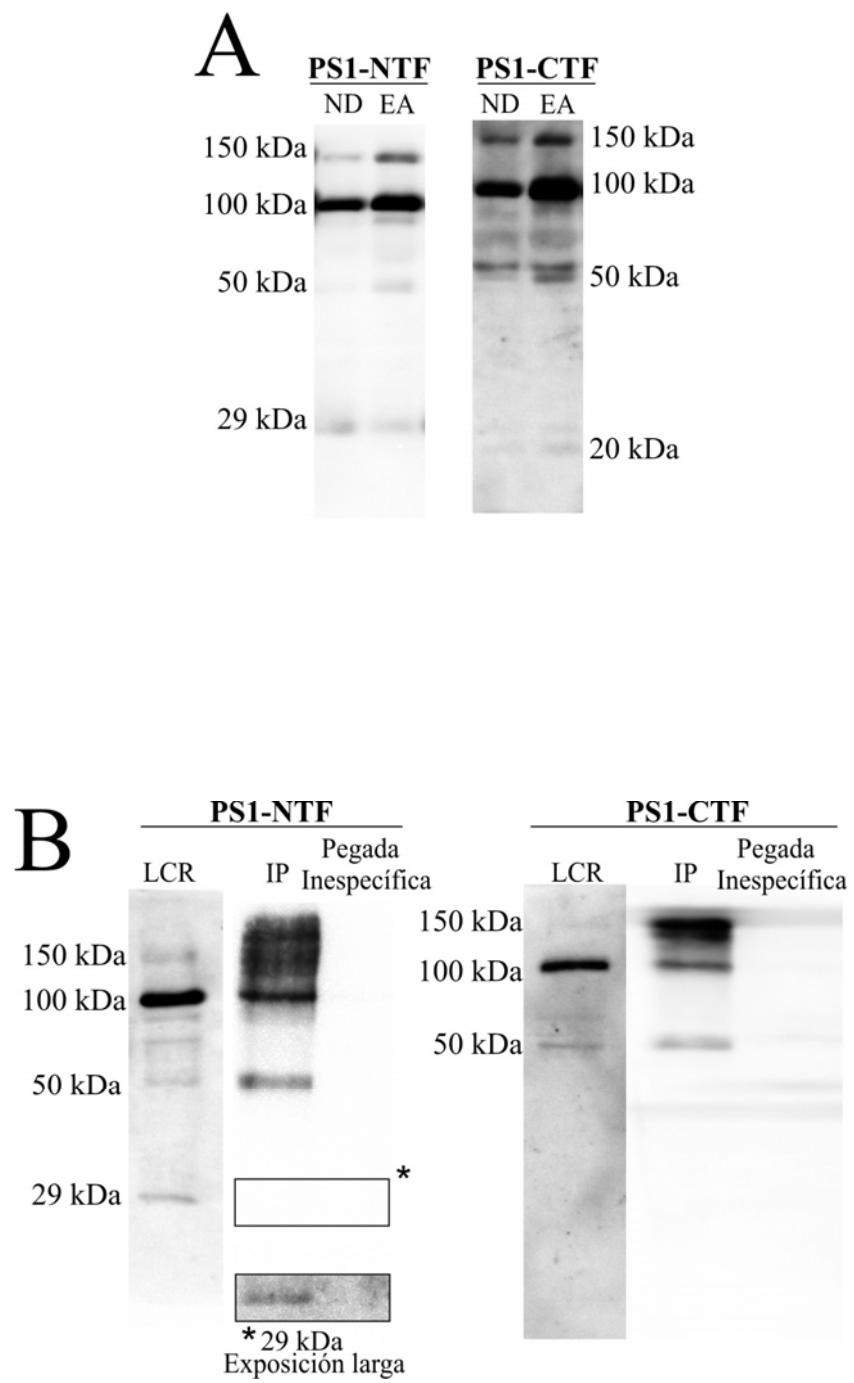
## REIVINDICACIONES

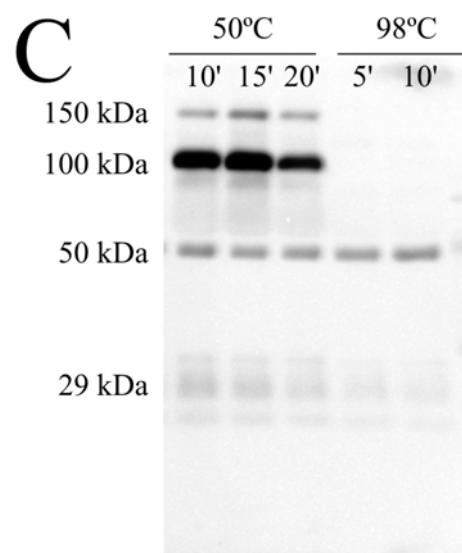
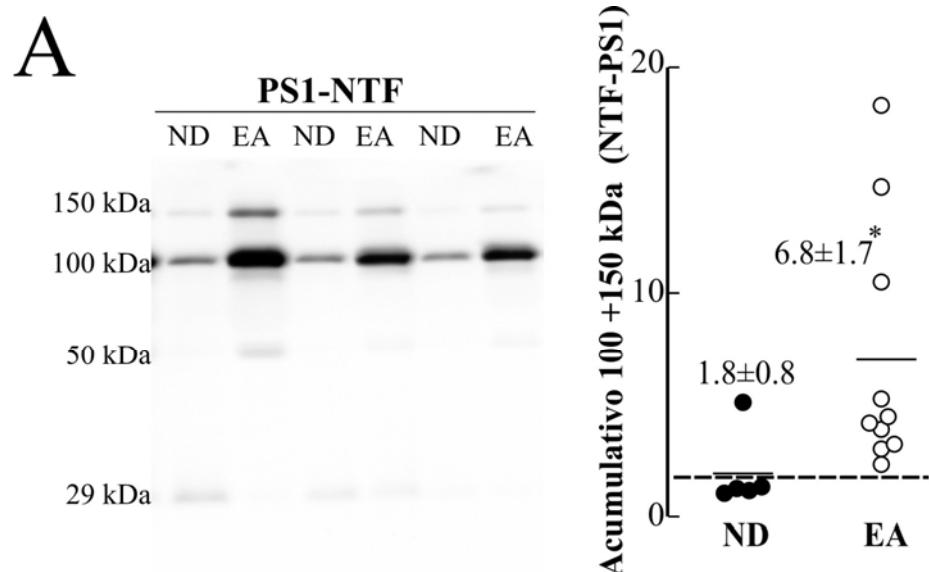
1. Uso del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1 para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer.
2. Método para el diagnóstico y/o pronóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer que comprende las siguientes etapas:
  - a) detectar los complejos heterodiméricos de presenilina 1 que comprenden los fragmentos C-terminal y N-terminal de la misma en una muestra biológica aislada de un sujeto,
  - b) determinar la estabilidad de los complejos detectados en el paso (a),
  - c) comparar el valor obtenido en la etapa (b) con un valor control, y
  - d) asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer o al grupo de pacientes con un mal pronóstico de la enfermedad de Alzheimer cuando el valor obtenido en la etapa (b) es significativamente mayor que el valor control.
3. El método según la reivindicación 2, donde el valor control es el valor de la estabilidad del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1 en una muestra biológica aislada de un sujeto sano.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, donde la muestra biológica aislada es líquido cefalorraquídeo.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la muestra biológica aislada es líquido cefalorraquídeo lumbar.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la muestra biológica aislada es líquido cefalorraquídeo ventricular.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde la detección de la etapa (a) se lleva a cabo mediante Western blot.

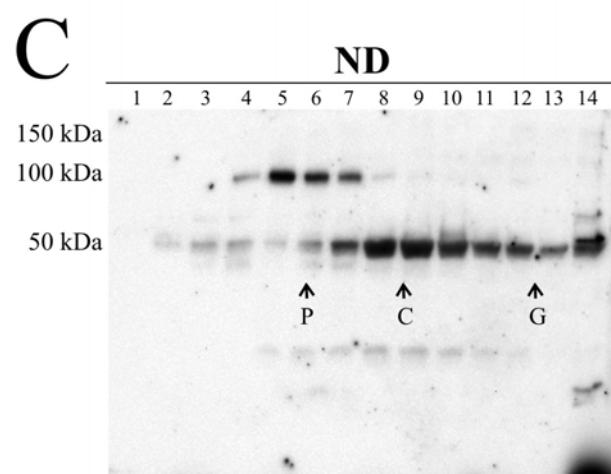
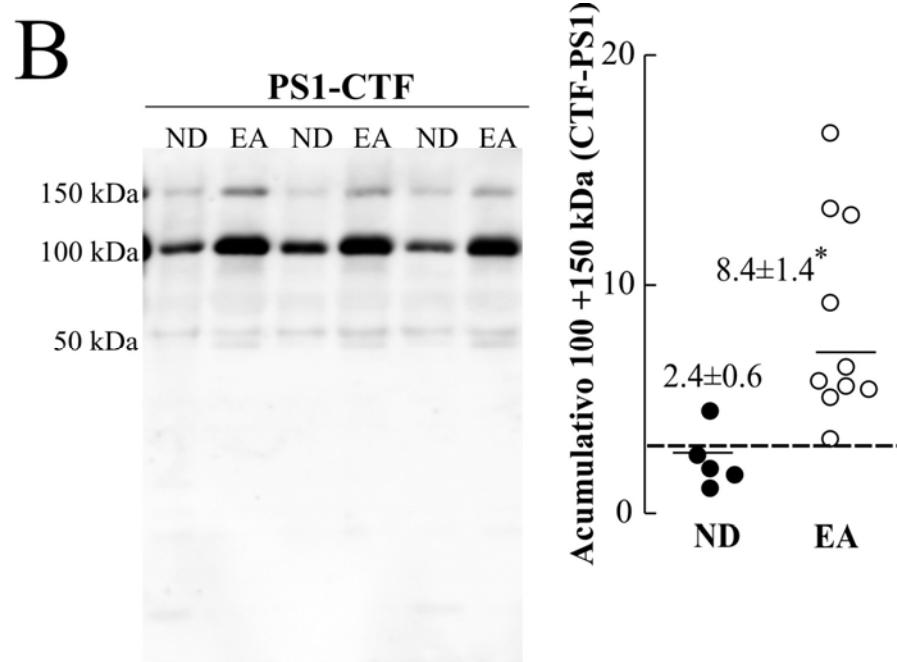
8. El método según la reivindicación 7, donde la muestra biológica aislada se procesa en presencia de SDS, y a una temperatura no superior a 50°C para su análisis por Western blot.
- 5    9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, donde la determinación de la estabilidad de los complejos en la etapa (b) se lleva a cabo mediante un primer paso de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en presencia de detergentes y un segundo paso de Western blot.
- 10    10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, donde el sujeto es un humano.
11. El método según la reivindicación 10, donde el humano está siendo sometido a un tratamiento terapéutico frente a la enfermedad de Alzheimer.
- 15    12. Un kit para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende anticuerpos para la detección del complejo heterodimérico que comprende los fragmentos C-terminal y N-terminal de presenilina 1.
- 20    13. El kit según la reivindicación 12 que comprende un anticuerpo específico frente al fragmento C-terminal de presenilina 1 y un anticuerpo específico frente al fragmento N-terminal de presenilina 1.
- 25    14. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13 que además comprende detergentes, agentes reductores, agentes desnaturalizantes y/o compuestos reguladores del pH.
15. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

30

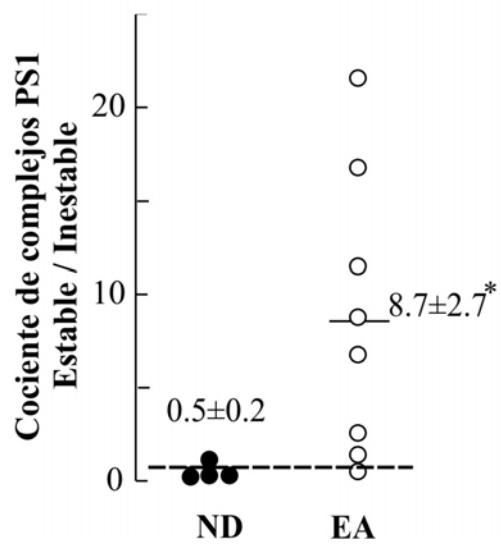
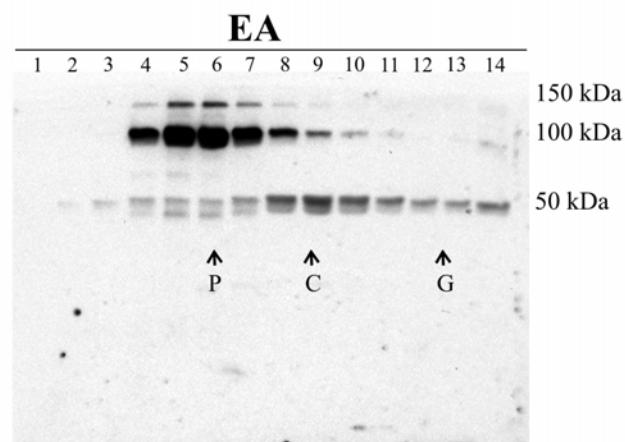
**FIG. 1****A****B**

**FIG. 2**

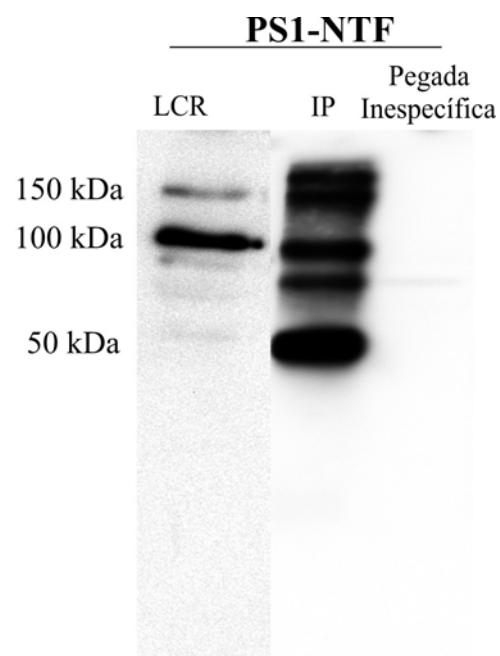
**FIG. 2 (cont.)****FIG. 3**

**FIG. 3 (cont.)**

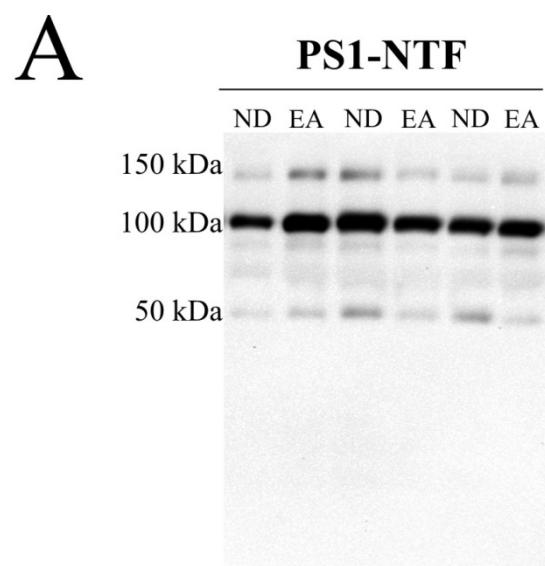
**FIG. 3C (cont.)**



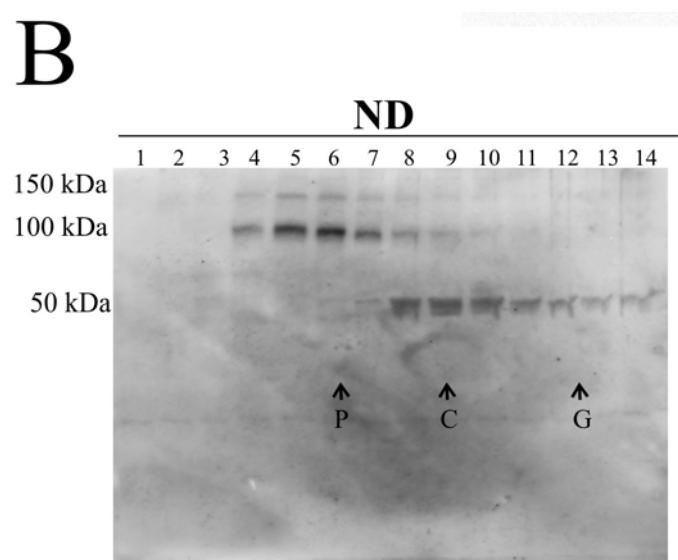
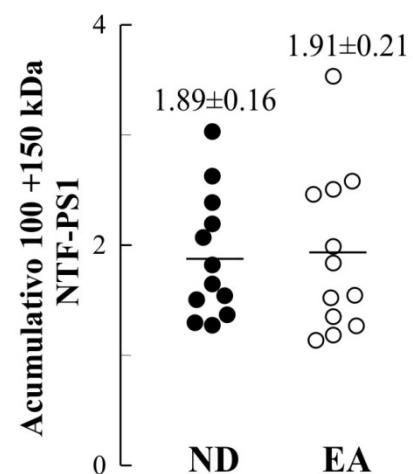
**FIG. 4**



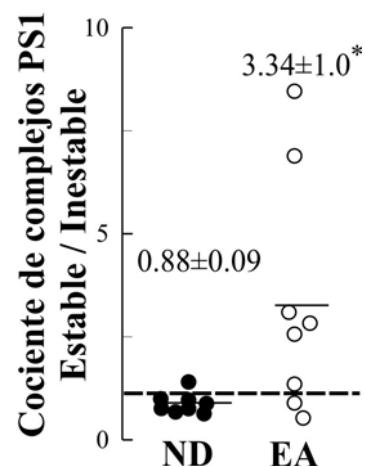
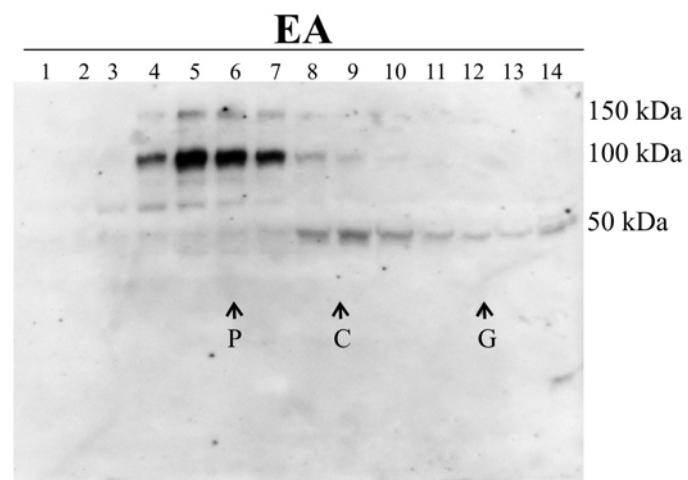
**FIG. 5**



**FIG. 5A (cont.)**



**FIG. 5B (cont.)**



## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Miguel Hernández de Elche  
 Universidad de Gothenburg  
 CIBERNED  
 Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y  
 Biomédica de la Comunitat Valenciana

<120> "MÉTODO DE DIAGNÓSTICO Y/O PRONÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER"

<130> ES2047.11

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 467  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met  
 1 5 10 15

Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn  
 20 25 30

Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu  
 35 40 45

Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu  
 50 55 60

Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys  
 65 70 75 80

His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val  
 85 90 95

Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln  
 100 105 110

Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg  
 115 120 125

Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val  
 130 135 140

Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys  
 145 150 155 160

Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe  
 165 170 175

ES 2 498 465 B1

Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala  
180 185 190

Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val  
195 200 205

Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala  
210 215 220

Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr  
225 230 235 240

Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr  
245 250 255

Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val  
260 265 270

Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr  
275 280 285

Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu  
290 295 300

Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr  
305 310 315 320

Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe  
325 330 335

Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg  
340 345 350

Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile  
355 360 365

Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly  
370 375 380

Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala  
385 390 395 400

Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile  
405 410 415

Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu  
420 425 430

Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala  
435 440 445

ES 2 498 465 B1

Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln  
450 455 460

Phe Tyr Ile  
465