

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 174**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2013 PCT/IL2013/050277**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2013 E 13767635 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2831584**

54 Título: **Marcadores celulares para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y para la progresión de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

26.03.2012 US 201261615465 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.04.2021

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD. (50.0%)
at the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL y
NEUROQUEST LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**EISENBACH-SCHWARTZ, MICHAL y
YOLES, ESTER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 819 174 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcadores celulares para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y para la progresión de la enfermedad de Alzheimer

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la técnica

Las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) tienen en común un desarrollo progresivo crónico que lleva a la neurodegeneración, incluyendo el daño neuroaxonal, la apoptosis y la gliosis. La patogenia y fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas son extremadamente complejas y sólo parcialmente comprendidas. Independientemente de las diferencias, la edad es un factor de riesgo común que desempeña un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas. Además, hay indicios sustanciales de que la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la agregación de proteínas, la inflamación y la apoptosis, entre otros, son sucesos patológicos comunes que tienen un papel en la progresión de la enfermedad. Después de más de dos décadas de intensos esfuerzos por parte de las comunidades científicas y farmacéuticas de todo el mundo y a pesar de la acumulación de conocimientos, las enfermedades neurodegenerativas siguen siendo inevitables, incurables y en gran medida intratables. Además, no se dispone de ningún test objetivo para el diagnóstico definitivo. El diagnóstico se suele hacer utilizando evaluaciones clínicas en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando el daño es importante y la posibilidad de retrasar la progresión de la enfermedad es baja.

El sistema inmunitario, mediante el empleo de una serie de redes celulares, es el mecanismo natural del cuerpo para la defensa del hospedante contra entidades extrañas, así como para el mantenimiento, curación, regeneración y vigilancia de los tejidos frente al crecimiento celular aberrante, esto es, el reconocimiento de tumores o de células transformadas. Sin embargo, ninguna actividad de las células inmunitarias periféricas del sistema nervioso central (SNC) ha sido considerada durante mucho tiempo como indeseable. El SNC de los animales vertebrados está excepcionalmente protegido de toxinas, patógenos invasores, células inflamatorias y macromoléculas a través de un mecanismo protector denominado la "barrera hematoencefálica", un sistema de uniones herméticas en los capilares dentro del SNC que proporcionan una barrera física protectora. En condiciones normales no patológicas, las células inmunitarias de transmisión sanguínea apenas pueden ser detectadas en el cerebro utilizando métodos histológicos estándar. La escasez de células inmunitarias de transmisión sanguínea en el parénquima del SNC sano, en combinación con el concepto de que el SNC es un "sitio inmune privilegiado", ha contribuido a la opinión común de que, en condiciones normales, el SNC funciona más eficazmente en ausencia de cualquier actividad celular inmunitaria.

En contraste con la consideración común, recientemente se ha puesto de manifiesto que los sistemas nervioso e inmunitario están involucrados en una intensa comunicación bidireccional. Se ha encontrado también que las células inmunitarias tienen un papel en las diferentes etapas de la neurogénesis incluyendo la proliferación progenitora, la supervivencia, la migración y la diferenciación (Ziv and Schwartz, 2008; Ekdahl *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que las células T activas vigilan el SNC en todo momento tanto en condiciones normales como patológicas, también que los animales privados de células T activadas presentan capacidades de memoria reducidas que se pueden invertir por el reabastecimiento de las células T (Butovsky *et al.* 2006a; Kipnis *et al.*, 2004; Ziv *et al.* 2006).

El papel positivo de las células T autorreactivas en el mantenimiento de la actividad normal del cerebro en condiciones normales y patológicas ha sido descrito en varias publicaciones (Schwartz, 2001; Schori *et al.*, 2001; Mizrahi *et al.*, 2002; Nevo *et al.*, 2003; Nevo *et al.*, 2004). En condiciones no patológicas, se da a entender que la actividad cerebral, tal como la actividad de aprendizaje intensivo, implica el apoyo continuo de las células T autorreactivas necesarias para la restauración de la homeostasis. Tales células T están localizadas en los bordes del cerebro. En "los bordes del SNC", las células T específicas del SNC se activan, secretan citocinas y factores de crecimiento y también afectan directamente a las microglías para convertirse en apoyo de la supervivencia y del crecimiento neuronal.

En el SNC lesionado, una interpretación emergente del papel del sistema inmunitario en la regulación de la neurotoxicidad mediante la secreción de factores de crecimiento, la eliminación de las neuronas que mueren y la desintoxicación del entorno, ha dado a entender que la situación es compleja, con un equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales del sistema inmunitario (Shaked *et al.*, 2005; Shaked *et al.*, 2004; Ziv *et al.*, 2006; Kipnis *et al.*, 2004; Ron-Harel and Schwartz 2009).

Como se muestra además, en respuesta a una lesión aguda, las células T efectoras (T-eff) dirigidas a los autoantígenos (células T autoinmunitarias) son necesarias como parte de una respuesta reparadora (Rapalino *et al.*, 1998; Hauben *et al.*, 2000; Hauben *et al.*, 2003; Schwartz and Hauben, 2002; Moalem *et al.*, 1999; Yoles *et al.*, 2001; Kipnis *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2003), pero esta actividad debe estar fuertemente regulada por las células T reguladoras (T-reg) (Taams and Akbar, 2005) como parte de un mecanismo para controlar las enfermedades

autoinmunes (Kipnis *et al.*, 2002; Schwartz and Kipnis, 2002; Schwartz and Kipnis, 2004; Kipnis and Schwartz, 2005). Por consiguiente, se ha demostrado que estimular la autoinmunidad es beneficioso en modelos animales de trastornos neurodegenerativos agudos o crónicos.

5 La disminución de la inmunidad dependiente de la edad, conocida como inmunosenescencia, se asocia con la reducción de las defensas del hospedante, que se manifiesta por un aumento de la predisposición a las enfermedades infecciosas, así como una reducción de la capacidad para desarrollar inmunidad después de vacunación (Aw *et al.*, 2007). La disminución de la inmunidad en los ancianos se ha atribuido en gran medida a cambios en la función de las células madre hematopoyéticas y a su capacidad para diferenciarse en diferentes linajes de células inmunitarias. Esto es acorde con el hecho de que el timo involuciona con la edad, de modo que el número de células nativas disponibles para responder a nuevos antígenos extraños también disminuye. Sin embargo, se ha prestado mucha menos atención al papel del sistema inmunitario en el mantenimiento, curación y regeneración de los tejidos. Esto es particularmente importante para entender el vínculo entre el envejecimiento del cerebro, el deterioro de la memoria y la senescencia inmunitaria.

15 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad relacionada con la edad. En un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, el aumento de la respuesta inmune adaptativa utilizando vacunación con acetato de glatiramer dio como resultado una disminución de formación de la placa e inducción de neurogénesis (Butovsky *et al.*, 2006b). Este tratamiento indujo el reclutamiento de los monocitos de transmisión sanguínea al cerebro enfermo. El agotamiento de estos monocitos de transmisión sanguínea en la sangre dio como resultado un aumento significativo de la formación de placas amiloides (Butovsky *et al.*, 2007). Por otra parte, utilizando el mismo modelo animal, se demostró que los ejercicios inducen la respuesta de las células T lo que coincide con una disminución de las placas amiloides en estados patológicos avanzados (Nichol *et al.*, 2008). Otro subconjunto de células inmunitarias que se ha demostrado que está implicado en la formación de placa son las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ de origen natural. La pérdida neuronal causada por inyección intraocular de agregado de beta-amiloide fue significativamente mayor en ratones inmunodeficientes que en ratones normales. La neurodegeneración se atenuó o se aumentó por eliminación o adición, respectivamente, de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ de origen natural (Treg) (Avidan *et al.*, 2004).

25 Se ha sugerido que la inmunidad que reconoce las proteínas propias que residen en el cerebro proporciona un mecanismo que puede detectar y responder a diferentes desviaciones de la homeostasis del SNC y mantener la integridad del tejido (Schwartz and Ziv, 2008a; Schwartz and Ziv, 2008b). Por consiguiente, durante la vejez, cuando la necesidad de mantenimiento aumenta, el sistema inmunitario senescente falla en proporcionar el apoyo necesario. Las enfermedades neurodegenerativas pueden surgir cuando los niveles/potencia de componentes inmunológicos clave, implicados en la anti autorrespuesta, alcanzan niveles liminares.

35 El documento WO 2011/111043 describe métodos para el diagnóstico precoz de la ELA y para monitorizar la progresión de la ELA, utilizando marcadores celulares sanguíneos. En un método particular descrito, se miden los niveles de células T gamma-delta, células CD11b⁺/CD14⁻, células Lin⁻/DR⁻/CD33⁺ y células CD14⁺/CD16⁺ en una muestra de sangre periférica de un individuo examinado y se comparan con el intervalo de niveles de cada uno de estos tipos de células en muestras de sangre de controles de la misma edad, en donde ningún cambio en el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ y el aumento en los niveles de cada uno de los otros tipos de células indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener ELA que dichos controles de la misma edad.

40 El documento US 2002/137108 describe la alteración de la isoforma CD45 en las células T auxiliares como un marcador de diagnóstico en la enfermedad de Alzheimer.

Fiszer *et al.*, 1995, Neurologia I Neurochirurgia Polska, Polskie Towarzystwo Neurologiczne, Warsaw, PL, 29 (5): 737-745 describe que las células T gamma-delta participan en la patogenia de las enfermedades neurológicas, incluida la enfermedad de Alzheimer.

Sumario de la invención

45 Se ha encontrado, según la presente invención, que mientras que no se observaron diferencias en la cantidad de linfocitos y monocitos en la sangre de pacientes de Alzheimer, pacientes de ELA y voluntarios sanos, se observaron diferencias significativas en la subpoblación de linfocitos y monocitos típicamente implicados en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, en los pacientes de Alzheimer. En particular se encontraron tales diferencias en los niveles de las células T gamma-delta ($\gamma\delta$), que fueron significativamente elevados en los pacientes de Alzheimer (aunque menos que en los pacientes de ELA) en comparación con los controles sanos, y en el subconjunto de monocitos proinflamatorios CD14⁺/CD16⁺, que fueron considerablemente elevados en los pacientes de Alzheimer pero no en los pacientes de ELA. Además, mientras que se encontró una notable elevación en el porcentaje de monocitos que tienen los marcadores CD14⁺/CD11b⁺/CD15⁺, un fenotipo asociado con células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC), en la sangre de los pacientes de ELA, no se encontró ninguna diferencia en el porcentaje de estas células entre los pacientes de Alzheimer y los controles sanos.

En un aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a un método para el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado, comprendiendo dicho método:

- (i) medir los niveles de células T $\gamma\delta$ y de al menos un tipo de células de las MDSC en una muestra de sangre periférica obtenida de dicho individuo; y
- (ii) comparar los niveles medidos en (i) con los niveles de referencia que representan el intervalo de niveles de las células T $\gamma\delta$ y de dicho al menos un tipo de células de las MDSC, respectivamente, en muestras de sangre de controles de la misma edad, obteniendo así un perfil que expresa los niveles medidos en (i) con respecto a dichos niveles de referencia, respectivamente,

en donde un aumento en el nivel de células T $\gamma\delta$; y ningún cambio en el nivel de cada uno de dichos al menos un tipo de células de las MDSC indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener EA que dichos controles de la misma edad.

- 10 En ciertas realizaciones, este método comprende además medir en la etapa (i) el nivel de al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios en dicha muestra de sangre; y comparar en la etapa (ii) el nivel de dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios con un nivel de referencia que representa un intervalo de nivel de dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios en muestras de sangre de controles de la misma edad, en donde un aumento en el nivel de células T $\gamma\delta$; ningún cambio en el nivel de cada uno de dichos al menos un tipo de células de las MDSC; y un aumento en el nivel de al menos uno de dichos al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios, indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener EA que dichos controles de la misma edad.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un kit para el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado, comprendiendo dicho kit:

- 20 (i) anticuerpos contra cada uno de los tipos de células seleccionados de células T gamma-delta ($\gamma\delta$); y de al menos un tipo de células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC); y
- (ii) reactivos para detectar dichos anticuerpos.

En ciertas realizaciones, los tipos de células comprendidos dentro del kit de la invención incluyen además al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios.

25 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B muestran la distribución de marcadores individuales en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) vivas totales. Las PBMC recién aisladas de voluntarios sanos se tiñeron con anticuerpos mononucleares frente a CD3, CD14, CD19, CD15, CD11c y CD34, marcados con FITC, PE o APC. Se analizó la proporción (% de células positivas; 1A) y el nivel de expresión (intensidad media de fluorescencia; 1B) de cada marcador por FACS. Los datos que se muestran son la media \pm error estándar (SE) de 4-6 muestras de sangre diferentes.

Las figuras 2A-2B muestran una subpoblación de linfocitos. Las PBMC recién aisladas de voluntarios sanos se tiñeron doblemente con anticuerpos mononucleares frente a CD3 marcados con APC y uno de los siguientes anticuerpos mononucleares frente a CD4, CD8, CTLA4 o TCRgd, marcados con FITC o PE. Las barras representan la media \pm error estándar (SE) del porcentaje de células que expresan cada uno de los marcadores de la población de células positivas CD3 (2A) y la intensidad de la expresión (2B). Los datos que se muestran son de 4 experimentos diferentes.

La figura 3 muestra la curva característica operativa del receptor (ROC) para las células T $\gamma\delta$ analizadas en base a los resultados obtenidos en el estudio descrito en el Ejemplo 2, lo que da a entender que el porcentaje de células T $\gamma\delta$ del total de linfocitos y monocitos parece ser altamente sensible y seguro para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer un nuevo enfoque que identifica los cambios inmunitarios periféricos relacionados con la edad como factores de riesgo primarios para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Estudios preliminares llevados a cabo según la presente invención y descritos más adelante han demostrado cambios específicos y consistentes, más particularmente un aumento, en los niveles de células T $\gamma\delta$ y de los monocitos proinflamatorios células CD14⁺/CD16⁺ en muestras de sangre periférica de pacientes de Alzheimer, en comparación con los medidos en muestras de sangre periférica de controles de la misma edad, mientras que no se ha observado ninguna alteración en el nivel de las MDSC CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺. Este patrón de alteraciones es sustancialmente diferente de lo que se describe en el documento mencionado WO 2011/111043 como indicativo de ELA, en donde se observó claramente ningún cambio en el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ y un aumento en los niveles de varias MDSC en muestras de sangre periférica de pacientes de ELA. Estos hallazgos indican que los cambios específicos en el nivel de ciertos subconjuntos de células T o monocitos tales como los mencionados antes se pueden utilizar, ya sea por separado o en combinación uno con otro o con otros marcadores, como marcadores sanguíneos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

En un aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a un método para el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado, comprendiendo dicho método:

- (i) medir los niveles de células T $\gamma\delta$ y de al menos un tipo de células de las MDSC en una muestra de sangre periférica obtenida de dicho individuo; y
- 5 (ii) comparar los niveles medidos en (i) con los niveles de referencia que representan el intervalo de niveles de las células T $\gamma\delta$ y de dicho al menos un tipo de células de las MDSC, respectivamente, en muestras de sangre de controles de la misma edad, obteniendo así un perfil que expresa los niveles medidos en (i) con respecto a dichos niveles de referencia, respectivamente,

10 en donde un aumento en el nivel de células T $\gamma\delta$; y ningún cambio en el nivel de cada uno de dichos al menos un tipo de células de las MDSC indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener EA que dichos controles de la misma edad.

15 El término "células T gamma-delta " (células T $\gamma\delta$), como se usa en la presente memoria, se refiere a un pequeño subconjunto de células T que tienen un claro receptor de células T (TCR) en su superficie. En contraste con una mayoría de células T en las que el TCR se compone de dos cadenas de glucoproteína designadas cadenas α -TCR y β -TCR, el TCR en las células T $\gamma\delta$ está formado por una cadena γ y una cadena δ . Se ha demostrado que estas células desempeñan un papel en la inmunovigilancia y en la inmunorregulación (Girardi, 2006), y se ha encontrado que son una fuente importante de IL-17 (Roark *et al.*, 2008) y que inducen una respuesta fuerte de células T citotóxicas CD8⁺ (Brandes *et al.*, 2009).

20 La expresión "células supresoras derivadas de mieloides" (las MDSC), como se usa en la presente memoria, se refiere a una población heterogénea de células que consiste en células progenitoras mieloides y células mieloides inmaduras (las IMC). En individuos sanos, las IMC que se generan rápidamente en la médula ósea se diferencian en granulocitos maduros, macrófagos o células dendríticas (las DC). La interferencia con la diferenciación de las IMC en células mieloides maduras da como resultado la expansión de la población de MDSC. La evidencia acumulada ha demostrado que las MDSC contribuyen a la regulación negativa de las respuestas inmunitarias durante el cáncer y otras enfermedades. En el cáncer humano, se ha encontrado que un subconjunto de células mieloides tiene una actividad de arginasa aumentada significativamente, lo que reduce la expresión de la cadena CD3- ζ del receptor de células T; y que suprime la proliferación de células T, lo que sugiere que estas células pueden mediar en la depresión inmunitaria relacionada con los tumores (Ochoa *et al.*, 2007; Zea *et al.*, 2005). Por otra parte, puesto que se ha demostrado que la IL-13 desempeña un papel crucial en la actividad supresora de las MDSC (Beers *et al.*, 2008), la sugerencia de que la actividad de las MDSC está implicada en la progresión de la enfermedad es coherente con un informe que muestra que los porcentajes de ambas células T CD4⁺IL-13⁺ y CD8⁺IL-13⁺ en la sangre de los pacientes con ELA son significativamente más altos que en los controles sanos. La proporción de células T CD4⁺IL-13⁺ se ha demostrado que tiene una correlación negativa importante con las puntuaciones de la escala de calificación funcional de ELA, y una correlación positiva importante con la tasa de progresión de la enfermedad (Chiu *et al.*, 2008).

35 Ejemplos no limitantes de las MDSC incluyen los tipos de células CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺, CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo, y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺.

40 En ciertas realizaciones, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la invención son células T $\gamma\delta$ y una cualquiera de CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺, CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo, o Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺.

45 En ciertas realizaciones, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la invención son células T $\gamma\delta$ y cualquiera de los dos tipos de células de las MDSC enumerados, esto es, CD11b⁺/CD14⁻ y CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺; CD11b⁺/CD14⁻ y CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺; CD11b⁺/CD14⁻ y Lin⁻/DR⁻; CD11b⁺/CD14⁻ y Lin⁻/DR⁻/CD33⁺; CD11b⁺/CD14⁻ y CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺; CD11b⁺/CD14⁻ y ARG⁺/CD14⁺; CD11b⁺/CD14⁻ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; CD11b⁺/CD14⁻ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; CD11b⁺/CD14⁻ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y Lin⁻/DR⁻; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y Lin⁻/DR⁻/CD33⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y ARG⁺/CD14⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y Lin⁻/DR⁻; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y Lin⁻/DR⁻/CD33⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺; CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y ARG⁺/CD14⁺; Lin⁻/DR⁻ y Lin⁻/DR⁻/CD33⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺; Lin⁻/DR⁻ y ARG⁺/CD14⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; Lin⁻/DR⁻ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺; Lin⁻/DR⁻ y ARG⁺/CD14⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; Lin⁻/DR⁻ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; Lin⁻/DR⁻ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺ y ARG⁺/CD14⁺; CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; ARG⁺/CD14⁺ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; ARG⁺/CD14⁺ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; ARG⁺/CD14⁺ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; CD34⁺/Lin⁻/DR⁻

5 En ciertas realizaciones, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la invención son células T γδ y cualquiera de los ocho tipos de células de las MDSC enumerados, esto es, CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺ y CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺; CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; o CD11b⁺/CD14⁻, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺, CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺.

15 En ciertas realizaciones, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la invención son células T γδ y cualquiera de los nueve tipos de células de las MDSC enumerados, esto es, CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺ y CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo; CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺ y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺; o CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺, CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺.

20 En ciertas realizaciones, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la invención son células T γδ y cualquiera de los nueve tipos de células de las MDSC enumerados, esto es, CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺, CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺, CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo y Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺.

En una realización particular, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la presente invención son células T γδ y CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺.

25 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado como se ha definido anteriormente, donde comprende además medir en la etapa (i) el nivel de al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios en dicha muestra de sangre; y comparar en la etapa (ii) el nivel de dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios con un nivel de referencia que representa un intervalo de nivel de dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios en muestras de sangre de los controles de la misma edad, en donde un aumento en el nivel de células T γδ; ningún cambio en el nivel de cada uno de dichos al menos un tipo de células de las MDSC; y un aumento en el nivel de al menos uno de dichos al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios, indican que dicho individuo tiene una mayor probabilidad de tener EA que dichos controles de la misma edad.

35 El término "monocitos proinflamatorios", como se usa en la presente memoria, se refiere a un tipo no clásico de monocitos caracterizado por el bajo nivel de expresión de CD14 y la coexpresión adicional del receptor CD16 (monocitos CD14⁺/CD16⁺), que se desarrolla a partir de los monocitos CD14⁺⁺.

40 En tales realizaciones particulares, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la invención son, por tanto, células T γδ; al menos un tipo de células de las MDSC enumeradas anteriormente; y células CD14⁺/CD16⁺. De tales realizaciones son más particulares aquellas en las que se mide un solo tipo de células de las MDSC, o aquellas en las que se mide cualquier combinación de dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más tipos de células de las MDSC como se han definido anteriormente.

45 En una realización particular a modo de ejemplo en la presente memoria, las células cuyos niveles se miden en la etapa (i) del método de la presente invención son células T γδ, células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y células CD14⁺/CD16⁺, en donde un aumento en el nivel de células T γδ; ningún cambio en el nivel de células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺; y un aumento en el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener la enfermedad de Alzheimer que dichos controles de la misma edad.

En tal aspecto particular, la presente invención se refiere por lo tanto a un método para el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado, comprendiendo dicho método:

50 (i) medir los niveles de células T γδ, de células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y de células CD14⁺/CD16⁺ en una muestra de sangre periférica obtenida de dicho individuo; y

(ii) comparar los niveles medidos en (i) con los niveles de referencia que representan el intervalo de niveles de las células T γδ, de las células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y de las células CD14⁺/CD16⁺, respectivamente, en muestras de sangre de controles de la misma edad, obteniendo así un perfil que expresa los niveles medidos en (i) con respecto a dichos niveles de referencia, respectivamente,

55 en donde un aumento en el nivel de células T γδ; ningún cambio en el nivel de células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺; y un aumento en el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener EA que dichos controles de la misma edad.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a un método como se ha definido anteriormente, en donde los tipos de células cuyos niveles se miden en la etapa (i) son células T $\gamma\delta$, células CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺ y células CD14⁺/CD16⁺, y el perfil obtenido en la etapa (ii), que expresa el nivel medido en la etapa (i) para cada uno de los tipos de células y que indica una probabilidad más alta de EA para el individuo examinado, incluye un aumento de al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, aproximadamente 100 % o más, preferiblemente aproximadamente 100 %, en el nivel de células T $\gamma\delta$ en la muestra de sangre analizada, es decir, la muestra de sangre obtenida del individuo examinado, en comparación con un nivel de referencia que representa un intervalo de nivel de células T $\gamma\delta$ en las muestras de sangre de controles de la misma edad; y un aumento de al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, aproximadamente 50 %, o más, preferiblemente aproximadamente 50 %, en el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ en la muestra de sangre analizada en comparación con un nivel de referencia que representa un intervalo de nivel de células CD14⁺/CD16⁺ en las muestras de sangre de controles de la misma edad.

La muestra de sangre periférica analizada en la etapa (i) del método de la presente invención se obtiene tomando la muestra de sangre del individuo a ser diagnosticado de la probabilidad de presentar la enfermedad de Alzheimer; y poniendo en contacto dicha muestra de sangre con diversos tipos de anticuerpos dirigido cada uno a uno de los tipos o subconjuntos de células cuyos niveles se miden, es decir, células T $\gamma\delta$, al menos un tipo de células de las MDSC como se ha definido antes, y opcionalmente al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios como se ha definido antes, en donde cada tipo de los anticuerpos usados está marcado directa o indirectamente, por ejemplo, con un marcador fluorescente. El nivel de cada uno de los tipos o subconjuntos de células se mide entonces en dicha muestra de sangre utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, preferiblemente por FACS como se describe en la sección de los Ejemplos más adelante.

El nivel medido para cada uno de los tipos o subconjuntos de células analizados, según la etapa (i) del método de diagnóstico de la invención, se compara con un nivel de referencia que representa un intervalo de nivel de dicho tipo o subconjunto de células en muestras de sangre de controles de la misma edad, es decir, un grupo de individuos sanos en el mismo grupo de edad que el individuo examinado. Este intervalo de nivel, denominado también en la presente memoria "el intervalo de nivel normal", se deriva del conocimiento médico disponible y representa el intervalo de nivel normal para el tipo o subconjunto de células específico analizado en las muestras de sangre de controles de la misma edad.

Según la etapa (ii) de este método, después de comparar el nivel medido para cada uno de los tipos o subconjuntos de células analizados con el nivel de referencia, es decir, el intervalo de nivel normal del mismo, se obtiene un perfil, que expresa el nivel de cada uno de los tipos o subconjuntos de células analizados en la muestra de sangre obtenida del individuo examinado con respecto al nivel de cada uno de estos tipos o subconjuntos de células, respectivamente, en las muestras de sangre de controles de la misma edad.

El perfil obtenido en la etapa (ii) del método de diagnóstico de la invención es un perfil relativo, que muestra el nivel de cada uno de los tipos o subconjuntos de células medidos según este método en la muestra de sangre obtenida del individuo examinado con respecto al nivel de referencia de dicho tipo o subconjunto de células en las muestras de sangre de los controles de la misma edad. Puesto que el nivel de referencia con el que se compara el nivel medido representa, en efecto, un intervalo de nivel de dicho tipo o subconjunto de células en las muestras de sangre de individuos sanos en el mismo grupo de edad que el individuo examinado, cada uno de los niveles medidos en la muestra de sangre analizada se puede comparar o con el valor de la mediana o con el valor del nivel superior, pero preferiblemente con el valor del nivel superior, de la referencia normal.

Según la etapa (i) de este método como se ha definido antes, se mide el nivel de células T $\gamma\delta$, de al menos un tipo de células de las MDSC, y opcionalmente de al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios, y por lo tanto, el perfil obtenido en la etapa (ii) expresa el nivel de al menos dos, es decir, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más, pero preferiblemente tres o más tipos o subconjuntos de células, como se ha definido antes.

El nivel relativo medido de cada uno de los tipos o subconjuntos de células se representa en el perfil por "aumento", que indica que el nivel de dicho tipo o subconjunto de células en la muestra de sangre analizada en comparación con el límite superior del intervalo de nivel normal del mismo, esto es, el intervalo de nivel de dicho tipo o subconjunto de células en las muestras de sangre de los controles de la misma edad, está aumentado en al menos un 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más; se representa por "disminución", que indica que el nivel de dicho tipo o subconjunto de células en la muestra de sangre analizada en comparación con el límite inferior del intervalo de nivel normal del mismo, está disminuido en al menos aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más; o se representa como "sin cambio", que indica que el nivel de dicho tipo o subconjunto de células en la muestra de sangre analizada no se ve ni aumentado ni disminuido como se ha definido antes, es decir, está dentro o cerca del intervalo de nivel normal del mismo.

La enfermedad de Alzheimer se desarrolla durante una cantidad de tiempo desconocida y variable antes de llegar a ser totalmente evidente, y puede progresar sin ser diagnosticada durante años. Por otra parte, a menudo se piensa equivocadamente que los primeros síntomas de EA son preocupaciones "relacionadas con la edad" o manifestaciones de estrés. La EA normalmente se diagnostica clínicamente a partir de la historia del paciente, de la historia colateral de los familiares, y de observaciones clínicas, en base a la presencia de rasgos característicos neurológicos y

neuropsicológicos y a la ausencia de condiciones alternativas. El método expuesto anteriormente está dirigido a diagnosticar, más específicamente a diagnosticar precozmente, la probabilidad de presentar EA en un individuo examinado, en donde los individuos sometidos a este método son aquellos que presentan ciertos signos que podrían ser asociados con EA, particularmente la dificultad en recordar los sucesos recientes (antes que los recuerdos más antiguos de la vida de las personas, llamada también "memoria episódica", los hechos aprendidos, es decir, memoria semántica, y la memoria implícita, es decir, la memoria corporal sobre cómo hacer las cosas, que se ven afectadas en un grado menor), que es el síntoma más común en las primeras etapas de la enfermedad.

Los individuos diagnosticados según el método de la presente invención con una mayor probabilidad de padecer EA, pueden ser dirigidos a etapas posteriores de diagnóstico confirmatorio, o pueden comenzar a recibir un tratamiento terapéutico dirigido a tratar las manifestaciones cognitivas de la EA, por ejemplo, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, tal como tacrina, rivastigmina, galantamina y donepezilo, o un antagonista del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) tal como memantina, o recibir intervención psicosocial. Cuando se sospecha la presencia de EA, el diagnóstico se confirma usualmente con tests que evalúan las capacidades de comportamiento y de pensamiento, a menudo seguidos por un escaneo cerebral, también llamado neuroimagen, si es posible. Para excluir otra patología cerebral o subtipos de demencia, se pueden utilizar técnicas avanzadas de formación de imágenes médicas con tomografía computarizada (CT) o formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), y con tomografía computarizada de emisión de un solo fotón (SPECT) o tomografía de emisión de positrón (PET). La decisión de si son necesarias etapas posteriores de confirmación de diagnóstico, o si se puede proporcionar un tratamiento, será determinada como lo considere apropiado el facultativo.

La frase "un intervalo de nivel", como se usa en la presente memoria con respecto a un tipo o subconjunto particular de células en las muestras de sangre de los controles de la misma edad, se refiere al intervalo de nivel normal para un tipo o subconjunto específico de células en las muestras de sangre de controles de la misma edad, como se ha definido antes.

Como se ha descrito anteriormente, en contraste con ciertas enfermedades neurodegenerativas tales como la ELA, no se ha observado ninguna alteración en el nivel de las MDSC CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ en las muestras de sangre periférica de pacientes de Alzheimer en comparación con el intervalo de nivel normal de estas células. Por lo tanto, el nivel de estos monocitos se puede utilizar, en combinaciones con el nivel de otros tipos o subconjuntos de células como se han definido antes, para el diagnóstico de la probabilidad de presencia de EA en un individuo examinado.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para uso en el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado, comprendiendo dicho kit:

- (i) anticuerpos contra cada uno de los tipos de células seleccionados de células T gamma-delta ($\gamma\delta$); y de al menos un tipo de células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC); y
- (ii) reactivos para detectar dichos anticuerpos.

El kit de la presente invención se puede utilizar para llevar a cabo el método no terapéutico descrito anteriormente, es decir, el método en el que se diagnostica la probabilidad de EA en un individuo examinado.

En ciertas realizaciones, el kit de la presente invención se utiliza para el diagnóstico de la probabilidad de EA en un individuo examinado, como se ha definido anteriormente, en donde dichos tipos de células incluyen además al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios como se ha definido antes. En tales realizaciones particulares, dichos monocitos proinflamatorios son células CD14⁺/CD16⁺.

El kit de la invención comprende además anticuerpos contra cada uno de dichos tipos de células, así como los reactivos necesarios para la detección de esos anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, pero son preferiblemente anticuerpos monoclonales. Tanto los anticuerpos como los reactivos proporcionados se utilizan para medir los niveles de los tipos de células enumerados, en dicha muestra de sangre.

Como se define por los métodos no terapéuticos de la invención, el nivel medido para cada uno de los tipos de células se compara con un intervalo de nivel de dicho tipo de células en las muestras de sangre de controles de la misma edad para evaluar así si el nivel medido es más alto que, o está dentro del intervalo de nivel normal de dicho tipo de células, es decir, el intervalo de nivel de dicho tipo de células en las muestras de sangre de controles de la misma edad. Estos datos se comparan con los niveles de referencia, incluidos además en el kit, que expresan el intervalo de niveles de dichos tipos de células en las muestras de sangre de controles de la misma edad, para determinar así si dicho individuo tiene una mayor probabilidad de tener EA que dichos controles de la misma edad.

La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

5 Pacientes: Los individuos incluidos en el grupo de pacientes, tanto hombres como mujeres, que han sido clínicamente diagnosticados como enfermos de EA y que accedieron a firmar el consentimiento informado. El grupo de control incluyó hombres y mujeres voluntarios sin síntomas clínicos de EA, que accedieron a firmar el consentimiento informado. Los pacientes de Alzheimer y los controles que fueron incluidos en el estudio fueron examinados en cuanto a sus capacidades cognitivas utilizando el test minimal. Se tomó una muestra de sangre de hasta 20 ml y se envió al laboratorio para ser analizada en cuanto a los diferentes componentes celulares después de excluir la presencia de los siguientes virus: HCV, HBsAg, VIH, HTLV y TPHA. El análisis de sangre se realizó entre las 18-24 horas desde el momento en que se tomó.

10 Tinción por FACS de sangre completa: Se incubaron 50 µl de muestras de sangre completa con 5 µl de cada uno de los mAb designados durante 45 minutos a 4 °C. Se añadieron a cada tubo 2 ml de FACSLyse (Becton Dickinson, San Jose, CA), y se incubaron entonces los tubos a temperatura ambiente durante 12 minutos, seguido por un lavado con 2 ml de PBS. De cada muestra, se adquirieron 10⁵ datos por FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) y se analizaron por el software FCS Express V3.

15 Los mAb designados: CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD11b, CD16, Lin, HLA-DR⁻, CD33, TCRgd- Becton Dickinson, San José, CA. TLR4 eBioscience San Diego, CA.

Ejemplo 1. Exactitud y robustez de los resultados en voluntarios sanos

20 En este estudio, se analizó la distribución de marcadores individuales sobre el total de las células mononucleares de sangre periférica vivas (PBMC), en primer lugar utilizando sangre de voluntarios sanos, jóvenes, para examinar así la exactitud y robustez de las medidas, y después, en un estudio controlado comparando los pacientes de Alzheimer y los controles de la misma edad.

Las PBMC recién aisladas de voluntarios sanos se tiñeron con anticuerpos mononucleares contra CD3, CD14, CD19, CD11c, CD34 y CD15, marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o alofococianina (APC), y se analizaron la proporción y el nivel de expresión de cada uno de estos marcadores mediante la clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS) (Figuras 1A-1B).

25 Las PBMC recién aisladas de voluntarios sanos se tiñeron doble con anticuerpos mononucleares contra CD3 marcados con APC y anticuerpos mononucleares contra CD4, CD8, CTLA4 o TCRgd, marcados con FITC o con PE y se midió el porcentaje de células que expresan cada uno de estos marcadores en la población de células CD3 positivas, así como la intensidad de expresión. (Tabla 1; Figuras 2A-2B).

30 Los resultados que se muestran en las Figuras 1-2 indican que se pueden monitorizar los marcadores con desviaciones relativamente pequeñas entre las diferentes muestras de sangre. Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran que la distribución de CD14 y CD16 en los monocitos de sangre periférica se puede separar en tres subpoblaciones distintas: expresión alta, débil y negativa de CD14, y cada una representa un fenotipo celular diferente.

Tabla 1: Subpoblación de monocitos

	CD14 ⁺ CD40 ⁺	CD14 alta CD16 ⁻	CD14 alta CD16 ⁺	CD14 débil CD16 ⁺	CD14 ⁻ CD15 ⁺ CD11b ⁺
% de células positivas	40,27 (4,72) n = 4	75,23 (4,16) n = 4	10,38 (3,71) n = 4	4,44 (0,62) n = 4	15,82 (2,81) n = 4
Intensidad media de fluorescencia	213,38 (17,45)	247,29 (44,64)	167,42 (27,99)	32,64 (1,78)	78,05 (20,97)

35 Ejemplo 2. Los pacientes de Alzheimer presentan niveles elevados tanto de células T γδ como de células CD14⁺/CD16⁺ en PBMC en comparación con los controles sanos

40 Los estudios descritos en la presente memoria se llevaron a cabo utilizando aproximadamente 32 muestras de sangre, aproximadamente la mitad de ellas obtenidas de pacientes de Alzheimer y la mitad de ellas obtenidas de voluntarios sanos de la misma edad. Además, se examinaron 7 muestras de sangre de pacientes de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), otra enfermedad neurodegenerativa. Se codificaron todas las muestras de sangre y el análisis de los resultados se realizó a ciegas.

Tabla 2: Recuento diferencial de células mononucleares periféricas (% del total de PBMC)

		Media	SD	Mínimo	Mediana	Máximo	n
Monocitos CD14	Sanos	16,6	6,28	9,1	16,2	29,8	14

	EA	19,1	4,95	11,6	18,5	29,9	15
	ELA	18,9	4,3	13,4	17,3	25,7	7
Células T CD3	Sanos	53,9	11,95	27,7	57,6	69,7	14
	EA	57,5	9,39	40,4	56,5	73,2	16
	ELA	49,4	8,4	38,3	48	63,1	7
Células B CD19	Sanos	8,2	3,42	2,8	8,0	17,0	14
	EA	7,2	3,44	2,9	5,7	13,0	16
	ELA	ND	ND	ND	ND	ND	ND

La proporción de la población de PBMC medida por citometría de flujo (monocitos CD14, células T-CD3 y células B-CD19) se presenta en la Tabla 2, que no indica ninguna diferencia significativa entre los pacientes y los controles sanos.

- 5 El porcentaje de células T auxiliares (células CD4 positivas) y células T citotóxicas (células CD8 positivas) en el total de células T (células CD3 positivas), así como también la relación entre estas dos poblaciones celulares, se midieron utilizando el método de citometría de flujo en la sangre de los pacientes y de los controles sanos. No se encontraron diferencias entre los dos grupos (Tabla 3).

Tabla 3: Subpoblaciones de leucocitos

		Media	SD	Mínimo	Mediana	Máximo	n
Monocitos CD14	Sanos	64,3	17,13	20,9	68,4	86,9	14
	EA	63,5	16,37	33,6	66,1	87,1	16
	ELA	65,5	5,2	59,3	65,2	75,4	7
Células T CD3	Sanos	31,7	16,47	11,7	29,3	78,2	14
	EA	30,5	14,59	11,3	29,7	56,6	16
	ELA	27,9	7,8	16,1	31,5	34,9	7
Células B CD19	Sanos	2,8	1,96	0,3	2,3	8,1	14
	EA	3,0	2,15	0,6	2,2	7,7	16
	ELA	2,6	1,1	1,7	2,0	4,3	7

10

Aunque no se encontraron diferencias en la cantidad de linfocitos y monocitos en la sangre de pacientes de EA, de ELA y voluntarios sanos, como se ha mostrado antes, se encontraron diferencias significativas en la subpoblación de linfocitos y monocitos, como se muestra en la Tabla 4. Estos tipos de células están típicamente implicados en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa como se describe a continuación.

- 15 Tabla 4: Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos y monocitos totales respectivamente

		Media	SD	Mínimo	Mediana	Máximo	n
Células T $\gamma\delta$	Sanos	2,6	1,96	0,7	1,9	7,3	14
	EA	6,0	2,87	2,3	5,0	12,8	16
	ELA	12,9	8,1	1,8	11,8	26,8	7
CD14 ⁺ /CD16 ⁺	Sanos	10,5	5,78	2,4	9,7	20,4	14
	EA	16,3	8,70	3,2	17,4	34,9	16
	ELA	7,8	3,9	2,5	8,1	14,7	7
MDSC	Sanos	1,9	2,0	0,04	1,05	6,94	14
	EA	1,7	1,8	0,2	0,9	5,8	16
	ELA	11,0	10,5	1,4	9,2	32,6	7

- 20 Se encontró que las células T gamma-delta ($\gamma\delta$) eran significativamente elevadas en los pacientes de EA en comparación con los controles sanos, pero menos que en los pacientes de ELA. Este grupo de células tiene un comportamiento complejo; se demuestra que actúan como "primera línea de defensa", "células reguladoras", y como "puente entre las respuestas innatas y adaptativas". Su papel exacto en la cascada patológica de EA se debe seguir investigando. Sin embargo, los resultados preliminares sugieren que pueden ser utilizadas para el diagnóstico de EA con una precisión relativamente alta.

Se encontraron niveles elevados del subconjunto de monocitos proinflamatorios (CD14⁺/CD16⁺) en los pacientes de EA pero no en los pacientes de ELA. Más particularmente, mientras que en los donantes sanos estas células representaron aproximadamente el 10 % de todos los monocitos, en los pacientes de EA representaron aproximadamente el 16 % de todos los monocitos. Se ha demostrado que las células CD14⁺/CD16⁺ producen de manera eficiente la citocina proinflamatoria TNF α , mientras que no producen o producen en muy poca cantidad la citocina antiinflamatoria IL-10 (Beige *et al.*, 2002). Esto puede dictar el fenotipo de la respuesta inmunitaria adaptativa hacia un tipo de respuesta Th1 en lugar de la respuesta beneficiosa Th2. Es por lo tanto importante examinar la correlación entre el nivel de las células y la gravedad de la enfermedad.

Dentro de la población de monocitos, mientras que se encontró en la sangre de pacientes con ELA una notable elevación en el porcentaje de células con los marcadores CD14⁺/CD11b⁺/CD15⁺, un fenotipo asociado con las células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC), no se encontró diferencia en el porcentaje de estas células entre los pacientes de EA y los controles sanos. Estas células constituyen una población de células mieloides inmaduras con potentes funciones inmunodepresoras.

Las diferencias significativas descritas antes en el perfil de los glóbulos blancos sanguíneos de pacientes de EA en comparación con los controles de la misma edad y con los pacientes de ELA se pueden utilizar para el diagnóstico preciso de la enfermedad de Alzheimer.

Se realizó un análisis para evaluar así el potencial de los hallazgos descritos en la presente memoria para ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico preciso de EA. El análisis incluyó la evaluación de los antígenos independientes del sistema inmunitario descritos antes, junto con un algoritmo analítico sofisticado para el procesamiento de datos en un esfuerzo de definir claramente la relación molecular de estos antígenos y el resultado del test en relación con el diagnóstico de EA. En esta etapa, y para evaluar el potencial de los marcadores individuales, por cada uno de los marcadores descritos antes, se determinaron los resultados válidos basados en los niveles de precisión. En particular, se examinó la suma máxima de sensibilidad y especificidad y el área bajo la curva característica operativa del receptor (AUC de ROC). El área bajo la curva es una medida general de la precisión de un test. Como regla general, con excepciones, la AUC debe ser aproximadamente 0,8 o más alta antes de que un marcador sea considerado viable.

La curva ROC para las células T $\gamma\delta$ se muestra en la Figura 3. Este marcador parece ser altamente sensible y preciso para el diagnóstico de EA, como se muestra en la Tabla 5. Se puede esperar que la combinación de este marcador con los marcadores adicionales, contribuirá a la sensibilidad, selectividad y especificidad de este test. Además, se sugiere que el nivel de estas células puede estar correlacionado también con la gravedad de la enfermedad.

Tabla 5: La sensibilidad y especificidad de los biomarcadores encontrados para el diagnóstico de EA

	Sensibilidad	Especificidad	AUC	P
Células T $\gamma\delta$	87 %	85 %	0,87	<0,001
CD14 ⁺ /CD16 ⁺	60 %	85 %	0,70	0,064

Referencias

Avidan H., Kipnis J., Butovsky O., Caspi R.R., Schwartz M., Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4⁺CD25⁺ T cells. *Eur J Immunol.*, 2004, 34(12), 3434-3445

Aw D., Silva A.B., Palmer D.B., Immunosenescence: emerging challenges for an ageing *population*. *Immunology*, 2007, 120(4), 435-446

Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Appel S.H., CD4⁺ T cells support glial neuroprotection, slow disease progression, and modify glial morphology in an animal model of inherited ALS, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(40), 15558-15563

Beige K.U., Dayyani F., Horelt A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B., Espevik T., Ziegler Heitbrock L., The proinflammatory CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.*, 2002, 168(7), 3536-3542

Brandes M., Willmann K., Bioley G., Lévy N., Eberl M., Luo M., Tampé R., Lévy F., Romero P., Moser B., Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8⁺ alphabeta T cell responses, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(7), 2307-2312

Butovsky O., Ziv Y., Schwartz A., Landa G., Talpalar A.E., Pluchino S., Martina G., Schwartz M., *Mol Cell Neurosci.*, 2006a, 31(1), 149-160

Butovsky O., Koronyo-Hamaoui M., Kunis G., Ophir E., Landa G., Cohen H., Schwartz M., Glatiramer acetate fights

- against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing Insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006b, 103(31) 29
- Butovsky O., Kunis G., Koronyo-Hamaoui M., Schwartz M., Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur J Neurosci*, 2007, 26(2), 413-416
- 5 Chiu I.M., Chen A., Zheng Y., Kosaras B., Tsiftoglou S.A., Vartanian T.K., Brown R.H. Jr, Carroll M.C., T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(46), 17913- 17918
- Ekdahl C.T., Kokaia Z., Lindvall O., Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience*, 2009, 158(3), 1021-1029. Epub 2008
- 10 Girardi M., Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells, *J Invest Dermatol.*, 2006, 126(1), 25-31
- Hauben E., Nevo U., Yoles E., Moalem G., Agranov E., Mor F., Akselrod S., Neeman M., Cohen I.R., Schwartz M., *Lancet*, 2000, 355(9200), 286-287
- Hauben E., Gothilf A., Cohen A., Butovsky O., Nevo U., Smirnov I., Yoles E., Akselrod S., Schwartz M., *J Neurosci*, 2003, 23(25), 8808-8819
- 15 Kipnis J., Yoles E., Schori H., Hauben E., Shaked I., Schwartz M., *J Neurosci*, 2001, 21(13), 4564-4571
- Kipnis J., Mizrahi T., Hauben E., Shaked I., Shevach E., Schwimz M., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24), 15620-15625
- Kipnis J., Cohen H., Cardan M., Ziv Y., Schwartz M., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21), 8180-8185
- 20 Kipnis J., Schwartz M., Controlled autoimmunity in CNS maintenance and repair: naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T-Cells at the crossroads of health and disease. *Neuromolecular Med.*, 2005, 7(3), 197-206
- Mizrahi T., Hauben E., Schwartz M., The tissue-specific self-pathogen is the protective self-antigen: the case of uveitis. *J Immunol.*, 2002, 169(10), 5971-5977
- Moalem G., Leibowitz-Amit R., Yoles E., Mor F., Cohen I.R., Schwartz M., *Nat Med.*, 1999, 5(1), 49-55
- 25 Nevo U., Kipnis J., Golding I., Shaked I., Neumann A., Akselrod S., Schwartz M., Autoimmunity as a special case of immunity: removing threats from within. *Trends Mol Med.*, 2003, 9(3), 88-93
- Nevo U., Golding I., Neumann A.U., Schwartz M., Akselrod S., Autoimmunity as an immune defense against degenerative processes: a primary mathematical model illustrating the bright side of autoimmunity. *J Theor Biol.*, 2004, 227(4), 583-592
- 30 Nichol K.E., Poon W.W., Parachikova A.I., Cribbs D.H., Glabe C.G., Cotman C.W., Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflammation*, 2008, 5, 13
- Ochoa A.C., Zea A.H., Hernandez C., Rodriguez P.C., Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma, *Clin Cancer Res.*, 2007, 13(2 Pt 2), 721s-726s
- 35 Rapalino O., Lazarov-Spiegler O., Agranov E., Velan G.J., Yoles E., Fraidakis M., Solomon A., Gepstein R., Katz A., Belkin M., Hadani M., Schwartz M., *Nat Med.*, 1998, 4(7), 814-821
- Roark C.L., Simonian P.L., Fontenot A.P., Born W.K., O'Brien R.L., Gammadelta T cells: an important source of IL-17, *Curr Opin Immunol.*, 2008, 20(3), 353-357
- 40 Ron-Harel N., Schwartz M., Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss? *Trends Neurosci.*, 2009, 32(7), 367-375
- Schori H., Yoles E., Schwartz M., T-cell-based immunity counteracts the potential toxicity of glutamate in the central nervous system. *J Neuroimmunol.*, 2001, 119(2), 199- 204
- Schwartz M., Physiological approaches to neuroprotection. boosting of protective autoimmunity. *Surv Ophthalmol.*, 2001, 45 Suppl 3, S256-60
- 45 Schwartz M., Hauben E., Differing views on spinal cord repair. *Science*, 2002, 296(5572), 1400
- Schwartz M., Kipnis J., Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'. *Trends Immunol.*, 2002, 23(11), 530-534

- Schwartz M., Shaked 1., Fisher J., Mizrahi T., Scholi H., *Trends Neurosci.*, 2003, 26(6), 297-302
- Schwartz M., Kipnis J., Self and non-self discrimination is needed for the existence rather than deletion of autoimmunity: the role of regulatory T cells in protective autoimmunity. *Cell Mol Life Sci.*, 2004, 61(18), 2285-2289
- 5 Schwartz M., Ziv Y., Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies. *Trends Immunol.*, 2008a, 29(5), 211-219
- Schwartz M., Ziv Y., Immunity to self and self-maintenance: what can tumor immunology teach us about ALS and Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.*, 2008b, 29(6), 287-293
- Shaked 1., Porat Z., Gersner R., Kipnis J., Schwartz M., *J Neuroimmunol.*, 2004, 146(1-2), 84-93
- 10 Shaked 1., Tchoresh D., Gersner R., Meiri G., Mordechai S., Xiao X., Hart R.P., Schwartz M., *J Neurochem.*, 2005, 92(5), 997-1009
- Taams L.S., Akbar A.N., *Curr Top Microbio[Immunol.*, 2005,293, 115-131
- Yoles E., Hauben E., Palgi O., Agranov E., Gothilf A., Cohen A., Kuchroo V., Cohen I.R., Weiner H., Schwartz M., Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *J Neurosci.*, 2001, 21(11), 3740-3748
- 15 Zea A.H., Rodriguez P.C., Atkins M.B., Hernandez C., Signoretti S., Zabaleta J., McDermott D., Quiceno D., Youmans A., O'Neill A., Mier J., Ochoa A.C., Arginase- producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion, *Cancer Res.*, 2005, 65(8), 3044-3048
- Ziv Y., Ron N., Butovsky O., Landa G., Sudai E., Greenberg N., Cohen H., Kipnis J., Schwartz M., Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.*, 2006, 9(2), 268-275
- 20 Ziv Y., Schwartz M., Immune-based regulation of adult neurogenesis: implications for learning and memory. *Brain Behav Immun.*, 2008, 22(2), 167-176

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico de la probabilidad de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un individuo examinado, que comprende:
 - 5 (i) medir los niveles de células T gamma-delta ($\gamma\delta$) y de al menos un tipo de células de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) en una muestra de sangre periférica obtenida de dicho individuo; y
 - (ii) comparar los niveles medidos en (i) con los niveles de referencia que representan el intervalo de niveles de las células T $\gamma\delta$ y de dicho al menos un tipo de células de las MDSC, respectivamente, en muestras de sangre de controles de la misma edad, obteniendo así un perfil que expresa los niveles medidos en (i) con respecto a dichos niveles de referencia, respectivamente,
- 10 en donde un aumento en el nivel de células T $\gamma\delta$; y ningún cambio en el nivel de cada uno de dichos al menos un tipo de células de las MDSC indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener EA que dichos controles de la misma edad.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho al menos un tipo de células de las MDSC son células CD11b⁺/CD14⁻, CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺, CD11b⁺/CD14⁺/CD15⁺, Lin⁻/DR⁻, Lin⁻/DR⁻/CD33⁺, CD34⁺/CD33⁺/CD13⁺, ARG⁺/CD14⁺,
15 CD34⁺/Lin⁻/DR⁻/CD11b⁺/CD15⁺, CD14⁺/HLA-DR⁻/bajo o Lin⁻/HLA-DR⁻/bajo/CD11b⁺/CD33⁺.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho al menos un tipo de células de las MDSC son células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además medir en la etapa (i) el nivel de
20 al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios en dicha muestra de sangre; y comparar en la etapa (ii) el nivel de dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios con un nivel de referencia que representa un intervalo de nivel de dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios en muestras de sangre de controles de la misma edad,
- en donde un aumento en el nivel de células T $\gamma\delta$; ningún cambio en el nivel de cada uno de dichos al menos un tipo
25 de células de las MDSC; y un aumento en el nivel de al menos uno de dichos al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios, indican que dicho individuo tiene una probabilidad más alta de tener EA que dichos controles de la misma edad-
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios son células CD14⁺/CD16⁺.
6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde los niveles de células T $\gamma\delta$, células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺ y células
30 CD14⁺/CD16⁺ se miden en la etapa (i).
7. El método de la reivindicación 6, en donde el nivel de células T $\gamma\delta$ en la muestra de sangre obtenida de dicho individuo es por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % más alto que el nivel de células T $\gamma\delta$ en las muestras
35 de sangre de controles de la misma edad; y el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ en la muestra de sangre obtenida de dicho individuo es por lo menos 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, o 50 % más alto que el nivel de células CD14⁺/CD16⁺ en las muestras de sangre de controles de la misma edad.
8. Un kit para uso en el diagnóstico de la probabilidad de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un individuo examinado, comprendiendo dicho kit:
 - (i) anticuerpos contra cada uno de los tipos de células seleccionados de células T gamma-delta ($\gamma\delta$); y de al menos un tipo de células supresoras derivadas de mieloides (las MDSC); y
 - 40 (ii) reactivos para detectar dichos anticuerpos.
9. El kit para uso de la reivindicación 8, en donde dichos tipos de células incluyen además al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios.
10. El kit para uso de la reivindicación 9, en donde dicho al menos un tipo de células de monocitos proinflamatorios son células CD14⁺/CD16⁺.
- 45 11. El kit para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde dicho al menos un tipo de células de las MDSC son células CD11b⁺/CD14⁻/CD15⁺.

Fig. 1A

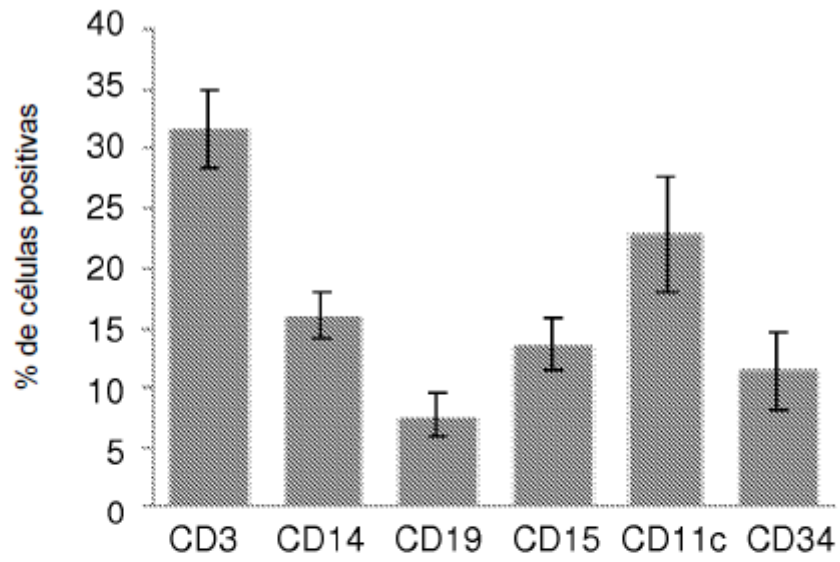


Fig. 1B

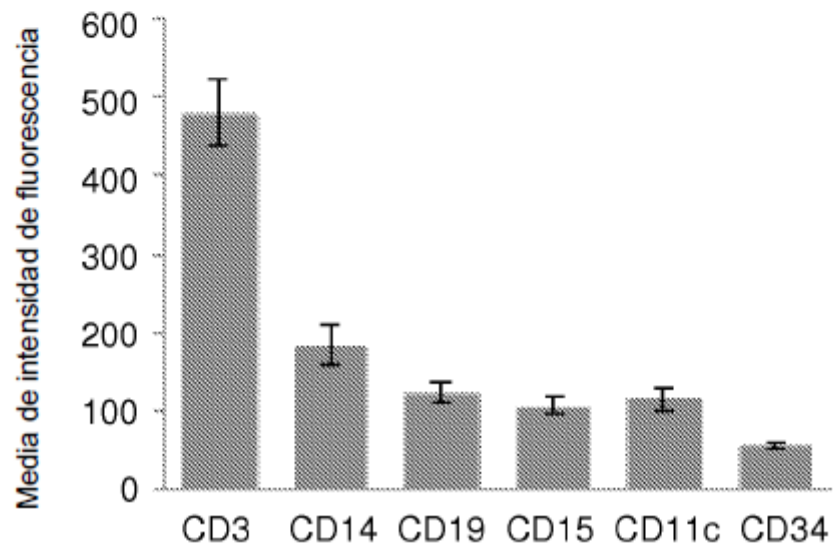


Fig. 2A

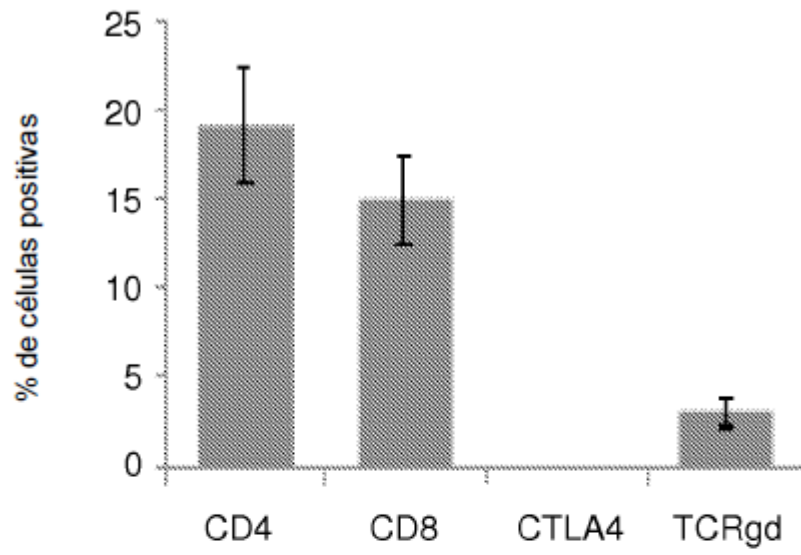


Fig. 2B

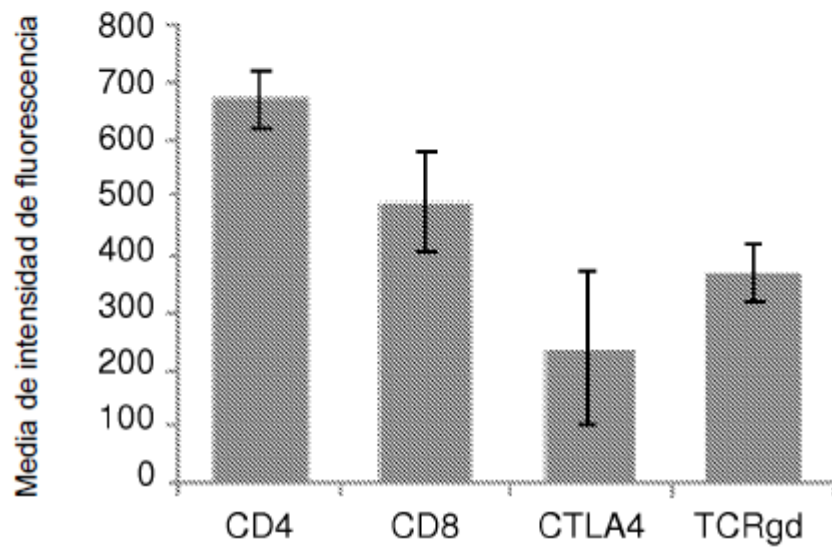


Fig. 3

