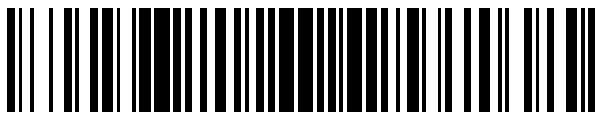


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 889 914**

(21) Número de solicitud: 202030671

(51) Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

(12)

## PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN

B2

(22) Fecha de presentación:

**01.07.2020**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**14.01.2022**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**23.03.2022**

Fecha de concesión:

**14.07.2022**

(45) Fecha de publicación de la concesión:

**21.07.2022**

(73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE (64.0%)**  
**AVDA. DE LA UNIVERSIDAD S/N 03202 ELCHE (Alicante) ES;**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (6.0%) y**  
**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (30.0%)**

(72) Inventor/es:

**SÁEZ VALERO, Javier;**  
**LÓPEZ FONT, Inmaculada Belén;**  
**CUCHILLO IBÁÑEZ, Inmaculada y**  
**BOIX RODRÍGUEZ, Claudia Paola**

(74) Agente/Representante:

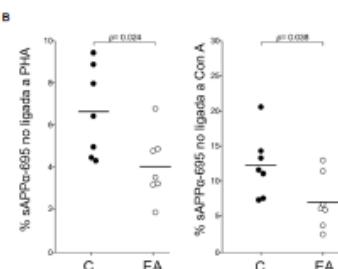
**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

(54) Título: **PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DE sAPP $\alpha$  Y/O sAPP $\beta$  COMO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, MÉTODO Y KIT BASADOS EN EL MISMO**

(57) Resumen:

Patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  como biomarcador diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, método y kit basados en el mismo.

La invención se refiere a un método in vitro de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el que se determina el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra biológica, los biomarcadores sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  para uso en dicho método in vitro, así como un kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende reactivos para determinar el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra biológica.



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

**ES 2 889 914 B2**

## DESCRIPCIÓN

### **PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DE sAPP $\alpha$ Y/O sAPP $\beta$ COMO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, MÉTODO Y KIT BASADOS EN EL MISMO**

#### **5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La invención se relaciona con métodos *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en los que se determina el patrón de glicosilación de proteínas. En particular, la invención se relaciona con un método *in vitro* en el que se determina el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ , fragmentos generados en el procesamiento 10 proteolítico del precursor de la proteína amiloide (APP).

#### **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia senil y se caracteriza por la presencia de depósitos proteináceos cerebrales, a nivel extracelular, 15 como placas amiloides y, a nivel intracelular, como ovillos neurofibrilares. La EA es una tauopatía en la que ovillos neurofibrilares de la proteína citoesquelética tau anormalmente hiperfosforilada (P-tau) llevan al colapso y muerte neuronal. La EA es la única tauopatía que cursa con depósitos fibrilares amiloides, constituidos principalmente por el péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ).

20 El A $\beta$  es un péptido de 40-42 aminoácidos producto del procesamiento proteolítico de la proteína transmembrana conocida como precursor de la proteína amiloide (APP). El procesamiento de APP puede llevarse a cabo por distintas vías que coexisten en condiciones fisiológicas normales, la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. En 25 ambas vías se producen largos fragmentos N-terminales (NTF, del inglés *N-terminal fragment*).

En la vía no amiloidogénica, con la acción secuencial de  $\alpha$ -secretasa (ADAM10) y  $\gamma$ -secretasa, no se produce A $\beta$ . Con la acción de la  $\alpha$ -secretasa, se producen el fragmento 30 NTF sAPP $\alpha$  y el fragmento C-terminal (CTF, del inglés *C-terminal fragment*) APP-CTF83. Con la acción de la  $\gamma$ -secretasa, el fragmento APP-CTF83 produce los fragmentos AICD y P3.

La vía amiloidogénica, dirigida por la acción secuencial de las enzimas  $\beta$ -secretasa (BACE1) y  $\gamma$ -secretasa, genera el A $\beta$ . Con la acción de la  $\beta$ -secretasa, se produce el fragmento NTF sAPP $\beta$  y el fragmento CTF APP-CTF99. Con la acción de la  $\gamma$ -secretasa, el fragmento APP-CTF99 produce los fragmentos AICD y A $\beta$ .

5

Hoy en día se acepta que los verdaderos “efectores” patológicos de la EA son los oligómeros de A $\beta$  y el P-tau y que un exceso de formas oligoméricas de A $\beta$  (especialmente la forma de 42 aminoácidos: A $\beta$ 42) es el determinante primigenio de la neurotoxicidad en la EA. La determinación de A $\beta$ 42 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) 10 se ha propuesto como marcador diagnóstico (junto a tau y P-tau, buenos marcadores pero que carecen de especificidad frente a otras tauopatías y desórdenes neurológicos).

Respecto al A $\beta$  como biomarcador, se da la paradoja de que lo que existe es una disminución en sus valores en el LCR de EA. Ello sería el resultado del aumento de la 15 producción de A $\beta$  en el cerebro, que a su vez fibrila, forma placas y queda secuestrado en dichas placas amiloides, por lo que llega al LCR en cantidades menores de las determinadas en sujetos sin placas, sin EA. Esta circunstancia hace difícil que el A $\beta$  en LCR pueda ser considerado un marcador temprano o de progresión.

20 Se han propuesto los niveles de los fragmentos NTF de APP, sAPP $\beta$  y el sAPP $\alpha$ , antes mencionados, como marcadores alternativos al A $\beta$ . Pese a las altas expectativas, los resultados no han sido alentadores, por la poca consistencia en los resultados de diversos estudios. Algunos de dichos estudios describieron aumento de sAPP $\beta$ , pero otros describieron que no había ningún cambio o incluso disminuciones de sAPP $\beta$ . Algo 25 equivalente ha ocurrido con los niveles de sAPP $\alpha$ ; algunos estudios describieron disminución de sAPP $\alpha$ , mientras que otros estudios describieron o bien que no había cambios o aumentos de sAPP $\alpha$ . Los estudios que examinaron ambos, sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ , describieron que ambos NTF de APP mostraban la misma tendencia, fuese aumento o disminución en sus niveles en LCR, cuando lo esperable es que muestren tendencias 30 opuestas por desequilibrio de las vías de procesamiento (Perneczky et al., 2014).

Además, se ha determinado que la proteína completa de APP (sin procesar proteolíticamente) está también presente en el LCR coexistiendo con sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  y que todas las especies forman heterómeros, por lo que los análisis de ELISAs para

determinar niveles de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ , aun contando con anticuerpos específicos, no cuantifican las especies separadamente de forma fiable (Cuchillo-Ibañez et al., 2015).

Posteriormente, se realizó un estudio por Western blot, evitando que los heterómeros 5 falsearan la interpretación de los resultados, en el que no se evidenciaron niveles alterados de sAPP $\alpha$  o sAPP $\beta$  (Lopez-Font et al., 2017).

La glicosilación es un proceso de adición de glúcidos a proteínas, que puede darse como 10 una modificación cotraduccional (ocurre paralela a la síntesis de la proteína cuando el ribosoma se encuentra asociado al retículo endoplásmico) o postraduccional (ocurre cuando la proteína ya ha terminado su síntesis). Los glúcidos pueden unirse a las 15 proteínas mediante N-glicosilación, en la que se unen al nitrógeno de las cadenas laterales de los aminoácidos asparagina o arginina o mediante O-glicosilación, en la que se unen al oxígeno del grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina, treonina o tirosina.

La glicosilación es un proceso específico del tipo celular y del momento del desarrollo 20 celular, y que muestra alteraciones asociadas a algunas patologías. La glicosilación también determina la interacción de las proteínas, su funcionalidad y posterior procesamiento. El patrón de glicosilación de proteínas y/o péptidos como biomarcadores ha sido descrito para el diagnóstico de la EA. Así, US2002022242A1 describe el patrón 25 de glicosilación de la enzima butirilcolinesterasa como un biomarcador para el diagnóstico de la EA. Dicho documento describe la detección del patrón de glicosilación de la butirilcolinesterasa mediante la unión a lectinas. Las lectinas son proteínas que reconocen con muy alta especificidad azúcares terminales expuestos en glicoproteínas.

WO2012056008A1 describe la O-glicosilación de un aminoácido del A $\beta$  como un biomarcador para el diagnóstico de la EA y describe, entre otras, las siguientes técnicas 30 para detectar el aminoácido O-glicosilado en el A $\beta$ : ELISA, espectrometría de masas, tomografía por emisión de positrones (PET), resonancia magnética, radioinmunoensayos, ensayos de unión a lectinas, inmunohistoquímica, Western blot y citometría de flujo. Sin embargo, no se describe en este documento nada acerca de la utilidad de los patrones de glicosilación de sAPP $\alpha$  o de sAPP $\beta$  como biomarcadores para el diagnóstico de la EA.

Por otro lado, se han caracterizado la O-glicosilación de residuos específicos de A $\beta$  en LCR y las diferencias en los niveles de glicosilación de dichos residuos entre pacientes con EA y sujetos control (Halim et al., 2011). Este documento, centrado en la glicosilación de A $\beta$ , no describe, sin embargo, nada acerca de los patrones de 5 glicosilación de sAPP $\alpha$  o de sAPP $\beta$ , con residuos altamente N-glicosilados, además de la O-glicosilación; ni de su utilidad como biomarcadores para el diagnóstico de la EA.

A pesar de los avances recientes en el desarrollo de biomarcadores para el diagnóstico 10 de la EA, existe actualmente una necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de esta enfermedad.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término "comprende", "que comprende" y sus variantes no son de naturaleza limitativa y, por lo tanto, no pretenden 15 excluir otras características técnicas. El término "comprende", "que comprende" y sus variantes, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, incluye también, específicamente, el término "consiste en", "que consiste en" y sus variantes.

Como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares "el", 20 "la" incluyen referencias a las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados a 25 lo largo de la descripción y reivindicaciones, tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en el campo de la invención.

A efectos de la presente invención, el término "sujeto" se refiere a un humano. Más preferentemente, dicho sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer o se sospecha que 30 tiene, o está en riesgo de tener, dicha enfermedad. Los sujetos que están afectados por dicha enfermedad pueden ser identificados por los síntomas que acompañan a la enfermedad, que son conocidos en el estado de la técnica. Sin embargo, un sujeto que se sospecha que está afectado por la enfermedad mencionada puede ser también un sujeto aparentemente sano, por ejemplo, investigado mediante un examen clínico de

rutina, o puede ser un sujeto que corre el riesgo de desarrollar la enfermedad mencionada.

- A efectos de la presente invención, el término “muestra” se refiere a una muestra de un fluido corporal, a una muestra de células, a una muestra de un tejido o a una muestra de fluido de lavado/enjuague obtenida de una superficie corporal externa o interna. Preferentemente, las muestras son muestras de líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, saliva, células y tejidos.
- 5 A efectos de la presente invención, “patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ ” se refiere, de forma general, al conjunto de glúcidos unidos a sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ . En la presente invención, se puede utilizar cualquier método de reconocimiento de patrones conocido en el estado de la técnica, de forma que se detecten diferencias entre el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  del sujeto respecto a un patrón de glicosilación de referencia. Ventajosamente, se puede obtener un valor numérico o un rango de valores numéricos que dependan del patrón de glicosilación, permitiendo la comparación entre el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  del sujeto respecto al patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia. En la presente invención, se pueden utilizar ensayos de unión a lectinas para determinar el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ . En dichos ensayos de unión a lectinas, se puede obtener un porcentaje o fracción de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  ligada a una lectina, dicho porcentaje o fracción de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  depende del patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  y permite la comparación entre el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en el sujeto respecto al patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia.
- 10 15 20 25 A efectos de la presente invención, el término “comparar” se refiere a contrastar el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en la muestra que se va a analizar con el patrón de glicosilación en una muestra de referencia adecuada, tal como se especifica más adelante en la presente descripción. La comparación se refiere a la de los parámetros o valores correspondientes a dichos patrones de glicosilación, por ejemplo, un porcentaje o fracción de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  ligada a lectinas se compara con un porcentaje o fracción de referencia de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  ligada a lectinas; una señal de intensidad obtenida del patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  ligada a lectinas en una muestra se compara con el mismo tipo de señal de intensidad de dicho patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  ligada a lectinas en una muestra de referencia. La
- 30 35

comparación referida puede ser llevada a cabo manualmente o asistida por ordenador. En el caso de una comparación asistida por ordenador, el valor de la cantidad determinada puede compararse con los valores correspondientes a las referencias adecuadas que se almacenan en una base de datos mediante un programa informático.

- 5 En consecuencia, el resultado de la identificación a que se hace referencia en el presente documento podrá facilitarse automáticamente en un formato de salida adecuado.

En la presente patente, el término “patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia”, se deriva de muestras de sujetos sanos, para los cuales se sabe que no padecen la enfermedad de Alzheimer. Un patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia adecuado puede determinarse, mediante los métodos de la presente invención, a partir de una muestra de referencia para analizarse juntos, es decir, simultáneamente, o posteriormente, con la muestra de prueba. Preferiblemente, se 10 puede usar un valor de corte como un valor de referencia asociado al patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia.

15

A efectos de la presente invención, el término “diferencia en la comparación” puede corresponder a una disminución o a un aumento de un valor numérico o rango de valores 20 dependiente del patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en la muestra que se va a analizar, respecto a un valor numérico o rango de valores dependiente del patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ , en una muestra de referencia adecuada, tal como se especificó anteriormente. Preferiblemente, aunque no necesariamente, dicha diferencia, es estadísticamente significativa, es decir, una disminución estadísticamente 25 significativa, o un aumento estadísticamente significativo. Se puede determinar si una diferencia es estadísticamente significativa, utilizando diversas herramientas de evaluación estadística, bien conocidas en la técnica, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza y determinación del valor  $p$ , por ejemplo, a través de pruebas binomiales. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 90%, al menos 95%, al 30 menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Los niveles de significación de las pruebas estadísticas son, preferiblemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

En la presente patente, el término “indicativa” se refiere a que, una diferencia entre el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en la muestra que se va a analizar, respecto

al patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra de referencia adecuada, permite diagnosticar si un sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer.

A efectos de la presente invención, “Western blot”, también denominado “inmunoblot” o 5 “electrotransferencia”, se refiere a una técnica analítica usada en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos. La técnica utiliza las siguientes tres etapas: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido y, finalmente, visualización mediante unión de proteínas a anticuerpos primarios o 10 secundarios apropiados.

A efectos de la presente invención, “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)” se refiere a una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado 15 se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) capaz de generar un producto detectable a partir de un sustrato, por medio de un cambio de color o algún otro tipo de cambio, provocado por la acción enzimática sobre dicho sustrato. En dicha técnica puede existir un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario unido a dicha enzima. El antígeno se puede detectar indirectamente en la muestra mediante los 20 cambios de color medidos por espectrofotometría.

A efectos de la presente invención, “*splicing* alternativo” se refiere a un procedimiento en el que se obtienen, a partir de un transcripto primario de ARNm o pre-ARNm, distintas 25 isoformas de ARNm y proteínas, las cuales pueden tener funciones diferentes. Este proceso ocurre principalmente en eucariotas.

A efectos de la presente invención, la expresión “anticuerpos pan-específicos” se refiere a anticuerpos con especificidad frente a un dominio específico presente únicamente en una diana, por ejemplo, el dominio exclusivo que diferencia varias formas o variantes de 30 una proteína.

El problema técnico a resolver consiste en el desarrollo de un método de diagnóstico *in vitro* para el diagnóstico de la EA basado en nuevos biomarcadores.

La presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, proporciona a una solución a dicho problema técnico.

La presente invención proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad

5 de Alzheimer en un sujeto, que comprende:

- (a) determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ ,
  - (b) comparar dicho patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  con un patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia, en el que una diferencia en dicha comparación es indicativa de un diagnóstico positivo
- 10 de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto.

En una realización del método de la invención, dicho biomarcador es sAPP $\alpha$ .

15 En una realización del método de la invención, la muestra biológica está seleccionada del grupo que consiste en: líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, saliva, células y tejidos.

20 En una realización del método de la invención, se determina dicho patrón de glicosilación por una técnica seleccionada del grupo que consiste en: ELISA, espectrometría de masas, tomografía por emisión de positrones (PET), resonancia magnética nuclear (RMN), radioinmunoensayos, ensayos de unión a lectinas, inmunohistoquímica, Western blot y citometría de flujo.

25 En una realización preferente del método de la invención, se determina dicho patrón de glicosilación por ensayos de unión a lectinas.

En una realización más preferente del método de la invención, dichas lectinas son Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Con A) y/o PHA de *Phaseolus vulgaris*.

30 En una realización del método de la invención, en dichos ensayos de unión a lectinas se detecta la cantidad o concentración de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  discriminando entre ligados o no ligados a lectinas.

En una realización del método de la invención, la detección de la cantidad o concentración de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  se lleva a cabo por ELISA o Western blot.

En una realización del método de la invención, sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  derivan de cualquiera 5 de las variantes del precursor de la proteína amiloide (APP). Preferentemente, dichas variantes del APP se seleccionan del grupo que consiste en: APP695, APP751 y APP770.

En una realización del método de la invención, una disminución en un sujeto, respecto 10 a un valor de referencia derivado de muestras de sujetos sanos, de los niveles de sAPP $\alpha$  derivado de APP695 y derivado de la combinación de las variantes APP-KPI, APP751 y APP770, no ligado a las lectinas Con A o PHA, es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto; una disminución en un sujeto, respecto a un valor de referencia derivado de muestras de sujetos sanos, del nivel de sAPP $\beta$  15 derivado de APP695, no ligado a las lectinas Con A o PHA, es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer; y en el que un aumento en un sujeto, respecto a un valor de referencia derivado de muestras de sujetos sanos, del nivel de sAPP $\beta$  derivado de la combinación de las variantes APP-KPI, APP751 y APP770, no ligado a las lectinas Con A o PHA, es indicativo de un diagnóstico positivo de 20 enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto.

Información sobre la secuencia del APP humano y sobre las variantes de procesamiento proteolítico de APP, junto con información sobre aminoácidos con glicosilación potencial, es accesible en la base de datos de proteínas UniProtKB (Nº de acceso 25 P05067). Según dicho registro del APP humano en la base de datos de proteínas UniProtKB, los siguientes aminoácidos de APP pueden tener glicosilación potencial (numeración para la variante mayoritaria APP695):

N-glicosilación: aminoácidos 542, 571  
30 O-glicosilación: aminoácidos 633, 651, 652, 659, 663, 667, 681.

Los aminoácidos 1-17 del APP corresponden al péptido señal. El fragmento sAPP $\beta$  corresponde a los aminoácidos 18-671 del APP. El fragmento sAPP $\alpha$  corresponde a los aminoácidos 18-687. Esta información está también accesible en la base de datos de 35 proteínas UniProtKB (Nº de acceso P05067).

La presente invención también proporciona los biomarcadores sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  para uso en un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el que se determina el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra biológica.

5

En una realización de los biomarcadores para uso de la invención, dicho biomarcador es sAPP $\alpha$ .

10 En una realización de los biomarcadores para uso de la invención, la muestra biológica está seleccionada del grupo que consiste en: líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, saliva, células y tejidos.

En una realización de los biomarcadores para uso de la invención, la muestra biológica ha sido obtenida de un sujeto.

15

La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende reactivos para determinar el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra biológica.

20 En una realización del kit de la invención, dichos reactivos comprenden la lectina Con A y/o PHA.

En una realización, el kit de la invención además comprende anticuerpos específicos frente a sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ .

25

En una realización, el kit de la invención además comprende al menos una disolución tampón.

30 Ejemplos de tampones son: tampón fosfato, tampón fosfato salino, tampón acetato, tampón borato-cloruro, tampón carbonato, tampón glicina y tampón Tris.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Aumento de la expresión de APP en tejido cerebral de EA. Expresión relativa de ARNm de APP analizada por qRT-PCR en tejido de corteza frontal de sujetos control (C) (n = 7) y sujetos con EA (etapa V-VI en la escala Braak y Braak, n = 7). Los valores

se calcularon a partir de curvas estándar relativas, se normalizaron al ARNm de la subunidad ribosomal 18S a partir del mismo ADNc. Se obtuvo un valor  $p < 0,001$  respecto a C.

- 5 **Figura 2.** Representación esquemática y caracterización bioquímica de fragmentos NTF y CTF de APP. **(A)** Representación esquemática de los fragmentos proteolíticos sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , CTF $\alpha$  y CTF $\beta$  generados por la  $\alpha$ -secretasa (vía no amiloidogénica) y la  $\beta$ -secretasa (vía amiloidogénica) (no dibujado a escala). Se indica la localización del dominio KPI presente en las variantes APP751 y APP770, pero no en APP695. También
- 10 se muestran los epítopes para los anticuerpos utilizados en este estudio. **(B)** Para evaluar la identidad de las especies sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  de mayor masa molecular derivadas de las variantes de KPI, dos extractos cerebrales se procesaron en paralelo y se probaron por separado mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes con el anticuerpo indicado para identificar las bandas inmunoreactivas al anticuerpo anti-sAPP $\alpha$  (generado en ratón), al anticuerpo anti-sAPP $\beta$  (generado en conejo) y al anti-KPI (generado en conejo). Se señala mediante una flecha la banda coincidente con todos los anticuerpos y mediante asterisco la banda no coincidente. Se indican las posiciones correspondientes a una masa molecular de 100 y 130 kDa. **(C)** Se representan bajo el número 2 los resultados con extractos de corteza frontal, analizados
- 15 con el anticuerpo anti-sAPP $\alpha$  y el anticuerpo anti-sAPP $\beta$ , tras tratamiento de deglicosilación mediante incubación con N- y O-glicosidasas específicas, combinadas con Sialidasa A en condiciones desnaturalizantes. Se representan bajo el número 1 los resultados del control (tampón sin las glicosidasas). El Western blot se resolvió incubando simultáneamente con los anticuerpos sAPP $\alpha$  (ratón) y sAPP $\beta$  (conejo) y
- 20 anticuerpos secundarios fluorescentes. La fluorescencia de los anticuerpos secundarios (IRDye 800CW cabra anti-conejo y IRDye 680RD cabra anti-ratón) se detectó con un aparato Odyssey CLx para fluorescencia simultánea (en el panel marcado con el término “Unión” se muestran las bandas que co-localizan). Se indican las posiciones correspondientes a una masa molecular de 100 y 130 kDa. **(D)** Para caracterizar CTF $\alpha$
- 25 y CTF $\beta$ , se analizaron células CHO-PS70 tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, DAPT, o el vehículo solo (DMSO; control: Ctrl) en paralelo para controlar los extractos cerebrales (corteza frontal humana: Cx). Las inmunotransferencias de extractos de CHO-PS70 se detectaron simultáneamente con dos anticuerpos diferentes: el anticuerpo C-terminal generado en conejo y que reconoce un dominio común a CTF $\alpha$  y
- 30 CTF $\beta$ ; y el anticuerpo generado en rata 2D8 y que reconoce el dominio N-terminal de
- 35 CTF $\beta$ .

A $\beta$  que, por lo tanto, solo detecta CTF $\beta$  (se indica mediante flecha la banda que se acumula tras tratamiento con DAPT). Se indican las posiciones correspondientes a una masa molecular de 6,5, 10 y 14 kDa.

5 **Figura 3.** Las variantes sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  permanecen inalteradas en tejido cerebral de EA. (A) Western blot de muestras de corteza frontal humana de sujetos control (n=7) y sujetos con EA (n=7) detectados con anticuerpos contra sAPP $\alpha$ . (B) Cuantificación densitométrica de las bandas de Western blot de sujetos control (n=7) y sujetos con EA (n = 7) detectados con anticuerpos contra sAPP $\alpha$ , de las variantes APP-695 y APP-KPI, 10 con cantidades equivalentes de proteína cargadas en cada carril y utilizando vinculina como control de carga. Los cálculos se realizaron por duplicado. (C) Western blot de muestras de corteza frontal humana de sujetos control (n=7) y sujetos con EA (n=7) detectados con anticuerpos contra sAPP $\beta$ . (D) Cuantificaciones densitométricas de las bandas de Western blot de sujetos control (n=7) y sujetos con EA (n = 7) detectados con 15 anticuerpos contra sAPP $\beta$ , de las variantes APP-695 y APP-KPI, con cantidades equivalentes de proteína cargadas en cada carril y utilizando vinculina como control de carga. Los cálculos se realizaron por duplicado. (E) Gráfico de la relación obtenida dividiendo los valores para las especies sAPP (sAPP $\alpha$  o sAPP $\beta$ ) derivadas de la variante APP-KPI por los derivados de APP695 para cada muestra. Ninguna de las 20 comparaciones resultó en diferencias estadísticamente significativas entre las muestras EA y C.

**Figura 4.** CTF $\alpha$  y CTF $\beta$  permanecen inalterados en tejido cerebral de EA. (A) Western blot de tejido de la corteza frontal humana de sujetos control (n = 7) y EA (n = 7), 25 detectado con un anticuerpo C-terminal (de la APP de longitud completa). (B) Cuantificación densitométrica de las especies CTF $\beta$  (B) y CTF $\alpha$  (C), utilizando GAPDH como control de carga para asegurar que se cargaron cantidades equivalentes de proteína en cada carril. Los cálculos se realizaron por duplicado. (D) Gráfico de la relación obtenida para cada muestra dividiendo la inmunorreactividad de CTF $\beta$  por la 30 de CTF $\alpha$ . No hubo diferencias estadísticamente significativas evidentes.

**Figura 5.** Comparación de la glicosilación APP695 y APP-KPI en tejido cerebral de sujetos control y con EA. Representación gráfica del porcentaje del fragmento sAPP $\alpha$  derivado de las variantes APP695 o APP-KPI de los tejidos cerebrales de 7 sujetos control (C) y 7 sujetos con EA que no se unieron a las lectinas inmovilizadas de PHA 35

(A) o Con A (B). Representación gráfica del porcentaje del fragmento sAPP $\beta$  derivado de las variantes APP695 o APP-KPI de los tejidos cerebrales de 7 sujetos control (C) y 7 sujetos con EA que no se unieron a las lectinas inmovilizadas de PHA (C) o Con A (D). Los valores de p están indicados en la figura (ns, no significativo).

5

**Figura 6.** Comparación de la glicosilación de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  en tejido cerebral de

sujetos control y sujetos con EA. Representación gráfica del porcentaje del fragmento sAPP $\alpha$  derivado de las variantes APP695 o APP-KPI de los tejidos cerebrales de 7 sujetos control (C) y 7 sujetos con EA que no se unieron a las lectinas inmovilizadas de

10 PHA (A) o Con A (B). Representación gráfica del porcentaje del fragmento sAPP $\beta$  derivado de las variantes APP695 o APP-KPI de los tejidos cerebrales de 7 sujetos control (C) y 7 sujetos con EA que no se unieron a las lectinas inmovilizadas de PHA (C) o Con A (D). Los valores p están indicados en la figura.

15 **Figura 7.** Comparación de la glicosilación cerebral de sAPP entre sujetos control y sujetos con EA. Representación gráfica del porcentaje del fragmento sAPP $\alpha$  derivado de APP695 (A) y APP-KPI (B) en los tejidos cerebrales de 7 sujetos control (C) y 7 sujetos con EA que no se unieron a las lectinas inmovilizadas de PHA y Con A. Representación gráfica del porcentaje del fragmento sAPP $\beta$  derivado de APP695 (C) y 20 APP-KPI (D) en los tejidos cerebrales de 7 sujetos control (C) y 7 sujetos con EA que no se unieron a las lectinas inmovilizadas de PHA y Con A. Los valores p están indicados en la figura (n.s., no significativo).

## DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

### 25 **Materiales y métodos**

#### *Muestras biológicas*

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante, España), y se llevó a cabo en conformidad con la declaración de Helsinki. Las muestras se recibieron anonimizadas e identificadas sólo en base al código

30 del banco de tejidos.

Las muestras congeladas de corteza cerebral de 7 pacientes con la EA (3 hombres y 4 mujeres, con un rango de edad  $81 \pm 12$  años) y 7 pacientes sanos como controles (3 hombres y 4 mujeres, con un rango de edad de  $65 \pm 15$  años), fueron obtenidas del 35 banco de tejidos neurológicos de la Fundación CIEN-Unidad de Investigación Proyecto

Alzheimer (UIPA; Madrid), y del banco de tejidos de la Región de Murcia, ambos coordinados por el neuropatólogo Dr. Alberto Rábano (Fundación CIEN-UIPA).

Todos los pacientes con la EA cumplían criterios clínicos para probable EA (NINCDS-ADRDA). Los pacientes con la EA se correspondían a casos esporádicos que fueron seleccionados en base a su historial clínico y diagnóstico neuropatológico basado en los criterios de diagnóstico CERAD, del inglés *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*. Los casos fueron categorizados como estadios V-VI durante el análisis neuropatológico siguiendo la escala de Braak y Braak (Braak y Braak, 1991). El intervalo postmortem medio del tejido fue entre 1,5 y 6 horas, sin diferencias significativas en ambos grupos. Los sujetos control resultaron negativos en su análisis histopatológico, y no tenían antecedentes de síntomas neurológicos o psiquiátricos ni de alteración en la memoria.

15 *Procesamiento de las muestras biológicas*

Las muestras de tejido cerebral recolectadas en los bancos de tejidos se mantuvieron en todo momento a -80°C. Posteriormente, se descongelaron lentamente en hielo y se homogeneizaron en un tampón de extracción (10% p/v) Tris-HCl 50 mM; pH 7,4; NaCl 500 mM; EDTA 5 mM; 1% (p/v) Nonidet P-40; 0,5% (p/v) Triton X-100, complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P834). El homogeneizado se sonicó utilizando un sonicador *Microson ultrasonic cell disruptor Misonix* en 3 series de 10 pulsos. Tras sonicar, las muestras se centrifugaron a 70.000×g a 4°C durante 1 hora. Por último, se recolectó el sobrenadante, se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta el momento de su utilización. La concentración total de proteína de los distintos extractos se determinó utilizando como estándar albúmina de suero bovino (BSA) de acuerdo con el método del ácido bicinconílico (BCA; Pierce).

*Células que sobre-expresan APP*

Las células CHO-PS70 que sobre-expresan de manera estable la APP humana (variante 751) de tipo salvaje y la subunidad catalítica de γ-secretasa, presenilina-1, se cultivaron durante 48 horas en placas de seis pocillos (350000 células/pocillo) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con GlutaMAX™ (Gibco® Life Technologies, Paisley, Reino Unido), 5% de suero fetal bovino (FBS; Gibco) y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se trataron con el inhibidor de γ-secretasa DAPT (5 µM, LY-374973 t-butil éster de (N-[N-(3,5-difluorofenacetilo)-l-alanil]-

S-fenilglicina; Calbiochem®, Merck KGaA). Las células de control se trataron solo con el mismo volumen de dimetilsulfóxido (DMSO). Después de una exposición de 18 h de las células al inhibidor, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato solución salino (PBS) frío y se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de extracción (descrito más arriba) enfriado con hielo complementado con un cóctel de inhibidores de proteasa (descrito más arriba). Los lisados celulares se sonicaron y centrifugaron durante 1 hora a 70000 × g y 4 °C, y los extractos se congelaron a -80 °C para futuros análisis.

#### *Aislamiento de ARN y análisis qRT-PCR*

10 El ARN total se aisló de las muestras de tejido cerebral usando el reactivo TRIzol y el sistema de purificación de ARN *PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante de dicho kit y se realizó un análisis de moléculas de ARN mensajero (ARNm) por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR). El ADN complementario (ADNc) de primera cadena se obtuvieron por transcripción inversa del ARN total (1,5 µg), utilizando el kit de transcripción inversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems; Life Technologies Paisley, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante de dicho kit. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en el sistema de PCR en tiempo real *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), utilizando los ensayos de expresión génica *TaqMan Gene Expression Assays* (Hs00169098-m1 para APP y Hs03003631-g1 para 18S; Thermo Fisher) y la mezcla maestra de la PCR *TaqMan PCR Master Mix*. Los niveles de transcripción se calcularon mediante el método comparativo  $2^{-\Delta Ct}$  con respecto al ADNc de la subunidad ribosomal 18S.

25

#### *Western blot*

Las muestras de tejido cerebral (30 µg por pocillo) se hirvieron a 95°C durante 5 minutos, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (en inglés, SDS-PAGE) al 7,5% en Tris-Tricina y posteriormente se transfirieron a 30 membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm (Schleicher & Schuell Bioscience, GmbH, Dassel, Germany). Se cuantificó la señal inmunorreactiva de las bandas APP en las transferencias Western (*Western blots*). Las especies de APP en las muestras se detectaron usando: un antisuero policlonal anti-APP C-terminal de conejo (1:1000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.; denominado aquí Sigma-Ct); un anticuerpo monoclonal de rata llamado 2D8 producido contra el dominio N-terminal de Aβ, por lo

que detecta CTF $\beta$  pero no CTF $\alpha$  (1:50) (Willem et al., 2015), un antisuero policlonal de conejo anti-sAPP $\beta$  específico para el C-terminal de sAPP $\beta$  (1:100; IBL, Hamburgo, Alemania; denominado aquí IBL- $\beta$ ); un anticuerpo monoclonal de ratón anti-sAPP $\alpha$  específico para el C-terminal de sAPP $\alpha$  (1:100; IBL; denominado aquí IBL- $\alpha$ ); y un antisuero policlonal de conejo anti-KPI específico para el dominio KPI de APP (1:500; Millipore; denominado aquí como KPI). Vinculina (1:2000, anticuerpo monoclonal de ratón anti-vinculina, sc-73614 Santa Cruz; antisuero de conejo anti-vinculina 1:1000, Sigma V4139) y GAPDH (1:10000 anticuerpo monoclonal de ratón anti-GAPDH; Proteintech 60004-1) se utilizaron como controles de carga. Las intensidades de las bandas se analizaron utilizando el programa informático Image Studio Lite (LI-COR). Los anticuerpos utilizados tenían una reactividad cruzada entre los fragmentos sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  inferior al 1,5%, y ninguno de los anticuerpos reacciona de forma cruzada con la APP de longitud completa. Las transferencias se detectaron utilizando anticuerpos secundarios conjugados apropiados (IRDye 680RD cabra anti-ratón (Número de catálogo 925-68180); IRDye 800CW cabra anti-conejo (Número de catálogo 925-32211); IRDye 680RD cabra anti-conejo (Número de catálogo 925-68071) o IRDye 800CW cabra anti-rata (Número de catálogo 926-32210); todos de LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Alemania) y se analizaron en un sistema de imagen infrarrojo Odyssey Clx (LI-COR).

20

#### *De-glicosilación enzimática*

Las glicoproteínas solubilizadas de cerebro se trataron con un kit de de-glicosilación enzimática de ProZyme (GK80110), de acuerdo con las instrucciones del fabricante de dicho kit, y luego se sometieron a SDS-PAGE y análisis por Western blot. Los extractos de la corteza frontal se desnaturizaron y se de-glicosilaron mediante incubación con N-Glicanasa, O-Glicanasa y Sialidasa A. Este tratamiento elimina todos los glicanos unidos a N y los glicanos simples unidos a O (incluidos los polisialilados) de las glicoproteínas.

30 *Unión a lectinas*

Las muestras de corteza cerebral se incubaron a 4°C durante toda la noche con lectinas específicas de azúcares terminales: la lectina de *Canavalia ensiformis* Concanavalina A (Con A) (Sigma; Número de catálogo C9017), con alta especificidad por residuos de manosa terminales, o la lectina de *Phaseolus vulgaris* PHA (Vector; Número de catálogo AL113), con alta especificidad por residuos de galactosa terminales, inmovilizadas en

sefarosa (Con A) o agarosa (PHA). La fracción de glicoproteína no ligada a las lectinas se separó por centrifugación y se analizó en Western blot utilizando anticuerpos contra sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ . La proporción de APP no unida a lectina se calculó como la relación entre la inmunoreactividad de APP no unida a lectina y la inmunoreactividad total, 5 obtenida de una alícuota mantenida en las mismas condiciones, pero no incubada con una lectina. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

#### *Análisis estadístico*

Todos los datos se analizaron en SigmaStat (Versión 2.0; SPSS Inc.), aplicando una prueba t de Student (de dos colas) o una prueba U de Mann-Whitney para comparaciones individuales, y determinando los valores p exactos (los valores p <0.05 fueron considerados significativos). Los resultados se presentan como las medias  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y la correlación entre las variables se evaluó mediante análisis de regresión lineal.

15

#### **Ejemplo 1. Aumento de la expresión de APP en el cerebro de sujetos con EA**

Se realizaron ensayos de qRT-PCR para determinar la expresión del ARN mensajero (ARNm) de APP en EA, usando cebadores que correspondían a secuencias en los exones 10-11 de APP y que son comunes a las principales variantes cerebrales. Por lo tanto, se determinaron los niveles totales de ARNm de las variantes APP695, APP751 y APP770. En consecuencia, los niveles de transcritos de APP en su conjunto fueron significativamente mayores en el tejido cerebral de sujetos con EA que en el tejido cerebral de sujetos control (C) (p<0,001; Figura 1).

25 **Ejemplo 2. Caracterización de sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , CTF $\alpha$  and CTF $\beta$  en el tejido cerebral de sujetos con EA**

Se caracterizaron el sAPP $\alpha$  o sAPP $\beta$  en Western blot del tejido cerebral de sujetos con EA, un método que permitió discriminar diferentes especies de APP, especialmente aquellas con diferentes masas moleculares. Sin embargo, sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  se distinguen entre sí sólo en 16 aminoácidos (lo que representa 1-2 kDa en masa molecular), y se ha predicho que sAPP $\alpha$  o sAPP $\beta$  son sólo ~5-10 kDa más pequeños que la APP de longitud completa, y por lo tanto, no se distinguen por separación electroforética. Además, pequeñas diferencias en la migración electroforética también pueden atribuirse a diferencias en la glicosilación, o incluso reflejar formas inmaduras de la proteína. En consecuencia, para poder distinguir sAPP $\alpha$  o sAPP $\beta$ , se abordó la discriminación de

estas proteínas por electroforesis SDS-PAGE, utilizando anticuerpos pan-específicos generados contra el dominio exclusivo C-terminal de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ .

Tanto para sAPP $\alpha$  y el sAPP $\beta$ , en el cerebro existen 3 variantes de *splicing* alternativo, 5 la de 695 aminoácidos, APP695, mayoritariamente expresada en neuronas, y las variantes APP751 y APP770, expresadas en células gliales, que presentan el dominio inhibidor de serín proteasa tipo Kunitz KPI (del inglés *Kunitz-type serine protease inhibitor*). Los NTF de APP sAPP $\alpha$  y el sAPP $\beta$  se distinguen electroforéticamente y por Western blot con anticuerpos pan-específicos contra el extremo C-terminal exclusivo de 10 sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ . En las muestras de tejido cerebral, las diferentes especies de APP y sus fragmentos N-terminales largos se detectaron en varias bandas que migraron en el rango 100-130 kDa. Las diferencias en la masa molecular reflejan variantes alternativas de la especie predominante neuronal, la especie denominada APP695, y las isoformas APP751 y APP770, ambas portadoras del dominio KPI y prácticamente indistinguibles 15 entre ellas por tamaño. Todas las variantes sufren el mismo procesamiento por secretasas y generan los mismos tipos de fragmentos, incluidos el sAPP $\alpha$  y el sAPP $\beta$ . La Figura 2A muestra una representación esquemática de la longitud completa de APP y de los fragmentos N- y C-terminales determinados en este ejemplo, así como los epítopos reconocidos por los diferentes anticuerpos utilizados. Las especies de APP- 20 NTF de cerebro se caracterizaron en Western blot, utilizando anticuerpos pan-específicos contra los dominios C-terminales específicos de sAPP $\alpha$  o sAPP $\beta$  (Figura 2B). Cuando se utilizó un anticuerpo anti-KPI, solo las especies de mayor masa molecular mostraron tamaños compatibles con las bandas inmunorreactivas de KPI. 25 Dado que las variantes sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  derivadas del APP695 (no KPI) tampoco mostraron co-localización, se exploró si esas diferencias en masa molecular eran atribuibles a glicosilación (si la extensión de la glicosilación entre los distintos NTF variaba). Para ello, se de-glicosiló APP de manera completa, observando que, tras de-glicosilación, todas las bandas identificadas con anticuerpos sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  sí co- 30 localizaban (Fig. 2C).

El CTF $\alpha$  y el CTF $\beta$  no difieren entre las variantes de APP y se caracterizaron usando extractos de células CHO-PS70 que sobre-expresan de manera estable la APP humana de tipo salvaje y la subunidad catalítica de  $\gamma$ -secretasa, presenilina-1.

- Los extractos de estas células tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, DAPT, se ensayaron con el anticuerpo C-terminal, proporcionando evidencia de la acumulación de CTF $\alpha$  (también llamado C83 por su longitud de aminoácidos) y CTF $\beta$  (también llamado C99 por su longitud de aminoácidos) en los extractos celulares, y de bandas coincidentes en homogeneizados cerebrales cargados en paralelo (Figura 2D). Cuando se ensayó con el anticuerpo 2D8 de rata generado contra el dominio N-terminal de A $\beta$ , CTF $\alpha$  y CTF $\beta$  podían discriminarse ya que el epítopo reconocido por este anticuerpo está ausente en CTF $\alpha$  (ver esquema en la Figura 2A).
- Después de esta caracterización bioquímica, se evaluaron las diferentes isoformas de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  en extractos de tejido cerebral. No se detectaron diferencias entre las muestras C y EA en los niveles relativos de sAPP $\alpha$  (Figura 3A y 3B) o sAPP $\beta$  (Figura 3C y 3D) derivados de APP695 o APP-KPI. A pesar de las grandes diferencias en las proporciones APP695/APP-KPI para las especies sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ , no había diferencias evidentes en estas proporciones entre las muestras de C y EA (Figura 3E). La acumulación de bandas inmunorreactivas sAPP $\alpha$ -695 y sAPP $\alpha$ -KPI se correlacionó tanto en extractos de tejido C ( $r=0.76$ ;  $p=0.048$ ) como EA ( $r=0.96$ ;  $p<0.001$ ), aunque esta correlación no fue significativa para las especies sAPP $\beta$  (C:  $r=0.19$ ;  $p=0.69$ ; EA:  $r=0.57$ ;  $p=0.17$ ). No hubo correlaciones significativas entre sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  en las isoformas APP695 o APP-KPI en sujetos con C o EA.

Para evaluar si los niveles de APP-CTF se alteraron en extractos cerebrales de pacientes con EA, se utilizó un anticuerpo generado contra el dominio C-terminal original de la APP de longitud completa. La inmunoreactividad para CTF $\alpha$  y CTF $\beta$  en el tejido cerebral (Figura 4A, Figura 4B y Figura 4C) fue similar entre los sujetos con C y EA. Además, la relación CTF $\beta$ /CTF $\alpha$  no indicó diferencias entre los grupos EA y C (Figura 4D).

### Ejemplo 3. Unión de sAPP $\alpha$ and sAPP $\beta$ a lectinas

- Para comparar el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ , se incubaron muestras de extractos de corteza frontal de sujetos C ( $n=7$ ) y sujetos con la EA ( $n=7$ ) con la lectina Con A, que tiene alta especificidad por residuos de manosa terminales, y la lectina PHA, que tiene alta especificidad por residuos de galactosa terminales, inmovilizadas en sefarosa (Con A) o agarosa (PHA). Se utilizaron anticuerpos pan-específicos para

determinar qué porcentaje de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  no era reconocido por cada una de las lectinas (Tabla 1).

Tabla 1

Muestra	Especie APP	%APP no ligado a la lectina			
		sAPP $\alpha$		sAPP $\beta$	
Con A	PHA	Con A	PHA		
Control	APP695	12,2±1,7 [7,3-20,6]	6,6±0,8 [4,3-9,4]	2,9±0,8 [0,3-7,1]	2,6±0,8 [0,2-6,8]
	APP-KPI	13,7±2,1 [9,2-24,6]	5,7±0,8 [2,8-8,1]	40,4±4,6 [20,2-58,3]	37,0±3,2 [22,6-51,0]
EA	APP695	7,0±1,5 [2,4-12,9]	4,0±0,6 [1,8-6,8]	1,2±0,5 [0,1-3,7]	1,9±0,3 [1,0-3,1]
	APP-KPI	7,7±1,3 [4,0-12,4]	3,8±0,6 [2,3-5,4]	57,1±8,5 [37,6-89,0]	56,7±9,7 [27,4-95,3]

5

Los fragmentos sAPP $\beta$  derivados tanto de APP695 como de APP-KPI mostraron diferencias en su interacción con ambas lectinas, tanto en el grupo control como en el de pacientes con la EA (Figuras 5A-5D). Esto puede deberse al origen celular diferente para las isoformas derivadas de la especie APP695 (neuronal) y las APP-KPI (mayormente glial), y a que cada tipo celular tiene una maquinaria de glicosilación particular. Sin embargo, los distintos fragmentos sAPP $\alpha$  exhibieron un patrón similar de unión a Con A o PHA en ambos grupos. Lo que resultó más interesante fue constatar que el patrón de unión a lectinas variaba al comparar sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ , tanto para las especies derivadas de APP695, como para las derivadas de APP-KPI, y en ambos grupos, control y con la EA (Figuras 6A-6D). Este resultado, junto con las evidencias de una extensión diferente en glicosilación entre sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  derivada de la misma variante (Figura 2C), sugiere que diferentes glicoformas de APP se procesan preferencialmente por la vía no amiloidogénica ( $\alpha$ -secretasa) o por la amiloidogénica ( $\beta$ -secretasa). Además, esta determinación se da tanto en neuronas (APP695) como en células gliales (APP-KPI).

Para estudiar si la glicosilación de APP difiere en extractos cerebrales de sujetos con la EA en comparación con los sujetos control, se confrontó el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$  (Figuras 7A-7D). Se determinaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con la EA en cuanto a la interacción del sAPP $\alpha$  derivado de la APP695 con Con A y PHA; y también con Con A para el sAPP $\alpha$  derivado de las especies APP-KPI. Existían diferencias en la proporción de sAPP $\beta$  que no se unió ni a Con A ni

a PHA en muestras de pacientes con la EA en comparación con controles en la especie APP695 y en las especies APP-KPI, aunque dichas diferencias no eran estadísticamente significativas con número de sujetos del presente ejemplo y con la precisión alcanzada en el presente ejemplo. No obstante, no es descartable que se puedan detectar diferencias con mayor significación estadística utilizando técnicas más precisas o un mayor número de pacientes. Los resultados de este ejemplo indicaron que la glicosilación de APP en el cerebro con la EA está alterada y afecta principalmente a las glicoformas procesadas por la vía no amiloidogénica.

## 10 LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Braak y Braak. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239-259. doi:10.1007/BF00308809
- Cuchillo-Ibañez et al. (2015). Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid. *Mol Neurodegener*, 10(2). doi:10.1186/1750-1326-10-2
- Halim et al. (2011). Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(29), 11848-11853. doi:10.1073/pnas.1102664108
- Lopez-Font et al. (2017). Alterations in the Balance of Amyloid- $\beta$  Protein Precursor Species in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients. *J Alzheimers Dis*, 57(4), 1281-1291. doi:10.3233/JAD-161275
- Perneczky et al. (2014). Soluble amyloid precursor proteins and secretases as Alzheimer's disease biomarkers. *Trends Mol Med*, 20(1), 8-15. doi:10.1016/j.molmed.2013.10.001
- Willem et al. (2015).  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526(7573), 443-447. doi:10.1038/nature14864

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende:
  - (a) determinar, en una muestra biológica de dicho sujeto, el patrón de glicosilación de los biomarcadores sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ ,
  - (b) comparar dicho patrón de glicosilación de los biomarcadores sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  con un patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  de referencia, en el que una diferencia en dicha comparación es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho biomarcador es sAPP $\alpha$ .
- 10 3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la muestra biológica está seleccionada del grupo que consiste en: líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, saliva, células y tejidos.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se determina dicho patrón de glicosilación por una técnica seleccionada del grupo que consiste en: ELISA, espectrometría de masas, tomografía por emisión de positrones (PET), resonancia magnética nuclear (RMN), radioinmunoensayos, ensayos de unión a lectinas, inmunohistoquímica, Western blot y citometría de flujo.
- 20 5. El método según la reivindicación 4, en el que se determina dicho patrón de glicosilación por ensayos de unión a lectinas.
6. El método según la reivindicación 5, en el que dichas lectinas son Concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Con A) y/o PHA de *Phaseolus vulgaris*.
7. El método según la reivindicación 5 ó 6, en el que, en dichos ensayos de unión a lectinas, se detecta la cantidad o concentración de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  discriminando entre ligados o no ligados a lectinas.
- 25 8. El método según la reivindicación 7, en el que la detección de la cantidad o concentración de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  se lleva a cabo por ELISA o Western blot.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  derivan de cualquiera de las variantes del precursor de la proteína amiloide (APP).
- 30 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichas variantes del APP se seleccionan del grupo que consiste en: APP695, APP751 y APP770.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que una disminución en un sujeto, respecto a un valor de referencia derivado de muestras de sujetos sanos, de los niveles de sAPP $\alpha$  derivado de APP695 y derivado de la combinación

- de las variantes APP-KPI, APP751 y APP770, no ligado a las lectinas Con A o PHA, es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto; en el que una disminución en un sujeto, respecto a un valor de referencia derivado de muestras de sujetos sanos, del nivel de sAPP $\beta$  derivado de APP695, no ligado a las lectinas Con A o PHA, es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer; y en el que un aumento en un sujeto, respecto a un valor de referencia derivado de muestras de sujetos sanos, del nivel de sAPP $\beta$  derivado de la combinación de las variantes APP-KPI, APP751 y APP770, no ligado a las lectinas Con A o PHA, es indicativo de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto.
- 5
12. Los biomarcadores sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  para uso en un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en el que se determina el patrón de glicosilación de sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra biológica.
13. Los biomarcadores para uso según la reivindicación 12, en el que en el que dicho 15 biomarcador es sAPP $\alpha$ .
14. Un kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende reactivos para determinar el patrón de glicosilación de los biomarcadores sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$  en una muestra biológica, en el que dichos reactivos comprenden la lectina Con A y/o PHA y anticuerpos específicos frente a sAPP $\alpha$  y/o sAPP $\beta$ .
- 20
15. El kit según la reivindicación 14, en el que dicho biomarcador es sAPP $\alpha$ .
16. El kit según la reivindicación 14 ó 15, en el que dichos anticuerpos específicos son el anticuerpo policlonal IBL- $\alpha$ , específico frente a sAPP $\alpha$  y el anticuerpo monoclonal IBL- $\beta$ , específico frente a sAPP $\beta$ .
17. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que además comprende al 25 menos una disolución tampón.

**FIGURA 1**

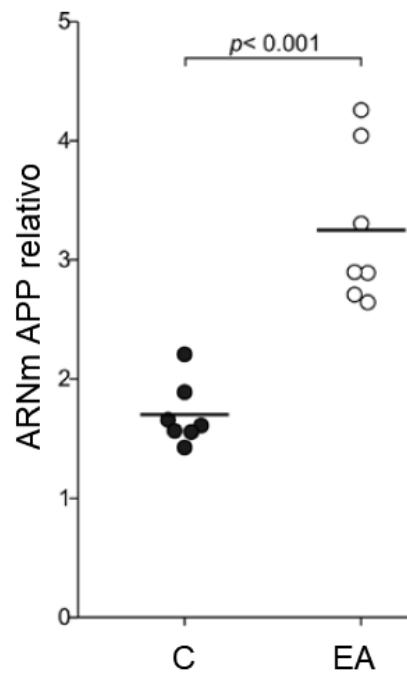


FIGURA 2

A

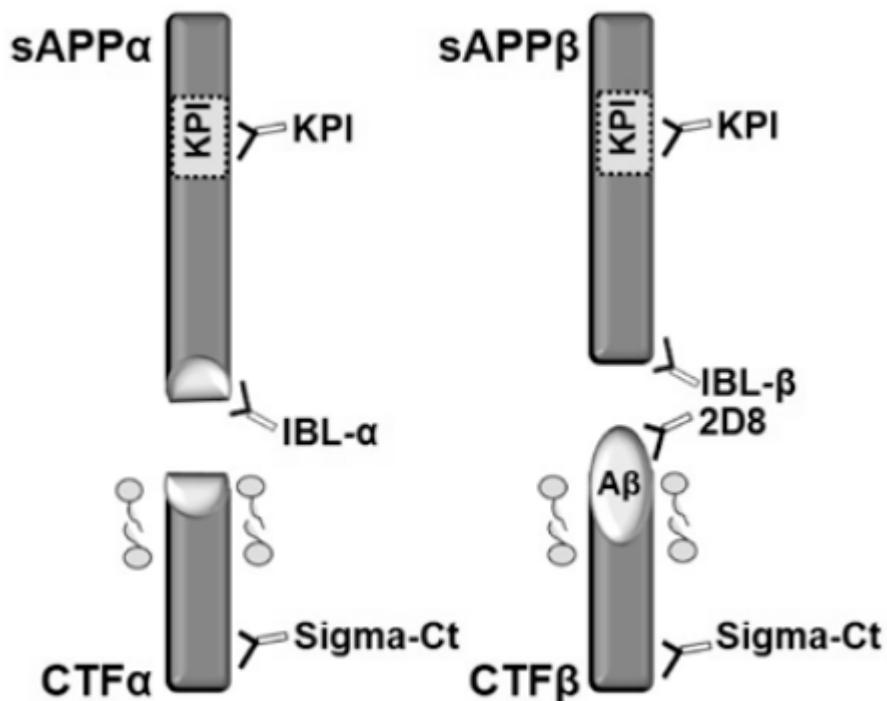
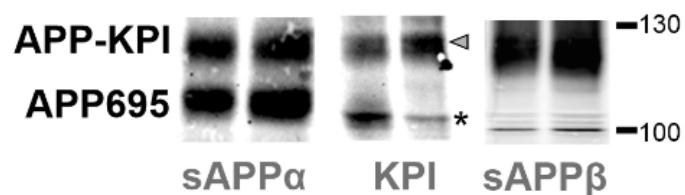
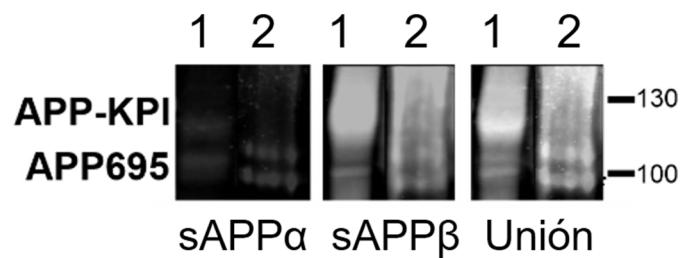


FIGURA 2 (Cont.)

B



C



**FIGURA 2 (Cont.)**

**D**

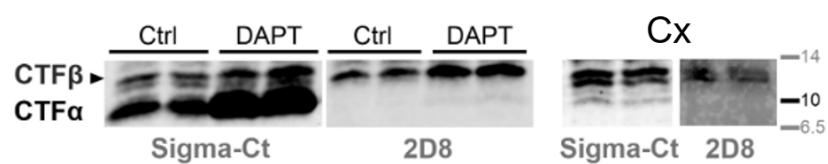
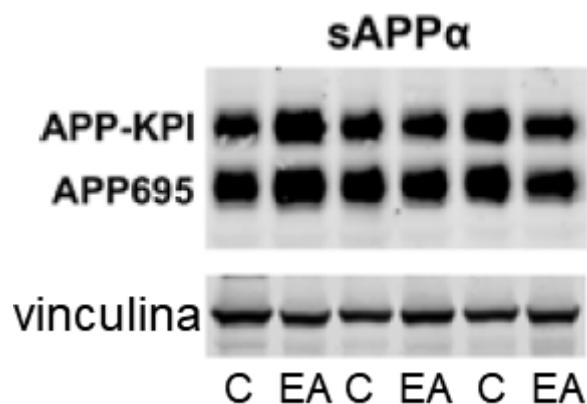


FIGURA 3

A



B

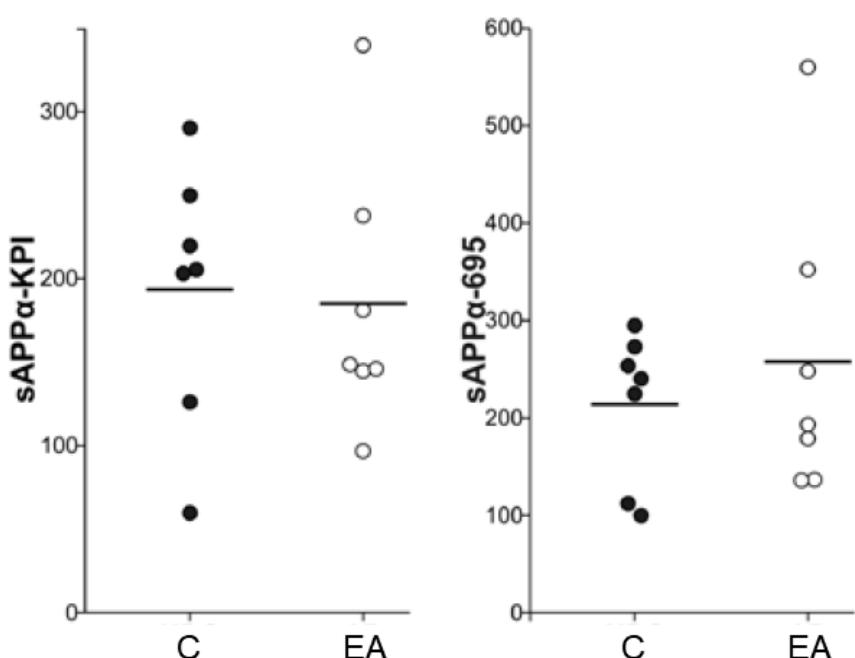
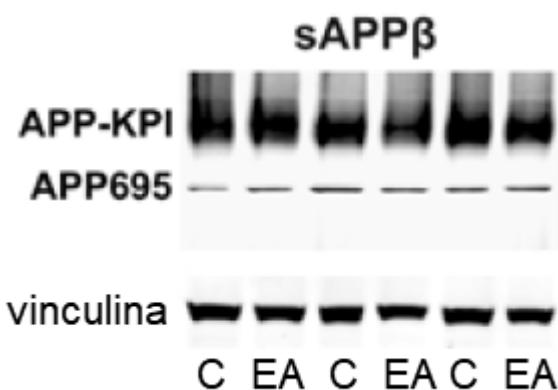


FIGURA 3 (Cont.)

C



D

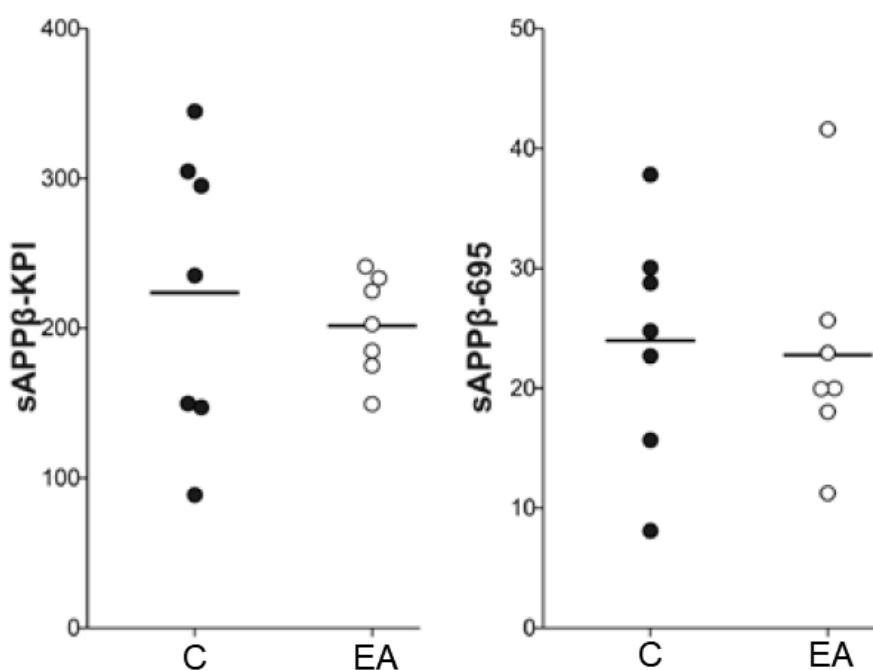


FIGURA 3 (Cont.)

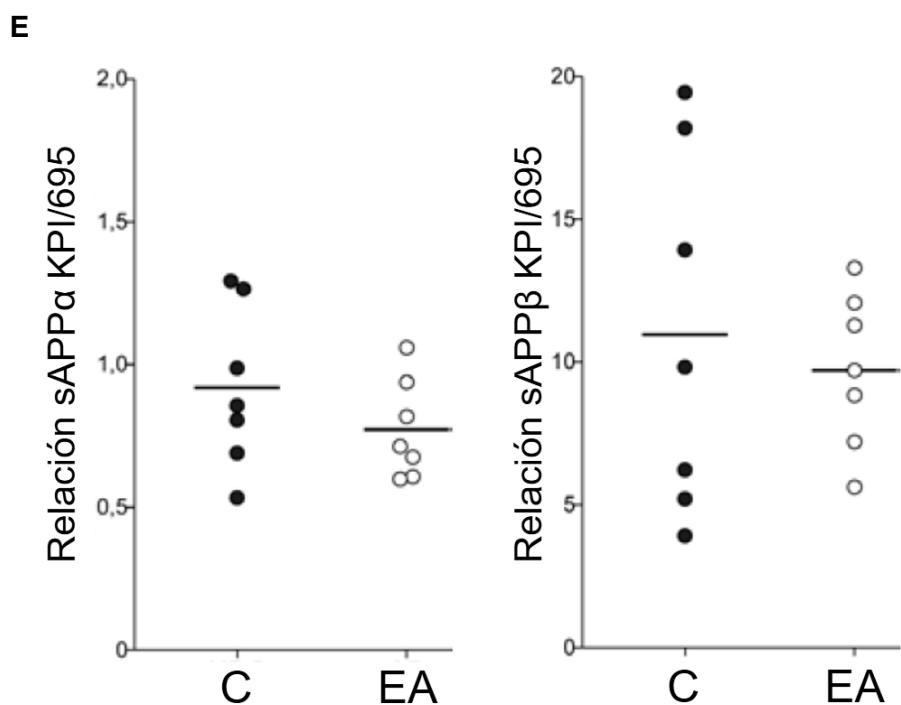


FIGURA 4

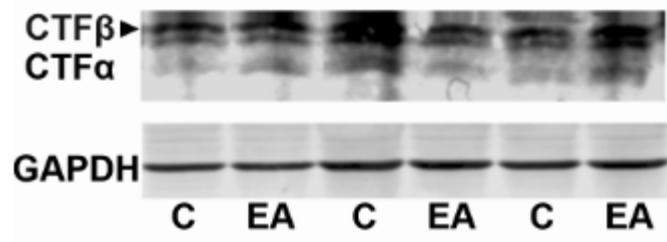
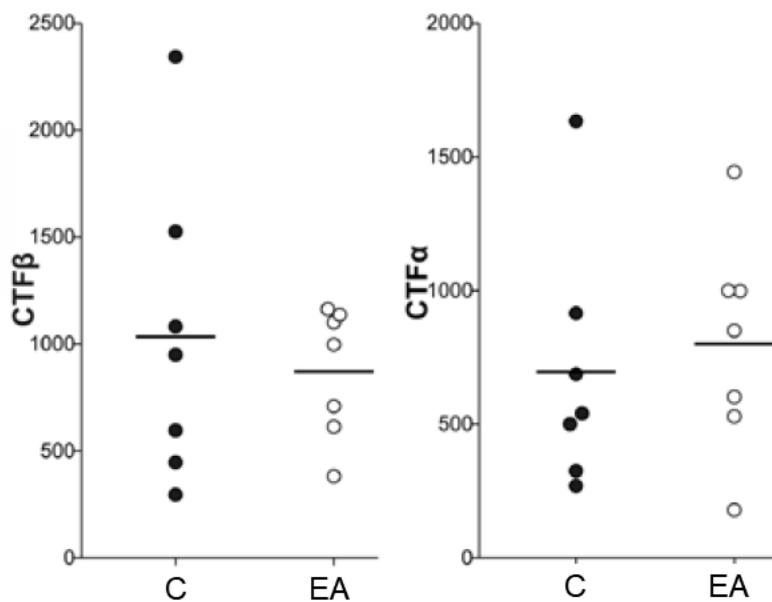
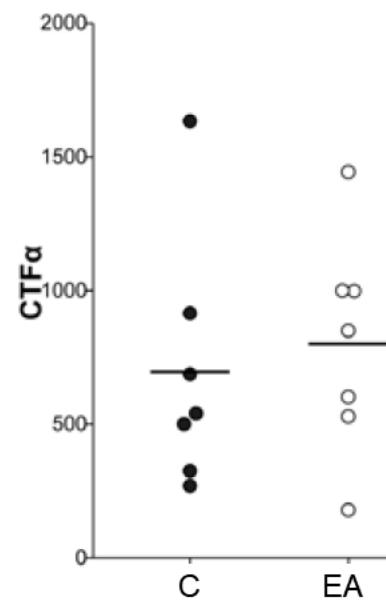
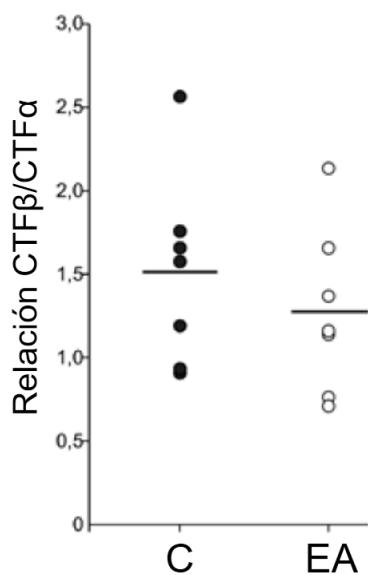
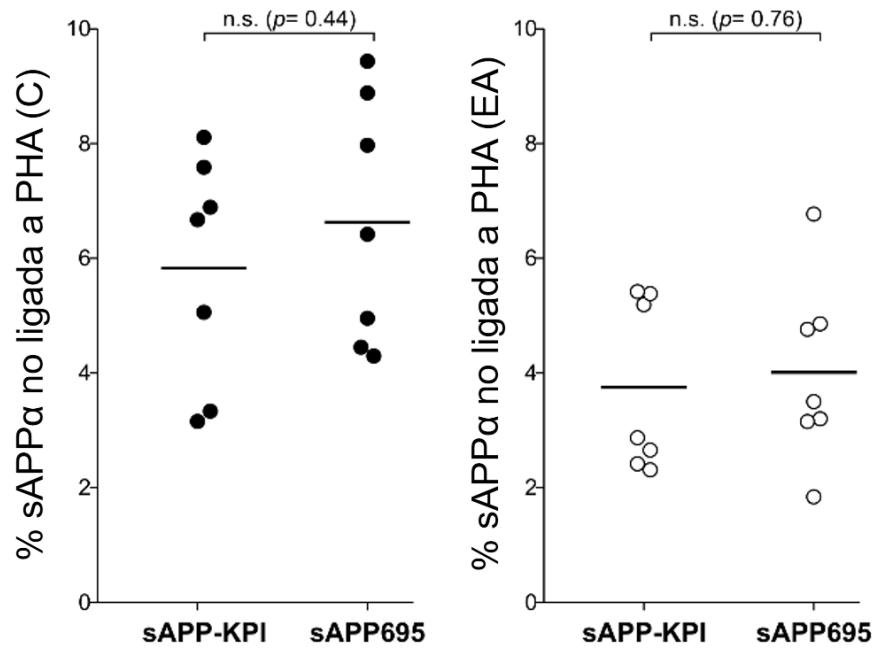
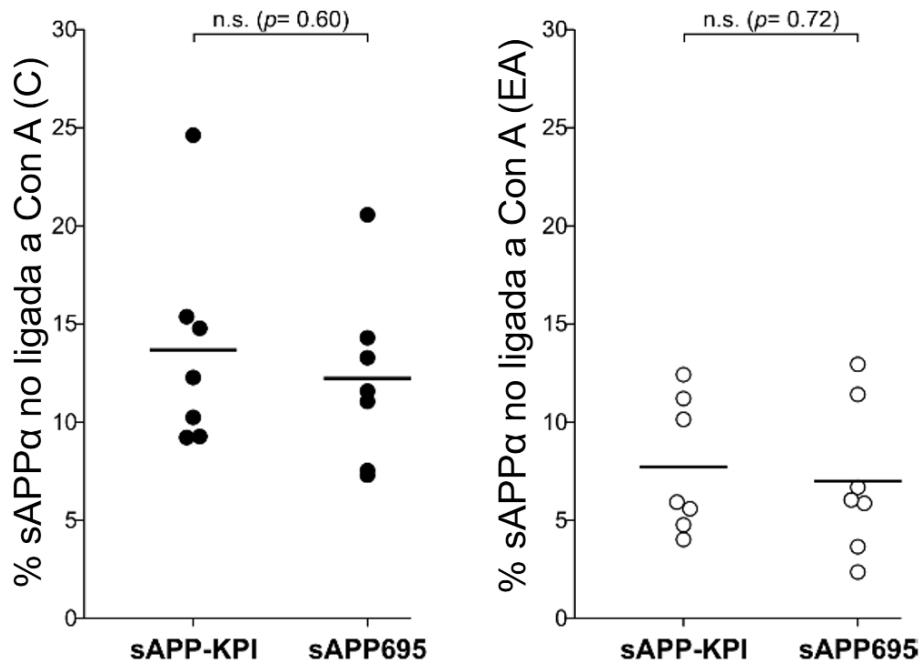
**A****B****C****D**

FIGURA 5

**A****B**

## FIGURA 5 (Cont.)

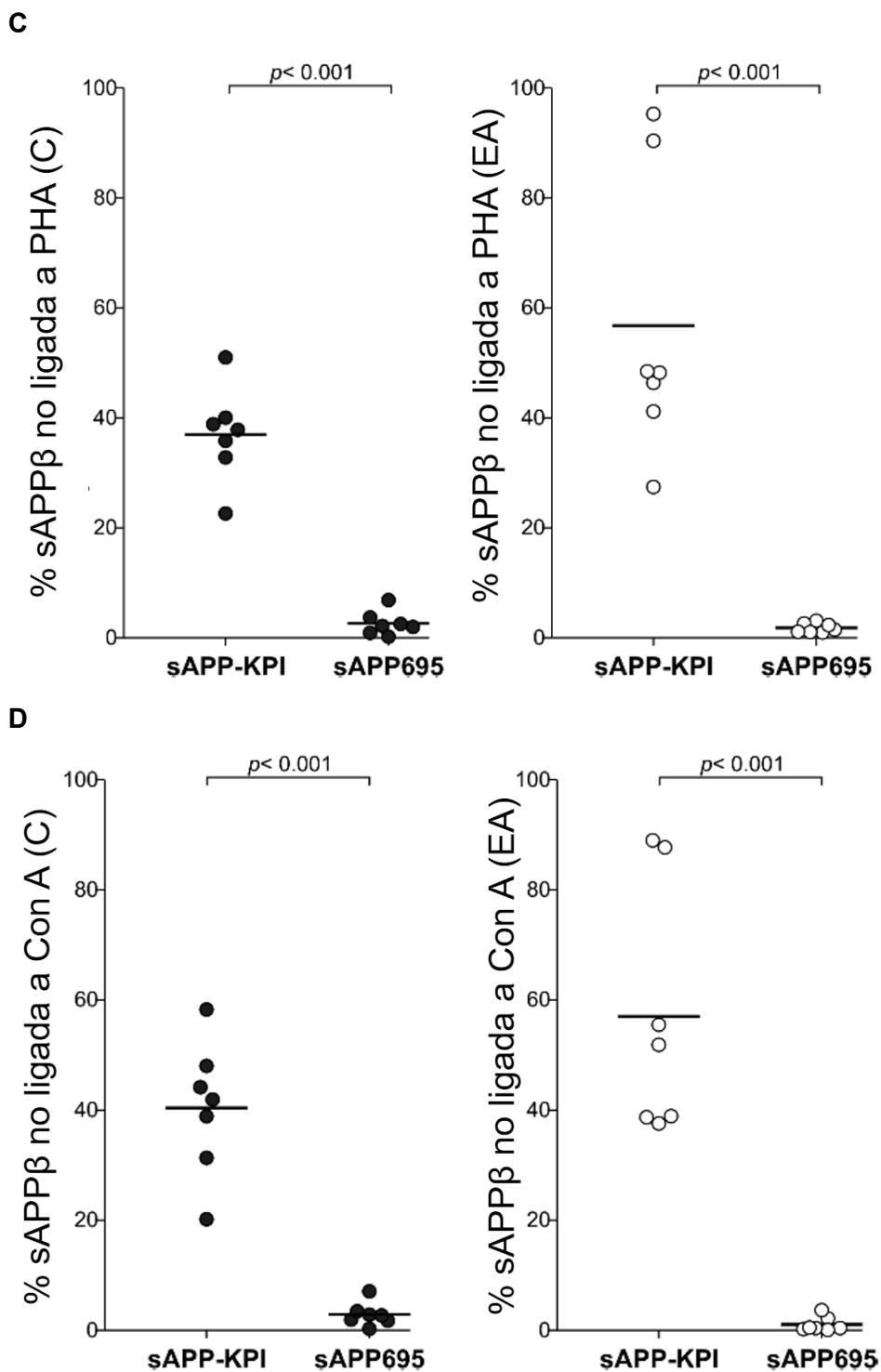


FIGURA 6

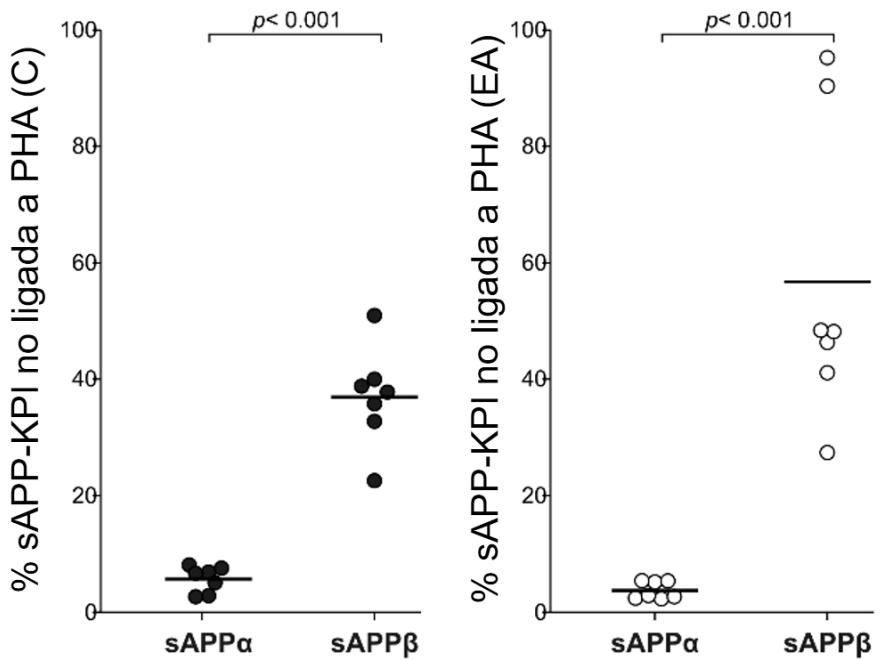
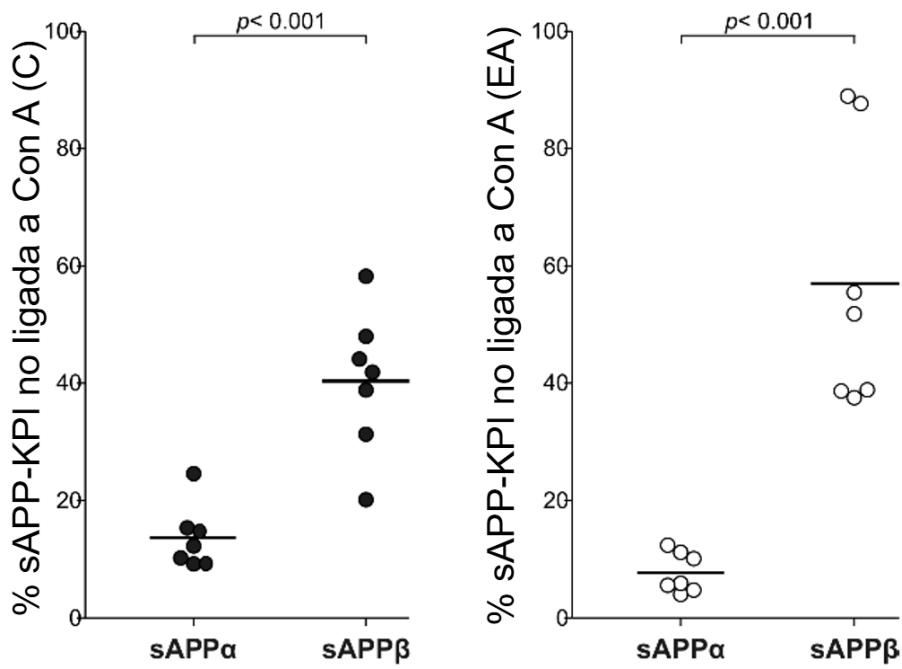
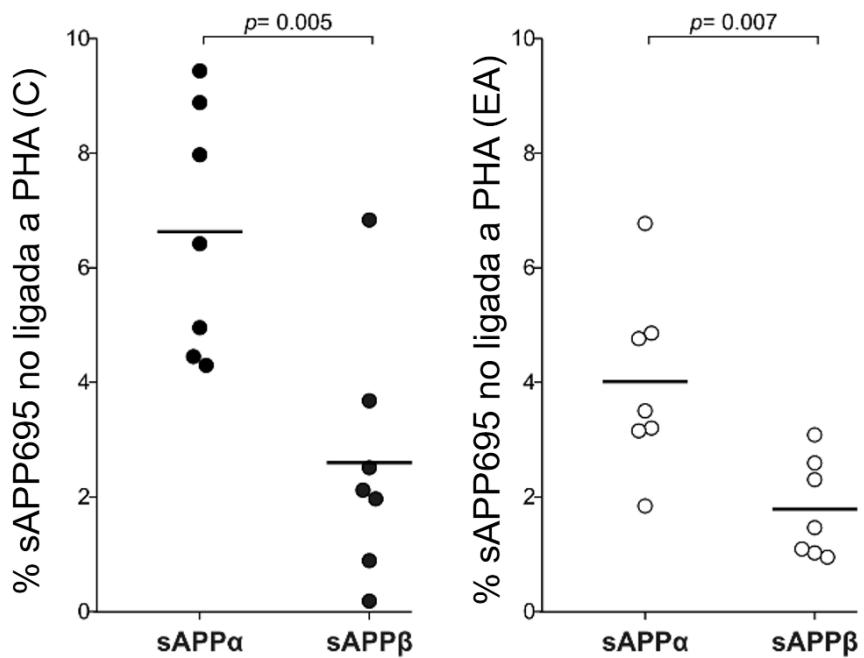
**A****B**

FIGURA 6 (Cont.)

C



D

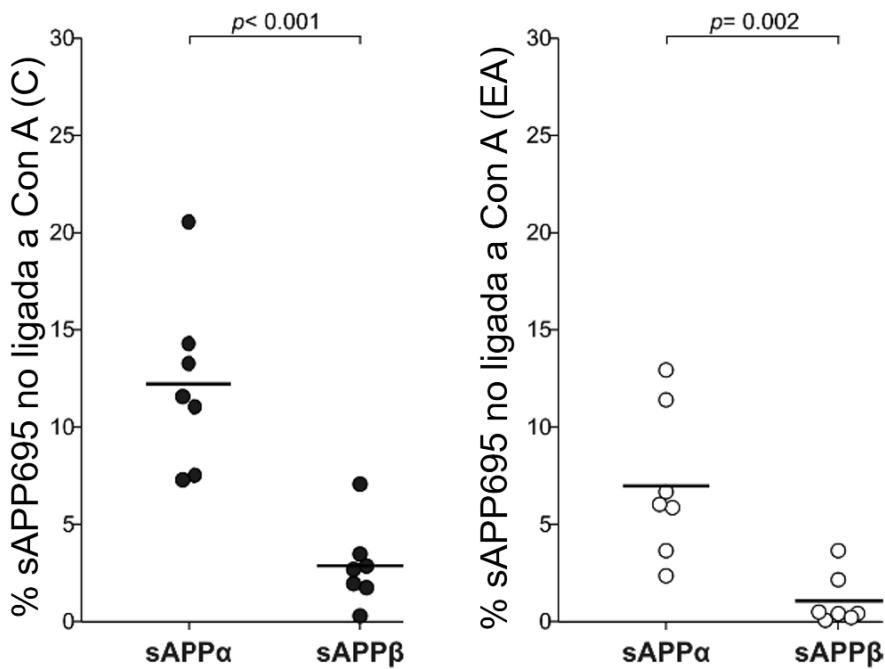


FIGURA 7

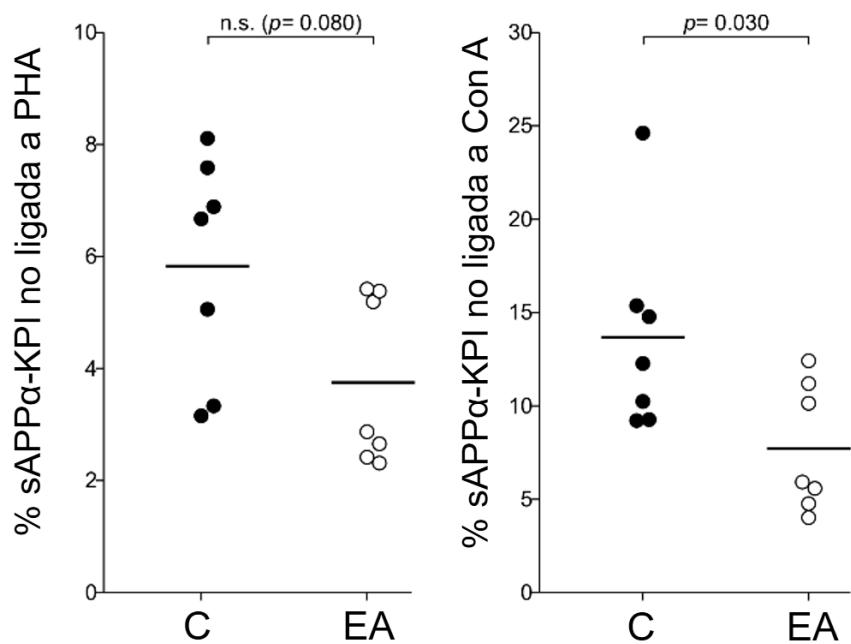
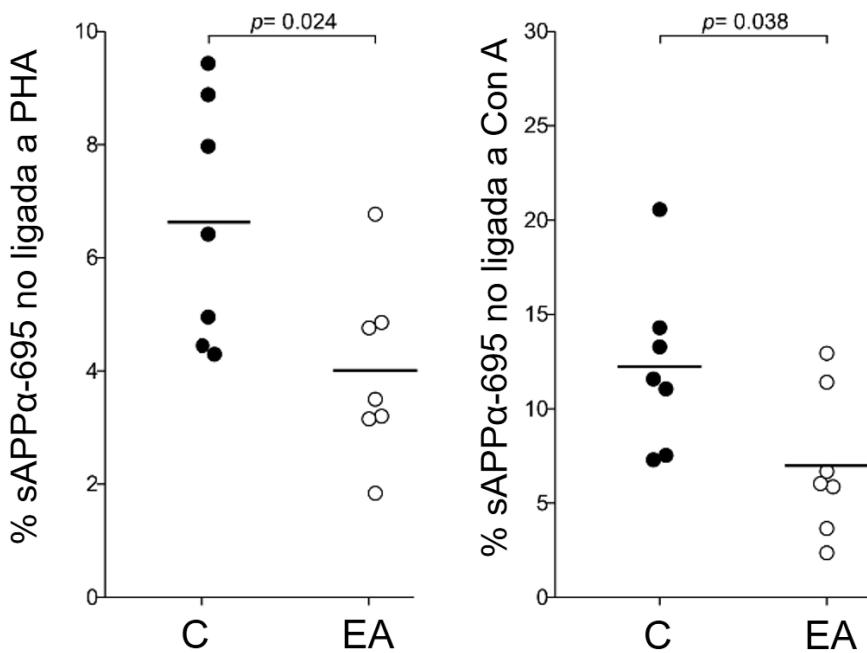
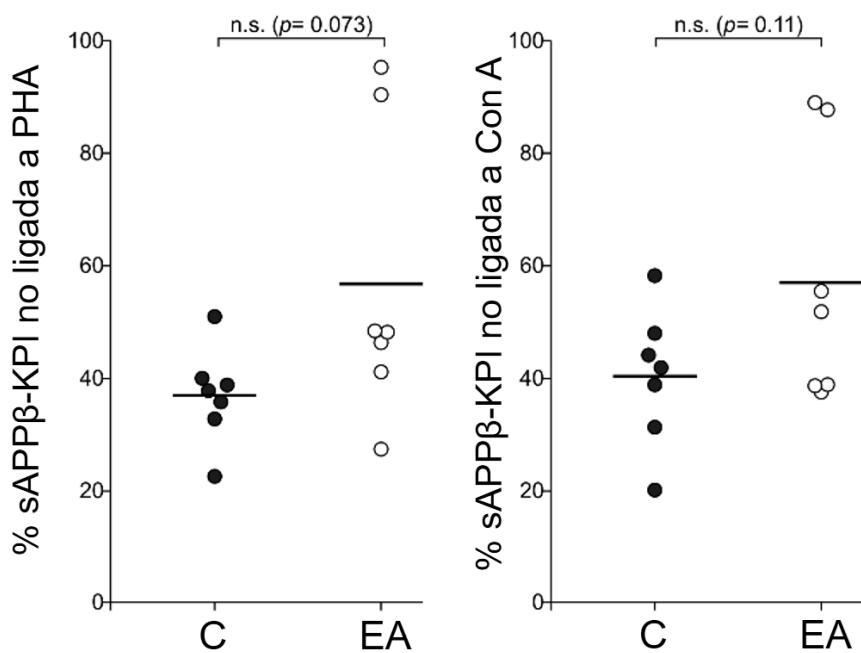
**A****B**

FIGURA 7 (Cont.)

C



D

