



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 951 901**

(21) Número de solicitud: 202230224

51 Int. Cl.:

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

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

17.03.2022

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

25.10.2023

(71) Solicitantes:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
(76.5%)**
**Avda. de la Universidad s/n
03202 Elche (Alicante) ES;**
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (8.5%) y**
**CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED (15.0%)**

(72) Inventor/es:

SÁEZ VALERO, Javier;
LENNOL, Matthew P. y
CUCHILLO IBÁÑEZ, Inmaculada

(74) Agente/Representante:

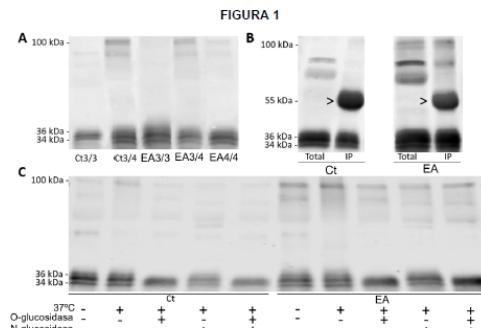
ILLESCAS TABOADA, Manuel

(54) Título: MÉTODO Y KIT DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER BASADO EN LA DETECCIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA E

57 Resumen:

Método y kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer basado en la detección de apolipoproteína E.

Método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende determinar un biomarcador basado en apolipoproteína E (apoE) seleccionado del grupo que consiste en: presencia, cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa; relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa; y presencia de dímeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa. Kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende reactivos para llevar a cabo el método de la invención.



DESCRIPCIÓN

MÉTODO Y KIT DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER BASADO EN LA DETECCIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA E

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 La invención se relaciona con métodos *in vitro* de diagnóstico en humanos en los que se determina un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer y con kits de diagnóstico que comprenden reactivos para la determinación de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema de salud mundial que tiene una carga cada vez más importante para la sociedad a medida que aumenta la esperanza de vida.

Apoliproteína E (apoE) es un componente de las partículas de lipoproteínas en el plasma, así como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el líquido intersticial del parénquima cerebral en el sistema nervioso central (SNC), cumpliendo un papel en el transporte de lípidos, incluido el colesterol, pero además participando de otras diversas funciones más allá de formar parte de lipoproteínas, en parte, interaccionando con receptores de transducción de señales celulares. En el SNC, apoE es secretada mayormente por astrocitos y sus receptores son neuronales y microgliales.

20 El alelo $\epsilon 4$ de apoE ha sido identificado como un factor de riesgo muy importante para la EA. Los seres humanos son la única especie con tres versiones o isoformas del gen *APOE*, alelo $\epsilon 2$ (apoE2), alelo $\epsilon 3$ (apoE3) y alelo $\epsilon 4$ (apoE4); otros mamíferos tienen sólo una versión del gen *APOE*.

25 Las diferencias en la estructura de las isoformas de apoE influyen en su capacidad para unirse a lípidos, pero también a receptores y al efecto desencadenante de la EA, el péptido β -amiloide ($A\beta$). Es posible que estas diferencias en sus interacciones a diversas moléculas se deban a que mientras apoE2 y apoE3 cuentan con un residuo de

30 Cys en la posición 112, formando de este modo heterodímeros y homodímeros unidos por puentes disulfuro, la isoforma apoE4 presenta Arg en esa posición, y consecuentemente no puede formar dímeros unidos por puentes disulfuro.

Portar un alelo ε4 implica un aumento de 2-3 veces en la probabilidad de desarrollar EA y mayor de 8-10 veces si se tienen los dos alelos ε4; mientras que portar el alelo ε2 es protector contra el desarrollo de la EA. Alrededor del 75% de la población son portadores de apoE3, considerado de riesgo neutro. Los portadores de apoE4 suponen alrededor de un 15% de la población y la presencia de apoE2 es relativamente rara, con una incidencia menor al 5% en la población. Por su alta asociación a la EA, en los pacientes con esta enfermedad, el porcentaje de portadores de apoE4 se sitúa en torno al 35-40%.

10

En el estado de la técnica se han descrito métodos para la determinación del tipo de variante apoE, así como métodos para sub-agrupar los enfermos de EA por genotipos *APOE* para estimar otros biomarcadores.

15 Sin embargo, en el estado de la técnica no se han descrito métodos o kits de diagnóstico de la EA basados en alteraciones de la proteína apoE (por ejemplo, formas aberrantes o anómalas de apoE) asociadas al desarrollo de la EA.

20 A pesar de los avances en el diagnóstico de la EA, existe la necesidad de desarrollar métodos y kits de diagnóstico de la EA basados en nuevos biomarcadores.

DESCRIPCIÓN 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 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.

A efectos de la presente invención, el término “comparar” se refiere a contrastar la determinación del biomarcador basado en apoE en la muestra que se va a analizar, frente a la determinación del biomarcador, en muestras de sujetos de referencia adecuados, tal como se especifica más adelante en la presente descripción. La 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. 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.

15

A efectos de la presente invención, “sujetos de referencia” son sujetos sanos, para los cuales se sabe que no padecen la enfermedad de Alzheimer. La determinación del biomarcador basado en apoE puede determinarse, mediante los métodos de la presente invención, a partir de una muestra de sujetos de referencia para analizarse, simultánea o posteriormente, con la muestra de prueba. Se puede usar un valor de corte como un valor de referencia asociado al biomarcador en sujetos de referencia.

A efectos de la presente invención, el término “indicativa” se refiere a que:

- (a) la presencia, o una mayor cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en la muestra biológica que se va a analizar, respecto a los sujetos de referencia; o
- (b) una mayor relación dímeros/monómeros de apoE detectados mediante un ensayo de electroforesis nativa, en la muestra biológica que se va a analizar, respecto a los sujetos de referencia; o
- (c) la presencia de dímeros de apoE detectados mediante un ensayo de electroforesis nativa, en la muestra biológica que se va a analizar; permite diagnosticar si un sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer.

A efectos de la presente invención, “lectina” se refiere a proteínas que se unen de forma específica a azúcares.

A efectos de la presente invención, “electroforesis nativa” se refiere a un ensayo de electroforesis en un gel nativo, también denominado gel no desnaturalizante. En dicha técnica se analizan proteínas en su estado plegado y, por lo tanto, la movilidad 5 electroforética depende no solo de la relación carga-masa, sino también de la forma y el tamaño de la proteína.

A efectos de la presente invención, “Western blot”, también denominado “inmunoblot” o “electrotransferencia”, se refiere a una técnica analítica usada en biología celular y 10 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 secundarios apropiados.

15 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 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 20 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 cambios de color medidos por espectrofotometría.

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

La presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, proporciona una 30 solución a dicho problema técnico.

La presente invención proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto, que comprende:

(a) determinar un biomarcador basado en apolipoproteína E (apoE) 35 seleccionado del grupo que consiste en:

- (i) presencia, cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa;
- (ii) relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en sujetos con un genotipo APOE3/4; y
- 5 (iii) presencia de dímeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en sujetos con un genotipo APOE4/4; y
- (b) comparar el resultado de la determinación de la etapa (a) con un resultado obtenido en sujetos de referencia, en el que cualquiera de las siguientes condiciones es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de
- 10 Alzheimer en dicho sujeto:
- (i) la presencia, o una mayor cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en dicha muestra biológica, respecto a los sujetos de referencia;
- (ii) una mayor relación dímeros/monómeros de apoE detectados mediante un ensayo de electroforesis nativa, en dicha muestra biológica, respecto a los sujetos de referencia;
- 15 (iii) la presencia de dímeros de apoE detectados mediante un ensayo de electroforesis nativa, en dicha muestra biológica.
- 20 El biomarcador de la etapa (a)(i) del método de la invención está basado en que apoE de 34 kDa es una especie aberrante de apoE que forma parte de agregados de mayor tamaño, de 100 kDa y en que dicha especie aberrante está asociada al desarrollo de la EA.
- 25 El biomarcador de la etapa (a)(ii) del método de la invención está basado en que la relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, está asociada al desarrollo de la EA en sujetos con un genotipo APOE3/4.
- 30 El biomarcador de la etapa (a)(iii) del método de la invención está basado en que los dímeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa es una especie aberrante de apoE asociada al desarrollo de la EA en sujetos con un genotipo APOE4/4.

En una realización preferente del método de la invención, en la etapa (a) se detecta apoE con un tamaño de 34 kDa con una lectina específica frente a apoE con un tamaño

de 34 kDa. ApoE es una proteína glicosilada y puede detectarse con una lectina específica (la lectina reconoce los azúcares presentes en apoE).

Dicha lectina específica incluye, sin limitación, a:

- 5 (a) lectina específica frente a ácido siálico incluyendo, sin limitación: lectina de *Sambucus nigra* (SNA), lectina de *Maackia amurensis* (MAL), lectina de *Maackia amurensis* (MAA), lectina de *Limax flavus*, lectina de *Allomyrina dichotoma* y lectina I1 siálico;
- 10 (b) lectina específica frente a ácido siálico y N-acetil- β -D-glucosamina incluyendo, sin limitación, a la aglutinina de germen de trigo (WGA) de *Triticum vulgaris*;
- 15 (c) lectina específica frente a manosa incluyendo, sin limitación, a: lectina de *Lens culinaris* (LCA) y concanavalina A (Con A);
- 20 (d) lectina específica frente a N-acetilgalactosamina incluyendo, sin limitación, a: lectina de *Griffonia simplicifolia* (GSL); lectina de *Helix aspersa* (HAA), lectina de *Helix pomatia* (HPA), lectina de *Vicia villosa* (VV), aglutinina de soja (SBA) y lectina de *Sophora japonica* (SJL); y
- 25 (e) lectina específica frente a oligosacáridos incluyendo, sin limitación, a la lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA).
- En otra realización preferente del método de la invención, en la etapa (a) se detecta la presencia de apoE4 en el agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en una muestra biológica de un sujeto con un genotipo APOE3/4 o APOE4/4, siendo la presencia de apoE4 en el agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto.
- La gran mayoría de los sujetos con el genotipo APOE4/4 padece EA. No obstante, no se puede administrar a dichos sujetos un tratamiento frente a la EA antes de la aparición de síntomas clínicos. Es deseable tener un diagnóstico temprano antes de la aparición de los síntomas clínicos para así comenzar a tratar la enfermedad lo antes posible. La realización preferente del párrafo anterior proporciona un método de diagnóstico para los sujetos con el genotipo APOE4/4 que posibilita el diagnóstico temprano de la EA antes de la aparición de los síntomas clínicos, permitiendo así el inicio de un tratamiento de la enfermedad antes de que los síntomas clínicos aparezcan.

En una realización más preferente del método de la invención, se detecta apoE4 con un anticuerpo específico frente a apoE4. Existen varios anticuerpos comerciales específicos frente a apoE4, incluyendo, sin limitación, a: anticuerpo NBP1-49529 (Novus Biologicals), anticuerpo EPR24181-64 (Abcam), anticuerpo MABN43 (Sigma-Aldrich), y otros. En una realización aún más preferente del método de la invención, dicho anticuerpo específico frente a apoE4 es el anticuerpo NBP1-49529, anticuerpo EPR24181-64 y anticuerpo MABN43.

En otra realización preferente del método de la invención, en la etapa (a) se detecta apoE con un anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE. Existen numerosos anticuerpos comerciales específicos frente a todas las isoformas de apoE, incluyendo, sin limitación, a: anticuerpo AB178479 (Merck Millipore), anticuerpo AB947 (Merck Millipore) y otros. Preferentemente, dicho anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE es el anticuerpo AB178479 o el anticuerpo AB947.

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

En otra realización preferente del método de la invención, en la determinación del biomarcador de la etapa (a)(i), se utiliza una técnica seleccionada del grupo que consiste en: electroforesis en gel en condiciones reductoras, electroforesis en gel en condiciones no reductoras, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electroforesis nativa, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa, Western blot, ensayos de unión a lectinas y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Preferentemente, la electroforesis en gel en condiciones reductoras comprende utilizar el agente reductor β-mercaptoetanol o ditiotreitol.

En otra realización preferente del método de la invención, en la determinación del biomarcador de la etapa (a)(ii) o (a)(iii), dicho ensayo es un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa.

La presente invención también proporciona un kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende reactivos para:

- (a) la detección y/o cuantificación de la cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en una muestra biológica obtenida de un sujeto; o
- 5 (b) determinar la relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en una muestra biológica obtenida de un sujeto; o
- (c) detectar la presencia de agregados de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en una muestra biológica obtenida de un sujeto.
- 10 En una realización preferente, el kit de la invención comprende una lectina específica frente a apoE con un tamaño de 34 kDa.

En otra realización preferente, el kit de la invención además comprende un anticuerpo específico frente a apoE4. Existen varios anticuerpos comerciales específicos frente a apoE4, incluyendo, sin limitación, a: anticuerpo NBP1-49529 (Novus Biologicals), anticuerpo EPR24181-64 (Abcam), anticuerpo MABN43 (Sigma-Aldrich), y otros. Preferentemente, dicho anticuerpo específico frente a apoE4 es el anticuerpo NBP1-49529, anticuerpo EPR24181-64 y anticuerpo MABN43.

- 20 En otra realización preferente, el kit de la invención además comprende al menos un anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE. Existen numerosos anticuerpos comerciales específicos frente a todas las isoformas de apoE, incluyendo, sin limitación, a: anticuerpo AB178479 (Merck Millipore), anticuerpo AB947 (Merck Millipore) y otros. Preferentemente, dicho anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE es el anticuerpo AB178479 o el anticuerpo AB947.

25 En otra realización preferente, el kit de la invención además comprende el agente reductor β-mercaptopetanol o ditioltreitol.

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

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 excluir otras características técnicas. El término “comprende”, “que comprende” y sus

variantes, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, incluye, 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”,

- 5 “la” incluyen referencias a las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados a

lo largo de la descripción y reivindicaciones, tienen el mismo significado que el

- 10 comúnmente entendido por un experto en el campo de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Caracterización de la proteína apoE en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de controles o de pacientes con EA. (A) Las muestras de LCR de controles (representados con la etiqueta “Ct”) y casos de EA con diferentes genotipos APOE

- 15 ($\epsilon 3/\epsilon 3$: 3/3; $\epsilon 3/\epsilon 4$: 3/4; $\epsilon 4/\epsilon 4$: 4/4) se inmunotransfirieron con el anticuerpo apoE AB178479. (B) Las muestras de LCR se inmunoprecipitaron con el anticuerpo apoE AB178479 y las proteínas inmunoprecipitadas se inmunotransfirieron con el anticuerpo apoE AB947 (se representan con la etiqueta “IP”): >: indica una banda no específica. (C): Las muestras de LCR se inmunotransfirieron con el anticuerpo apoE AB178479 después
- 20 de desglicosilación ligada a O, ligada a N o la combinación de ambas. Se incluyeron muestras calentadas a 37°C en ausencia de enzimas desglicosilantes como control del proceso de desglicosilación.

Figura 2. Caracterización de especies de apoE en LCR mediante electroforesis en gel

- 25 de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa. Muestras de LCR de controles (representados con la etiqueta “Ct”) y casos de EA con diferentes genotipos APOE $\epsilon 3/\epsilon 4$ (3/4) se sometieron a inmunotransferencia después de SDS-PAGE no reductora (NR) o reductora (R) con (A) anticuerpo apoE AB178479 o (B) anticuerpo específico de apoE4 NBP1-49529. (C) Transferencia representativa de muestras de LCR ($\epsilon 3/\epsilon 3$: 3/3; $\epsilon 3/\epsilon 4$: 3/4; $\epsilon 4/\epsilon 4$: 4/4) resueltas mediante PAGE nativa con el anticuerpo AB178479, que revela monómeros apoE (~35 kDa) y dímeros (~70 kDa). Las muestras de proteína apoE recombinante (representadas con la etiqueta “Rec”) y una muestra de control de LCR desnaturalizada por ebullición a 95 °C durante 5 min (representada con la etiqueta “LCR desn.”) sirvieron

para identificar la posición de las bandas de apoE monoméricas y diméricas. (D) Cuantificación del cociente dímeros/monómeros de apoE en los diferentes genotipos de APOE. La figura muestra las medias ± error estándar y los valores de p.

- 5 Figura 3. Análisis de especies de apoE en LCR de la cohorte de Gotemburgo. Muestras
de LCR de controles (representadas con la etiqueta "Ct") y casos de EA con diferentes
genotipos de APOE ($\epsilon 3/\epsilon 3$: 3/3; $\epsilon 3/\epsilon 4$: 3/4; $\epsilon 4/\epsilon 4$: 4/4) se analizaron mediante Western
blot con el anticuerpo AB178479 después de SDS-PAGE. (A) Se muestran
inmunotransferencias representativas. (B) Cuantificación densitométrica de la banda
10 inmunorreactiva de apoE de 34 kDa en casos control y EA. (C) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (B). (D) Cuantificación
densitométrica de apoE de 36 kDa en casos control y EA. (E) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (D). (F) Relación apoE
15 36kDa/34kDa en cada muestra para los casos control y EA. (G) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (F). (H) Cuantificación
densitométrica de la apoE de 36 kDa en casos control y EA. (I) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (H). Cada banda
individual se cuantificó y normalizó al valor de referencia (apoE recombinante). La figura
muestra las medias ± error estándar y los valores de p.

20

- Figura 4. Análisis de especies de apoE en LCR de la cohorte de Barcelona. Muestras
de LCR de controles (representadas con la etiqueta "Ct") y casos de EA con diferentes
genotipos de APOE ($\epsilon 3/\epsilon 3$: 3/3; $\epsilon 3/\epsilon 4$: 3/4; $\epsilon 4/\epsilon 4$: 4/4) se analizaron mediante Western
blot con el anticuerpo AB178479 después de SDS-PAGE. (A) Se muestran
inmunotransferencias representativas. (B) Cuantificación densitométrica de la banda
25 inmunorreactiva apoE de 34 kDa en casos control y EA. (C) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (B). (D) Cuantificación
densitométrica de apoE de 36 kDa en casos control y EA. (E) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (D). (F) Relación apoE
30 36kDa/34kDa en cada muestra para los casos control y EA. (G) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (F). (H) Cuantificación
densitométrica de apoE de 36 kDa en casos control y EA. (I) Representación de
subgrupos por genotipos APOE de los casos representados en (H). Cada banda
individual se cuantificó y normalizó al valor de referencia (apoE recombinante). La figura
35 muestra las medias ± error estándar y los valores de p.

Figura 5. Análisis de dos colecciones distintas de extractos de corteza frontal y corteza temporal de cerebros de controles y de pacientes con EA por Western blot. A la derecha, se representan los resultados de un ensayo de unión a la lectina SNA (lectina de 5 *Sambucus nigra* con especificidad por ácido siálico) ligada a agarosa en muestras de cerebros de sujetos control. Se muestra el total (representado con la etiqueta "Ct Total") y la fracción unida a la lectina (representada con la etiqueta "Ct Unión a SNA").

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Materiales y métodos

10 Pacientes

Se obtuvieron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) lumbar con genotipos APOE conocidos de dos cohortes independientes. Las muestras de LCR de ambas cohortes utilizadas para este estudio fueron alícuotas anonimizadas de análisis clínicos de rutina, siguiendo un procedimiento aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de 15 Gotemburgo y el Hospital Sant Pau, respectivamente. Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Miguel Hernández y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre investigación en humanos. La primera cohorte fue del Laboratorio de Neuroquímica Clínica (Gotemburgo, Suecia) de pacientes que solicitaron consejo clínico sobre síntomas clínicos menores. Esta primera cohorte estaba formada 20 por 45 pacientes con EA (14 hombres y 31 mujeres, edad media 77 ± 1 años; APOE: 15 ε3/ε3, 15 ε3/ε4, 15 ε4/ε4) y 14 controles sin EA (7 hombres y 7 mujeres, edad media (67 ± 3 años); APOE: 9 ε3/ε3, 5 ε3/ε4). La segunda cohorte se obtuvo del Hospital Sant Pau (Barcelona, España). Esta segunda cohorte estaba formada por muestras de 29 pacientes con EA (13 hombres y 16 mujeres, edad media 73 ± 1 años; APOE: 10 ε3/ε3, 25 10 ε3/ε4, 9 ε4/ε4) y 10 controles (7 hombres y 3 mujeres, edad media 69 ± 2 años; APOE: 5 ε3/3, 5 ε3/4).

Los pacientes fueron designados como EA o controles de acuerdo con los niveles de biomarcadores en el LCR usando puntos de corte que son >90% específicos para la EA: 30 Aβ42 < 550 ng/l y tau total (T-tau) > 400 ng/l. Todos los pacientes con EA cumplían los criterios de demencia del NIA-AA (del inglés *National Institute on Aging and Alzheimer's Association*). No hubo más información clínica disponible para los sujetos. Las Tablas 1A-1D muestran información adicional sobre las cohortes.

Tablas 1A-1D. Información de la cohorte de Gotemburgo (Suecia) y la cohorte de Barcelona (España). Las tablas muestran las medias \pm error estándar. *: significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto al grupo control con el mismo genotipo
 5 APOE.

| Tabla 1A | | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Cohorte Gotemburgo (Suecia) | | | |
| Control | | | |
| APOE | $\epsilon 3/3$ | $\epsilon 3/4$ | Todos |
| N | 9 | 5 | 14 |
| Edad (años) | 69 \pm 2 | 62 \pm 5 | 67 \pm 3 |
| Edad (años) | 60-81 | 44-75 | 44-81 |
| Mujeres/Hombres | 5/4 | 2/3 | 7/7 |
| Aβ42 en LCR (pg/mL) | 845 \pm 96 | 746 \pm 121 | 804 \pm 74 |
| Tau en LCR (pg/mL) | 317 \pm 53 | 303 \pm 34 | 312 \pm 35 |

| Tabla 1B | | | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------|
| Cohorte Gotemburgo (Suecia) | | | | |
| EA | | | | |
| APOE | $\epsilon 3/3$ | $\epsilon 3/4$ | $\epsilon 4/4$ | Todos |
| N | 15 | 15 | 15 | 45 |
| Edad (años) | 79 \pm 2 | 78 \pm 1 | 73 \pm 1 | 77 \pm 1* |
| Edad (años) | 62-88 | 69-84 | 63-83 | 62-88 |
| Mujeres/Hombres | 11/4 | 11/4 | 9/6 | 31/14 |
| Aβ42 en LCR (pg/mL) | 470 \pm 13* | 480 \pm 8* | 419 \pm 21 | 457 \pm 10* |
| Tau en LCR (pg/mL) | 816 \pm 88* | 917 \pm 112* | 731 \pm 53 | 840 \pm 52* |

| Tabla 1C | | | |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------|
| Cohorte Barcelona (España) | | | |
| Control | | | |
| APOE | $\epsilon 3/3$ | $\epsilon 3/4$ | Todos |
| N | 5 | 5 | 10 |
| Edad (años) | 71 \pm 2 | 67 \pm 52 | 69 \pm 2 |
| Edad (años) | 66-76 | 60-72 | 60-76 |
| Mujeres/Hombres | 1/4 | 2/3 | 3/7 |
| Aβ42 en LCR (pg/mL) | 1139 \pm 248 | 1010 \pm 116 | 1075 \pm 131 |
| Tau en LCR (pg/mL) | 295 \pm 49 | 261 \pm 23 | 278 \pm 26 |

| Tabla 1D | | | | |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Cohorte Barcelona (España) | | | | |
| EA | | | | |
| APOE | ε3/3 | ε3/4 | ε4/4 | Todos |
| N | 10 | 10 | 9 | 29 |
| Edad (años) | 75±2 | 73±2 | 72±2 | 73±1* |
| Edad (años) | 64-84 | 64-83 | 61-85 | 61-85 |
| Mujeres/Hombres | 7/3 | 2/8 | 7/2 | 16/13 |
| Aβ42 en LCR (pg/mL) | 607±60* | 543±37* | 493±62 | 549±31* |
| Tau en LCR (pg/mL) | 778±94* | 624±62* | 908±81 | 765±50* |

Western blot

Se desnaturizaron muestras de LCR humano (10 µL) a 98°C durante 5 minutos y se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras o no reductoras (determinadas por la presencia o ausencia de β-mercaptoetanol utilizado en el tampón de muestra). Para este estudio se utilizaron geles de poliacrilamida al 12 % (Bio-Rad Laboratories, GmbH, Munich, Alemania, #4561046). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, GmbH, Munich, Alemania). Se detectaron bandas apoE inmunorreactivas utilizando el anticuerpo AB178479 (policlonal de cabra; Merck Millipore) o el anticuerpo AB947 (policlonal de cabra, Merck Millipore), ambos comunes a todas las isoformas de apoE o, alternativamente, mediante un anticuerpo específico para la isoforma apoE4 (reconoce el residuo Arg112 presente exclusivamente en especies apoE4; monoclonal de ratón, Novus Biologicals, NBP1-49529). Seguidamente, las transferencias se detectaron con los anticuerpos secundarios conjugados apropiados (anticuerpos secundarios IRDye, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU.) y se tomaron imágenes en un sistema de imágenes por infrarrojos Odyssey CLx (LI-COR Biosciences). Las intensidades de las bandas se analizaron utilizando el software LI-COR (ImageStudio Lite). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se incluyó apoE3 recombinante (Peprotech, ThermoFisher Scientific, #350-12) en cada transferencia para que sirviera como referencia de carga y para normalizar la señal de inmunorreactividad entre transferencias.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa, las muestras de LCR no se calentaron y se cargaron con el tampón de muestra NuPage LDS (ThermoFisher Scientific, NP007) en geles nativePage 4-16% (ThermoFisher Scientific, BN1002BOX).

Los tampones se prepararon utilizando tampón de carrera de PAGE nativa (ThermoFisher Scientific, BN2001) y aditivo de tampón de cátodo de PAGE nativa (Thermofisher Scientific, BN2002).

Inmunoprecipitación de ApoE

- 5 Se incubaron las muestras de LCR (50 µL) durante la noche con 100 µL de Dynabeads (Merck Millipore) junto con el anticuerpo apoE 178479 (Merck Millipore). Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las perlas y, después, se resuspendieron y se hirvieron a 98° durante 5 minutos en tampón de muestra SDS-PAGE y se analizaron por Western blot con el anticuerpo AB947 (Merck Millipore).

10 **Análisis estadístico**

Todos los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism (Versión 7; software GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de cada variable. Se utilizó ANOVA para variables paramétricas y la prueba de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas en la comparación entre 15 grupos. Se empleó una prueba t de Student para variables paramétricas y una prueba U de Mann-Whitney para variables no paramétricas en la comparación entre dos grupos y en la determinación de los valores de p. Se utilizaron las pruebas de Pearson y Spearman para las correlaciones. Los resultados se presentan como medias ± error estándar.

20 **Ejemplo 1. Caracterización de apoE en LCR humano**

Se examinó la presencia de especies de apoE del LCR de controles y pacientes con EA mediante SDS-PAGE y Western blot en condiciones reductoras (en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol que rompe los enlaces disulfuro) en muestras de una cohorte de Gotemburgo (Suecia), incluidos sujetos con diferente genotipo APOE. En 25 esta cohorte, los biomarcadores de EA se midieron mediante ELISA, lo que confirmó niveles elevados de T-tau en LCR y niveles bajos de Aβ42 en las muestras de pacientes con EA (Tabla 1B).

En todas las muestras de LCR, utilizando el anticuerpo AB178479, apoE aparece como 30 dos bandas inmunorreactivas distintas de ~34 y ~36 kDa (Fig. 1A). La inmunoprecipitación con el anticuerpo AB178479 y la inmunotransferencia con el

anticuerpo apoE alternativo AB947 confirmaron la identidad de ambas especies monoméricas de apoE de 34 y 36 kDa (Fig. 1B). También se observó una banda de apoE de ~100 kDa en las muestras de LCR de pacientes con EA; la inmunoprecipitación también confirmó las especies de 100 kDa como apoE (Fig. 1A, Fig. 1B).

5

Las dos bandas distintas con diferente masa molecular podrían representar diferentes glicoformas de la proteína. Se realizó un ensayo de desglicosilación enzimática para investigar este aspecto. La N-desglicosilación no alteró el patrón de bandas de apoE. Sin embargo, la O-desglicosilación simplificó el patrón de apoE a una sola banda inmunorreactiva, lo que sugiere que la O-glicosilación podría explicar las diferencias en la masa molecular entre las especies apoE de 36 y 34 kDa (Fig. 1C). Las pequeñas diferencias en la movilidad electroforética entre los monómeros apoE glicosilados y desglicosilados probablemente estén relacionadas con la ligera masa de carbohidratos asociada a la O-glicosilación, pero también con cambios en la forma de las proteínas que afectan a su migración, ya que las proteínas glicosiladas normalmente son más globulares dado que sus cadenas de carbohidratos son no lineales, incluso en condiciones reductoras. Los niveles aparentes de la banda de apoE de 100 kDa no se modificaron significativamente después de la desglicosilación enzimática, lo que sugiere que estas especies también son resistentes a la desglicosilación enzimática (Fig. 1C).

10

Más interesante aún, la especie apoE de ~100 kDa se observó casi exclusivamente en muestras de LCR de pacientes con EA, incluidas las muestras con genotipo APOE ε4/ε4 (Fig. 1A). Para caracterizar aún más esta especie de apoE, se realizaron estudios SDS-PAGE en condiciones no reductoras para preservar los enlaces disulfuro. Estudios previos indicaron que ~100 kDa es la masa molecular identificada para los homodímeros apoE del cerebro (Elliott et al., 2010) y el LCR (Rebeck et al., 1998), cuando las muestras se analizan en estado no reducido, a diferencia de los ~70 kDa predichos. La banda de apoE de 100 kDa parecía ser indistinguible de la observada en condiciones reductoras en casos de EA, y también apareció en las muestras de control que probablemente representaban dímeros de enlaces disulfuro (Fig. 2A). Cuando se usó un anticuerpo específico para apoE4, NBP1-49529, los controles con genotipo APOE ε3/ε4 no mostraron ninguna inmunorreactividad, mientras que se detectó inmunorreactividad en sujetos con EA con genotipo APOE ε3/ε4 tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Fig. 2B). Esto corrobora que apoE4 en las muestras de pacientes con EA

participa en complejos para formar especies estables de 100 kDa que no dependen de los enlaces disulfuro, lo que representa agregados de apoE aberrantes/anómalos.

La diferente contribución de la especie apoE 100 kDa en los casos de EA y de control se estableció en primer lugar estimando el equilibrio dímero/monómero de apoE mediante electroforesis PAGE nativa. Se observaron dos bandas de apoE inmunorreactivas que probablemente representan monómeros y dímeros de apoE, respectivamente (Fig. 2C). La comparación del patrón de bandas del análisis de complejos de proteínas anfifílicas con PAGE nativa y SDS-PAGE se complica por las limitaciones al comparar las determinaciones del tamaño molecular con las motilidades de los marcadores de peso molecular hidrofílicos. Para resolver esto, se incluyó la resolución de una muestra de control de LCR desnaturizada por ebullición a 95°C durante 5 min en condiciones totalmente reductoras y analizada por PAGE nativa, así como la proteína recombinante apoE3 en condiciones nativas (Fig. 2C). Estas muestras sirvieron para localizar las bandas apoE monoméricas y diméricas a pesar de la diferencia potencial en la estimación de la masa molecular de los complejos apoE resueltos en condiciones nativas y por SDS-PAGE y Western blot con el anticuerpo AB178479. Inesperadamente, se detectaron dímeros en LCR de casos de EA con genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4, cuya falta de Cys112 debería eliminar su capacidad para formar complejos dependientes de enlaces disulfuro. Debido a la dificultad de encontrar sujetos control con genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 (dada la baja prevalencia del genotipo en la población general sana), no se pudo comparar pacientes de EA con genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4 con casos control con genotipo APOE ϵ 4/ ϵ 4. Se comparó el cociente dímeros/monómeros de apoE (relación dímeros/monómeros) entre las muestras de LCR de control y pacientes con EA, subagrupando las muestras por genotipo APOE (Fig. 2D). En el grupo control el cociente dímeros/monómeros fue significativamente menor en el grupo con genotipo APOE ϵ 3/ ϵ 4 (relación dímeros/monómeros = 0,38) en comparación con el grupo con genotipo ϵ 3/ ϵ 3 (relación dímeros/monómeros = 2,20; p = 0,006), probablemente asociado a la incapacidad de la isoforma apoE4 para formar dímeros unidos por enlaces disulfuro. La misma situación se encontró en el grupo de pacientes con EA, donde la relación dímeros/monómeros disminuyó a medida que el alelo ϵ 4 estaba más presente (ϵ 3/ ϵ 3: relación dímeros/monómeros = 2,27; ϵ 3/ ϵ 4: relación dímeros/monómeros = 1,04; ϵ 4/ ϵ 4: relación dímeros/monómeros = 0,24). Para sujetos con genotipo APOE ϵ 3/ ϵ 3, la relación dímeros/monómeros en los controles no fue significativamente diferente a la encontrada en sujetos con EA; sin embargo, para los

sujetos APOE ϵ 3/ ϵ 4, el cociente fue mayor en el grupo de pacientes con EA respecto a los controles ($p = 0,02$). Esto puede estar reflejando la acumulación en las muestras de pacientes con EA que expresan apoE4 de agregados aberrantes además de los dímeros de enlaces disulfuro fisiológicos presentes solo en los controles.

5 **Ejemplo 2. Niveles de especies de apoE en LCR en pacientes con EA**

Dada la presencia de agregados de apoE, se evaluaron los niveles de las diferentes especies de apoE mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando el anticuerpo AB178479, una técnica que permite la cuantificación de especies de apoE individuales. Por lo tanto, se evaluaron los niveles de las especies de apoE de 34 kDa, 36 kDa y 100 kDa por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Fig. 3A). La banda de apoE de 34 kDa se incrementó significativamente en los pacientes con EA en comparación con los controles ($p = 0,003$; Fig. 3B). Al discriminar por genotipo APOE, solo el genotipo APOE ϵ 3/ ϵ 3 se elevó de forma estadísticamente significativa en pacientes con EA en comparación con las muestras control ($p = 0,02$; Fig. 3C). El mismo análisis dentro del genotipo APOE ϵ 3/ ϵ 4 exhibió menor poder estadístico debido a que el tamaño del grupo control es pequeño, sin embargo, se observó una tendencia de aumento de apoE de 34 kDa en el genotipo de pacientes con EA con genotipo APOE ϵ 3/ ϵ 4 con respecto a los controles ($p = 0,09$; Fig. 3C). ApoE de 36 kDa apareció significativamente aumentada globalmente en pacientes de EA en comparación con los controles ($p = 0,002$; Fig. 3D), pero no cuando se comparan los grupos con el mismo genotipo APOE (Fig. 3E).

A pesar de que estos resultados indican un aumento neto de apoE en LCR en muestras de pacientes con EA, cuando se define un cociente entre las especies monoméricas de apoE (relación 36 kDa/34 kDa) se detecta un desequilibrio en las muestras de pacientes con EA, que mostraron una disminución de la relación 36 kDa/34 kDa en comparación con los controles ($p = 0,007$; Fig. 3F). Estas diferencias se mantuvieron al separar por genotipo APOE (control ϵ 3/ ϵ 3: relación 36 kDa/34 kDa = 1,61 frente a pacientes con EA ϵ 3/ ϵ 3: relación 36 kDa/34 kDa = 1,46, $p = 0,01$; control ϵ 3/ ϵ 4: relación 36 kDa/34 kDa = 1,67 frente a pacientes con EA ϵ 3/ ϵ 4: relación = 1,38, $p = 0,001$; Figura 3G). En el grupo de pacientes con EA también se observaron diferencias significativas entre los genotipos, ya que la relación 36 kDa/34 kDa fue significativamente menor en las muestras APOE ϵ 3/ ϵ 3 ($p < 0,0001$) y ϵ 3/ ϵ 4 ($p < 0,0001$) en comparación con las muestras de pacientes con EA con genotipo ϵ 4/ ϵ 4 (relación 36 kDa/34 kDa = 1,64).

Como se mencionó anteriormente, la inmunorreactividad de la especie apoE de 100 kDa fue bastante débil en las muestras de control y, en consecuencia, se encontraron diferencias considerables entre las muestras de control y los pacientes con EA ($p < 0,0001$; Fig. 3H, Fig. 3I). En el grupo de pacientes con EA, los niveles de especies de apoE de 100 kDa fueron significativamente más bajos en el grupo APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ en comparación con los grupos $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p < 0,0001$) y $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p < 0,0001$). Curiosamente, en muestras de pacientes de EA con genotipo APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ hubo 5 muestras con inmunorreactividad apoE baja de 100 kDa que resultaron ser sujetos más jóvenes (casos de pacientes de EA APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ con los niveles más bajos de 100 kDa: $n = 5$, 68 ± 2 años frente a casos de pacientes de EA APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$ con niveles de 100 kDa similares a los otros casos de EA: $n = 10$, 76 ± 1 años, $p = 0,002$). Dentro de este subgrupo, los pacientes de EA APOE $\epsilon 4/\epsilon 4$, también se observó una correlación estadísticamente significativa entre la edad de los participantes y la inmunorreactividad de la banda de apoE de 100kDa ($R = 0,622$, $p = 0,0133$).

15

Se evaluó si las puntuaciones de los biomarcadores de las muestras de LCR se correlacionaban con los valores de apoE obtenidos. Se encontró que T-tau se correlaciona con los valores de apoE de las especies de 34 kDa ($p < 0,0001$), 36 kDa ($p = 0,0009$) y 100 kDa ($p < 0,0001$), así como con la relación 36 kDa/34 kDa ($p = 0,02$) y la edad media ($p = 0,03$). Se observó que la edad de los sujetos se correlacionaba con la relación 36 kDa/34 kDa ($p = 0,02$) y la especie apoE de 100 kDa ($p = 0,0002$).

Ejemplo 3. Niveles de especies de apoE en LCR en EA en una segunda cohorte

Se contrastaron los datos previos con los datos de una segunda cohorte independiente de muestras de LCR de Barcelona (ver Tablas 1C y 1D, Fig. 4A). Al igual que en la primera cohorte, los niveles de apoE de 34 kDa fueron significativamente más altos en los pacientes de EA respecto a los controles ($p = 0,001$) y, específicamente, solo para aquellos con genotipo APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p = 0,01$) (Fig. 4B, Fig. 4C). En contraste con la primera cohorte, los niveles de apoE de 36 kDa no fueron significativamente diferentes entre las muestras de control y de pacientes de EA o entre los genotipos (Fig. 4D, Fig. 30 4E). La relación 36 kDa/34 kDa fue nuevamente menor en pacientes de EA en comparación con las muestras control ($p < 0,001$, Fig. 4F) y esta diferencia se mantuvo cuando las muestras se separaron por genotipo (pacientes con EA frente a controles para APOE $\epsilon 3/\epsilon 3$, $p = 0,02$ y para APOE $\epsilon 3/\epsilon 4$, $p = 0,03$) (Figura 4G). En esta cohorte no se observaron diferencias significativas entre genotipos en pacientes con EA.

Se observó nuevamente que los niveles de apoE de 100 kDa eran más altos en pacientes con EA que en los controles ($p = 0,005$; Fig. 5H). Cuando las muestras se separaron en subgrupos por genotipo APOE (Fig. 4I), las diferencias significativas entre 5 pacientes con EA y controles se mantuvieron en el grupo $\epsilon3/\epsilon3$ ($p = 0,01$). No se obtuvo un resultado estadísticamente significativo en la comparación entre los pacientes de EA y los controles para APOE $\epsilon3/\epsilon4$ ($p = 0,050$), probablemente debido al pequeño número de controles. Dentro del grupo de pacientes con EA, APOE $\epsilon4/\epsilon4$ una vez más mostró 10 niveles de apoE de 100 kDa significativamente más bajos en comparación con los casos $\epsilon3/\epsilon3$ ($p = 0,02$). Los resultados de esta cohorte corroboran que la apoE de 100 kDa es casi exclusiva de los pacientes de EA y que los sujetos EA APOE $\epsilon4/\epsilon4$ presentan una capacidad reducida para formar estos complejos de 100 kDa.

En esta cohorte, dentro del grupo de pacientes de EA se detectó una correlación 15 significativa entre la edad de los sujetos y la especie de apoE de 100 kDa ($R = 0,6451$, $p = 0,0002$), lo que indica una posible asociación entre la edad de los sujetos y la aparición de estos agregados de esta apoE aberrante. Esta asociación se mantuvo dentro de los grupos de pacientes de EA con genotipo APOE $\epsilon3/\epsilon3$ ($R = 0,8133$, $p = 0,004$) y $\epsilon3/\epsilon4$ ($R = 0,7993$, $p = 0,006$).

20 **Ejemplo 4. Análisis de extractos de cerebro de pacientes de EA por Western blot.**
Ensayo de unión a la lectina SNA

Se analizaron dos colecciones distintas de extractos de corteza frontal y corteza temporal de cerebros de controles y pacientes de EA. Los extractos se solubilizaron en 25 un tampón con inhibidores de proteasas (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% (p/v) Triton X-100, 1% (p/v) Nonidet P-40, 0,5 mM PMSF y una mezcla de inhibidores de proteasas). Se realizó un estudio de SDS-PAGE con el anticuerpo AB178479 y se identificaron los monómeros de 34 y 36 kDa. En los pacientes de EA de estadios tardíos (Braak V-VI), la especie de apoE monomérica de 36 kDa desapareció casi completamente (Fig. 5). Mediante un ensayo de unión a la lectina SNA (lectina de 30 *Sambucus nigra* con especificidad por ácido siálico) ligada a agarosa, se observó la unión de ambas formas monoméricas de apoE en muestras de cerebros de sujetos control a la lectina SNA (Fig. 5; se muestra el total (Ct Total) y la fracción unida a la lectina (Ct Unión a SNA)), confirmando que ambas especies están glicosiladas en mayor o menor medida.

LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Elliott et al. (2010). Apolipoprotein-E forms dimers in human frontal cortex and hippocampus. *BMC Neurosci.*, 11, 23. doi:10.1186/1471-2202-11-23
- 5 Rebeck et al. (1998). Structure and functions of human cerebrospinal fluid lipoproteins from individuals of different APOE genotypes. *Exp Neurol.*, 149(1), 175-82. doi:10.1006/exnr.1997.6710

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, un biomarcador basado en apolipoproteína E (apoE) seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) presencia, cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa;
 - (ii) relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en sujetos con un genotipo APOE3/4; y
 - (iii) presencia de dímeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en sujetos con un genotipo APOE4/4; y
 - (b) comparar el resultado de la determinación de la etapa (a) con un resultado obtenido en sujetos de referencia, en el que cualquiera de las siguientes condiciones es indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto:
 - (i) la presencia, o una mayor cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en dicha muestra biológica, respecto a los sujetos de referencia;
 - (ii) una mayor relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en dicha muestra biológica, respecto a los sujetos de referencia;
 - (iii) la presencia de dímeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en dicha muestra biológica.
- 25 2. El método según la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), se detecta apoE con un tamaño de 34 kDa con una lectina específica frente a apoE con un tamaño de 34 kDa.
- 30 3. El método según la reivindicación 1 ó 2, en el que, en la etapa (a)(i), se determina la presencia de apoE4 en el agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en una muestra biológica de un sujeto con un genotipo APOE3/4 o APOE4/4, siendo la presencia de apoE4 en el agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa indicativa de un diagnóstico positivo de enfermedad de Alzheimer en dicho sujeto.

4. El método según la reivindicación 3, en el que se detecta apoE4 con un anticuerpo específico frente a apoE4.
5. El método según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo específico frente a apoE4 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpo NBP1-49529, anticuerpo EPR24181-64 y anticuerpo MABN43.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, en la etapa (a), se detecta apoE con un anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE.
- 10 7. El método según la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE es el anticuerpo AB178479 o el anticuerpo AB947.
- 15 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra biológica está seleccionada del grupo que consiste en: líquido cefalorraquídeo, orina, sangre, sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, saliva, células y tejidos.
- 20 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que, en la determinación del biomarcador de la etapa (a)(i), se utiliza una técnica seleccionada del grupo que consiste en: electroforesis en gel en condiciones reductoras, electroforesis en gel en condiciones no reductoras, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, SDS-PAGE en condiciones no reductoras, electroforesis nativa, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa, Western blot, ensayos de unión a lectinas y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 25 10. El método según la reivindicación 9, en el que la electroforesis en gel en condiciones reductoras comprende utilizar el agente reductor β-mercaptopetanol o ditiotreitol.
- 30 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que, en la determinación del biomarcador de la etapa (a)(ii) o (a)(iii), dicho ensayo es un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) nativa.
- 35 12. Un kit de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende reactivos para:

(a) la detección y/o cuantificación de la cantidad o concentración de apoE con un tamaño de 34 kDa en un agregado de apoE con un tamaño de 100 kDa, en una muestra biológica obtenida de un sujeto; o

5 (b) determinar la relación dímeros/monómeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en una muestra biológica obtenida de un sujeto; o

(c) detectar la presencia de dímeros de apoE detectados en un ensayo de electroforesis nativa, en una muestra biológica obtenida de un sujeto.

10 13. El kit según la reivindicación 12, que comprende una lectina específica frente a apoE con un tamaño de 34 kDa.

14. El kit según la reivindicación 12 ó 13, que además comprende un anticuerpo específico frente a apoE4.

15 15. El kit según la reivindicación 14, en el que dicho anticuerpo específico frente a apoE4 es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpo NBP1-49529, anticuerpo EPR24181-64 y anticuerpo MABN43.

20 16. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que además comprende al menos un anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE.

17. El kit según la reivindicación 16, en el que dicho anticuerpo específico frente a todas las isoformas de apoE es el anticuerpo AB178479 o el anticuerpo AB947.

25 18. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, que además comprende el agente reductor β-mercptoetanol o ditiotreitol.

19. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, que además comprende al 30 menos una disolución tampón.

FIGURA 1

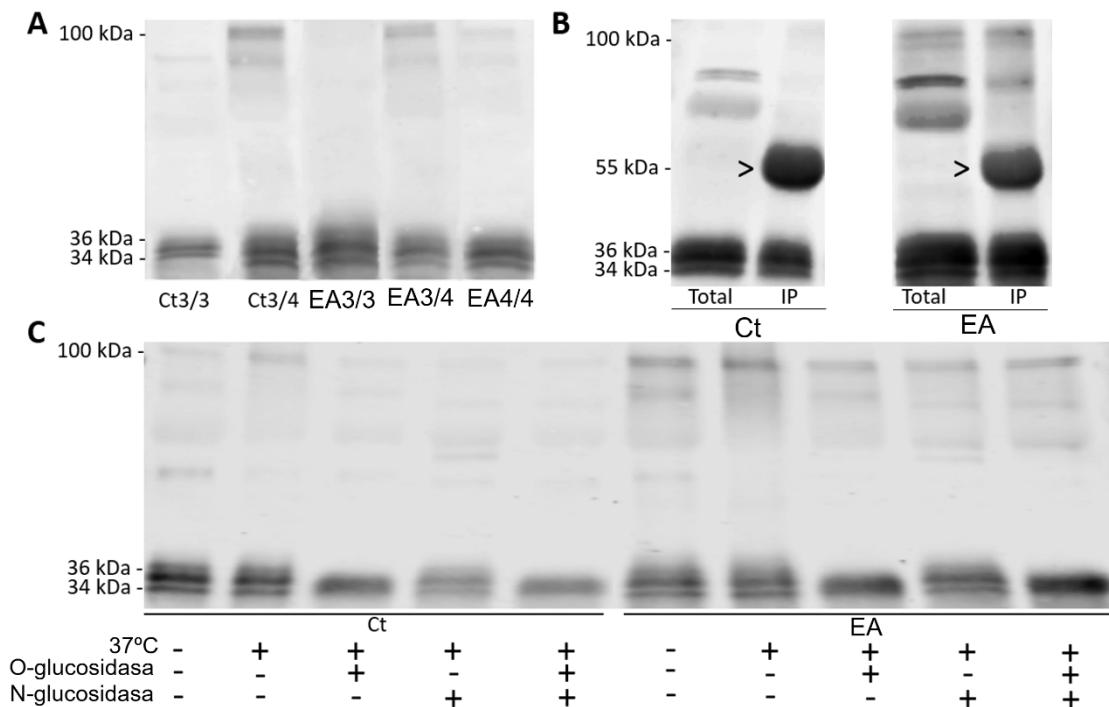


FIGURA 2

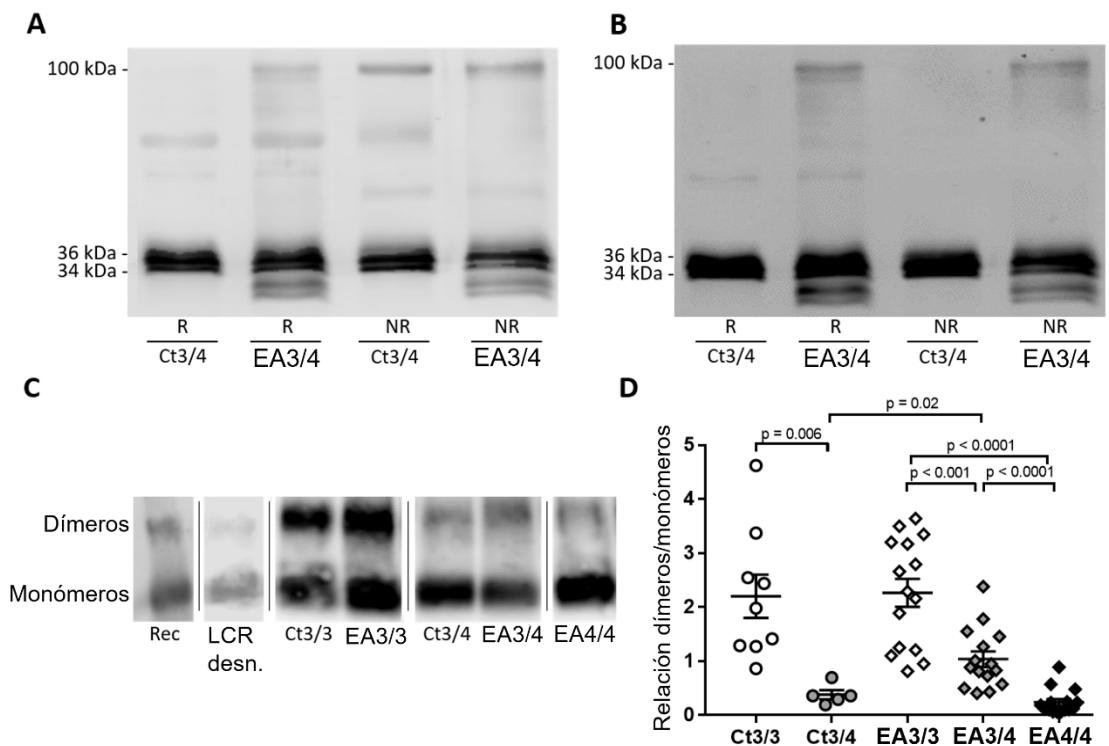


FIGURA 3

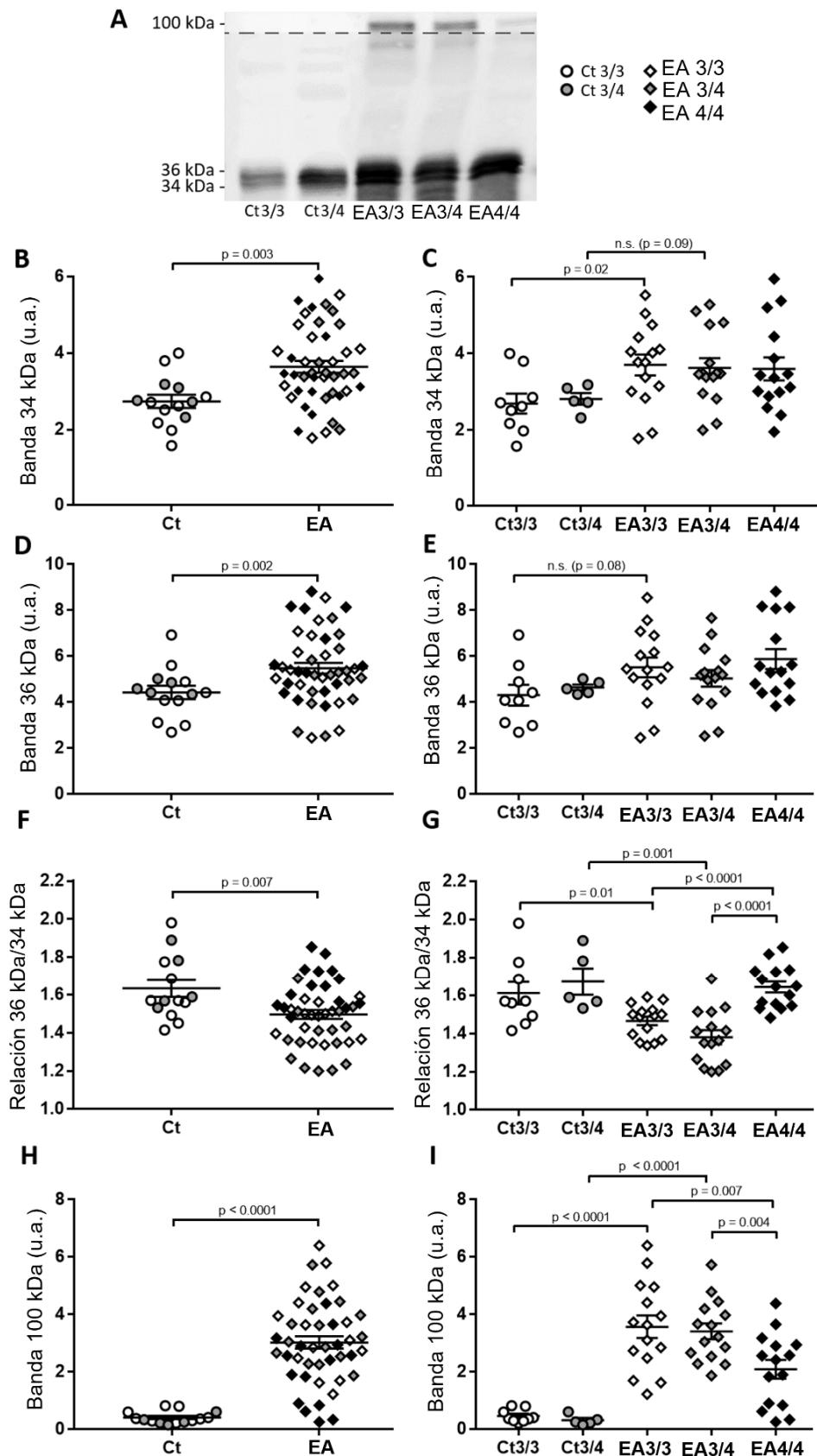


FIGURA 4

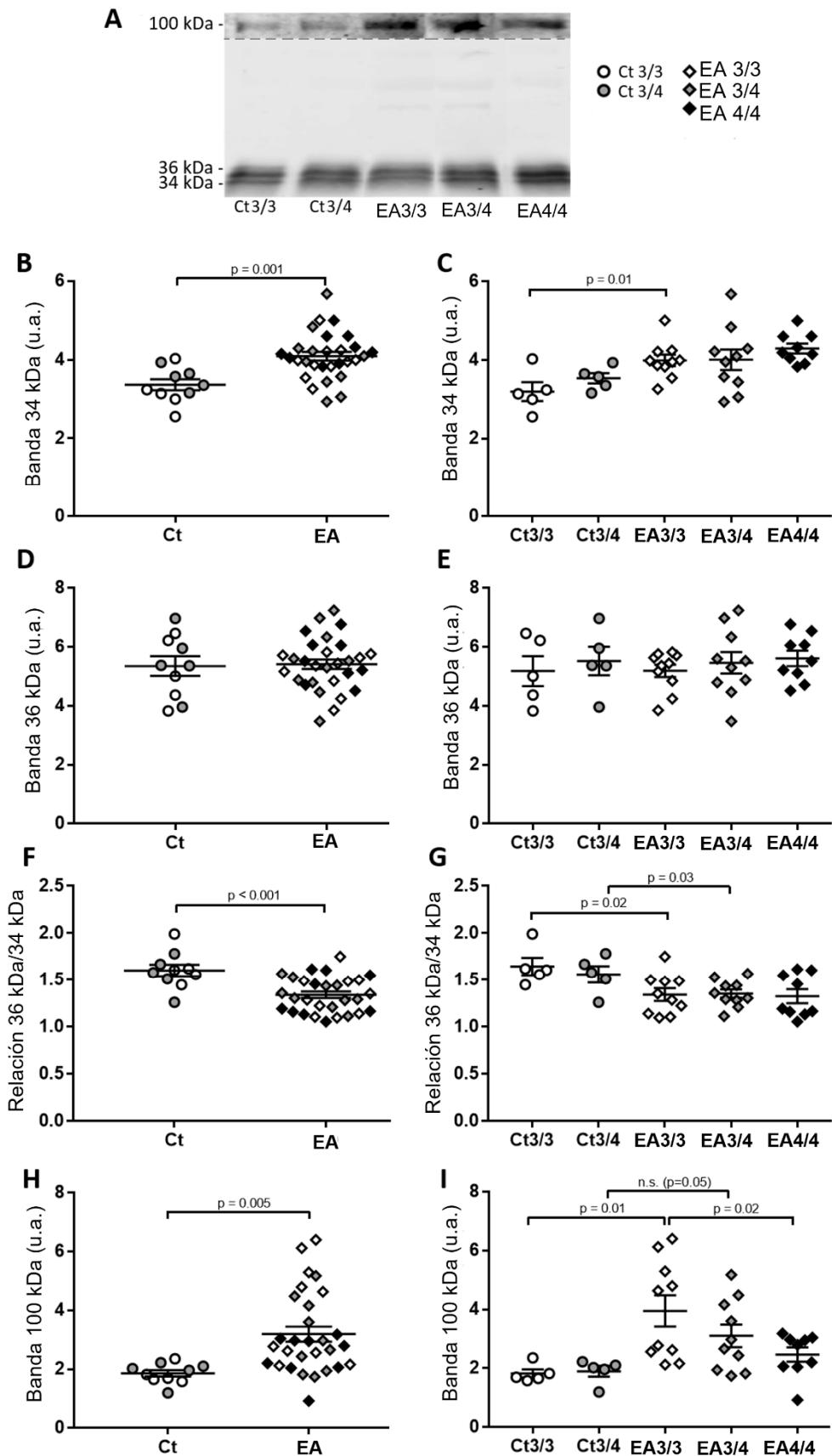
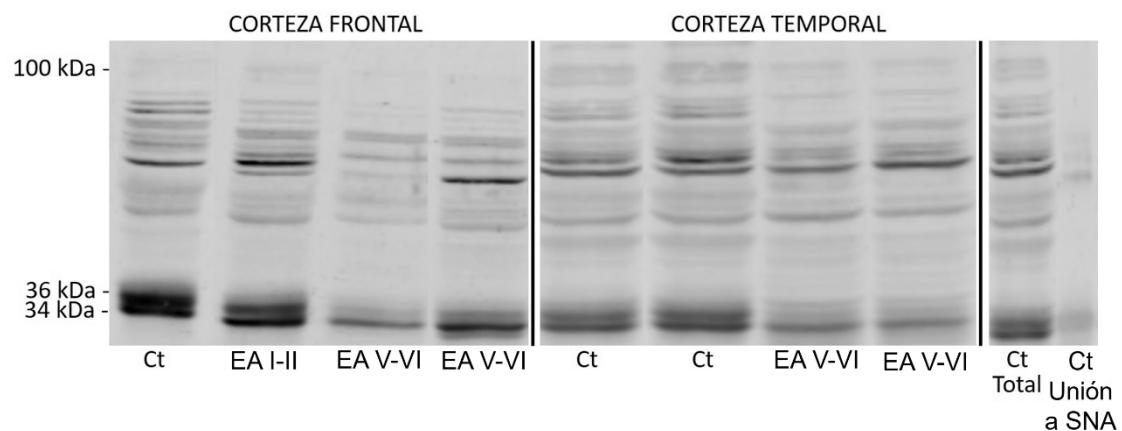


FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202230224

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 17.03.2022

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl. : **G01N33/68** (2006.01)
C07K14/47 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | 56 | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|--------------------|----------------------------|
| A | HEINSINGER N M et al. "Apolipoprotein E genotype affects size of ApoE complexes in cerebrospinal fluid". Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 20161001 Lippincott Williams and Wilkins USA, 01/10/2016, Vol. 75, Nº 10, Páginas 918 - 924 [en línea] [recuperado el 19/11/2022]., ISSN 0022-3069 (print) ISSN 1554-6578 (electronic), <DOI: 10.1093/jnen/nlw067>. Todo el documento | | 1-19 |
| A | MONTINE K S et al. "Apolipoprotein E allelic influence on human cerebrospinal fluid apolipoproteins". Journal of lipid research United States Dec 1998, 30/11/1998, Vol. 39, Nº 12, Páginas 2443 - 2451 [en línea] [recuperado el 18/11/2022]., ISSN 0022-2275 (Print), <DOI: pubmed:9831633>. Todo el documento | | 1-19 |
| A | HU YUEMING et al. "Simple and Fast Assay for Apolipoprotein E Phenotyping and Glycotyping: Discovering Isoform-Specific Glycosylation in Plasma and Cerebrospinal Fluid". Journal of Alzheimer's Disease 2020 , 30/11/2019, Vol. 76, Nº 3, Páginas 883-893 [en línea][recuperado el 18/11/2022]., ISSN 1387-2877(print) ISSN 1875-8908(electronic), <DOI: 10.3233/JAD-200203>. Todo el documento | | 1-19 |
| A | WO 9409364 A1 (UNIV DUKE et al.) 28/04/1994, Ejemplos 10-13 | | 1-19 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

| | | |
|--|------------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe 21.11.2022 | Examinador M. L. Seriñá Ramírez | Página 1/2 |
|--|------------------------------------|---------------|

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

G01N, C07K

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

INVENES, EPODOC