

19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 389 199**

21 Número de solicitud: 201130560

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **08.04.2011**43 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2012**43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**24.10.2012**71 Solicitante/s:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)  
C/ SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES;  
VALL D'HEBRON INSTITUT DE RECERCA (VHIR) (4.0%);  
VALL D'HEBRON INSTITUTE OF ONCOLOGY (VHIO)  
(3.9%);  
INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS  
AVANÇATS (ICREA) (2.1%) y  
NATIONAL UNIVERSITY OF SINGAPORE (10.0%)**72 Inventor/es:  
**BOVOLENTA NICOLAO, Paola;  
ESTEVE PASTOR, Pilar;  
SANDONIS CONSUEGRA, Africa;  
CRESPO GALÁN, Inmaculada;  
GUERRERO VEGA, M<sup>a</sup> Isabel;  
IBÁÑEZ PÉREZ, Carmen;  
MALAPEIRA ARGUILAGA, Jordi;  
ARRIBAS, Joaquin y  
SHIMONO, Akihiko**74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**54 Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER QUE EMPLEA SFRP1  
COMO BIOMARCADOR.**

57 Resumen:

Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que emplea sfrp1 como biomarcador. La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que comprende (a) detectar y/o cuantificar el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen sfrp1 en una muestra aislada; (b) comparar la cantidad detectada y/o cuantificada con una cantidad de referencia; (c) identificar cualquier desviación significativa en la comparación de datos de la etapa (b); y, (d) atribuir la desviación significativa identificada a la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Así mismo, la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas que hibridan con la secuencia nucleotídica de un gen sfrp1 o anticuerpos que se unen específicamente a una secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica de un gen sfrp1 para determinar la presencia de una enfermedad de Alzheimer.

ES 2 389 199 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que emplea Sfrp1 como biomarcador.

5 La presente invención pertenece al campo de la Biología Molecular y se refiere a Sfrp1 como biomarcador para la enfermedad de Alzheimer en su etapa más temprana y a su uso para el diagnóstico precoz de dicha enfermedad.

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta con un deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales asociadas a la muerte neuronal en distintas zonas del cerebro. La EA es incurable y terminal. Su diagnóstico se realiza mediante evaluaciones de conducta y cognitivas, mediante análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o Tomografía por Emisión de Positrones (PET). Las causas de la EA son en gran medida desconocidas. La enfermedad se caracteriza por la aparición de placas seniles que contienen acumulaciones anómalas de, entre otros, el péptido conocido como beta amiloide (A $\beta$ ), que se genera por el procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) (Tanzi, RE, Bertram, L. 2005 *Cell*, 120: 545-555).

15 Actualmente, los únicos marcadores descritos son el péptido A $\beta$ , la proteína tau total y la proteína tau fosforilada en la posición 181. Sin embargo, supone un gran reto encontrar nuevos biomarcadores en líquido cefalorraquídeo o sangre (Humpel, C. 2011. *Trends Biotechnol.* 29(1): 26–32), ya que no existen marcadores capaces de predecir la susceptibilidad de un individuo de padecer EA, con la excepción en los casos de EA familiar, ni tampoco marcadores para determinar qué pacientes con un deterioro cognitivo leve van a desarrollar EA. Por lo tanto, es urgente desarrollar nuevos biomarcadores para el diagnóstico precoz de la EA. La EA a menudo pasa desapercibida o se diagnostica incorrectamente en sus primeras etapas, a menudo porque sus síntomas se confunden con las inevitables consecuencias del envejecimiento. Cuando la enfermedad progresa, el diagnóstico clínico puede hacerse con sólo el 65-90 % de precisión. El diagnóstico definitivo de la EA solo se hace *post mortem*, cuando la autopsia revela las placas seniles y los ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral. Las placas son el resultado de la agregación de péptidos A $\beta$  y se cree que participan en la patología de la EA. (Hardy, J, Selkoe, DJ. 2002. *Science*, 297: 353-356).

20 La identificación de un biomarcador de la EA para el diagnóstico temprano de la EA es un primer paso crítico en el desarrollo de metodologías para la intervención temprana de la enfermedad, y tendría varias ventajas. Sería capaz de identificar la EA en una etapa muy temprana de la enfermedad, antes de que los síntomas cognitivos puedan detectarse en pruebas neuropsicológicas, y antes de que los análisis de las imágenes cerebrales de RMN o PET puedan mostrar signos de degeneración. El diagnóstico diferencial de la EA es difícil, y un biomarcador que refleje cambios neuropatológicos a nivel molecular en el cerebro podría permitir distinguir los pacientes de Alzheimer no sólo de las personas con leve deterioro cognitivo que no desarrollan EA, sino también de pacientes con depresión. Un biomarcador también contribuiría en gran medida a la detección de nuevas terapias, especialmente las dirigidas a prevenir cambios neuropatológicos. Hasta ahora, la EA no se puede diagnosticar por un método clínico válido o por un biomarcador antes de que la enfermedad haya progresado tanto que la demencia sea evidente. Además, no hay un método válido para determinar qué pacientes con un deterioro cognitivo leve desarrollarán EA. Por lo tanto, un correcto diagnóstico en la fase precoz de la EA no solo es de gran importancia porque el tratamiento temprano es más eficaz, sino también porque la carga psicológica de los pacientes y familiares puede aliviarse antes.

25 Se han investigado muchos marcadores bioquímicos *ante mortem* para la EA, tanto en plasma como en orina, pelo, piel y otros, pero aún no se ha encontrado ninguno que permita monitorizar la eficacia de nuevos medicamentos o estrategias terapéuticas en ensayos clínicos.

30 Debido a que la EA queda a menudo sin diagnosticar o se diagnostica mal, es muy importante identificar un marcador biológico robusto y fácil de medir, especialmente uno que permita la detección temprana de la enfermedad. Esto podría permitir la intervención temprana y el tratamiento terapéutico para restaurar potencialmente la memoria y detener la deposición del péptido A $\beta$  para así prevenir la neurodegeneración (Ward, M. 2007. *Expert Rev Mol Diagn* 7: 635–646).

35 APP es una proteína integral de membrana que está presente en muchos tipos de tejidos, pero que es particularmente abundante en las sinapsis neuronales. APP puede sufrir dos tipos alternativos de procesamiento que son excluyentes entre sí. El procesamiento no amiloidogénico de la proteína APP lo realiza ADAM10, una metaloproteasa con actividad  $\alpha$ -secretasa, que corta APP dentro del péptido A $\beta$ , más concretamente en el aminoácido 16 de APP, provocando la liberación del dominio extracelular soluble de APP (sAPP $\alpha$ ) e impidiendo la generación del péptido tóxico A $\beta$ . Posteriormente, APP es procesada por una  $\gamma$ -secretasa, generándose unos péptidos llamados p3. Alternativamente, APP puede sufrir un procesamiento amiloidogénico, realizado por una  $\beta$ -secretasa que corta en un extremo del péptido A $\beta$ . Este péptido es de nuevo procesado por la  $\gamma$ -secretasa y da lugar a los péptidos tóxicos A $\beta$ . (Lichtenthaler, SF. 2011. *J*

*Neurochem.* 116:10-21).

5 Las proteínas SFRPs (del inglés “*secreted Frizzled related proteins*”) son proteínas secretables conocidas por su actividad como moduladores de la vía de señalización de Wnt (nombre derivado de los genes “Wingless” e “int”), y también por su capacidad para regular la actividad de metaloproteasas de tipo “Tolloid” (Bovolenta, P et al. 2008 .*J Cell Science* 121(6):737-46 ).

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al uso de SFRP como biomarcador para la enfermedad de Alzheimer (EA).

10 Los autores de la presente invención han demostrado que algunas proteínas de la familia SFRP presentan niveles alterados en muestras de fluidos biológicos procedentes de enfermos de Alzheimer respecto de personas sanas. Por tanto, la presente invención supone un nuevo biomarcador para la detección precoz de la EA.

Como muestran los ejemplos de la presente invención, los niveles de la proteína SFRP1 están alterados en sujetos enfermos de Alzheimer con respecto a sujetos control. De esta forma, la detección y/o cuantificación de esta proteína permite el diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer.

15 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de la EA o para la determinación del riesgo de padecer EA o para la determinación de la evolución de una EA en un sujeto susceptible de padecer EA que comprende las siguientes etapas:

a) detectar y/o cuantificar el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* en una muestra aislada;

20 b) comparar la cantidad detectada y/o cuantificada en la etapa (a) con una cantidad de referencia;

c) identificar cualquier desviación significativa en la comparación de datos de la etapa (b); y,

d) atribuir la desviación significativa identificada en la etapa (c) a la presencia de la EA o al riesgo de padecer EA.

25 El término “determinación de la evolución”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento.

30 El término “producto de expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia al producto resultante de la transcripción (síntesis de ARN) o de la traducción (síntesis de la proteína) de un gen o de una secuencia nucleotídica de ADN, o a cualquier forma resultante del procesamiento del producto resultante de la transcripción o de la expresión de un gen o de una secuencia nucleotídica de ADN.

El gen *sfrp1* es el gen de la “*secreted Frizzled related protein 1*”.

La detección de la etapa (a), tal y como es entendida por un experto en la materia, no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente.

35 La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

45 La cantidad de referencia adecuada puede ser determinada a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, mediante el método del primer aspecto de la invención, junto con la muestra aislada procedente de un sujeto susceptible de padecer EA. Más preferiblemente, la cantidad de referencia puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

50 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia nucleotídica del gen *sfrp1* codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un ochenta por ciento, al menos un ochenta y cinco por ciento, al menos un noventa por ciento, al menos un noventa y cinco por ciento, al menos un

noventa y nueve por ciento de identidad con SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica del gen *sfrp1* codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

5 El término "tanto por ciento de identidad" o "porcentaje de identidad" tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al tanto por ciento o al porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos. El tanto por ciento o el porcentaje de identidad es el resultado de contar el número de posiciones a lo largo del alineamiento de dos secuencias donde todos los aminoácidos en la misma posición son idénticos. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

10 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de la proteína SFRP1 humana que se encuentra en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el número de referencia: NP\_003003.3.

Las secuencias de aminoácidos de SFRP1 de chimpancé, vaca, ratón, rata y gallo presentan una alta homología con la secuencia de humano, como muestra la tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de identidad de secuencia para el gen y la proteína *sfrp1* de humano con distintas especies.

Especie	Gen	Identidad (%)	
		Proteína	ADN
<i>H. sapiens</i>	<i>sfrp1</i>		
vs. <i>P. troglodytes</i>	<i>sfrp1</i>	99,4	98,9
vs. <i>B. taurus</i>	<i>sfrp1</i>	96,1	92,8
vs. <i>M. musculus</i>	<i>sfrp1</i>	94,9	92,5
vs. <i>R. norvegicus</i>	<i>sfrp1</i>	93,9	91,6
vs. <i>G. gallus</i>	<i>sfrp1</i>	85,4	84,8
vs. <i>D. rerio</i>	<i>sfrp1a</i>	68,2	69,1
vs. <i>D. rerio</i>	<i>sfrp1b</i>	65,9	69,6

15 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la muestra aislada de la etapa (a) es un fluido biológico. Preferiblemente, el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, suero o plasma sanguíneo. Más preferiblemente, el fluido biológico es suero sanguíneo. Más preferiblemente, el fluido biológico es LCR.

20 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la muestra aislada comprende células.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, donde la muestra aislada comprende un tejido.

25 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* es una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* es la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el producto de expresión es detectado por PCR.

30 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el producto de expresión es detectado por electroforesis, inmunoensayo, cromatografía, tecnología de *microarrays* y/o espectrometría de masas. Preferiblemente, el producto de expresión es detectado por inmunoensayo. Preferiblemente, el inmunoensayo es un ELISA. Preferiblemente, el producto de expresión es detectado por espectrometría de masas.

35 La detección y/o cuantificación del paso (a) del método de la invención puede llevarse a cabo mediante cualquier combinación de cualquiera de las técnicas mencionadas. La detección puede realizarse evaluando la presencia o la ausencia del producto de expresión o de un fragmento del mismo.

Un inmunoensayo es un ensayo bioquímico que mide la concentración de una sustancia en una muestra usando una reacción de un anticuerpo o anticuerpos contra su antígeno. El ensayo se basa en la unión específica de un anticuerpo con su antígeno. La detección y/o cuantificación del anticuerpo y/o del antígeno puede realizarse con diversos métodos. Uno de los más comunes es el marcaje del antígeno o el anticuerpo. Este marcaje puede consistir, aunque sin limitarse, en una enzima, un radioisótopo (radioinmunoensayo), un marcador magnético (inmunoensayo magnético) o un fluoróforo. Además hay otras técnicas como la aglutinación, la nefelometría, la turbidimetría o el *immunoblot*. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. En un inmunoensayo competitivo la respuesta es inversamente proporcional a la concentración de antígeno de la muestra. En un ensayo no competitivo, también llamado ensayo en sándwich, los resultados son directamente proporcionales a la concentración de antígeno. Una técnica de inmuno ensayo que puede usarse en la presente invención es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (del inglés "*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*").

En otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a la proteína sfrp1, sus variantes o fragmentos de las mismas. A continuación, los cortes se hibridan con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo primario que reconoce la proteína sfrp1, su variante o un fragmento de las mismas, el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

Por medio de técnicas cromatográficas se puede separar las moléculas según su carga, su tamaño o su peso molecular, por su polaridad o por su potencial redox, entre otros. La técnica cromatográfica puede ser, aunque sin limitarse, cromatografía líquida (de partición, de absorción, de exclusión, de intercambio iónico), cromatografía gaseosa o cromatografía de fluidos supercríticos.

La tecnología de *microarrays* se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a la fijación en un soporte sólido de una molécula que reconoce el producto de expresión de la presente invención. El *microarray* de anticuerpos es uno de los más comunes *microarrays* de proteínas. En este caso los anticuerpos se colocan en pequeños puntos, se fijan en el soporte sólido (llamado chip de proteínas) y se usan para capturar moléculas y así detectar las proteínas en una muestra aislada, como pueden ser un lisado celular, un medio condicionado, suero, orina o LCR.

El término "soporte sólido" tal y como se emplea en la presente descripción se refiere a una gran variedad de materiales, por ejemplo, pero sin limitarse, resina de intercambio iónico o adsorción, vidrio, plástico, látex, nylon, gel, ésteres o celulosa, esferas paramagnéticas o una combinación de algunos de ellos.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso del producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen sfrp1 como marcador para la determinación del riesgo de padecer la EA, para determinar la presencia de la EA y/o para predecir la progresión de una EA en un sujeto susceptible de padecer EA.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas que hibridan con la secuencia nucleotídica de un gen sfrp1 que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer la EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA en un sujeto susceptible de padecer EA, en una muestra aislada.

El término "cebadores" se refiere a los oligonucleótidos con secuencias nucleotídicas idénticas o complementarias reversas que permitan la amplificación de algún fragmento del gen en cuestión mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El término "cebador" se refiere a secuencias de entre 15-30 nucleótidos que hibridan con una de las cadenas del ácido nucleico molde y permiten la amplificación de una secuencia de ADN mediante una reacción de PCR. El término "sonda" se refiere a una secuencia de ARN o ADN que puede estar marcada o no con cualquier compuesto marcador conocido en el estado de la técnica.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende anticuerpos que se unen específicamente a una secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica de un gen sfrp1 donde dicha secuencia aminoacídica tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, o donde dicha secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer la EA o para determinar la presencia de una EA o para predecir la progresión de una EA en un sujeto susceptible de padecer EA, en una muestra aislada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir

otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Muestra que los niveles de SFRP1 en el suero sanguíneo de sujetos enfermos de Alzheimer (EA) son significativamente diferentes de los niveles en sujetos sanos (control).

### EJEMPLOS

10 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la eficacia del método de diagnóstico de la invención.

#### **EJEMPLO 1: Análisis de los niveles de SFRP1 en suero de sujetos enfermos de Alzheimer.**

Se analizaron los niveles de la proteína SFRP1 en muestras de suero sanguíneo de 10 sujetos enfermos de Alzheimer y en 5 sujetos sin demencia con edades comprendidas entre los 76 y los 81 años, que se consideraron sujetos control.

15 Entre los sujetos enfermos de Alzheimer, algunos presentan el alelo 4 del gen ApoE en homocigosis y otros son heterocigotos para el alelo3 y el alelo 4.

Las muestras de suero sanguíneo se conservaron a – 20 °C.

20 Para la cuantificación de los niveles en suero de estos sujetos se empleó un kit comercial de ELISA para detectar la proteína SFRP1 humana ("*kit for Secreted Frizzled Related Protein1*" de Usn Life Science Inc.). La detección se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó un lector de microplaca para leer la absorbancia a 450 nm.

Los resultados de la cantidad de SFRP1 en suero sanguíneo se analizaron estadísticamente mediante una t de Student. Como muestra la figura 1, se encontraron diferencias significativas ( $P=0.014$ ) entre el grupo de sujetos enfermos de Alzheimer y el grupo de sujetos control.

#### **25 EJEMPLO 2: Análisis de los niveles de SFRP1 en líquido cefalorraquídeo de sujetos enfermos de Alzheimer.**

Se cuantificaron los niveles de proteína SFRP1 en muestras de líquido cefalorraquídeo de sujetos enfermos de Alzheimer y sujetos control.

30 Los datos de los niveles de SFRP1 detectados por ELISA se analizaron estadísticamente y se encontraron diferencias significativas entre el grupo de sujetos enfermos de Alzheimer y el grupo de sujetos control.

Estos resultados demuestran que SFRP1 es un marcador útil para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo.

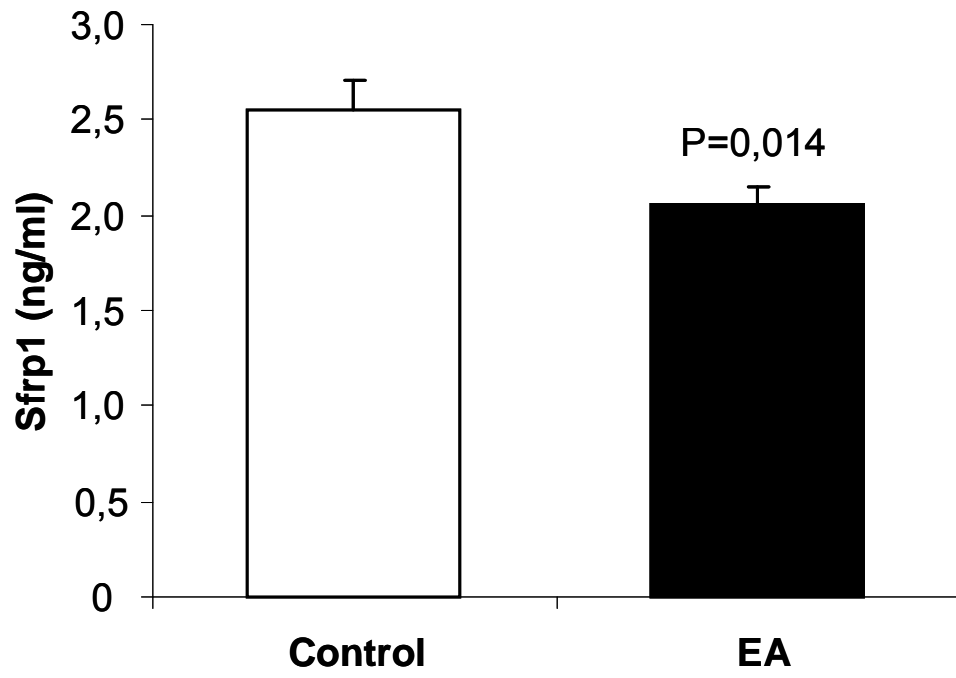
**REIVINDICACIONES**

1. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer que comprende las siguientes etapas:
- 5           a) detectar y/o cuantificar el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* en una muestra aislada;
- b) comparar la cantidad detectada y/o cuantificada en la etapa (a) con una cantidad de referencia;
- c) identificar cualquier desviación significativa en la comparación de datos de la etapa (b); y,
- 10           d) atribuir la desviación significativa identificada en la etapa (c) a la presencia de la enfermedad de Alzheimer o al riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer.
2. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación anterior donde la secuencia nucleotídica del gen *sfrp1* codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1.
- 15
3. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores donde la secuencia nucleotídica del gen *sfrp1* codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
- 20
4. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores donde la muestra aislada de la etapa (a) es un fluido biológico.
- 25
5. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación anterior donde el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo, sangre, suero o plasma sanguíneo.
- 30
6. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación anterior donde el fluido biológico es suero sanguíneo.
- 35
7. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación anterior donde el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo.
- 40
8. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según las reivindicaciones 1 a 3, donde la muestra aislada comprende células.
- 45
9. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según las reivindicaciones 1 a 3, donde la muestra aislada comprende un tejido.
- 50
10. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* es una secuencia aminoacídica con al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1.
11. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 10 donde el producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* es la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

12. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el producto de expresión es detectado por PCR.
- 5 13. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el producto de expresión es detectado por electroforesis, inmunoensayo, cromatografía, tecnología de *microarrays* y/o espectrometría de masas.
- 10 14. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 13 donde el producto de expresión es detectado por inmunoensayo.
- 15 15. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 14 donde el inmunoensayo es un ELISA.
- 20 16. Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o para la determinación del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer o para la determinación de la evolución de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 13 donde el producto de expresión es detectado por espectrometría de masas.
- 25 17. Uso del producto de expresión de una secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* como marcador para la determinación del riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer, para determinar la presencia de la enfermedad de Alzheimer y/o para predecir la progresión de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer.
- 30 18. Uso de un kit que comprende cebadores y/o sondas que hibridan con la secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* que codifica para una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer o para determinar la presencia de una enfermedad de Alzheimer o para predecir la progresión de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer, en una muestra aislada.
- 35 19. Uso de un kit que comprende anticuerpos que se unen específicamente a una secuencia aminoacídica codificada por la secuencia nucleotídica de un gen *sfrp1* donde dicha secuencia aminoacídica tiene al menos un 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, o donde dicha secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1, para determinar el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer o para determinar la presencia de una enfermedad de Alzheimer o para predecir la progresión de una enfermedad de Alzheimer en un sujeto susceptible de padecer enfermedad de Alzheimer, en una muestra aislada.



FIG. 1



# ES 2 389 199 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Vall d'Hebron Institute of Oncology  
Institució Catalana de Recerca i Estudis Avancats  
Vall d'Hebron Institut de Recerca  
National University of Singapore
- <120> Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que emplea sfrp1 como biomarcador
- <130> ES1641.685
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 314
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Gly Ile Gly Arg Ser Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly  
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Val Gly Ser Ala Ser  
20 25 30

Glu Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser  
35 40 45

Gly Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp  
50 55 60

Leu Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn  
65 70 75 80

Leu Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser  
85 90 95

Trp Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe  
100 105 110

Leu Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro  
115 120 125

Cys Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met  
130 135 140

Gln Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe  
145 150 155 160

Pro Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu  
165 170 175

ES 2 389 199 A1

Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu  
180 185 190

Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala  
195 200 205

Leu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys  
210 215 220

Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys  
225 230 235 240

Lys Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys  
245 250 255

Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly  
260 265 270

Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp  
275 280 285

Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His  
290 295 300

Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys  
305 310



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130560

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.04.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)  
**C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20070082350 A1 (LANDFIELD, P. et al.) 12.04.2007, todo el documento, especialmente párrafos [0014],[0027],[0048]; tabla 6 (9), hoja 83, línea 9.	1-19
A	WO 03028543 A2 (PFIZER PROD INC et al.) 10.04.2003, resumen.	1-19
A	BOVOLenta, P. et al. "Beyond WNT inhibition: new functions of secreted frizzled-related proteins in development and disease". JOURNAL OF CELL SCIENCE. 15.03.2008. Vol. 121, N.º. 6, páginas 737-746; todo el documento.	1-19
A	HUMPEL, C. et al. "Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease". TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. 01.01.2011. Vol. 29, N.º. 1, páginas 26-32; todo el documento.	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 n.º:

Fecha de realización del informe  
09.10.2012

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/4

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

G01N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.10.2012

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-19	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-19	<b>NO</b>

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

#### Base de la Opinión.-

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

#### Consideraciones:

La invención consiste en un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que determina los niveles de la proteína Sfrp1 en una muestra aislada de un enfermo.

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20070082350 A1 (LANDFIELD, P. et al.)	12.04.2007
D02	WO 03028543 A2 (PFIZER PROD INC et al.)	10.04.2003
D03	BOVOLENTA, P. et al. "Beyond WNT inhibition: new functions of secreted frizzled-related proteins in development and disease". JOURNAL OF CELL SCIENCE. 15.03.2008. Vol. 121, N°. 6, páginas 737-746; todo el documento.	
D04	HUMPEL, C. et al. "Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease". TRENDSIN BIOTECHNOLOGY. 01.01.2011. Vol. 29, N°. 1, páginas 26-32; todo el documento.	

En el documento D01, se identifican varios genes y las correspondientes proteínas codificadas por ellos, que se expresan anormalmente en la fase temprana de la enfermedad de Alzheimer. Entre los genes identificados está el gen Sfrp1. Los ensayos se realizan preferentemente en muestras de cerebro, pero no se descarta que se puedan realizar en otro tipo de muestra biológica.

El documento D02, describe un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que consiste en la determinación de varios biomarcadores en muestras de líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y plasma.

El documento D03, describe la implicación de las proteínas de la familia Sfrp, en varios estados patológicos.

El documento D04, describe la importancia médica que supone la identificación de nuevos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer tanto en líquido cefalorraquídeo como en sangre.

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

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

Reivindicaciones 1-19

El documento D01, describe varios genes cuya expresión se ve alterada en los estadios iniciales de la enfermedad de Alzheimer. Entre los genes que se relacionan con dicha patología, está el gen Sfrp1. Los ensayos en el documento D01, se han realizado en muestras cerebrales pero se menciona que puede realizarse en cualquier tipo de muestra del paciente; por tanto el método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer que utiliza el gen Sfrp1 o su producto de expresión como marcador no es nuevo. Las reivindicaciones 1-19 no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.