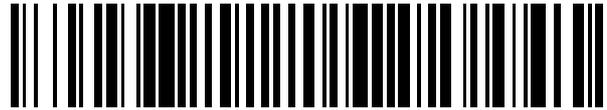


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 255**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2007 E 07725231 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2016418**

54 Título: **Procedimiento in vitro para la diagnosis y la diagnosis precoz de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

17.05.2006 DE 102006023175

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

08.04.2013

73 Titular/es:

**B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
NEUENDORFSTRASSE 25
16761 HENNIGSDORF, DE**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, ANDREAS;
SPARWASSER, ANDREA y
HAMPEL, HARALD**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 400 255 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento in vitro para la diagnosis y la diagnosis precoz de enfermedades neurodegenerativas

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento in vitro para la diagnosis y en particular para la diagnosis precoz de enfermedades neurodegenerativas, y en particular de enfermedades de demencia tales como la enfermedad de Alzheimer y sus precursores.
- 10 **[0002]** Dentro del marco de la presente invención el concepto de “diagnóstico” (o “diagnosis”) se utiliza además como concepto general para determinaciones médicas que, según el estado clínico del paciente al que se le efectúe la determinación, pueden estar basadas en distintos planteamientos y sirven para la detección y en el caso presente en particular también para la detección precoz, para la determinación del grado de severidad y para la valoración evolutiva, y también para la valoración evolutiva como acompañamiento a la terapia y para la prognosis de la futura evolución de una enfermedad. En el presente contexto tiene además particular importancia el hecho de que un diagnóstico puede ser también un diagnóstico negativo, en el que sobre la base de la no detectabilidad de una determinada característica típica de enfermedad, tal como p. ej. la no determinabilidad de un biomarcador asociado a la enfermedad en cuestión en una muestra de sangre de un paciente, se pone de manifiesto que es improbable la existencia de una determinada enfermedad.
- 20 **[0003]** Para el diagnóstico negativo son también de gran valor biomarcadores que pueden encontrarse incrementados en varias distintas enfermedades y por consiguiente aún no permiten en solitario y por sí solos diagnóstico positivo alguno de una enfermedad específica, si bien por regla general y cuando se añaden adicionales parámetros clínicos o bioquímicos pueden también ser decisivos para el diagnóstico positivo.
- 25 **[0004]** Las enfermedades de cuya diagnosis se ocupa la presente invención son enfermedades neurodegenerativas crónicas de etiología no infecciosa que evolucionan más bien lentamente, y son en particular enfermedades de demencia presenil.
- 30 **[0005]** Se califican de enfermedades de demencia (dementia) en general las enfermedades para las que una característica común es la pérdida de capacidades intelectuales adquiridas, y ante todo de la memoria y del nivel de personalidad normal como consecuencia de lesiones cerebrales. Las enfermedades de demencia son enfermedades de carácter crónico que por regla general evolucionan con relativa lentitud. Si surgen fenómenos de demencia en la mediana edad y antes de la edad avanzada, se les califica de enfermedades de demencia presenil, y entre las mismas se distinguen sobre la base de los síntomas y de las modificaciones cerebrales patológicas que se dan típicamente para las mismas en particular las siguientes enfermedades, o mejor dicho los siguientes grupos de enfermedades:
- 35 **[0006]** La **demencia de Alzheimer (AD)** (enfermedad de Alzheimer; Morbus Alzheimer) es la enfermedad de demencia neurodegenerativa más frecuente, constituye los 2/3 de todos los casos de demencia y representa también el campo de aplicación más importante para la presente invención. La AD se distingue por tres importantes características patológicas, que por cierto no son detectables con seguridad más que *post mortem*: la formación de placas amiloides y de haces neurofibrilares, así como la pérdida de células nerviosas (para la sinopsis, véase (1); los datos de referencias de la literatura que se dan en la descripción en forma de números se refieren a la lista de referencias de la literatura que se da a continuación de la descripción). Las placas amiloides constan de agregados extraneuronales de la proteína β -amiloide, mientras que los haces de neurofibrillas contienen principalmente proteína tau y neurofilamentos. Se presume que la formación de placas y de neurofibrillas es la causa de la necrosis de células nerviosas.
- 40 **[0007]** Los síntomas más importantes de la AD son los crecientes trastornos de la capacidad de concentración y de la capacidad de razonamiento con irritabilidad relativamente persistente, yendo estos síntomas acompañados de otros trastornos menos específicos que dificultan la delimitación entre la AD y otras formas de demencia.
- 50 **[0008]** Observaciones realizadas en pacientes con AD y en pacientes que a lo largo de su observación clínica durante muchos años desarrollaron AD, condujeron a la formulación de criterios para grupos de pacientes delimitables entre sí que cubren toda la amplitud de selección que va desde
- 55 (a) personas sin trastornos cognitivos subjetivos y objetivos (que dentro del marco de la presente solicitud representan el grupo de control), pasando por
- (b) pacientes que se quejan de pérdidas de capacidad cognitiva percibidas subjetivamente, pero en los cuales no pueden constatarse déficits cognitivos (dentro del marco de la presente solicitud éste es el grupo de los pacientes con “SKS”, significando “SKS” “trastornos cognitivos subjetivos”), y pasando asimismo por
- 60 (c) pacientes en los que son constatables ligeros trastornos cognitivos y en los que, cuando no existen otras enfermedades provocadoras de demencia, se establece el diagnóstico de “posiblemente AD” (“mgl AD”) (dentro del marco de la presente solicitud éste es el grupo “LKS mgl AD”, significando “LKS” “ligeros trastornos cognitivos”), hasta
- (d) el grupo de los pacientes con el típico cuadro de considerables trastornos cognitivos que comenzaron lentamente y progresan lentamente, para los que, cuando pueden excluirse otras causas de demencia, se establece el diagnóstico de

“probablemente AD” (dentro del marco de la presente solicitud éste es el grupo “ws AD”, significando la abreviatura “probablemente Alzheimer”).

5 [0009] Con respecto a la asignación de los pacientes con trastornos cognitivos subjetivos y/u objetivos a los distintos grupos, se hace complementariamente referencia a (2), (3), (4) y (5).

10 [0010] La **demencia con corpúsculos de Lewy** (dementia with lewy-bodies: DLB) es después de la demencia de Alzheimer la segunda causa más común de enfermedad demencial. Neuropatológicamente la DLB está caracterizada por la aparición de los llamados corpúsculos de Lewy en el tronco cerebral y en la corteza. Estos corpúsculos de Lewy constan predominantemente de agregados de la proteína presináptica (α -sinucleína) y ubiquitina. La patología de los corpúsculos de Lewy puede en distinta medida estar asociada a las modificaciones neuropatológicas típicas del Parkinson y del Alzheimer. Así, también en la DLB se produce la formación de beta-amiloide y de placas seniles, pero no se producen haces de neurofibrillas (para la sinopsis, véase (6)). También en el cerebro de pacientes con Morbus Parkinson hay corpúsculos de Lewy, si bien en una distinta distribución.

15 [0011] Son síntomas centrales de DLB un trastorno cognitivo progresivo, episodios de confusión mental con un fluctuante estado de atención y de conciencia, el parkinsonismo, y frecuentes caídas y síncope (desmayos de corta duración del tipo de un ataque). La sensibilidad y especificidad de los criterios diagnósticos presentan en todos los casos una alta especificidad, pero en parte una muy baja sensibilidad. Esto significa que en la cotidianidad clínica a menudo no se diagnostica la DLB. La **demencia frontotemporal (FTD)** se denomina también enfermedad de Pick y supone aproximadamente el 20% de las enfermedades de demencia presenil. La FTD está en parte condicionada genéticamente y se cuenta entre las llamadas tauopatías, que se distinguen por una sobreexpresión o subexpresión de un subtipo de proteína tau o por la expresión de una proteína tau mutada. Neuropatológicamente se produce una atrofia local de la corteza frontal y/o temporal, así como de la substantia nigra y de los ganglios basales. Esto trae como consecuencia trastornos del habla diversamente pronunciados, una modificación del carácter y excentricidades del comportamiento. En total la FTD es subdiagnosticada con una sensibilidad de un 93% para una especificidad de tan sólo un 23%, representando la AD el diagnóstico erróneo más frecuente.

20 [0012] Se agrupan bajo el concepto de **demencia vascular (vascular dementia; VAD)** enfermedades en las que es provocada una demencia debido a trastornos de la perfusión en el cerebro. Hay distintos tipos de VAD, de los cuales la demencia con infartos múltiples (MID) y la VAD subcortical (también denominada enfermedad de Binswanger) representan las formas más frecuentes.

25 [0013] En el caso de la enfermedad de Binswanger se trata de una evolución demencial lentamente progresiva que patológicamente está caracterizada por lesiones cerebrovasculares en la sustancia cerebral blanca. Clínicamente esto redundará en excentricidades del comportamiento tales como agitación, irritabilidad, depresión y euforia, así como en un ligero trastorno de la memoria.

30 [0014] La demencia con infartos múltiples se produce gradualmente como consecuencia de varias pequeñas apoplejías cerebrales, también llamadas ataques isquémicos transitorios (TIA), que condujeron al perecimiento de tejido cerebral en la corteza y/o en regiones subcorticales. Las apoplejías cerebrales también pueden haber pasado totalmente desapercibidas, siendo la demencia en este caso la primera consecuencia perceptible. En caso de haber una MID, se produce una disminución escalonada de capacidades cognitivas, combinada con severas depresiones, saltos de humor y epilepsia.

35 [0015] Un diagnóstico de enfermedades de demencia se efectúa hoy en día preponderantemente sobre la base de exámenes neuropsicológicos y de la observación del desarrollo de la enfermedad y de su evolución, recurriendo a criterios de exclusión para determinadas formas de demencia. Estos exámenes dan en muchísimos casos resultados ambiguos que aclaran las cifras anteriormente mencionadas para las formas de demencia subdiagnosticadas o los casos diagnosticados incorrectamente. Naturalmente, las modificaciones del cerebro típicas de enfermedad no pueden constatarse directamente en pacientes vivientes, y los exámenes con aparatos médicos de las funciones cerebrales p. ej. mediante tomografía de rayos X o tomografía de resonancia magnética nuclear son aparatosos y caros.

40 [0016] Sería por consiguiente deseable poder complementar y gracias a ello perfeccionar considerablemente la detección y en particular la detección precoz de enfermedades de demencia mediante la medición de biomarcadores con valor diagnóstico que con ayuda de un relativamente sencillo procedimiento de ensayo pudiesen ser determinados p. ej. en una muestra de sangre (muestra de suero, muestra de plasma) de un paciente.

45 [0017] Para la diagnosis del Alzheimer publicaron el Instituto Ronald y Nancy Reagan de la Asociación de Alzheimer y el Grupo de Trabajo del NIA (NIA = Instituto Nacional del Envejecimiento) directrices para los criterios que se establecen para un biomarcador ideal para la detección de la AD (7). En el caso ideal el biomarcador debe satisfacer los criterios siguientes:

50 1. Debería ser cerebro-específico y detectar una característica fundamental de la neuropatología de estas enfermedades.

2. Debería darse una sensibilidad diagnóstica y una especificidad de al menos un 80%.

3. La modificación morbo-específica del biomarcador debería manifestarse en un estadio lo más precoz posible de la enfermedad, para poder comenzar con la adopción de adecuadas medidas terapéuticas (8).

5 **[0018]** Hasta la fecha no hay sin embargo biomarcador alguno al que pueda recurrirse en la cotidianidad clínica en la sangre o en el líquido cerebroespinal con suficiente seguridad para el diagnóstico precoz y diferencial de la AD y que satisfaga todos los criterios anteriormente mencionados. Actualmente se investigan diversos potenciales candidatos a marcadores, entre los cuales se encuentran marcadores de inflamación tales como la IL-6 y el TNF α , marcadores para el estrés oxidativo tales como la 3-nitrotirosina, así como marcadores que van asociados a características modificaciones patológicas de la AD, tales como el amiloide β , que constituye un componente principal de las placas amiloides, y la proteína tau, que constituye un componente esencial de los haces de neurofibrillas (véase la sinopsis en (7); (10)).

15 **[0019]** Hay una necesidad actual de suplementarios métodos de análisis que proporcionen hallazgos de laboratorio válidos y se basen en una determinación de sustancias adecuadas como biomarcadores para enfermedades de demencia y en particular para la demencia de Alzheimer (AD), en muestras de sangre y de plasma y en pacientes en los que exista la sospecha de presencia de una enfermedad de demencia, y en particular de AD, y sean auxiliariamente adecuados para un diagnóstico positivo precoz y/o para un diagnóstico negativo de exclusión.

20 **[0020]** La presente invención aporta un método de análisis de este tipo en forma de un procedimiento *in vitro* según la reivindicación 1.

25 **[0021]** Están descritas en las reivindicaciones dependientes 2 a 8 ventajosas y preferidas configuraciones de un procedimiento según la reivindicación 1.

30 **[0022]** Deben considerarse como “péptidos natriuréticos o sus copéptidos formados a partir de un propéptido común” en particular los péptidos ANP (el “péptido atrial natriurético”), cuya determinación se hace en forma de la determinación del así llamado NT-proANP (o sea, del pro-ANP N-terminal, es decir, del péptido parcial N-terminal, que es formado al producirse la liberación de ANP desde el precursor común proANP), BNP (o sea, del así llamado “péptido natriurético cerebral”), cuya determinación se hace asimismo en forma de la determinación del así llamado NT-proBNP (o sea, del pro-BNP N-terminal, es decir, del péptido parcial N-terminal que es formado al producirse la liberación de BNP desde el precursor común proBNP), y del péptido afín así llamado CNP, que presenta la cadena peptídica más corta de entre los péptidos natriuréticos mencionados.

35 **[0023]** Dentro del marco de la presente invención el ANP es determinado como MR-proANP por cuanto que la determinación de NT-proANP se efectúa preferiblemente con ayuda de un inmunoensayo que detecta secuencias de aminoácidos en la zona de la región central (MR) del proANP o del NT-proANP y que está más detalladamente descrito en la WO 2004/046181 y en la patente europea EP 1 562 984 B1 originaria de la misma. Se encuentra en (9) una adicional descripción de este inmunoensayo.

40 **[0024]** Una variante preferida del procedimiento según la invención consiste en no tan sólo determinar un péptido natriurético solamente, sino además de la determinación de ANP, que preferiblemente se efectúa según el procedimiento de determinación anteriormente mencionado, determinar también el BNP según cualquier conocido procedimiento para la determinación directa o indirecta de BNP, y considerar y utilizar para la valoración los resultados de medición para la determinación de ANP y BNP juntamente, habitualmente tomando al mismo tiempo en consideración los hallazgos clínicos y otros parámetros de ensayo para el respectivo paciente.

45 **[0025]** La presente invención está basada en reflexiones de los inventores encaminadas a mejorar la diagnosis de las enfermedades de demencia aplicando el conocimiento de que las formas de la demencia presenil que son conocidas y que han sido aclaradas más detalladamente al comienzo van en distinta medida también acompañadas de procesos flogísticos (inflamatorios) y lesiones endoteliales que se consideran esenciales para el desarrollo, los síntomas y la evolución de las enfermedades de demencia, por lo cual las enfermedades neurodegenerativas son también consideradas como enfermedades neuroinflamatorias.

55 **[0026]** Así el Morbus Alzheimer está caracterizado entre otras cosas por la aparición de reacciones inflamatorias locales crónicas en el cerebro con participación de distintas proteínas inflamatorias tales como factores del complemento, proteínas de fase aguda y citoquinas proinflamatorias (10).

60 **[0027]** Los procesos inflamatorios desempeñan también un papel en la aparición de demencias vasculares (VAD). Los niveles de TNF α , TGF β , IL-6 y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos) están claramente incrementados en los pacientes con VAD (11, 12).

[0028] También en la DLB parecen desempeñar un papel procesos inflamatorios. Así está incrementado el número de células microgliales activadas en el cerebro de pacientes con DLB, y citoquinas proinflamatorias tales como el TNF α son sobreexpresadas en determinadas regiones cerebrales tales como la amígdala y el hipocampo.

5 [0029] A la aparición de reacciones inflamatorias en el cerebro de pacientes con FTD hay por el contrario tan sólo raras alusiones.

10 [0030] Partiendo (I) de la hipótesis de que los procesos neuroinflamatorios ligados a enfermedades de demencia conducen a trastornos de la perfusión, y en particular también a trastornos microcirculatorios del cerebro, y (II) de que en tal medida hay una similitud con enfermedades cardiovasculares que van ligadas a trastornos de la perfusión y a trastornos de la microcirculación (13) del tejido cerebral, así como (III) de hallazgos analíticos que muestran que en tales enfermedades cardiovasculares es detectable una incrementada formación, entre otras cosas, de los péptidos natriuréticos ANP y/o BNP, así como finalmente (IV) aprovechando las perfeccionadas posibilidades analíticas para la determinación del péptido natriurético en forma fiable y clínicamente válida con ayuda del nuevo inmunoensayo de la Solicitante anteriormente mencionado para la determinación del segmento central de proANP (MR-proANP) según (9), 15 los inventores investigaron la cuestión de si también en pacientes con trastornos cognitivos de distinta envergadura, pero que por lo demás no padecen de enfermedad conocida alguna ligada a una incrementada producción de péptidos natriuréticos, pueden encontrarse en el plasma indicaciones de incrementadas concentraciones de ANP.

20 [0031] En la medida en que en la literatura se han descrito intentos de efectuar una medición de los péptidos natriuréticos en personas que presentaban síntomas del tipo de los de la demencia, no se detectó correlación significativa alguna (14, 15).

25 [0032] Los resultados de medición que se describen a continuación en la parte experimental y fueron obtenidos en muestras de plasma con EDTA de 106 personas normales aparentemente sanas (controles sin síntomas) y de 196 pacientes con trastornos cognitivos desde leves hasta severos según los grupos (b) a (d) que han sido descritos al comienzo dieron como resultado por primera vez una clara correlación diagnósticamente significativa entre las concentraciones halladas para MR-proANP y la severidad de los síntomas de demencia en forma de trastornos cognitivos, correlacionándose las concentraciones medidas de manera significativa con la severidad de los trastornos y con ello de los precursores de la AD, y contribuyendo con ello las mismas a la diferenciación de los distintos grupos de 30 pacientes.

[0033] A pesar de que los análisis se limitaban hasta la fecha a los de muestras de plasma de pacientes que presentaban indicios de precursores de la AD o para los que se había establecido el diagnóstico de "probablemente Alzheimer", los inventores parten de la base de que (posiblemente con distintas típicas gamas de concentraciones) también en otras formas de demencia neuroinflamatorias, y en particular en la demencia vascular (VAD) y en la demencia con corpúsculos de Lewy (DLB), podrían ser determinables característicos incrementos de las concentraciones de MR-proANP en los plasmas de los pacientes. 35

[0034] El proceso de determinación que se aplica para las mediciones que se describen en la parte experimental para el MR-proANP en plasmas de pacientes se realizó con el ensayo inmunoluminométrico no competitivo en sándwich (SERISTRA® de la B.R.A.H.M.S), que se describe más detalladamente en la WO 2004/046181 de la Solicitante y en (9). Como complemento a las explicaciones que se dan en la presente solicitud se hace explícitamente referencia a las explicaciones generales sobre la problemática de la determinación de ANP en muestras de pacientes y a las aclaraciones relativas a la realización de los ensayos que se dan en las publicaciones mencionadas. 40 45

[0035] A continuación se aclara aún más detalladamente la invención a base de resultados de medición y de una figura. La figura 1 muestra los resultados de la medición de las concentraciones de MR-proANP en plasmas con EDTA de 106 personas de control sanas y de 196 pacientes con trastornos cognitivos de distinta severidad, que correspondían a los anteriormente mencionados grupos (b), (c) y (d), es decir, a los grupos "SKS" (50 pacientes), "LKS mgl AD" (46 50 pacientes) y "ws AD" (100 pacientes).

Parte experimental

55 Descripción del ensayo

[0036] La medición de MR-proANP en el plasma se realizó con un ensayo luminolumétrico en sándwich en esencia tal como se describe en la parte experimental de la anteriormente mencionada WO 2004/046181 y en (9).

60 [0037] Concretamente fueron introducidos en los tubitos recubiertos con el segundo anticuerpo 10 μ l de muestra/calibrador y 200 μ l de indicador (primer anticuerpo marcado) y se efectuó la incubación de los mismos con mezcla (a 170-300 rpm) por espacio de dos horas a temperatura ambiente (18-24°C). Entonces fue decantada la fase líquida, y los tubitos fueron lavados cuatro veces con 1 ml de solución de lavado LUMItest (de la B.R.A.H.M.S

Aktiengesellschaft, de Hennigsdorf, Alemania). A continuación de ello fue medida con un luminómetro LB952T (de la Berthold, de Wildbad, Alemania) por espacio de 1 seg. por cada tubito la quimioluminiscencia fijada.

5 **Medición de MR-proANP en el plasma de controles sanos y de pacientes con trastornos cognitivos de distinto grado de severidad**

10 **[0038]** Para la determinación de un valor de referencia para la concentración del MR-proANP se efectuó una medición en plasmas con EDTA de 106 personas de control sin síntomas, que ni presentaban síntomas de trastornos cognitivos ni padecían de cualquier otra enfermedad detectable (enfermedades cardiovasculares; infección o inflamación severa), y para las que es sabido que en las mismas pueden hallarse unas incrementadas mediciones de los péptidos natriuréticos ANP y/o BNP. Para el grupo de control se determinó una media (un valor mediano) para la concentración de MR-proANP medida de 63,45 pmoles/l.

15 **[0039]** Sirvieron de colectivo de pacientes pacientes con fenómenos de demencia en forma de trastornos cognitivos de diversa severidad, sobre la base de los cuales se hizo una asignación de los distintos pacientes a uno de los anteriormente mencionados grupos (b), (c) y (d).

20 **[0040]** Se muestran en la Figura 1 las concentraciones de MR-proANP medidas en el plasma de controles sanos y de pacientes con trastornos cognitivos.

[0041] Los valores numéricos obtenidos en forma de los así llamados valores medianos para los distintos grupos de pacientes, así como las especificidades y sensibilidades calculadas a partir de los datos de medición usando el valor indicado para el corte de 87,0 pmoles/l para los distintos grupos de pacientes fueron como se indica a continuación:

	Media controles	Media SKS	Media LKS mgl AD	Media ws AD
MR-proANP (indicada en pmoles/l)	62,6	81,5	103,0	98,8

	Corte (pmoles/l)	Especificidad (%)	Sensibilidad SKS (%)	Sensibilidad LKS mgl Ad (%)	Sensibilidad wa Ad (%)
MR-proANP	87,0	81,7	43,1	58,7	64,7

25 **[0042]** Las concentraciones de MR-proANP, detectables en los valores para los valores medianos de los distintos grupos de pacientes, aumentan claramente con la severidad de los síntomas en la dirección siguiente: controles < SKS < LKS mgl AD = ws AD.

30 **[0043]** Provisionales determinaciones orientativas de las concentraciones de BNP (usando un kit NT-proBNP comercial de la Fa. Roche Diagnostics) en pacientes de los mismos grupos de pacientes dieron como resultado para una especificidad de un 80,2% sensibilidades para el grupo SKS de un 38,0%, para el grupo "LKS mgl AD" de un 58,0% y para el grupo "ws AD" de un 61,0%.

35 **[0044]** La medición de BNP confirma con ello en esencia el hallazgo de las mediciones de ANP (como MR-proANP). Puesto que es sabido que en una situación de este tipo la significancia de las determinaciones mejora por regla general cuando se mide más de un parámetro y cuando los resultados de ambas mediciones se consideran juntamente para la valoración y/o se combinan analíticamente de manera adecuada, la determinación conjunta de ANP y de BNP y/o dado el caso de CNP queda explícitamente situada dentro del ámbito de la presente invención.

40 **[0045]** A pesar de que una incrementada liberación de péptidos natriuréticos, tal como p. ej. de ANP, medida como concentración de MR-proANP en plasma, es también mensurable en otras enfermedades (sepsis; enfermedades cardiovasculares/insuficiencia cardíaca; si bien éstas son clínicamente sin embargo por regla general sencillamente delimitables con respecto a las enfermedades de demencia) y de que los péptidos natriuréticos no representan por consiguiente parámetros específicos del cerebro, debido a la alta especificidad y a las sensibilidades claramente diferenciables entre sí la determinación de ANP, dado el caso en combinación con una determinación de BNP y/o de CNP es muy adecuada a efectos de diagnóstico precoz auxiliar de la AD.

50 **Literatura**

[0046]

1. SELKOE D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741-766
- 55 2. Boetsch T., Stübner S., Auer S., *Klinisches Bild, Verlauf und Prognose, Kapitel 5 in: Hampel, Padberg, Möller (Hrsg.), Alzheimer Demenz - Klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien; WVG mbH Stuttgart 2003*
3. Boetsch T., *Operationalisierte Demenzdiagnostik, Kapitel 6.1 in: Hampel, Padberg, Möller (Hrsg.), Alzheimer*

Demenz - Klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien; WVG mbH Stuttgart 2003

4. Reisberg B., Ferris S.H., de Leon M.J., Crook T., 1982, The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia, *Am J Psychiatry* 139:1136-1139
- 5
5. McKhann G., Drachmann D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. 1984, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ARDA work group under the auspices of department of health services task force on Alzheimer's disease, *Neurology* 24: 939-944
- 10
6. MCKEITH I. G. (2002). Dementia with lewy bodies. *British Journal of Psychiatry* 180: 144-147
7. FRANK R. A., GALASKO D., HAMPEL H., HARDY J., DE LEON M. J., MEHTA P. D., ROGERS J., SIEMERS E., TROJANOWSKI J. Q. (2003). Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 24: 521-536
- 15
8. GROWDON J. H., SELKOE D. J., ROSES A., TROJANOWSKI J. Q., DAVIES P., APPEL S. et al. [Working Group Advisory Committee] . (1998). Consensus report of the Working Group on Biological Markers of Alzheimer's Disease. [Ronald und Nancy Reagan Institute of the Alzheimer's Association and National Institute on Aging Working Group on Biological Biomarkers of Alzheimer's Disease]. *Neurobiology of Aging* 19: 109-116
- 20
9. Nils G. Morgenthaler, Joachim Struck, Barbara Thomas, Andreas Bergmann, "Immunoluminometric Assay for the Midregion of Pro-Atrial Natriuretic Peptide in Human Plasma", *Clinical Chemistry* 50, No. 1, 2004, S. 234-236.
- 25
10. TEUNISSEN C. E., DE VENDE J., STEINBUSCH H. W. M., DE BRUIJN C. (2002). Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging* 23:485-508
11. TARKOWSKI E. (2002). Cytokines in dementias. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy* 1: 193-200
- 30
12. TARKOWSKI E., LILJEROTH A. M., MINTHON L., TARKOWSKI A., WALLIN A., BLENNOW K. (2003). Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. *Brain Research Bulletin* 61: 255-260
13. CHU D.Q., SMITH D.M., BRAIN S.D.(2001). Studies of the microvascular effects of adrenomedullin and related peptides. *Peptides* 22:1881-1886
- 35
14. Karin Nilsson, Lars Gustavson, Björn Hultberg, Plasma Homocystein Concentration and Its Relation to Symptoms of Vascular Disease in Psychogeriatric Patients, *Dement Geriatr Cogn Disord* 2005; 20:35-41
- 40
15. M.D. Albadalejo, M. Antem, I. Pastor, C. Ruiz, R. Gonzalez-Aniorte, M. Asensio, Determinacion plasmatica de peptidos natriureticosen dementes, *Rev Neurol* 1997; 25 (139)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento *in vitro* para la detección y la detección precoz, para la determinación del grado de severidad y para la valoración evolutiva y la prognosis de la demencia de Alzheimer (AD), de la demencia con corpúsculos de Lewy (DLB), de la demencia frontotemporal (FTD) o de distintas formas de demencia vascular (VD), en el que en la sangre de un paciente que padece de trastornos cognitivos determinables subjetiva u objetivamente y con ayuda de un procedimiento de determinación inmunodiagnóstica se detecta un segmento central del péptido proatrialnatriurético (MR-proANP), y en el que sobre la base de la concentración medida se sacan conclusiones con respecto a la existencia de una enfermedad neurodegenerativa o de una forma precoz de la misma típica de ésta o bien con respecto a la evolución de la enfermedad y/o al éxito de los esfuerzos realizados para aliviarla o prevenirla.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** además del MR-proANP se determina adicionalmente el BNP y/o el CNP o bien un correspondiente copéptido de BNP o CNP formado a partir de un correspondiente propéptido.
- 20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por el hecho de que** el procedimiento de determinación inmunodiagnóstica es un inmunoensayo tipo sándwich.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** el mismo es realizado dentro del marco de la diagnosis del Alzheimer para la detección de formas precoces de la demencia de Alzheimer (AD).
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por el hecho de que** el mismo es realizado dentro del marco de una determinación multiparamétrica en la que se determina al mismo tiempo al menos un adicional parámetro bioquímico o fisiológico con valor diagnóstico para el respectivo cuadro de enfermedad, y en la que se obtiene un resultado de medición en forma de un juego de al menos dos magnitudes de medición que se evalúa para el diagnóstico de precisión de la enfermedad neurodegenerativa.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** dentro del marco de la determinación multiparamétrica además de la determinación de MR-proANP se determina al menos otro parámetro bioquímico seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de mediadores inflamatorios, componentes del complemento, citoquinas, quimioquinas, coagulantes sanguíneos y factores fibrinolíticos, proteínas de fase aguda y compuestos radicales.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, **caracterizado por el hecho de que** la determinación multiparamétrica se realiza como determinación simultánea mediante un dispositivo de medición basado en la tecnología de chips o un dispositivo de medición inmunocromatográfica.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado por el hecho de que** la evaluación del complejo resultado de medición de la determinación multiparamétrica se realiza con ayuda de un programa informático.

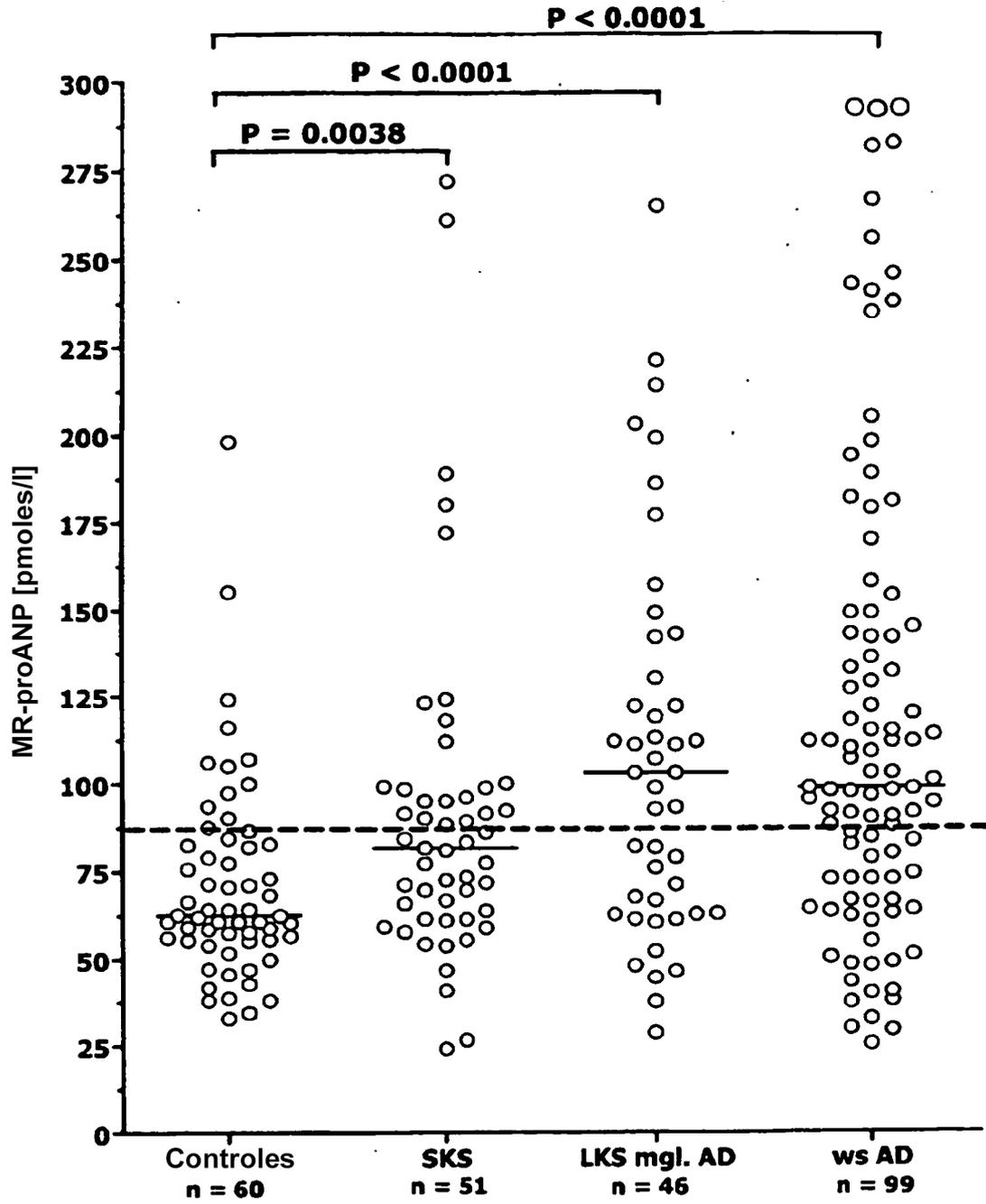


Figura 1