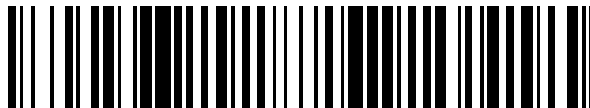


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 058**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2007** **E 07741099 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013** **EP 2006392**

54 Título: **Método para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer midiendo la tasa de degradación de beta-amiloide en sangre y reactivo de diagnóstico**

30 Prioridad:

13.04.2006 JP 2006110881

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

24.06.2013

73 Titular/es:

EIDIA CO., LTD. (100.0%)
1-10-6 Iwamoto-cho, Chiyoda-ku
Tokyo, JP

72 Inventor/es:

TAKAYAMA, SHIGEO

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 409 058 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

Método para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer midiendo la tasa de degradación de beta-amiloide en sangre y reactivo de diagnóstico

5 La presente invención se refiere a un método para someter a prueba una enfermedad en la que está implicado el β -amiloide, tal como enfermedad de Alzheimer, midiendo la tasa de degradación de β -amiloide en una muestra de sangre.

10 El β -amiloide (denominado a continuación en el presente documento " $A\beta$ ") es un componente principal de la placa amiloide que es característico del cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer (EA) y se sabe que $A\beta$ se produce por una β -secretasa que escinde una posición β de un sitio N-terminal de una proteína precursora del mismo (APP) y por una γ -secretasa que escinde un sitio C-terminal de APP que está presente en una membrana celular.

15 Se sabe que las especies moleculares de $A\beta$ tienen diversos tamaños de peso molecular. Las especies más conocidas de aquéllas relacionadas con neurotoxicidad son especies de $A\beta$ compuestas por 42 aminoácidos (denominadas a continuación en el presente documento " $A\beta$ 1-42"). El $A\beta$ 1-42 tiene una naturaleza que forma rápidamente fibras. Se sabe que $A\beta$ 1-42 se deposita en los estadios tempranos de EA para formar una placa amiloide. Se considera que $A\beta$ 1-42 es una de las sustancias que provoca la aparición de EA.

20 Tal como se describió anteriormente, ha habido un aumento en la investigación sobre el proceso amiloidogénico de $A\beta$ y la relación entre $A\beta$ y la aparición de EA. Por otro lado, en los últimos años, se está aclarando gradualmente una ruta de degradación de $A\beta$ producido. En particular, el grupo de Saidou *et al.* ha descubierto la presencia de neprilisina, que es una enzima de degradación de $A\beta$ localizada específicamente en células nerviosas del cerebro, y sugirieron que la EA puede estar provocada por un aumento en el nivel de $A\beta$ depositado en el cerebro debido a una disminución en la actividad de la enzima (documentos que no son de patente 1 a 3). Mientras tanto, aunque se considera que $A\beta$ se produce en el cerebro y se transfiere a la sangre por el líquido cefalorraquídeo, se desconoce que la degradación de $A\beta$ en una parte que incluye sangre distinta de tejidos cerebrales, incluya la presencia o ausencia de una ruta de degradación y una enzima degradadora. El documento EP 0564946 da a conocer que el grado de escisión proteolítica de un sustrato de APP en presencia de la muestra de un paciente podría ser indicativo de enfermedad de Alzheimer.

30 Con respecto al diagnóstico de EA, se ha investigado un intento para diagnosticar pacientes con EA, en el que se usa $A\beta$ 1-42 como marcador de la enfermedad, porque $A\beta$ 1-42 está estrechamente relacionado con la aparición de EA. Se ha notificado que la concentración de $A\beta$ 1-42 en el líquido cefalorraquídeo de un paciente con EA es reducida (documentos que no son de patente 4 a 7). Sin embargo, el uso de líquido cefalorraquídeo como muestra implica un alto riesgo de deterioro corporal o daño de funciones corporales para el paciente cuando está recogiendo la muestra. Por tanto, actualmente, en la práctica, no es práctico el uso de líquido cefalorraquídeo como muestra, y no ha llegado a generalizarse su uso. Por otro lado, se considera que las muestras de sangre (suero o plasma) son las más comunes como reactivos de diagnóstico *in vitro* y tienen un bajo riesgo de deterioro corporal. Sin embargo, es casi imposible detectar $A\beta$ en el suero usando los métodos de medición generales tales como el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo que se han llevado a cabo hasta ahora; por tanto no se ha descubierto la utilidad clínica de la medición de $A\beta$ en el suero. Esto sugiere que es muy difícil diagnosticar pacientes con EA midiendo $A\beta$ 1-42 en muestras de sangre (documento que no es de patente 8). En un estudio de diagnóstico de EA, en la actualidad, es muy problemático que no pueda realizarse el diagnóstico en una muestra de sangre usada generalmente como reactivo de diagnóstico *in vitro*.

Documento que no es de patente 1: Takaki Y, *et al.*, J. Biochem (Tokio). 2000; 128(6): 897-902.

Documento que no es de patente 2: Shiroani K, *et al.*, J. Biol. Chem. 2001 276(24); 21895-901.

Documento que no es de patente 3: Iwata N, *et al.*, Science. 2001 292(5521); 1550-2.

45 Documento que no es de patente 4: Tamaoka A, *et al.*, J. Neurol. Sci. 1997; 148: 41-45.

Documento que no es de patente 5: Andreasen N, *et al.*, Arch. Neurol. 1999; 56: 673-680.

Documento que no es de patente 6: Galasko D, *et al.*, Arch. Neurol. 1998; 55: 937-945.

Documento que no es de patente 7: Motter R, *et al.*, Ann Neurol 1995; 38: 643-648.

Documento que no es de patente 8: Tamaoka A, *et al.*, J. Neurol. Sci. 1996; 141: 65-68.

50 Documento que no es de patente 9: Namba *et al.*, Studies on New Immunoassay Method Using Electrochemiluminescence (ECL), JJCLA, 1996, vol. 21, n.º 5

Documento que no es de patente 10: Nature, 256, 459-497(1975)

Problemas que han de resolverse por la invención

5 La presente invención proporciona un método para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 1, que comprende medir una actividad de degradación de β -amiloide 1-42 en una muestra de sangre, en el que β -amiloide 1-42 significa β -amiloide humano compuesto por 42 aminoácidos.

La presente invención proporciona además el uso de un reactivo de diagnóstico para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer, según la reivindicación 3, que comprende, como componentes esenciales:

un péptido β -amiloide 1-42 que va a añadirse a una muestra de sangre, siendo el péptido β -amiloide 1-42, β -amiloide humano compuesto por 42 aminoácidos;

10 un anticuerpo que reconoce un sitio C-terminal del péptido β -amiloide 1-42; y

un anticuerpo que reconoce un sitio N-terminal del péptido β -amiloide 1-42,

en el que se usa el reactivo de diagnóstico para medir una cantidad residual del péptido β -amiloide 1-42 añadido a la muestra de sangre para medir una actividad de degradación de péptido β -amiloide 1-42 en la muestra de sangre.

Se exponen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes.

15 El inventor de la presente invención ha investigado si podría medirse o no la presencia o ausencia de degradación y metabolismo de un péptido $A\beta$ en suero humano con la idea de resolver los problemas mencionados anteriormente. Con el fin de confirmar la degradación de $A\beta$ 1-42 en sangre, se añadió un péptido sintético $A\beta$ 1-42 a suero humano, y se midió con el tiempo la cantidad residual de $A\beta$ 1-42. La medición se realizó mediante un inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo basado en el método de electroquimioluminiscencia (documento que no es de patente
20 9) en el que se usó un anticuerpo específico para el sitio N-terminal de $A\beta$ 1-42 como anticuerpo primario y se usó un anticuerpo específico para el sitio C-terminal de $A\beta$ 1-42 como anticuerpo secundario. Este método es un sistema de medición en el que es posible medir un $A\beta$ 1-42 de longitud completa pero es imposible medir fragmentos de $A\beta$ 1-42 producidos por degradación.

25 A partir de los resultados de la medición, se confirmó que el valor de medición del péptido sintético $A\beta$ 1-42 añadido disminuye con el paso del tiempo. Además, se confirmó que, cuando el péptido sintético $A\beta$ 1-42 se añadía a suero, se suprimía significativamente la disminución en el valor de medición del péptido sintético $A\beta$ 1-42 con el paso del tiempo, añadiendo por adelantado un inhibidor de proteasas que puede inhibir la actividad de la enzima en el suero.

30 Estos hechos significan que $A\beta$ se fragmenta y degrada rápidamente en la sangre por una proteasa, y esa medición basada en el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo que permite la medición de sólo un $A\beta$ 1-42 de longitud completa es imposible porque el péptido sintético $A\beta$ 1-42 añadido se fragmenta y digiere enzimáticamente en la sangre.

35 A continuación, se realizó una medición basada en el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo para muestras obtenidas añadiendo una cantidad apropiada de un péptido sintético $A\beta$ 1-42 a muestras de suero de pacientes con EA y sujeto normal y almacenando las mezclas a 25°C durante 20 horas. Se confirmó que, en todas las muestras, las proteasas en las muestras degradaron al péptido sintético $A\beta$ 1-42 porque los valores de medición disminuyen en el suero de pacientes con EA y sujetos normales en comparación con los medidos inmediatamente tras la adición del péptido sintético $A\beta$ 1-42. Los resultados obtenidos al comparar las tasas de disminución de los valores de medición en el suero de pacientes con EA y sujetos normales mostraron una diferencia significativa entre los mismos, y se confirmó la posibilidad de uso del suero para el diagnóstico de EA, mediante lo cual se ha logrado
40 la presente invención.

45 Es decir, el método para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 1, se caracteriza porque comprende medir la actividad de degradación de $A\beta$ en una muestra de sangre. Los ejemplos de un método de medición de la actividad de degradación de $A\beta$ incluyen un método que implica: añadir un péptido $A\beta$ en una muestra de sangre; medir la actividad para degradar el péptido tras el transcurso de un tiempo predeterminado; y comparar la actividad de degradación medida con la de sangre de sujetos normales.

50 El péptido $A\beta$ que va a añadirse a una muestra es un péptido que incluye un sitio que va a escindirse en el que el péptido $A\beta$ en un organismo vivo se escinde por una enzima degradadora tal como neprililina, y es un péptido $A\beta$ 1-42 humano. El método de medición de la cantidad residual del péptido $A\beta$ añadido implica un inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo en el que un anticuerpo reconoce el sitio N-terminal del péptido y un anticuerpo reconoce el sitio C-terminal del péptido. Es preferible que la muestra de sangre mencionada anteriormente sea suero o plasma.

El reactivo de diagnóstico de EA comprende, como componentes esenciales, un péptido $A\beta$ añadido a la muestra de

sangre, un anticuerpo que reconoce el sitio N-terminal del péptido A β , y un anticuerpo que reconoce el sitio C-terminal del péptido A β , y se caracteriza porque se mide la actividad de una enzima de degradación de péptido A β en una muestra de sangre midiendo la cantidad residual del péptido A β añadido a la muestra de sangre. El reactivo de diagnóstico tiene una constitución que varía según el inmunoensayo usado y el tipo del péptido A β añadido. Sin embargo, en el caso de usar el péptido A β 1-42 y el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo, el reactivo puede incluir, como componentes, un anticuerpo inmovilizado que reconoce el sitio N-terminal de A β 1-42 y un anticuerpo que reconoce el sitio C-terminal de A β 1-42 y está marcado con una sustancia de marcaje. Alternativamente, el reactivo puede incluir, como componentes, un anticuerpo inmovilizado que reconoce el sitio C-terminal de A β 1-42 y un anticuerpo que reconoce el sitio N-terminal de A β 1-42 y está marcado con una sustancia de marcaje. El anticuerpo que reconoce el sitio C-terminal de A β 1-42 no está limitado particularmente, pero es preferiblemente 21F12.

Pueden usarse tanto anticuerpos policlonales como anticuerpos monoclonales para los anticuerpos mencionados anteriormente en los métodos de prueba de la presente invención. Entre los anticuerpos mencionados anteriormente, el anticuerpo que reconoce el sitio C-terminal de A β 1-42 es preferiblemente un anticuerpo altamente específico para A β 1-42 pero no está limitado particularmente al mismo. Es preferible que la muestra de sangre mencionada anteriormente sea suero o plasma, pero la muestra puede ser sangre completa. Los ejemplos de la sustancia de marcaje incluyen sustancias fluorescentes, enzimas, pigmentos y sustancias luminiscentes y no está limitado particularmente, pero es preferible un complejo de rutenio. El soporte para la inmovilización no está limitado particularmente, y son preferiblemente perlas magnéticas.

Un método de medición de la cantidad residual de un péptido A β añadido no está limitado al inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo mencionado anteriormente. Por ejemplo, puede usarse un método que implica: preparar un péptido sintético A β marcado con una sustancia luminiscente o fluorescente; añadir el péptido preparado a sangre; y medir un cambio en la cantidad de luminiscencia o fluorescencia provocada por la degradación del péptido sintético A β añadido. La esencia de la presente invención reside en que puede medirse la actividad de degradación de A β de una composición en una muestra de sangre, según la reivindicación 1. Es decir, es un método para someter a prueba la EA midiendo la actividad o cantidad de una proteasa en una muestra de sangre. El punto específico de la presente invención es que puede diagnosticarse EA midiendo la tasa de degradación de un péptido A β añadido a una muestra de sangre, según la reivindicación 1, es decir, la actividad de una enzima de degradación de A β en la sangre.

Otro método de medición de la actividad de una enzima de degradación de A β en la sangre es un método en el que se usa un péptido A β marcado con un radioisótopo, una sustancia fluorescente o similar. Específicamente, el método comprende; marcar un sitio específico de A β con una sustancia fluorescente, añadir el péptido a una muestra de sangre y analizar la muestra mediante un analizador de HPLC equipado con un detector de fluorescencia tras el transcurso de un tiempo predeterminado para medir el tiempo para eluir la sustancia fluorescente. La degradación de un péptido A β puede medirse detectando un pico de un fragmento de péptido A β marcado con fluorescencia, que se detecta a un tiempo de elución diferente de un pico de un péptido A β no degradado marcado con fluorescencia.

Según la presente memoria descriptiva, es posible diagnosticar EA de manera más específica midiendo un pico específico para pacientes con EA incluso si está presente una pluralidad de productos de degradación del péptido A β . Mientras tanto, si se especifica un pico específico para EA, es posible especificar un sitio específico para EA en el que el péptido A β se escinde y desarrollar un reactivo de diagnóstico de EA con alta especificidad.

Efectos de la invención

La presente invención permite diagnosticar EA determinando el grado de degradación de un péptido sintético A β añadido a una muestra de sangre usando el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo en el que se usa un anticuerpo que reconoce específicamente un péptido A β para confirmar la intensidad de la actividad de degradación de péptido A β de una enzima según las reivindicaciones. Según la presente invención, es posible diagnosticar EA en una muestra de sangre tal como plasma y suero.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo experimental 1.

La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo experimental 2.

La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 1.

La figura 4 es una gráfica que muestra los resultados del ejemplo 2.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación se describe un caso, en el que usando suero como muestra de sangre y un péptido sintético A β 1-42

como péptido A β que va a añadirse a la muestra de suero, se adopta un inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo como método de cuantificación del péptido.

5 Se incuba a 25°C una mezcla obtenida añadiendo un péptido sintético A β 1-42 a una muestra de suero, y se separa una cantidad predeterminada de la mezcla. Entonces, se mide la cantidad residual del péptido sintético A β 1-42 mediante el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo para calcular la actividad de degradación del péptido en la muestra de suero. El valor resultante se compara con la actividad de degradación en suero de un sujeto normal para someter a prueba la presencia o ausencia de morbilidad de EA.

10 En el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo, se usan un anticuerpo que está inmovilizado en perlas magnéticas y que es específico para el sitio N-terminal de A β 1-42 y un anticuerpo que está marcado con un complejo de rutenio y que es específico para el sitio C-terminal, y el procedimiento debe llevarse a cabo según un método convencional. Es decir, se hace reaccionar la muestra separada con perlas magnéticas inmovilizadas con un anticuerpo para unirse a un péptido sintético A β 1-42, seguido por lavado (separación tipo BF). Posteriormente, se hace reaccionar con el mismo un anticuerpo secundario marcado para unirse al péptido sintético A β 1-42 unido a las perlas magnéticas, y se realiza un lavado. Finalmente, se permite que el complejo de rutenio, que es una sustancia de marcaje unida a las perlas magnéticas, emita luz aplicando al mismo energía eléctrica en presencia de triptofilamina, mediante lo cual se mide la cantidad del complejo de rutenio mediante la intensidad de luminiscencia.

El método de medición de la cantidad residual del péptido sintético A β 1-42 añadido no está limitado particularmente siempre que pueda determinarse la cantidad de A β 1-42, y puede emplearse un método distinto de los métodos inmunológicos.

20 Los anticuerpos que van a usarse en el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo pueden ser o bien anticuerpos monoclonales o bien anticuerpos policlonales siempre que sean un anticuerpo específico para el sitio N-terminal de A β 1-42 y un anticuerpo específico para el sitio C-terminal de A β 1-42.

25 El anticuerpo que reconoce el sitio N-terminal de A β 1-42 no está limitado a un anticuerpo que reconoce el sitio más N-terminal, y los ejemplos disponibles comercialmente de los mismos incluyen un anticuerpo 3D6 que es un anticuerpo que reconoce un sitio de aminoácidos 1-5 de A β 1-42 (fabricado por Innogenetics NV), un anticuerpo 6E10 que es un anticuerpo que reconoce un sitio de aminoácidos 10-16 (fabricado por Chemicon International, Inc.) y un anticuerpo 4G8 que reconoce un sitio de aminoácidos 17-24 (fabricado por Chemicon International, Inc.).

30 Los ejemplos disponibles comercialmente del anticuerpo que reconoce el sitio C-terminal de A β 1-42 incluyen: 21F12 (fabricado por Innogenetics NV) y 8G7 (fabricado por Nanotools GmbH) que son anticuerpos monoclonales de ratón; y AB5078P (fabricado por Chemicon International, Inc.) que es un anticuerpo policlonal de conejo.

35 También es posible emplear un método de medición de la tasa de degradación de un péptido sintético A β 1-40 en una muestra de sangre mediante el sistema de inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo en el que se usan un anticuerpo que reconoce el sitio C-terminal de A β 1-40 y un anticuerpo que reconoce el sitio N-terminal del mismo. En el caso en el que se use un anticuerpo 6E10 que reconoce un sitio de aminoácidos 10-16 como anticuerpo que reconoce el sitio N-terminal, es posible acortar el sitio N-terminal de un péptido sintético A β . Además, si se usa un anticuerpo que reconoce un sitio de degradación (escisión) de un péptido sintético A β , puede determinarse la presencia o ausencia de degradación en una muestra.

40 En el caso en el que se emplea un inmunoensayo como método de medición del péptido, puede seleccionarse apropiadamente la longitud de un péptido en vista de la especificidad o similar de un sitio de reconocimiento de un anticuerpo que va a usarse. En el método de la presente invención, un péptido sintético A β 1-42 que va a usarse como sustrato puede ser cualquiera de los péptidos fabricados por diferentes fabricantes siempre que el péptido tenga la misma secuencia de aminoácidos que la de A β 1-42 del ser humano. Los péptidos pueden sintetizarse mediante el método habitual tal como un método de síntesis en fase sólida.

45 Materiales para un soporte para inmovilizar el anticuerpo pueden ser vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno, poliamida, polietileno o polipropileno), metal o similar. El soporte puede adoptar la forma de un vaso, una placa plana, partículas o similares sin ninguna limitación particular. Es preferible que los materiales sean microperlas magnéticas (perlas magnéticas).

50 La inmovilización del anticuerpo sobre el soporte se realiza según el método habitual. En un caso en el que las perlas magnéticas se usan como soporte, es preferible el siguiente procedimiento; se hacen reaccionar perlas magnéticas y el anticuerpo en una disolución tampón, tras eso, se tratan las perlas magnéticas con un agente de bloqueo, y se conservan en el agente de bloqueo hasta que se usan.

55 La sustancia de marcaje que va a usarse en la presente invención no está limitada a una enzima, una sustancia luminosa, una sustancia fluorescente, un isótopo, y es preferible un complejo de rutenio. Se lleva a cabo el método de preparación del anticuerpo de marcaje según los métodos habituales. Por ejemplo, se hacen reaccionar el anticuerpo y un complejo de rutenio (éster de TAG-NHS Origen, fabricado por Igen Co.) en una disolución tampón, y entonces, se añade 2 M de glicina a la misma para provocar una reacción adicional. Tras eso, puede lograrse la

preparación purificando el anticuerpo marcado mediante cromatografía en columna de filtración en gel.

Un reactivo de diagnóstico (kit) basado en el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo comprende, como componentes esenciales, un anticuerpo específico para el sitio N-terminal de A β 1-42, un anticuerpo específico para el sitio C-terminal del mismo, y un péptido sintético A β 1-42. Obsérvese que el reactivo puede estar acompañado libremente por un tampón, una herramienta de medición o similar para la reacción. Tal como se describió anteriormente, puede seleccionarse apropiadamente un péptido sintético A β que va a añadirse a una muestra dependiendo de la especificidad de un anticuerpo que va a usarse.

Pueden prepararse los anticuerpos usados en la presente invención usando los métodos habituales. La preparación de un anticuerpo monoclonal implica usar un péptido que conserva el sitio C-terminal de A β 1-42 como antígeno, produciendo un material compuesto del mismo con una proteína transportadora según se requiera, e inoculando el material compuesto en un animal para inmunizarlo. Las células formadoras de anticuerpos obtenidas del hígado o los ganglios linfáticos del animal inmunizado mencionado anteriormente se fusionan con células de mieloma y se preparan seleccionando los hibridomas que producen anticuerpos que muestran una fuerte especificidad por el sitio C-terminal de A β 1-42. El procedimiento debe llevarse a cabo según los métodos conocidos existentes.

También puede usarse A β 1-42 como inmunógeno, pero puesto que los anticuerpos diana son anticuerpos que son específicos para el sitio C-terminal de A β 1-42, pueden seleccionarse apropiadamente péptidos que conservan, cada uno de ellos, el sitio C-terminal de A β 1-42, tales como A β 33-42. Generalmente, se usa un material compuesto del inmunógeno y una proteína transportadora para el antígeno, y puede prepararse el material compuesto usando diversos agentes de condensación, tales como ésteres activos de maleimida, carbodilimida y glutaraldehído. Pueden usarse albúmina sérica bovina, tiroglobulina, hemocianina y similares para la proteína transportadora y se usan generalmente métodos que implican el acoplamiento en una proporción de 1 a 5 veces.

El animal que se inmuniza con el inmunógeno puede ser un ratón, una cobaya o similar y puede llevarse a cabo la inoculación por vía subcutánea, por vía intramuscular o por vía intraperitoneal. En una administración del inmunógeno, puede administrarse como mezcla con adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund, y se lleva a cabo la administración generalmente una vez cada 2 a 5 semanas. Las células productoras de anticuerpos obtenidas del hígado o los ganglios linfáticos del animal inmunizado se forman en células fusionadas con células de mieloma y se aíslan como hibridomas. Pueden usarse células de mieloma que se originan a partir de ratones, ratas, seres humanos o similares, para las células de mieloma, y son preferibles las células que se originan a partir de la misma especie como las células productoras de anticuerpos, pero existen casos en los que pueden usarse células que se originan a partir de una especie diferente.

Puede llevarse a cabo la operación de fusión celular usando un método conocido como el método de Köhler y Milstein (documento que no es de patente 10). Pueden mencionarse polietilenglicol, virus Sendai o similares como agentes promotores de fusión. Puede llevarse a cabo la fusión celular generalmente haciendo reaccionar las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma en una razón de aproximadamente de 1:1 a 1:10 durante un periodo de aproximadamente 1 a 10 minutos usando una concentración de aproximadamente el 20 al 50% de polietilenglicol (peso molecular promedio de 1.000 a 4.000) a una temperatura de 20 a 40°C, y preferiblemente de 30 a 37°C.

Puede llevarse a cabo la selección de los hibridomas que producen anticuerpos que tienen especificidad por el sitio C-terminal de A β 1-42 usando diversos métodos inmunológicos. Por ejemplo, pueden emplearse el método ELISA, el método de inmunotransferencia de tipo Western o el método competitivo. Además, pueden seleccionarse anticuerpos que reaccionan con A β 1-42 y que no reaccionan con A β 1-40 usando el péptido A β 1-42 y el péptido A β 1-40.

Entonces se lleva a cabo la clonación por medio del método de dilución limitante, por ejemplo, de los pocillos que se han seleccionado de esta manera y pueden obtenerse los clones diana. Generalmente, se llevan a cabo la selección y el crecimiento de los hibridomas en un medio de cultivo de células animales (RPMI1640, por ejemplo) al que se le ha añadido HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) y que contiene desde el 10 hasta el 20% de suero bovino fetal. Los clones obtenidos de esta manera se trasplantan a las cavidades abdominales de un ratón BALB/C al que se le ha administrado de antemano Britstan, y se recoge el líquido abdominal que contiene una alta concentración del anticuerpo monoclonal después de 10 a 14 días y éste puede usarse como material de partida para la purificación del anticuerpo. Además, pueden cultivarse los clones y puede usarse el líquido de cultivo como material bruto para la purificación del anticuerpo. La recuperación de los anticuerpos monoclonales debe lograrse usando un método conocido para la purificación de inmunoglobulinas. Por ejemplo, puede lograrse por medios tales como fraccionamiento con sulfato de amonio, fraccionamiento con PEG y fraccionamiento con etanol, usando un material de intercambio aniónico o usando cromatografía de afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos policlonales usando los métodos habituales. Pueden prepararse como material compuesto inmunizando un animal tal como un conejo o una cobaya con el mismo procedimiento tal como se describió anteriormente usando un péptido cuya estructura principal es el sitio C-terminal de A β 1-42 como antígeno. Pueden obtenerse anticuerpos policlonales a través de purificación mediante los métodos descritos anteriormente midiendo la potencia de anticuerpo tras una extracción de sangre apropiada y usando el suero con la

alta potencia como material en bruto para la purificación del anticuerpo.

Un método de diagnóstico de EA midiendo la tasa de degradación de un péptido sintético A β añadido a una muestra de sangre (plasma, suero) basándose en el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo, es excelente y puede usarse para el diagnóstico de EA en una muestra de sangre. No se ha desarrollado un reactivo de diagnóstico *in vitro* que va a usarse para el diagnóstico de EA en el que se usa una muestra de sangre, y no se ha realizado ningún informe sobre algún intento de diagnosticar EA midiendo el grado de degradación de A β 1-42 centrándose en una enzima de degradación de A β en sangre. Por tanto, el inventor de la presente invención descubrió por primera vez que el método según la reivindicación 1 es útil para el diagnóstico de EA. La presente memoria descriptiva demuestra la disponibilidad clínica en muestras de sangre de pacientes con EA y sujetos normales midiendo la degradación de un péptido A β y permite el diagnóstico en una muestra de sangre para EA. Puede emplearse un método de medición de una enzima de degradación de A β y usarse para el diagnóstico de una enfermedad provocada por A β o similar.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, se describe en detalle la presente invención por medio de ejemplos, pero la presente invención no está limitada a los ejemplos ilustrativos que se describen a continuación siempre que no exista desviación alguna de las características esenciales de la presente invención.

(Ejemplo experimental 1) Inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo por electroquimioluminiscencia en el que se usan un anticuerpo 3D6 y un anticuerpo 21F12:

Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón 3D6 (fabricado por Innogenetics NV) que era un anticuerpo que reconoce un sitio de aminoácidos 1-5 de A β 1-42 como anticuerpo primario, y se marcó con un complejo de rutenio un anticuerpo monoclonal de ratón 21F12 (fabricado por Innogenetics NV) que era un anticuerpo de reconocimiento de sitio C-terminal de A β 1-42 y se usó como anticuerpo secundario.

A continuación en el presente documento, se describen los métodos usados para preparar los componentes constituyentes respectivos de un reactivo.

(1) Método de preparación de perlas magnéticas de unión a anticuerpo 3D6:

Se diluyó un anticuerpo monoclonal de ratón 3D6 hasta una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml con una disolución tampón fosfato de potasio 10 mmol/l (pH 7,8) y se mezclaron 0,5 ml del anticuerpo con 0,5 ml de las perlas magnéticas (DYNABEADS M-450 Epoxy, fabricadas por Dynal Co.) que tenían una concentración de 30 mg/ml. Se agitó la mezcla líquida durante 16 horas a 25°C de modo que se uniera el anticuerpo a las perlas magnéticas. Entonces, sólo se retiró la disolución líquida de la disolución de perlas magnéticas para eliminar los anticuerpos libres que no se habían unido a las perlas magnéticas y que permanecían en la disolución líquida. Entonces, se añadió 1 ml de un reactivo Block Ace al 4% (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) como agente de bloqueo, a las perlas magnéticas de unión a anticuerpo, y se agitó la mezcla durante 3 horas a 25°C. Entonces, se lavaron las perlas magnéticas con 10 ml del reactivo Block Ace al 4% (lavando cinco veces con 2 ml del reactivo Block Ace al 4%). Tras el lavado, se mezclaron las perlas magnéticas de unión al anticuerpo 3D6 con 0,5 ml del reactivo Block Ace al 4% y se almacenaron a 4°C hasta que fueron a usarse.

(2) Método de preparación de anticuerpo 21F12 marcado con complejo de rutenio:

Se diluyó un anticuerpo monoclonal de ratón 21F12 (fabricado por Innogenetics NV) hasta una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml con una disolución tampón fosfato de potasio 10 mmol/l (pH 7,8). Entonces, se añadieron 17,6 μ l de un complejo de rutenio 10 mg/ml (éster de TAG-NHS Origen, fabricado por Igen Co.) a 0,5 ml del anticuerpo 1 mg/ml, y se agitó la mezcla durante 30 minutos a 25°C. Tras eso, se añadieron 30 μ l de glicina 2 mol/l a la misma, y se agitó la mezcla durante 30 minutos a 25°C.

A continuación, se aplicó la disolución de anticuerpo marcado con rutenio a cromatografía en columna de filtración en gel (Sephadex G-25, fabricado por Amersham Biosciences K.K.) empaquetada en un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro y 30 cm de altura, y se aislaron los anticuerpos marcados con rutenio de los anticuerpos no marcados con rutenio y se purificaron. Se llevó a cabo una elución con una disolución tampón fosfato de potasio 10 mmol/l (pH 6,0).

(3) Medición de péptido A β 1-42 mediante inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo:

Se preparó el número requerido de vasos de poliestireno de 500 μ l (denominado a continuación en el presente documento "vasos de reacción"), y se vertieron en cada uno de los vasos de reacción 200 μ l de una disolución de reacción que contenía MOPS 50 mmol/l, Block Ace al 1% (p/v) (fabricado por Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), NaCl 0,15 mol/l, Tween 20TM al 0,01% (p/v), EDTA2Na 10 mmol/l y CHAPS al 0,1% (pH 7,2) (denominada a continuación en el presente documento "disolución de reacción"). Se añadieron a cada uno los vasos de reacción 20 μ l de una muestra obtenida diluyendo el péptido sintético A β 1-42 (fabricado por Peptide Institute, Inc.), el péptido

5 sintético A β 1-40 (fabricado por Peptide Institute, Inc.), el péptido sintético A β 1-11 (fabricado por Behem) y el péptido sintético A β 34-42 (fabricado por Sigma-Aldrich Japan K.K.) con la disolución de reacción hasta una concentración de 0, 1, 5, 10, 50, 100, 200 o 400 pg/ml. Posteriormente, se añadieron a cada uno de los vasos de reacción 25 μ l de perlas magnéticas de unión al anticuerpo 3D6 que se habían diluido hasta una concentración de 1 mg/ml con la disolución de reacción para permitir que avance una reacción durante 9 minutos a 30°C (primera reacción).

10 Posteriormente, se atraparon las perlas magnéticas con un imán y se retiró el líquido de los vasos de reacción. Se lavaron las perlas magnéticas dos veces con 350 μ l de Tris HCl 50 mmol/l, Tween 20 y NaCl 0,15 mol/l (pH 7,5) (denominada a continuación en el presente documento "disolución de lavado"), y se eliminaron las sustancias de unión no específica distintas de la reacción antígeno-anticuerpo. Entonces, se añadieron 200 μ l de un anticuerpo 21F12 marcado con rutenio que se había diluido hasta una concentración de 4 μ g/ml con la disolución de reacción y se hizo reaccionar durante 9 minutos a 30°C (segunda reacción). Tras la reacción, se atraparon las perlas magnéticas con un imán, y se retiró el líquido de los vasos. Se lavaron las perlas magnéticas dos veces con 350 μ l de una disolución de lavado y se eliminaron las sustancias de unión no específica distintas de la reacción antígeno-anticuerpo.

15 Posteriormente, se pusieron en cada vaso 300 μ l de triptofil-amina que es un sustrato luminiscente, y se mezclaron con las perlas magnéticas. El rutenio emitió luz cuando se aplicó energía eléctrica en este estado, y se detectó la intensidad de luminiscencia con un detector. A propósito, se llevó a cabo el procedimiento de medición tras la adición de las perlas magnéticas a los vasos de reacción descrita anteriormente con un dispositivo de medición de luminiscencia de rutenio automatizado Picolumi 8220 (fabricado por Sanko Junyaku Co., Ltd.). La tabla 1 y la figura 1 muestran los resultados.

[Tabla 1]

Resultados del ejemplo experimental 1

Muestra	Concentración de muestra (pg/ml)	Intensidad de luminiscencia EQL	Diferencia con respecto al blanco
Blanco	0	286,1	-
Péptido A β 1-42	1	771,0	484,9
	5	4124,5	3838,4
	10	9027,1	8741,0
	50	62800,0	62513,9
	100	138701,6	138415,5
	200	281159,2	280873,1
	400	600815,1	600529,0
Péptido A β 1-40	1	302,1	16,0
	5	297,8	11,7
	10	280,3	-5,8
	50	311,2	25,1
	100	290,1	4,0
	200	287,9	1,8
	400	307,9	21,8
Péptido A β 1-11	1	267,5	-18,6
	5	296,1	10,0
	10	288,3	2,2
	50	367,1	81,0
	100	290,4	4,3
	200	311,0	24,9
	400	291,1	5,0
Péptido A β 34-42	1	302,1	16,0
	5	277,1	-9,0
	10	293,7	7,6
	50	295,0	8,9
	100	290,2	4,1
	200	298,1	12,0
	400	287,3	1,2

25 Tal como se muestra en la tabla 1 y la figura 1, se confirmó que el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo era un sistema de medición que permitía una detección específica de sólo un péptido A β 1-42 de longitud completa pero incapacitaba la detección de un fragmento de A β .

(Ejemplo experimental 2) Prueba para confirmar la degradación de péptido sintético A β 1-42 por enzima en suero:

Se dispensó suero de un sujeto normal en dos microtubos (Immuno Ware Micro Tubes fabricados por Pierce, denominados a continuación en el presente documento "microtubos") en una cantidad de 90 µl cada uno. Entonces, se añadieron 9 µl de cóctel de inhibidor de proteasas (fabricado por Roche Diagnostics K. K.) a uno de los dos microtubos (denominado a continuación en el presente documento "muestra con inhibidor añadido"), mientras que se añadieron 9 µl de agua esterilizada al otro microtubo (denominado a continuación en el presente documento "muestra libre de inhibidor"). Entonces, se incubaron los tubos a 25°C.

Inmediatamente tras la preparación de las muestras (0 horas), 6 horas tras el inicio de la incubación y 20 horas tras el inicio de la incubación, se tomó como muestra una porción de 10 µl de cada muestra y se mezcló con 200 µl de una disolución de reacción en un microtubo (denominado a continuación en el presente documento "muestra diluida antes de la medición"). Se realizó la medición de las muestras diluidas antes de la medición inmediatamente tras la preparación mediante el inmunoensayo tipo sándwich de Aβ1-42 de la misma manera que el ejemplo experimental 1.

Los resultados de medición de las Intensidades de luminiscencia EQL se muestran en la tabla 2. En la tabla 2, se muestran los valores medidos para las muestras como razones relativas tomando que los valores medidos inmediatamente tras la preparación de las muestras son el 100%. La figura 2 es una gráfica que muestra las razones relativas.

[Tabla 2]

Resultados del ejemplo experimental 2

Muestra	Tiempo transcurrido tras el inicio de la incubación	Intensidad de luminiscencia EQL	Diferencia con respecto al blanco	% de razón relativa
Blanco		295,2	-	-
Muestra libre de inhibidor	0 horas	201217,2	200922,0	100
Muestra con inhibidor añadido		208443,8	208148,6	100
Blanco		280,9	-	-
Muestra libre de inhibidor	6 horas	91732,7	91451,8	46
Muestra con inhibidor añadido		201843,9	201563,0	97
Blanco		277,8	-	-
Muestra libre de inhibidor	20 horas	3850,1	3572,3	2
Muestra con inhibidor añadido		188281,8	188004,0	90

Tal como se muestra en la tabla 2 y la figura 2, el suero al que se ha añadido el péptido sintético Aβ1-42 tras la adición del inhibidor de proteasas proporcionó los resultados de que se había suprimido claramente la reducción en el valor medido con el paso del tiempo. Por tanto, se considera que los valores medidos se redujeron con el paso del tiempo en el sistema de inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo que permitió la detección de sólo un péptido Aβ1-42 de longitud completa, porque el suero contiene una enzima que puede degradar Aβ1-42 y el péptido sintético Aβ1-42 añadido se degrada por la enzima en fragmentos con el paso del tiempo. Por otro lado, los resultados sugirieron que, en el caso en el que se añadía un inhibidor de proteasas, la cantidad residual de Aβ1-42 era más grande en comparación con el caso en el que no se añadía inhibidor de proteasas, suprimiendo de ese modo una reducción en el valor medido, porque se inhibió la degradación de Aβ1-42 por la enzima.

(Ejemplo 1) Comparación de la tasa de degradación de Aβ1-42 en suero de pacientes con EA y sujetos normales:

En un número requerido de microtubos, se dispensaron suero de cada uno de los 30 pacientes con EA y suero de cada uno de los 30 sujetos normales en una cantidad de 100 µl cada uno. Se añadió 1 µl de un péptido sintético Aβ1-42 400 ng/ml a las muestras dispensadas. Al mismo tiempo, se preparó una sustancia patrón añadiendo 1 µl de un péptido sintético Aβ1-42 400 ng/ml a 100 µl de una disolución de reacción en lugar de una muestra de suero. Se incubaron el suero con péptido sintético Aβ1-42 añadido y la sustancia patrón a 25°C durante 20 horas.

Veinte horas tras el inicio de la incubación, se tomó como muestra una porción de 10 µl de cada muestra y se mezcló con 200 µl de una disolución de reacción en un microtubo, para producir de ese modo una muestra diluida antes de la medición. Se realizó la medición de las muestras diluidas antes de la medición inmediatamente tras la preparación mediante el inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo de la misma manera que el ejemplo experimental 1.

Los resultados de medición de las intensidades de luminiscencia EQL de los pacientes con EA se muestran en la tabla 3, y los resultados de medición de las intensidades de luminiscencia EQL de los sujetos normales se muestran en la tabla 4. En las tablas 3 y 4, se representa la razón relativa de una intensidad de luminiscencia de cada muestra como una tasa residual con respecto a la intensidad de luminiscencia de la sustancia patrón como el 100%. Además, las tablas muestran las tasas de degradación de Aβ1-42 (%), calculadas a partir de las tasas residuales. La tasa de degradación se calcula mediante la siguiente ecuación (1).

Tasa de degradación = $(1 - \text{intensidad de luminiscencia de la muestra} + \text{intensidad de luminiscencia de la sustancia patrón}) \times 100 \dots (1)$

5 Además, las tablas 3 y 4 muestran valores promedio de las tasas de degradación para los pacientes con EA y los sujetos normales, respectivamente. La figura 3 es una gráfica que muestra las tasas de degradación de Aβ1-42 de los pacientes con EA y los sujetos normales.

[Tabla 3]

Resultados de muestras de pacientes con EA en el ejemplo 1

Muestra	Intensidad de luminiscencia EQL	Diferencia con respecto al blanco	Tasa residual (%)	Tasa de degradación (%)	Valor promedio (%)
Blanco	283,5	-	-	-	-
Sustancia patrón	185636,1	185352,6	100	0	-
Pacientes con EA					
1	58851,8	58568,3	32	68	69
2	71864,7	71581,2	39	61	
3	64720,8	64437,3	35	65	
4	82682,7	82399,2	44	56	
5	45090,5	44807,0	24	76	
6	60320,9	60037,4	32	68	
7	64796,5	64513,0	35	65	
8	33154,1	32870,6	18	82	
9	27314,6	27031,1	15	85	
10	49100,1	48816,6	26	74	
11	38677,8	38394,3	21	79	
12	73834,7	73551,2	40	60	
13	55765,3	55481,8	30	70	
14	55550,0	55266,5	30	70	
15	40748,3	40464,8	22	78	
16	70231,4	69947,9	38	62	
17	49873,6	49590,1	27	73	
18	102935,4	102651,9	55	45	
19	62030,9	61747,4	33	67	
20	105944,0	105660,5	57	43	
21	54783,9	54500,4	29	71	
22	82510,7	82227,2	44	56	
23	50645,4	50361,9	27	73	
24	62341,1	62057,6	33	67	
25	37180,3	36896,8	20	80	
26	45537,1	45253,6	24	76	
27	24548,2	24264,7	13	87	
28	35322,8	35039,3	19	81	
29	25619,2	25335,7	14	86	
30	90013,5	89730,0	48	52	

[Tabla 4]

Resultados de muestras de sujetos normales en el ejemplo 1

Muestra	Intensidad de luminiscencia EQL	Diferencia con respecto al blanco	Tasa residual (%)	Tasa de degradación (%)	Valor promedio (%)
Blanco	283,5	-	-	-	-
Sustancia patrón	185636,1	185352,6	100	0	-
Sujetos normales					
1	8327,6	8044,1	4	96	
2	13559,4	13275,9	7	93	
3	2894,7	2611,2	1	99	
4	21526,1	21242,6	11	89	
5	6212,5	5929,0	3	97	

6	19143,9	18860,4	10	90	
7	31790,3	31506,8	17	83	
8	46978,0	46694,5	25	75	
9	24580,2	24296,7	13	87	
10	17087,3	16803,8	9	91	
11	19019,9	18736,4	10	90	
12	11035,9	10752,4	6	94	
13	48559,0	48275,5	26	74	
14	3850,1	3566,6	2	98	
15	8402,4	8118,9	4	96	89
16	18535,3	18251,8	10	90	
17	26507,6	26224,1	14	86	
18	25285,1	25001,6	13	87	
19	24973,5	24690,0	13	87	
20	31763,9	31480,4	17	83	
21	13458,4	13174,9	7	93	
22	46984,2	46700,7	25	75	
23	11783,4	11499,9	6	94	
24	27980,4	27696,9	15	85	
25	22642,8	22359,3	12	88	
26	24479,0	24195,5	13	87	
27	4375,3	4091,8	2	98	
28	31787,1	31503,6	17	83	
29	19323,7	19040,2	10	90	
30	19570,9	19287,4	10	90	

5 Tal como se muestra en las tablas 3 y 4 y la figura 3, se confirmó que las tasas de degradación de Aβ1-42 del grupo de sujetos normales eran mayores que las del grupo de pacientes con EA. Esto sugiere que la capacidad para degradar Aβ1-42 en sangre del grupo de sujetos normales es mayor que la del grupo de pacientes con EA. Además, se determinó mediante la prueba de la t que existía una diferencia significativa entre los dos grupos (p < 0,01) y el resultado revela que puede usarse el método de la presente invención para el diagnóstico de EA usando muestras de suero.

(Ejemplo 2) Comparación de la tasa de degradación de Aβ1-42 en suero de un paciente con EA y un sujeto normal mediante inmunoensayo de doble anticuerpo por electroquimioluminiscencia en el que se usan un anticuerpo 6E10 y un anticuerpo 21F12:

10 Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón 6E10 (fabricado por Chemicon International, Inc.) que reconoce un sitio de aminoácidos 10-16 de Aβ1-42 como anticuerpo primario y se usó un anticuerpo monoclonal de ratón 21F12 (fabricado por Innogenetics NV) que reconoce el sitio C-terminal de Aβ1-42 y que se marcó con complejo de rutenio como anticuerpo secundario. El método de preparación de perlas magnéticas de unión al anticuerpo 6E10, el método de preparación del anticuerpo 21F12 marcado con complejo de rutenio y el método de inmunoensayo tipo
 15 sándwich de doble anticuerpo fueron los mismos a los de en el ejemplo experimental 1. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6 y la figura 4.

[Tabla 5]

Resultados de muestras de pacientes con EA en el ejemplo 2

Muestra	Intensidad de luminiscencia EQL	Diferencia con respecto al blanco	Tasa residual (%)	Tasa de degradación (%)	Valor promedio (%)
Blanco	199,8	-	-	-	-
Sustancia patrón	48543,4	48343,7	100	0	-
Pacientes con EA					
31	20766,9	20567,2	43	57	
32	23410,7	23211,0	48	52	
33	20757,9	20558,2	43	57	
34	18542,0	18342,3	38	62	
35	16370,8	16171,1	33	67	
36	18571,4	18371,7	38	62	
37	13287,9	13088,2	27	73	
38	26418,2	26218,5	54	46	54
39	26393,8	26194,1	54	46	

40	29402,9	29203,2	60	40
41	15522,0	15322,3	32	68
42	28302,5	28102,8	58	42
43	25235,2	25035,5	52	48
44	22783,9	22584,2	47	53
45	30225,6	30025,9	62	38

[Tabla 6] Resultados de muestras de sujetos normales en el ejemplo 2

Muestra	Intensidad de luminiscencia EQL	Diferencia con respecto al blanco	Tasa residual (%)	Tasa de degradación (%)	Valor promedio (%)
Blanco	199,8	-	-	-	-
Sustancia patrón	48543,4	48343,7	100	0	-
Sujetos normales					
31	14591,8	14392,1	30	70	76
32	5206,2	5006,5	10	90	
33	15326,9	15127,2	31	69	
34	12944,4	12744,7	26	74	
35	13526,9	13327,2	28	72	
36	18627,1	18427,4	38	62	
37	5636,7	5437,0	11	89	
38	21588,1	21388,4	44	56	
39	13439,9	13240,2	27	73	
40	8579,5	8379,8	17	83	
41	15473,5	15273,8	32	68	
42	14528,0	14328,3	30	70	
43	6204,2	6004,5	12	88	
44	8663,9	8464,2	18	82	
45	4189,1	3989,4	8	92	

5 Tal como se muestra en las tablas 5 y 6 y la figura 4, se confirmó que las tasas de degradación de A β 1-42 del grupo de sujeto normal eran mayores que las del grupo de pacientes con EA. Como en el ejemplo 1, se determinó mediante la prueba de la t que existía una diferencia significativa entre los dos grupos, es decir, un grupo de los pacientes con EA y un grupo de los sujetos normales ($p < 0,01$). Esto revela que puede realizarse el diagnóstico de EA mediante un ensayo tipo sándwich en el que se usó el anticuerpo 6E10 que reconoce un sitio de 10-16 aminoácidos en lugar del anticuerpo 3D6 que reconoce un sitio de 1-5 aminoácidos del extremo N-terminal de A β 1-42.

Aplicabilidad industrial

10 El método según la reivindicación 1, que permite la medición de una actividad de enzima de degradación de A β 1-42 en sangre, puede usarse para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en una muestra de sangre (suero, plasma).

REIVINDICACIONES

1. Método para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho método

añadir un péptido β -amiloide 1-42 a una muestra de sangre, en el que β -amiloide 1-42 significa β -amiloide humano compuesto por 42 aminoácidos y en el que el péptido β -amiloide 1-42 incluye un sitio que va a escindir-se por una enzima degradadora,

medir una cantidad residual del péptido β -amiloide 1-42 añadido a la muestra de sangre mediante un inmunoensayo tipo sándwich de doble anticuerpo, en el que se usan un anticuerpo que reconoce un sitio C-terminal del péptido β -amiloide 1-42 que va a añadirse a la muestra de sangre y un anticuerpo que reconoce un sitio N-terminal del mismo, para medir una actividad de degradación de péptido β -amiloide 1-42 en la muestra de sangre, y

comparar la actividad de degradación medida con la de la sangre de sujetos normales.
2. Método para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer según la reivindicación 1, en el que la muestra de sangre es suero o plasma.
3. Uso de un reactivo de diagnóstico para someter a prueba la enfermedad de Alzheimer, que comprende, como componentes esenciales:

un péptido β -amiloide 1-42 que va a añadirse a una muestra de sangre; siendo el péptido β -amiloide 1-42, β -amiloide humano compuesto por 42 aminoácidos e incluyendo el péptido β -amiloide 1-42 un sitio que va a escindir-se por una enzima degradadora;

un anticuerpo que reconoce un sitio C-terminal del péptido β -amiloide 1-42; y

un anticuerpo que reconoce un sitio N-terminal del péptido β -amiloide 1-42,

en el que se usan el anticuerpo que reconoce un sitio C-terminal del péptido β -amiloide 1-42 y el anticuerpo que reconoce un sitio N-terminal del péptido β -amiloide 1-42 para medir una cantidad residual del péptido β -amiloide 1-42 añadido a la muestra de sangre para medir una actividad de degradación de péptido β -amiloide 1-42 en la muestra de sangre.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la muestra de sangre es suero o plasma.

FIG.1

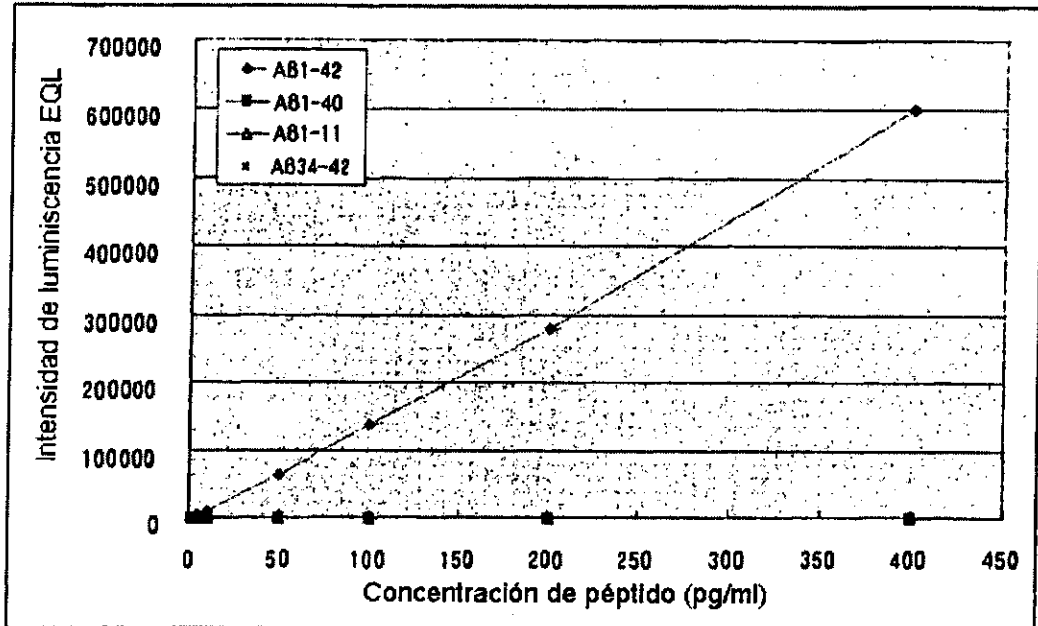


FIG.2

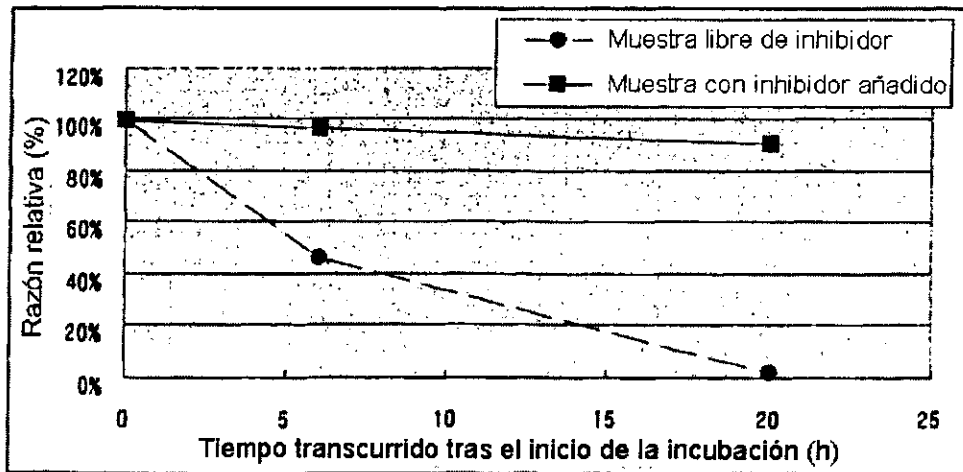


FIG.3

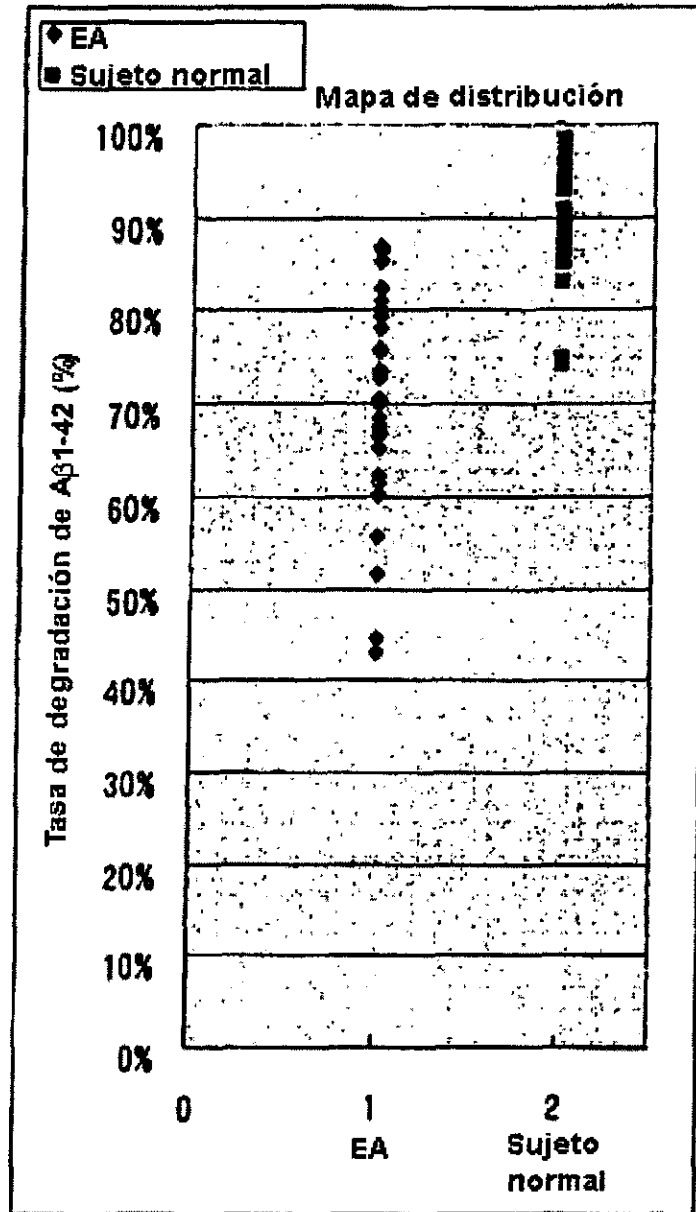


FIG.4

