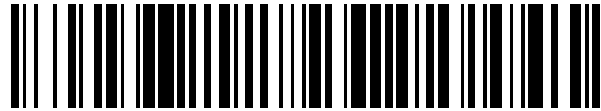


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 455**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2004 E 10002682 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2211183**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

19.11.2003 US 523796 P

30.04.2004 US 566783 P

30.04.2004 US 566782 P

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

05.07.2013

73 Titular/es:

RULES-BASED MEDICINE, INC. (33.3%)

3300 Duval Road Suite 110

Austin, TX 78759, US;

THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND

STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (33.3%) y

U.S. GOVERNMENT REPRESENTED BY THE

DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS (33.3%)

72 Inventor/es:

RAY, SANDIP y

WYSS-CORAY, ANTON

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 411 455 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 para el diagnóstico y la monitorización de la enfermedad de Alzheimer

Antecedentes de la invención

5 Se estima que 4,5 millones de americanos tienen la enfermedad de Alzheimer ("EA"). En el año 2050, se estima que el intervalo de prevalencia de EA sea de 11,3 millones a 16 millones. Actualmente, el coste social de la EA para los EE. UU. es de 100.000 millones de dólares por año, incluyendo 61.000 millones de dólares nacidos de empresas de los EE. UU. Ni Medicare ni el seguro médico más privado cubre el cuidado a largo plazo que la mayoría de los pacientes necesita.

10 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa del sistema nervioso central asociada con la pérdida de memoria progresiva que da como resultado la demencia. Se observan dos características patológicas en los pacientes de EA en la autopsia: placas extracelulares y marañas intracelulares en el hipocampo, corteza cerebral, y otras áreas del cerebro esenciales para la función cognitiva. Las placas se forman mayormente del depósito de beta-amiloide ("A β "), un péptido derivado de la proteína precursora amiloide ("APP"). Las marañas filamentosas se forman de filamentos helicoidales apareados compuestos de neurofilamentos y proteína tau hiperfosforilada, una proteína asociada a microtúbulos. Sin embargo, no queda claro si estos dos cambios patológicos están asociados sólo con la enfermedad o si en verdad están implicados en el proceso degenerativo. La EA de inicio tardío/espóradica presenta una patología virtualmente idéntica a la EA heredada de inicio temprano/familiar (FAD), lo que sugiere, por tanto, rutas patogénicas comunes para ambas formas de EA. Hasta la fecha, los estudios genéticos han identificado tres genes que provocan EA de inicio temprano, autosómica dominante la proteína precursora amiloide ("APP"), presenilina 1 ("PS1"), y presenilina 2 ("PS2"). Un cuarto gen, apolipoproteína E ("ApoE"), es el factor de riesgo genético más fuerte y más común para la EA, pero no necesariamente la provoca. Todas las mutaciones asociadas con las proteínas APP y PS pueden dar lugar a un incremento en la producción de péptidos A β , específicamente la forma más amiloidógena, A β ₄₂. Además de las influencias genéticas sobre la formación de placas amiloides y marañas intracelulares, los factores ambientales (por ejemplo, citocinas, neurotoxinas, etc.) también pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo y la progresión de la EA.

15 La característica clínica principal de la EA es un deterioro cognitivo progresivo que da lugar a una pérdida de memoria. La disfunción de memoria implica un impedimento para aprender nueva información que a menudo se caracteriza como una pérdida de memoria a corto plazo. En las fases temprana (leve) y moderada de la enfermedad, puede parecer que se preserva un recuerdo de material bien aprendido, remoto, pero la nueva información no se puede incorporar adecuadamente en la memoria. La desorientación en el tiempo está estrechamente relacionada con la alteración de la memoria.

20 Las alteraciones en el lenguaje también son una parte prominente de la EA. A menudo se manifiestan, en primer lugar, como una dificultad para encontrar las palabras en el habla espontánea. A menudo, el lenguaje de los pacientes con EA es vago, carente de detalles y puede tener un incremento de frases automáticas y clichés. La dificultad para nombrar los objetos cotidianos a menudo es por deficiencias complejas prominentes en la función visual que están presentes en muchos pacientes con EA, ya que son deficiencias cognitivas focales tales como apraxia, acalculia y desorientación izquierda-derecha. Con frecuencia se observan alteraciones en el juicio y en la resolución de problemas.

25 En la EA también son comunes síntomas no cognitivos o de conducta y pueden representar una proporción incluso mayor de carga o estrés para el cuidador que la disfunción cognitiva. Comúnmente se informa de cambios en la personalidad y de variaciones de pasividad progresiva a agitación marcada. Los pacientes pueden presentar cambios tales como una disminución en las expresiones de afecto. Los síntomas depresivos están presentes hasta en un 40 %. También se ha reconocido una tasa de ansiedad similar. Se produce psicosis en un 25 %. En algunos casos, los cambios en la personalidad pueden preceder a alteraciones cognitivas.

Actualmente, el procedimiento primario de diagnóstico de la EA en pacientes vivos implica obtener una historia clínica detallada del paciente, realizar pruebas de memoria y psicológicas, y descartar otras explicaciones para la pérdida de memoria, incluyendo trastornos temporales (por ejemplo, depresión o carencia de vitamina B₁₂) o permanentes (por ejemplo, apoplejía). Sin embargo, estos procedimientos de diagnóstico clínico no son infalibles.

30 Un obstáculo para el diagnóstico es establecer con exactitud el tipo de demencia; la EA sólo es una de las setenta afecciones que producen demencia. Debido a esto, la EA no se puede diagnosticar con completa precisión hasta después de la muerte, cuando la autopsia revela placas amiloides y marañas neurofibrilares características de la enfermedad en el cerebro del paciente. Además, los procedimientos de diagnóstico clínico sólo son útiles después de que los pacientes hayan comenzado a presentar pérdida de memoria o cambios en la personalidad anormales significativos. Para entonces, es probable que el paciente haya tenido EA durante años.

35 Dada la magnitud del problema para la salud pública planteado por la EA, se han emprendido considerables esfuerzos de investigación para aclarar la etiología de la EA así como para identificar los biomarcadores (proteínas o metabolitos secretados) que se pueden usar para diagnosticar y/o predecir si es probable que una persona

desarrolle la EA. Debido a la EA, el SNC está relativamente aislado de los otros órganos y sistemas del organismo, la mayoría de la investigación (con respecto tanto a la etiología de la enfermedad como a los biomarcadores) se ha centrado en acontecimientos, expresión génica, biomarcadores, etc. dentro del sistema nervioso central. Con respecto a los biomarcadores, las proteínas beta-amiloide y tau son probablemente las mejor caracterizadas. La

5 investigación ha demostrado que las muestras del líquido cefalorraquídeo ("LCR") de pacientes con EA contienen cantidades de tau más altas de lo normal, lo que se libera cuando se degeneran las neuronas, y cantidades de beta amiloide más bajas de lo normal, presuntamente porque queda atrapada en el cerebro en forma de placas amiloides. Debido a que estos biomarcadores se liberan en el LCR, se requiere una punción lumbar (o "punción espinal") para obtener una muestra para las pruebas.

10 Se han emitido varias patentes de los EE. UU. con relación a procedimientos para el diagnóstico de la EA, incluyendo las patentes de los EE. UU. N.º 4.728.605, 5.874.312, 6.027.896, 6.114.133, 6.130.048, 6.210.895, 6.358.681, 6.451.547, 6.461.831, 6.465.195, 6.475.161, 6.495.335, el documento US 2003/064416 y el documento US 2003/119074.

15 Adicionalmente, varios informes en la bibliografía científica hacen referencia a determinados marcadores bioquímicos y su correlación/asociación con la EA, incluyendo Fahnestock *et al*, 2002, *J. Neural Transm. Suppl.* 2002(62):241-52; Masliah *et al*, 1195, *Neurobiol. Aging* 16(4):549-56; Power *et al*, 2001, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12(2):167-70; y Burbach *et al*, 2004, *J. Neurosci.* 24(10):421-30. Adicionalmente, Li *et al*. (2002, *Neuroscience* 113(3):607-15) y Sanna *et al*. (2003, *J. Clin. Invest.* 111(2):241-50) han investigado la leptina con relación a la memoria y la esclerosis múltiple, respectivamente.

20 Los factores de crecimiento insulinoideos y las proteínas de unión a factores de crecimiento insulinoideos en el líquido cefalorraquídeo y el suero de pacientes con demencia de tipo Alzheimer se divulgan en Tham *et al.*, *Journal of neural transmission Parkinson's disease and dementia section 5* (1993), 165-176. Los marcadores biológicos y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer se describen en Galasko, *Journal of molecular neuroscience* 17 (2001), 119-125.

25 **Breve resumen de la invención**

Los inventores han descubierto una colección de marcadores bioquímicos, presentes en el suero de los individuos, que están alterados en individuos con enfermedad de Alzheimer ("EA"). En consecuencia, estos biomarcadores ("biomarcadores de diagnóstico de EA") se pueden usar para evaluar la función cognitiva, para diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de la EA y/o para medir la progresión de la EA en pacientes con EA. Los marcadores de

30 diagnóstico de EA se pueden usar individualmente o en combinación para el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de la EA. La invención proporciona procedimientos para la ayuda en el diagnóstico de la EA en un individuo midiendo la cantidad de al menos IGFBP-2 en una muestra de fluido biológico periférico que es una muestra de sangre o de orina del individuo y comparar la cantidad medida con un valor de referencia para cada biomarcador de diagnóstico de EA medido. La información así obtenida se puede usar para ayudar en el diagnóstico o para

35 diagnosticar la EA en el individuo. En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), que comprende comparar un nivel medido de al menos IGFBP-2 en una muestra de fluido biológico periférico que es una muestra de sangre u orina de un individuo con un nivel de referencia para el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR;

40 IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En algunos ejemplos, el biomarcador para el diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico

45 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina-6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombospoetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformador beta 3 (TGF- β 3), y

50 factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). En otros ejemplos, el marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, sIL-6R, IL-8, leptina, MIP-1 δ , PDGF-BB, y TIMP-1. En otros ejemplos adicionales, el marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en SEL-6R, IL-8, y TIMP-1. En otros ejemplos, el marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, MIP-1 δ , y TIMP-1. En ejemplos adicionales, el marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES. En ejemplos adicionales, el marcador de diagnóstico de la EA comprende BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.

Se divulgan en el presente documento procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), que comprenden comparar un nivel medido de al menos cuatro biomarcadores de diagnóstico de la EA, en los que dichos biomarcadores comprenden BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES, en una muestra de fluido biológico

60 periférico como se define en las reivindicaciones de un individuo con un nivel de referencia para cada biomarcador de diagnóstico de la EA. En algunos ejemplos, la EA es diagnóstica cuando el BDNF disminuye al menos

aproximadamente en un 20 % en comparación con un nivel de referencia de BDNF. En otros ejemplos, la EA se diagnostica cuando la leptina disminuye al menos aproximadamente en un 25 % en comparación con un nivel de referencia de leptina. En ejemplos adicionales, la EA se diagnostica cuando RANTES disminuye al menos aproximadamente en un 16 % en comparación con un nivel de referencia de RANTES. En ejemplos adicionales, la EA grave se diagnostica cuando PDGF-BB disminuye al menos aproximadamente en un 85 % en comparación con un nivel de referencia de PDGF-BB. En otros ejemplos adicionales, la muestra de fluido biológico es una muestra de fluido biológico periférico.

Se proporciona en el presente documento procedimientos para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer ("EA") en un paciente con EA, que comprende: comparar un nivel medido de al menos IGFBP-2 en una muestra de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones de un individuo con un nivel de referencia para el biomarcador se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3;NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En algunos ejemplos, el biomarcador para el diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina-6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombotopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformador beta 3 (TGF-β3), y factor de necrosis tumoral beta (TNF-β). En otros ejemplos, el marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.

Los inventores también han descubierto procedimientos de identificación de individuos con deficiencia cognitiva leve (DCL), un trastorno clínicamente reconocido distinto de la EA en el que el conocimiento y la memoria son levemente deficientes. Los inventores han descubierto que el biomarcador RANTES disminuye en individuos con DCL. Se pueden distinguir los individuos con DCL de los individuos con EA midiendo los biomarcadores que se reducen en los pacientes con EA, pero no en los individuos con DCL (por ejemplo, leptina). En consecuencia, se divulgan en el presente documento procedimientos para el diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de DCL obteniendo un valor medido para el nivel de RANTES en una muestra de fluido biológico periférico y comparando el valor medido frente a un valor de referencia. Dichos procedimientos incluyen obtener un valor de medición para niveles de leptina en la muestra de fluido biológico periférico y comparar ese nivel medido frente a un valor de referencia. La información así obtenida se puede usar para ayudar en el diagnóstico o para diagnosticar la DCL en el individuo.

Además, los inventores han descubierto procedimientos de estratificación de pacientes con EA (es decir, clasificar individuos con un diagnóstico probable de EA o diagnosticados con EA en diferentes clases de EA) obteniendo valores medidos para los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico periférico de un paciente con EA. Los niveles medidos de estos dos biomarcadores se comparan con valores de referencia. La información así obtenida se puede usar para ayudar en la estratificación del diagnóstico de la EA (o diagnóstico de EA probable) del individuo. En consecuencia, se divulgan en el presente documento procedimientos para estratificar la enfermedad de Alzheimer (EA) en un individuo, que comprende comparar valores medidos para los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico de dicho paciente con valores de referencia para BDNF y PDGF-BB. En algunos ejemplos, la muestra de fluido biológico es una muestra de fluido periférico, incluyendo sangre, suero o plasma. En otros ejemplos, el procedimiento comprende además comparar valores medidos para niveles de leptina y Rantes con valores de referencia para leptina y Rantes, en el que los valores de referencia para BDNF, PDGF-BB, leptina y Rantes son para muestras de individuos con puntuaciones de MMSE de 25 a 28, en el que un incremento en los niveles de leptina y PDGF-BB y en el que los niveles de BDNF y RANTES permanecen sustancialmente iguales indican EA leve, como se indica por una puntuación de MMSE de 20-25. En ejemplos adicionales, el procedimiento comprende además comparar valores medidos para niveles de leptina y Rantes con valores de referencia para leptina y Rantes, en el que los valores de referencia para BDNF, PDGF-BB, leptina y Rantes son para muestras de individuos con puntuaciones de MMSE de 20-25, en el que una disminución en los niveles de Rantes, BDNF, y PDGF y en el que los niveles de leptina permanecen sustancialmente iguales indican EA moderada, como se indica por una puntuación de MMSE de 10-20.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") obteniendo un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico, como se define en las reivindicaciones, de un individuo, en los que el biomarcador de diagnóstico de la EA es del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador

neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), y comparando el nivel medido con el nivel de referencia. En algunas realizaciones, los niveles medidos se obtienen para al menos dos, tres, cuatro o cinco biomarcador de diagnóstico de la EA. En algunas realizaciones, la comparación del valor medido y el valor de referencia incluye calcular una diferencia en veces entre el valor medido y el valor de referencia. En algunas realizaciones, el valor medido se obtiene midiendo el nivel del/de los biomarcador(es) de diagnóstico de la EA en la muestra, mientras que en otras realizaciones, el valor medido se obtiene de un tercer grupo. También se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") comparando un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico definida en las reivindicaciones de un individuo con un nivel de referencia. Además, se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") midiendo un nivel de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones de un individuo, en los que una disminución en comparación con un nivel de referencia sugiere un diagnóstico de EA.

En otro aspecto, se divulgan procedimientos para ayudar en el diagnóstico de dificultad cognitiva leve (DCL) obteniendo un nivel medido para RANTES en una muestra de fluido biológico periférico de un individuo, y comparando el nivel medido con un nivel de referencia.

El procedimiento para ayudar en el diagnóstico de DCL también incluye obtener un valor medido para leptina en la muestra de fluido biológico periférico y comparar el valor medido para leptina con un nivel de referencia. El valor medido se obtiene midiendo el nivel de RANTES (y/o leptina) en la muestra, mientras que en otros aspectos, el/los valor(es) medido(s) se obtiene(n) a partir de un tercer grupo. También se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico de dificultad cognitiva leve (DCL) comparando un nivel medido para RANTES, y opcionalmente leptina, en una muestra de fluido biológico periférico de un individuo con un nivel de referencia. Además, se proporcionan procedimientos para ayudar en el diagnóstico de DCL midiendo un nivel para RANTES, y opcionalmente leptina, en una muestra de fluido biológico periférico de un individuo, en los que una reducción en el nivel de RANTES en comparación con un nivel de referencia sugiere un diagnóstico de DCL (en aspectos en los que se mide leptina, un nivel de leptina que es igual a o mayor que el nivel de referencia también sugiere DCL).

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un paciente con EA obteniendo un valor medido para leptina en una muestra de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones y comparar dicho valor medido para leptina con un valor de referencia. En determinadas realizaciones, el valor medido se obtiene midiendo el nivel de leptina en la muestra que se produce, mientras que en otras realizaciones, el valor medido se obtiene a partir de un tercer grupo. También se proporcionan procedimientos para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA comparando un valor medido para leptina en una muestra de fluido biológico periférico, tal como se define en las reivindicaciones, con un valor de referencia. Además, se divulgan procedimientos para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA midiendo un nivel para leptina en una muestra de fluido biológico periférico, en los que una disminución en leptina en comparación con un valor de referencia sugiere progresión (incremento en la gravedad) de la EA.

En otro aspecto, se divulgan procedimientos para estratificar la EA en un paciente con EA.

La estratificación entre EA leve y más avanzada se lleva a cabo obteniendo un valor medido para los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en una muestra de fluido biológico periférico de un paciente con EA, y comparando el valor medido con valores de referencia para BDNF.

La estratificación entre EA leve, moderada, y grave se lleva a cabo obteniendo niveles para BDNF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), y comparando los niveles medidos con los niveles de referencias para BDNF y PDGF-BB. El valor medido se obtiene midiendo el/los nivel(es) de BDNF (y PDGF-BB) en la muestra para producir el/los valor(es) medido(s), mientras que en otras realizaciones, el/los valor(es) medido(s) se obtiene(n) a partir de un tercer grupo. También se proporcionan procedimientos para estratificar EA en un paciente con EA comparando un nivel de BDNF (y, opcionalmente, PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico periférico de un paciente con EA con un valor de referencia para BDNF (y PDGF-BB cuando sea apropiado). Además, se proporcionan procedimientos para estratificar EA en un paciente con EA midiendo un nivel de BDNF (y, opcionalmente, un nivel de PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico periférico, en el que un nivel bajo de BDNF (en comparación con un valor de referencia) sugiere EA leve, un nivel alto de BDNF (en comparación con un valor de referencia) sugiere EA más avanzada, un nivel alto de BDNF y un nivel bajo de PDGF-BB (en comparación con valores de referencia) sugiere EA moderada, y un nivel alto de BDNF y un nivel alto de PDGF-BB (en comparación con valores de referencia) sugiere EA grave.

En algunas realizaciones, la muestra de fluido biológico periférico es una muestra de sangre. En determinadas realizaciones, la muestra de fluido biológico periférico es una muestra de plasma. En otras realizaciones, la muestra de fluido biológico periférico es una muestra de suero.

En otro aspecto adicional, se divulgan procedimientos de identificación de agentes candidatos para el tratamiento de

la enfermedad de Alzheimer sometiendo a ensayo un agente candidato potencial para determinar su actividad en la modulación de un biomarcador de la EA, en los que el biomarcador de la EA es del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2(NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). Se proporcionan en el presente documento procedimientos de identificación de un agente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprenden: someter a ensayo un agente candidato potencial para determinar su actividad en la modulación de un biomarcador de la EA, dicho biomarcador de la EA se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En algunos ejemplos, los biomarcadores de la EA se seleccionan del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.

En otro aspecto, se divulgan kits para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) incluyendo al menos un reactivo específico para un marcador de diagnóstico de la EA, en los que el marcador de diagnóstico de la EA es del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), e instrucciones para llevar a cabo un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de EA descrito en el presente documento. Se divulgan en el presente documento kits que comprenden al menos un reactivo específico para al menos un marcador de diagnóstico de la EA, dicho al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MEP-1d; IL-3; FGF- 6; IL-6R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R e instrucciones para llevar a cabo los procedimientos proporcionados en el presente documento. Adicionalmente, se divulgan en el presente documento conjuntos de valores de referencia para los biomarcadores de diagnóstico de la EA que comprenden BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES y un conjunto de reactivos específicos para los biomarcadores de diagnóstico de la EA, en los que dichos biomarcadores comprenden BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.

En otro aspecto, se divulgan kits para identificar individuos con dificultad cognitiva leve (DCL) incluyendo al menos un reactivo específico para RANTES; e instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de ayuda en el diagnóstico de DCL descrito en el presente documento. Los kits para identificar individuos con DCL también pueden incluir un reactivo específico para leptina.

En otro aspecto adicional, se divulgan kits para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) en pacientes con EA incluyendo al menos un reactivo específico para leptina; e instrucciones para llevar a cabo un procedimiento de monitorización de la progresión de la EA descrito en el presente documento.

En otro aspecto, se divulgan kits para estratificar pacientes con la enfermedad de Alzheimer (EA) incluyendo al menos un reactivo específico para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), al menos un reactivo específico para el factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), e instrucciones para llevar a cabo un procedimiento de estratificación en un paciente con EA descrito en el presente documento. En otros ejemplos adicionales, los kits comprenden marcadores de diagnóstico de la EA que se seleccionan del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES. En otros ejemplos de kits, el reactivo específico para el biomarcador de diagnóstico de la EA es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que es específico para dicho biomarcador de diagnóstico de la EA. En otros ejemplos, los kits comprenden además al menos un reactivo específico para un biomarcador que mide características de la muestra.

Se divulgan en el presente documento superficies que comprenden unidas a ellas, al menos un reactivo específico para cada biomarcador de diagnóstico de la EA en un conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA, en el que dicho conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA comprende BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES. Se divulgan en el presente documento superficies que comprenden unidas a ellas, al menos un reactivo específico para cada biomarcador de diagnóstico de la EA en un conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA, en el que cada conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES; y al menos un reactivo específico para un biomarcador que mide características de la muestra. En otros ejemplos, se divulgan en el

presente documento superficies en las que dicho reactivo específico para dicho biomarcador de diagnóstico de la EA es un anticuerpo, o fragmento del mismo que es específico para dicho biomarcador de diagnóstico de la EA.

5 Se divulgan en el presente documento combinaciones que comprenden las superficies como se describen en el presente documento que tienen unidas a ellas al menos un reactivo específico para cada biomarcador de diagnóstico de la EA y una muestra de fluido biológico periférico de un individuo. En algunos ejemplos, el individuo tiene al menos 60, 65, 70, 75, 80, u 85 años de edad.

Se divulgan en el presente documento procedimientos para obtener valores para la comparación del nivel medido con el nivel de referencia de muestras de fluido biológico. Se divulgan formatos legibles por ordenador que comprenden los valores obtenidos por los procedimientos descritos en el presente documento.

10 Breve descripción de los dibujos

15 Las fig. 1A-1C muestran resultados de ELISA para 3 proteínas, la fig. 1A BDNF; la fig. 1B leptina; y la fig. 1C RANTES, seleccionados de la lista de la tabla 3 mostrada en el presente documento en los ejemplos. Se compararon 95 muestras de plasma de individuos con EA y con una media de puntuaciones de MMSE de 20, y media de edad de 74, con la muestra de plasma de 88 controles de edad coincidente con una puntuación de MMSE media de 30. Se usaron pruebas t independientes no paramétricas que comparaban la concentración media de cada proteína para determinar la significación estadística (valor p).

La fig. 2 muestra un histograma de células para la concentración de BDNF en plasma (Variable(s) de agrupación del histograma de células: Estadio, Barras de error: ± 1 Error(es) estándar; Criterios de inclusión: Manchas de todos los centros)

20 La fig. 3 muestra BDNF en control frente a EA para hombres y mujeres. (Variable(s) de agrupación del histograma de células: Enfermedad; dividida por: sexo; Barras de error: ± 1 Error(es) estándar; Exclusión de fila: Todas las del centro)

La fig. 4 muestra la concentración de RANTES en plasma. (Variable(s) de agrupación del histograma de células: Estadio; Barras de error: ± 1 Error(es) estándar; Exclusión de fila: Todas las del centro)

25 La fig. 5 muestra la concentración de leptina en plasma. (Variable(s) de agrupación del histograma de células: Estadio; Barras de error: ± 1 Error(es) estándar; Exclusión de fila: Todas las del centro)

La fig. 6 muestra la concentración de PDGF-BB en plasma. (Variable(s) de agrupación del histograma de células: Estadio; Barras de error: ± 1 Error(es) estándar; Exclusión de fila: Todas las del centro)

30 La fig. 7 muestra la concentración de BDNF en plasma. (Variable(s) de agrupación del histograma de células: Estadio; Barras de error: ± 1 Error(es) estándar; Exclusión de fila: Todas las del centro)

Descripción detallada de la invención

35 Las respuestas a inflamación y lesión están asociadas de forma invariable con la degeneración neuronal en la EA, EP, demencia frontotemporal, enfermedad cerebrovascular, esclerosis múltiple, y neuropatías. El cerebro y el SNC no sólo son inmunológicamente activos por sí solos, sino que también tienen interacciones inmunológicas periféricas complejas. Fiala *et al* (1998 *Mol. Med.* Jul; 4(7) :480-9) ha demostrado que en la enfermedad de Alzheimer, las alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la quimiotaxis, mediadas en parte por quimiocinas y citocinas, pueden permitir el reclutamiento y el paso transendotelial de células periféricas en el parénquima cerebral. Se construyó un paradigma de la barrera hematoencefálica utilizando células endoteliales y astrogiales de cerebro humano con las características anatómicas y fisiológicas observadas *in vivo*. Se usó este modelo para
40 probar la capacidad de los monocitos/macrófagos a transmigrar cuando se enfrentan a A beta 1-42 en el lado del cerebro del modelo de barrera hematoencefálica. En ese modelo, el A beta 1-42 y los monocitos en el lado del cerebro potenciaron la trans migración de los monocitos desde el lado de la sangre al lado del cerebro. En algunos individuos, los monocitos/macrófagos en circulación, cuando se reclutan por quimiocinas producidas por microglía y macrófagos activados, pudieron aumentar la destrucción inflamatoria del cerebro en la enfermedad de Alzheimer.

45 Los inventores afirman que la monitorización de concentraciones relativas de muchos marcadores secretados medidas simultáneamente en el suero es un procedimiento más sensible para monitorizar la progresión de la enfermedad que la concentración absoluta de cualquier marcador bioquímico individual que haya podido lograr. Un material compuesto o matriz que incorpora el uso de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 marcadores en la tabla 7 simultáneamente, que consiste en anticuerpos unidos a un
50 soporte sólido o proteína unida a un soporte sólido, para la detección de marcadores de respuesta a inflamación y lesión asociados con la degeneración neuronal en la EA, EP, demencia frontotemporal, enfermedad cerebrovascular, esclerosis múltiple, y neuropatías.

Los inventores han descubierto una colección de marcadores bioquímicos (denominados de forma colectiva "biomarcadores de la EA") útiles para el diagnóstico de la EA, la ayuda en el diagnóstico de EA, la monitorización de

EA en pacientes con EA (por ejemplo, el seguimiento de la progresión de la enfermedad en pacientes con EA, lo que puede ser útil para seguir el efecto del tratamiento médico o quirúrgico en pacientes con EA), estratificación de pacientes con EA, y diagnóstico o ayuda en el diagnóstico de la dificultad cognitiva leve (DCL) así como el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de la dificultad cognitiva. Los biomarcadores de la EA están presentes en los fluidos biológicos de los individuos. En algunos ejemplos, los biomarcadores de la EA están presentes en fluidos biológicos periféricos (por ejemplo, sangre) de los individuos, lo que permite la recogida de muestras por procedimientos que son relativamente no invasivos, en particular en comparación con el procedimiento de punción lumbar usando comúnmente para recoger muestras de líquido cefalorraquídeo.

Definiciones

10 Como se usa en el presente documento, los términos "paciente con Alzheimer", "paciente con EA", e "individuo diagnosticado con la EA" se refieren todos a un individuo al que se le ha diagnosticado con la EA o que se le ha dado un diagnóstico probable de enfermedad de Alzheimer (EA).

Como se usa en el presente documento, la expresión "biomarcador de la EA" se refiere a un biomarcador que es un biomarcador de diagnóstico de la EA.

15 El término "polinucleótido biomarcador de la EA", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de: una secuencia de polinucleótidos que codifica un biomarcador de la EA, los elementos de control de actuación trans asociados (por ejemplo, promotor, potenciador, y otras secuencias reguladoras génicas), y/o ARNm que codifica el biomarcador de la EA.

20 Como se usa en el presente documento, los procedimientos para "ayudar en el diagnóstico" se refieren a procedimientos que ayudan en la realización de una determinación clínica con respecto a la presencia, o naturaleza, de la EA o DCL, y puede o no ser concluyente con respecto al diagnóstico definitivo. En consecuencia, por ejemplo, un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de la EA puede comprender medir la cantidad de uno o más biomarcadores de la EA en una muestra biológica de un individuo.

25 Como se usa en el presente documento, el término "estratificar" se refiere a clasificar los individuos en diferentes clases o estratos en base a las características de una enfermedad neurológica. Por ejemplo, la estratificación de una población de individuos con la enfermedad de Alzheimer implica asignar los individuos en base a la gravedad de la enfermedad (por ejemplo, leve, moderada, avanzada, etc.).

30 Como se usa en el presente documento, el término "predecir" se refiere a realizar una conclusión de que un individuo tiene una probabilidad significativamente potenciada de desarrollar una determinada enfermedad neurológica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad neurológica" se refiere a una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central. Las enfermedades neurológicas incluyen esclerosis múltiple, neuropatías, y trastornos neurodegenerativos tales como EA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), dificultad cognitiva leve (DCL) y demencia frontotemporal.

35 Como se usa en el presente documento, "muestra de fluido biológico" engloba una variedad de tipos de muestras de fluidos obtenidas de un individuo y se puede usar en un ensayo de diagnóstico o monitorización. La definición engloba sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina y otras muestras líquidas de origen biológico. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de cualquier modo después de su obtención, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento en determinados componentes, tales como proteínas o polinucleótidos.

40 Como se usa en el presente documento, el término "muestra de fluido biológico periférico" se refiere a una muestra de fluido biológico que no se deriva del sistema nervioso central (es decir, no es una muestra de LCR) e incluye muestras de sangre y otros fluidos biológicos no derivados del SNC.

45 Una "muestra de sangre" es una muestra biológica que se deriva de sangre, preferentemente sangre periférica (o en circulación). Una muestra de sangre puede ser, por ejemplo, sangre completa, plasma o suero.

Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates, animales de granja, animales de competición, roedores y mascotas.

50 Un individuo o muestra "normal" de un individuo "normal" como se usa en el presente documento para datos cuantitativos y cualitativos se refiere a un individuo al que un médico ha evaluado, o evaluaría, que no presenta EA o DCL, y tiene una puntuación del mini examen del estado mental (MMSE) (referenciado en Folstein *et al*, J. Psychiatr. Res 1975; 12:1289-198) o lograría una puntuación del MMSE en el intervalo de 25-30. En general, un individuo "normal" es de edad coincidente dentro de un intervalo de 5 a 10 años, incluyendo pero sin limitarse a un individuo que es de edad coincidente, con el individuo que se va a evaluar.

Un "individuo con EA leve" es un individuo al que (a) se la ha diagnosticado la EA o se le ha dado un diagnóstico de

EA probable, y (b) se ha evaluado con el mini examen del estado mental (MMSE) (referenciado en Folstein *et al*, J. Psychiatr. Res 1975; 12:1289-198) y puntuó 22-27 o bien lograría una puntuación de 22-27 en la prueba MMSE. En consecuencia, "EA leve" se refiere a la EA en un individuo que se a evaluado con el MMSE y puntuó 22-27 o bien que lograría una puntuación de 22-27 en la prueba MMSE.

- 5 Un "individuo con EA moderada" es un individuo al que (a) se le ha diagnosticado con EA o se le ha dado un diagnóstico de EA probable, y (b) se ha evaluado con el MMSE y puntuó 16-21 o bien que lograría una puntuación de 16-21 en la prueba MMSE. En consecuencia, "EA moderada" se refiere a la EA en un individuo que se a evaluado con el MMSE y puntuó 16-21 o bien que lograría una puntuación de 16-21 en la prueba MMSE.

- 10 Un "individuo con EA grave" es un individuo al que (a) se le ha diagnosticado con EA o se le ha dado un diagnóstico de EA probable, y (b) se ha evaluado con el MMSE y puntuó 12-15 o bien que lograría una puntuación de 12-15 en la prueba MMSE. En consecuencia, "EA grave" se refiere a la EA en un individuo que se a evaluado con el MMSE y puntuó 12-15 o bien que lograría una puntuación de 12-15 en la prueba MMSE.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere al alivio, mejora y/o estabilización de los síntomas, así como el retraso en la progresión de los síntomas de un trastorno particular. Por ejemplo, "tratamiento" de EA incluye una cualquiera o más de; eliminación de uno o más síntomas de EA, reducción de uno o más síntomas de EA, estabilización de los síntomas de EA (por ejemplo, falta de progreso a estadios más avanzados de EA), y retraso en la progresión (es decir, empeoramiento) de uno o más síntomas de la EA.

- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "diferencia en veces" se refiere a una representación numérica de la diferencia de magnitud entre un valor medido y un valor de referencia para un biomarcador de la EA. La diferencia en veces se calcula matemáticamente por la división del valor numérico medido entre el valor numérico de referencia. Por ejemplo, si un valor medido para un biomarcador de la EA es de 20 nanogramos/mililitro (ng/ml), y el valor de referencia es de 10 ng/ml, la diferencia en veces es de 2 ($20/10 = 2$). De forma alternativa, si un valor medido para un biomarcador de la EA es de 10 nanogramos/mililitro (ng/ml), y el valor de referencia es de 20 ng/ml, la diferencia en veces es $10/20$ o $-0,50$ o -50% .

- 25 Como se usa en el presente documento, un "valor de referencia" puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tenga un límite superior y/o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor de la mediana, un valor medio, o un valor en comparación con un valor de control o de referencia particular. Un valor de referencia se puede basar en un valor de muestra de un individuo, tal como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del individuo con EA, DCL o dificultad cognitiva, pero en un punto temporal temprano, o un valor obtenido de una muestra de un paciente con EA distinto al individuo que se somete a prueba, o un individuo "normal", que es un individuo no diagnosticado con EA. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tales como de pacientes con EA o individuos normales o se puede basar en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que se va a someter a prueba.

- 35 Como se usa en el presente documento, "un", "una", y "el/la" pueden significar singular o plural (es decir, pueden significar uno o más) a menos que se indique de otro modo.

Procedimientos de la invención

Procedimientos para identificar biomarcadores

- 40 Se divulgan en el presente documento procedimientos para identificar uno o más biomarcadores útiles para el diagnóstico, ayuda en el diagnóstico, estratificación, evaluación del riesgo, monitorización, y/o predicción de una enfermedad neurológica. En determinados aspectos de la invención, se obtienen niveles de un grupo de biomarcadores para un conjunto de muestras de fluido biológico periférico definido en las reivindicaciones de uno o más individuos. Las muestras se seleccionan de modo que se puedan secretar en uno o más subconjuntos en base a una enfermedad neurológica (por ejemplo, muestras de individuos normales y de los diagnosticados con esclerosis lateral amiotrófica o muestras de individuos con enfermedad de Alzheimer leve y con enfermedad de Alzheimer grave). Los valores medidos a partir de las muestras se comparan entre sí para identificar los biomarcadores que difieren significativamente entre los subconjuntos. Los biomarcadores que varían significativamente entre los subconjuntos se pueden usar entonces en procedimientos para ayudar en el diagnóstico, diagnóstico, estratificación, monitorización y/o predicción de enfermedad neurológica. En otros aspectos de la invención, se comparan los valores medidos para un conjunto de muestras de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones obtenidas de uno o más individuos (en el que las muestras se pueden secretar en uno o más subconjuntos en base a una enfermedad neurológica), en las que los biomarcadores que varían significativamente son útiles para ayudar en el diagnóstico, diagnóstico, estratificación, monitorización y/o predicción de enfermedad neurológica. En otros aspectos de la invención, se miden los niveles de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones obtenidas de uno o más individuos (en el que las muestras se pueden secretar en uno o más subconjuntos en base a una enfermedad neurológica) para producir valores medidos, en las que los biomarcadores que varían significativamente son útiles para ayudar en el diagnóstico, diagnóstico, estratificación, monitorización y/o predicción de enfermedad neurológica.

La presente invención utiliza un conjunto de muestras de fluido biológico periférico, como se define en las

reivindicaciones, tales como muestras de sangre, que se obtienen de uno o más individuos. El conjunto de muestras se selecciona de modo que se pueda dividir en uno o más subconjuntos en base a una enfermedad neurológica. La división en subconjuntos puede ser en base a la presencia/ausencia de enfermedad, estratificación de enfermedad (por ejemplo, leve frente a moderada), o subclasificación de enfermedad (por ejemplo, recidiva/remisión frente a recidiva progresiva).

Los biomarcadores medidos en la práctica de la invención pueden ser cualquier marcador biológico proteínico hallado en una muestra de fluido biológico periférico. La tabla 7 contiene una colección de biomarcadores ejemplares. En el presente documento se describen biomarcadores adicionales.

En consecuencia, se divulgan procedimientos de identificación de uno o más biomarcadores que se pueden usar para ayudar en el diagnóstico, diagnosticar, detectar, estratificar, y/o predecir enfermedades neurológicas tales como trastornos neurodegenerativos. Los procedimientos de la invención se llevan a cabo obteniendo un conjunto de valores medidos para una pluralidad de biomarcadores a partir de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico, como se define en las reivindicaciones, en los que el conjunto de muestras de fluido biológico periférico es divisible en al menos dos subconjuntos en relación con una enfermedad neurológica, comparando dichos valores medidos entre los subconjuntos para cada biomarcador, e identificando los biomarcadores que son significativamente diferentes entre los subconjuntos.

El procedimiento de comparación de los valores medidos se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo análisis de significación de micromatrices, recolección en árboles, CART, MARS, mapas de autoorganización, conjunto de elementos frecuentes, o redes bayesianas.

En un aspecto, se divulgan procedimientos para identificar uno o más biomarcadores útiles para el diagnóstico de una enfermedad neurológica obteniendo valores medidos a partir de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico para una pluralidad de biomarcadores, en los que el conjunto de muestras de fluido biológico periférico es divisible en subconjuntos en base a una enfermedad neurológica, comparar los valores medidos de cada subconjunto para al menos un biomarcador; e identificar al menos un biomarcador para el que los valores medidos son significativamente diferentes entre los subconjuntos. En algunas realizaciones, el procedimiento de comparación se lleva a cabo usando análisis de significación de micromatrices. En determinadas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa es del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En otro aspecto, se divulgan procedimientos para identificar al menos un biomarcador útil para ayudar en el diagnóstico de una enfermedad neurológica obteniendo valores medidos a partir de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico para una pluralidad de biomarcadores, en los que el conjunto de muestras de fluido biológico periférico es divisible en subconjuntos en base a una enfermedad neurológica, comparar los valores medidos de cada subconjunto para al menos un biomarcador; e identificar biomarcadores para los que los valores medidos son significativamente diferentes entre los subconjuntos.

En otro aspecto, se divulgan procedimientos para identificar al menos un biomarcador útil para la estratificación de una enfermedad neurológica obteniendo valores medidos a partir de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico para una pluralidad de biomarcadores, en los que el conjunto de muestras de fluido biológico periférico es divisible en subconjuntos en base a un estrato de una enfermedad neurológica, comparar los valores medidos de cada subconjunto para al menos un biomarcador, e identificar biomarcadores para los que los valores medidos son significativamente diferentes entre los subconjuntos.

En otro aspecto, se divulgan procedimientos para identificar al menos un biomarcador útil para la monitorización de una enfermedad neurológica obteniendo valores medidos a partir de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico para una pluralidad de biomarcadores, en los que el conjunto de muestras de fluido biológico periférico es divisible en subconjuntos en base a un estrato de una enfermedad neurológica, comparar los valores medidos de cada subconjunto para al menos un biomarcador, e identificar biomarcadores para los que los valores medidos son significativamente diferentes entre los subconjuntos.

En otro aspecto adicional, se divulgan procedimientos para identificar al menos un biomarcador útil para la predicción de una enfermedad neurológica obteniendo valores medidos a partir de un conjunto de muestras de fluido biológico periférico para una pluralidad de biomarcadores, en los que el conjunto de muestras de fluido biológico periférico es divisible en subconjuntos en base a una enfermedad neurológica, comparar los valores medidos de cada subconjunto para al menos un biomarcador, e identificar biomarcadores para los que los valores medidos son significativamente diferentes entre los subconjuntos.

Procedimientos de evaluación de la función cognitiva

Se divulgan en el presente documento procedimientos para evaluar la función cognitiva, evaluar la dificultad cognitiva, diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de la dificultad cognitiva obteniendo niveles medidos de uno o más biomarcadores de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico de un individuo, tal como, por ejemplo, una muestra de fluido biológico periférico de un individuo, y comparar los niveles medidos con los niveles de referencia. La referencia a "marcadores de diagnóstico de la EA" en el presente documento es un término de

conveniencia para referirse a los marcadores descritos en el presente documento y su uso, y no está destinada a indicar que los marcadores sólo se usan para diagnosticar la EA. Como deja claro esta divulgación, estos biomarcadores son útiles para, por ejemplo, evaluar la función cognitiva, evaluar la DCL, evaluar el riesgo de desarrollo de la EA, estratificar la EA, etc. Los biomarcadores de la EA incluyen pero no se limitan a proteínas o metabolitos secretados presentes en los fluidos biológicos de una persona (esto es, una muestra de fluido biológico), tal como por ejemplo, sangre, incluyendo sangre completa, plasma o suero; orina; líquido cefalorraquídeo; lágrimas; y saliva. Las muestras de fluido biológico engloban muestras clínicas, y también incluyen suero, plasma, y otros fluidos biológicos. Como se describe en el presente documento, la evaluación de los resultados puede depender de si se obtuvieron los datos por los procedimientos cualitativos o cuantitativos descritos en el presente documento y/o el tipo de punto de referencia usado. Por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4, se puede obtener una medida cualitativa de los niveles de biomarcadores de la EA con relación a otro nivel de referencia, que puede ser relativo al nivel de otro biomarcador de la EA. En otros procedimientos descritos en el presente documento, tales como en el ejemplo 7, se pueden obtener valores cuantitativos o absolutos, esto es, niveles de concentración de proteínas, en una muestra de fluido biológico. Un resultado o datos "cuantitativos" se refiere a un valor absoluto (véase el ejemplo 7), lo que puede incluir una concentración de un biomarcador en pg/ml o ng/ml de molécula para la muestra. Un ejemplo de un valor cuantitativo es la medida de la concentración de niveles de proteínas directamente, por ejemplo, por ELISA. Un resultado o datos "cualitativos" proporcionan un valor relativo que es como se compara con un valor de referencia. En algunos ejemplos en el presente documento (ejemplo 4), las medias cualitativas se evalúan por intensidad de señal en un filtro. En algunos ejemplos en el presente documento, múltiples anticuerpos específicos para biomarcadores de la EA se unen a una superficie adecuada, por ejemplo, como portaobjetos o filtro.

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), obteniendo niveles medidos de uno o más biomarcadores de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones de un individuo y comparando los niveles medidos con los niveles de referencia como se define en las reivindicaciones y en los que un biomarcador de diagnóstico de la EA es IGFBP-2.

En algunos ejemplos, biomarcadores de diagnóstico de la EA adicionales se seleccionan del grupo mostrado en la tabla 7. En otros ejemplos, los biomarcadores de diagnóstico de la EA adicionales se seleccionan del grupo GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En otros ejemplos adicionales, el biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo mostrado en la tabla 3. En otros ejemplos (que no son parte de la presente invención), los biomarcadores de diagnóstico de la EA se seleccionan del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES. Como se muestra en el presente documento, en los ejemplos (que no son parte de la presente invención), los niveles de leptina y BDNF cuantitativos tienen una correlación positiva estadísticamente significativa con las puntuaciones MMSE; los niveles de PDGF-BB cuantitativos tienen una correlación negativa estadísticamente significativa con las puntuaciones MMSE en hombres (que no son parte de la presente invención); y los niveles de RANTES cuantitativos tienen una correlación positiva estadísticamente significativa con PDGF-BB y BDNF (que no son parte de la presente invención). En algunos ejemplos (que no son parte de la presente invención), los biomarcadores de diagnóstico de la EA para su uso en procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") y de diagnóstico de la EA incluyen dos o más de los siguientes 4 biomarcadores: BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES. En otros ejemplos (que no son parte de la presente invención), los biomarcadores de diagnóstico de la EA para su uso en procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") y de diagnóstico de la EA comprenden leptina y RANTES; leptina y BDNF; leptina y PDGF-BB; leptina, RANTES y BDNF; leptina, RANTES y PDGF-BB; leptina, BDNF y PDGF-BB; RANTES y BDNF; RANTES y PDGF-BB; RANTES, BDNF, y PDGF-BB; BDNF y PDGF-BB; o leptina, RANTES, BDNF y PDGF-BB. En algunos ejemplos (que no son parte de la presente invención), los marcadores de diagnóstico de la EA para su uso en procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la EA o de diagnóstico de la EA comprenden leptina, RANTES, BDNF y PDGF-BB. En otros ejemplos (que no son parte de la presente invención), los marcadores de diagnóstico de la EA para su uso en procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la EA o de diagnóstico de la EA consisten esencialmente en o consisten en leptina, RANTES, BDNF y PDGF-BB.

Los procedimientos de evaluación de la función cognitiva, ayuda en el diagnóstico de la EA y diagnóstico de la EA, como se describe en el presente documento, pueden comprender cualquiera de las siguientes etapas de obtener una muestra de fluido biológico muestra de un individuo, medir el nivel de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en la muestra y comparar el nivel medido con una referencia apropiada; obtener niveles medidos de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra y comparar el nivel medido con una referencia apropiada; comparar niveles medidos de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA obtenido de una muestra con una referencia apropiada; medir el nivel de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra; medir el nivel de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra y comparar el nivel medido con una referencia apropiada; diagnosticar la EA basándose en la comparación de niveles medidos con una referencia apropiada; u obtener un valor medido para al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra. La comparación de un nivel medido de un biomarcador de diagnóstico de la EA con un nivel de referencia o la obtención de un valor medido para un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra se puede realizar para 1,

- 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más biomarcadores de diagnóstico de la EA. También se divulgan procedimientos de evaluación de resultados de los procedimientos analíticos descritos en el presente documento. En general, dicha evaluación implica la revisión de dichos resultados y puede ayudar; por ejemplo, en el asesoramiento en relación con el seguimiento clínico y/o de diagnóstico y/o las opciones de tratamiento. También se divulgan procedimientos para evaluar una muestra de fluido biológico para un indicador de uno cualquiera o más de los siguientes: función y/o dificultad cognitiva; DCL; EA; extensión de EA, tal como, por ejemplo, leve, moderada, grave; progresión de la EA; midiendo el nivel de u obteniendo el nivel medido de o comparando un nivel medido de un biomarcador de diagnóstico de la EA, como se describe en el presente documento. Los procedimientos de evaluación de la dificultad cognitiva incluyen el ADAS-COG, que, en general, se acepta como equivalente de la puntuación MMSE.
- 10 Para los procedimientos de diagnóstico de la EA como se describe en el presente documento, en general, el nivel de referencia es un nivel predeterminado considerado "normal" para el biomarcador de diagnóstico de la EA particular (por ejemplo, un nivel promedio para individuos de edad comparable no diagnosticados con la EA), aunque también se contemplan niveles de referencia que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba). También se proporcionan procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") comparando un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico, como se define en las reivindicaciones, de un individuo con un nivel de referencia.

También se proporcionan procedimientos, como se define en las reivindicaciones, de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA") midiendo un nivel de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico de un individuo. Para los biomarcadores de diagnóstico de la EA divulgados en el presente documento, una medida para un marcador que sea inferior al nivel de referencia sugiere (es decir, ayuda en el diagnóstico de) o indica un diagnóstico de EA.

En otro aspecto, se divulgan procedimientos de identificación de individuos con dificultad cognitiva leve (DCL), obteniendo un nivel cuantitativo medido para RANTES en una muestra de fluido biológico, tal como, por ejemplo, una muestra de fluido biológico periférico de un individuo, y comparando ese nivel con un nivel de referencia. En general, el nivel de referencia para RANTES es un nivel predeterminado considerado 'normal' para RANTES, y puede ser un nivel normal de edad comparable para RANTES, aunque también se contemplan niveles de referencia que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba). También se divulgan procedimientos de ayuda en el diagnóstico de DCL comparando un nivel cuantitativo medido para RANTES en una muestra de fluido biológico, tal como, por ejemplo, una muestra de fluido biológico periférico de un individuo con un nivel de referencia. Además, se divulgan procedimientos para ayudar en el diagnóstico de DCL midiendo un nivel para RANTES en una muestra de fluido biológico, tal como, por ejemplo, una muestra de fluido biológico periférico de un individuo. El hallazgo de que el nivel cuantitativo de RANTES es bajo (por debajo del nivel de referencia) en la muestra de fluido biológico, tal como, por ejemplo, la muestra de fluido biológico periférico del individuo sugiere (es decir, ayuda en el diagnóstico de) o indica un diagnóstico de DCL. Dichos procedimientos incluyen además medir, obtener y/o comparar el nivel cuantitativo de leptina en la muestra de fluido biológico, tal como, por ejemplo, una muestra biológica periférica. Cuando se utilizan niveles tanto de RANTES como de leptina, el hallazgo de que el nivel cuantitativo de RANTES es bajo mientras que el nivel cuantitativo de leptina no lo es (es decir, es sustancialmente el mismo que o mayor que el valor de referencia de leptina) sugiere (es decir, ayuda en el diagnóstico de) o indica un diagnóstico de DCL. En consecuencia, la presente divulgación proporciona procedimientos para ayudar en el diagnóstico de la dificultad cognitiva leve (DCL), que comprenden comparar un nivel medido para RANTES en una muestra de fluido biológico obtenida de un individuo con un nivel de referencia. En algunos ejemplos, los procedimientos comprenden además comparar un valor medido para leptina en la muestra de fluido biológico obtenida de un individuo con un nivel de referencia. En otros ejemplos adicionales, los procedimientos comprenden además medir un nivel para leptina en dicha muestra de fluido biológico, produciendo de este modo dicho valor medido para leptina. En otros ejemplos adicionales, los procedimientos comprenden medir un nivel para RANTES en dicha muestra de fluido biológico, produciendo de este modo dicho valor medido para RANTES. En otros ejemplos adicionales, la muestra de fluido biológico es una muestra de fluido periférico.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos, como se define en las reivindicaciones, de monitorización de la progresión de la EA en un paciente con EA. Como se muestra en el ejemplo 7, los inventores han descubierto que los niveles cuantitativos de RANTES disminuyen en pacientes con EA con EA cuestionable (MMSE = 25-28); y que los niveles cuantitativos de RANTES disminuyen en pacientes con EA con EA leve (MMSE = 20-25), y los niveles de RANTES disminuyen además a medida que se intensifica la gravedad de la EA. Un individuo con "EA cuestionable", como se usa en el presente documento, para datos cuantitativos (también denominada medida absoluta) es un individuo que (a) se le ha diagnosticado con EA o se le ha dado un diagnóstico de EA probable, y (b) se ha evaluado con el mini examen del estado mental (MMSE) (referenciado en Folstein *et al.*, *J. Psychiatr. Res* 1975; 12:1289-198) y puntuó 25-28 o bien lograría una puntuación de 25-28 en la prueba MMSE. En consecuencia, "EA cuestionable" se refiere a la EA en un individuo que ha puntuado 25-28 en el MMSE y o que lograría una puntuación de 25-28 en la prueba MMSE. El nivel de referencia puede ser un nivel predeterminado considerado 'normal' para RANTES particulares (por ejemplo, un nivel promedio para individuos de edad comparable no diagnosticados con EA o DCL), o puede ser un nivel de referencia histórico para el paciente particular (por ejemplo, un nivel de RANTES que se obtuvo a partir de una muestra derivada del mismo individuo, pero en un punto temporal

temprano). También se contemplan niveles de referencia que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba). En consecuencia, los procedimientos, como se divulgan en el presente documento, para monitorizar la progresión de la EA en un paciente con EA pueden comprender obtener un valor cuantitativo para RANTES a partir de una muestra de fluido biológico periférico y comparar el valor medido con un valor de referencia. También se divulgan procedimientos para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA comparando un valor medido para leptina en una muestra de fluido biológico periférico con un valor de referencia o midiendo un nivel para leptina en una muestra de fluido biológico periférico. Una disminución en el valor medido indica o sugiere (diagnostica o sugiere un diagnóstico) progresión (por ejemplo, un incremento en la gravedad) de la EA en el paciente con EA.

En otro aspecto, los inventores han descubierto que los niveles cuantitativos de leptina se reducen en pacientes con EA con una EA cuestionable; y que los niveles cuantitativos de leptina disminuyen en pacientes con EA con una EA leve, y los niveles cuantitativos de leptina disminuyen además a medida que se intensifica la gravedad de la EA; y los niveles cuantitativos de leptina se correlacionan positivamente con las puntuaciones de MMSE (como se describe en el ejemplo 7). El nivel de referencia puede ser un nivel predeterminado considerado 'normal' para la leptina particular (por ejemplo, un nivel promedio para individuos de edad comparable no diagnosticados con EA o DCL), o puede ser un nivel de referencia histórico para el paciente particular (por ejemplo, un nivel de leptina que se obtuvo a partir de una muestra derivada del mismo individuo, pero en un punto temporal temprano).

También se contemplan niveles de referencia cuantitativos que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba).

En consecuencia, los procedimientos, como se divulgan en el presente documento, para monitorizar la progresión de la EA en un paciente con EA pueden comprender obtener un valor cuantitativo medido para leptina a partir de una muestra de fluido biológico periférico y comparar el valor medido con un valor de referencia. También se proporcionan procedimientos para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA comparando un valor medido para leptina en una muestra de fluido biológico periférico, tal como se define en las reivindicaciones, con un valor de referencia. También se proporcionan procedimientos, como se divulga en el presente documento, para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA midiendo un nivel para leptina en una muestra de fluido biológico periférico. Una disminución en el valor cuantitativo medido indica o sugiere (diagnostica o sugiere un diagnóstico) progresión (por ejemplo, un incremento en la gravedad) de la EA en el paciente con EA.

Los inventores han descubierto que los niveles cuantitativos de BDNF disminuyen en pacientes con EA con una EA leve, y que los niveles cuantitativos de BDNF en mujeres se correlacionan con las puntuaciones de MMSE y los niveles de BDNF disminuyen además a medida que se intensifica la gravedad de la EA (como se describe en el ejemplo 7). El nivel de referencia puede ser un nivel predeterminado considerado 'normal' para BDNF particulares (por ejemplo, un nivel promedio para individuos de edad comparable no diagnosticados con EA o DCL), o puede ser un nivel de referencia histórico para el paciente particular (por ejemplo, un nivel de BDNF que se obtuvo a partir de una muestra derivada del mismo individuo, pero en un punto temporal temprano). También se contemplan niveles de referencia que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, se divulga un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba). En consecuencia, la invención divulga procedimientos para monitorizar la progresión de la EA en un paciente con EA obteniendo un valor cuantitativo medido para BDNF a partir de una muestra de fluido biológico periférico y comparando el valor medido con un valor de referencia. También se proporcionan procedimientos para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA comparando un valor cuantitativo medido para BDNF en una muestra de fluido biológico periférico con un valor de referencia. También se proporcionan procedimientos, divulgados en el presente documento, para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA midiendo un nivel para BDNF en una muestra de fluido biológico periférico. En términos generales, una disminución en el valor medido indica o sugiere (diagnostica o sugiere un diagnóstico) progresión (por ejemplo, un incremento en la gravedad) de la EA en el paciente con EA.

Los inventores han descubierto que los niveles cuantitativos de PDGF-BB disminuyen en pacientes con EA con una EA cuestionable; que los niveles de PDGF-BB disminuyen en EA cuestionable en comparación con EA leve; y que las puntuaciones de MMSE para pacientes con EA varones se correlacionan negativamente con los niveles de PDGF-BB (como se describe en el ejemplo 7). El nivel de referencia puede ser un nivel predeterminado considerado 'normal' para los PDGF-BB (por ejemplo, un nivel promedio para individuos de edad comparable no diagnosticados con EA o DCL), o puede ser un nivel de referencia histórico para el paciente particular (por ejemplo, un nivel de PDGF-BB que se obtuvo a partir de una muestra derivada del mismo individuo varón, pero en un punto temporal temprano). También se contemplan niveles de referencia que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba).

En consecuencia, la invención divulga procedimientos para monitorizar la progresión de la EA en un paciente con EA obteniendo un valor medido para PDGF-BB a partir de una muestra de fluido biológico periférico de un varón y comparando el valor medido con un valor de referencia. También se proporcionan procedimientos para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA comparando un valor medido para PDGF-BB en una muestra de fluido biológico periférico con un valor de referencia. También se divulgan procedimientos para monitorizar la progresión de

EA en un paciente con EA midiendo un nivel para PDGF-BB en una muestra de fluido biológico periférico. Una disminución en el valor medido indica o sugiere (diagnostica o sugiere un diagnóstico) progresión (por ejemplo, un incremento en la gravedad) de la EA en el paciente con EA.

- Adicionalmente, se divulgan procedimientos de estratificación de individuos diagnosticados con (o que tiene un diagnóstico probable de) EA. Los inventores han descubierto que el análisis de los niveles de BDNF, o BDNF y PDGF-BB en muestras de fluido biológico, tales como, muestras de fluido biológico periférico proporciona información relativa a la gravedad de la EA en el paciente con EA del que se deriva la muestra de fluido biológico periférico. Los valores de referencia para BDNF y PDGF-BB usados en estos aspectos se obtienen de la forma más común a partir de una población de pacientes con EA distintos del paciente con EA que es la fuente de la muestra que se va a someter a prueba (por ejemplo, un valor medio o de la mediana derivado de un gran número de pacientes con EA), aunque también se contemplan niveles de referencia para BDNF y PDGF-BB que se determinan de forma contemporánea (por ejemplo, un valor de referencia que se deriva de un conjunto de muestras incluyendo la muestra que se va a someter a prueba). En consecuencia, se divulgan procedimientos de estratificación de pacientes con EA en estadios leve, y más avanzado (por ejemplo, moderado y grave) de EA ("estadificación") obteniendo un nivel medido para BDNF, y comparación del valor medido con un valor de referencia para BDNF. En consecuencia, se divulgan procedimientos de estratificación de la EA en un paciente con EA obteniendo un valor medido para BDNF, y, opcionalmente, PDGF-BB, en una muestra de fluido biológico, tal como una muestra de fluido biológico periférico, y comparación del nivel medido con un nivel de referencia. Se divulgan procedimientos de estratificación de EA en un paciente con EA comparando un valor medido para BDNF, y, opcionalmente, PDGF-BB, en una muestra de fluido biológico, tal como una muestra de fluido biológico periférico con un valor de referencia. Además, se divulgan procedimientos de estratificación de EA en un paciente con EA midiendo BDNF y, opcionalmente, PDGF-BB, en una muestra de fluido biológico, tal como una muestra de fluido biológico periférico. Como se describe en el ejemplo 4, y bajo las condiciones experimentales divulgadas en el ejemplo 4 que proporcionan resultados cualitativos, las muestras que tienen niveles de BDNF inferiores al nivel de referencia sugieren o indican una EA moderada EA, mientras que las muestras con niveles de BDNF superiores al nivel de referencia sugieren una EA más avanzada (es decir, EA moderada o grave). Entre las muestras con niveles de BDNF superiores al nivel de referencia, las que también tienen niveles de PDGF-BB inferiores al nivel de referencia sugieren o indican una EA moderada, mientras que las muestras que también tienen niveles de PDGF-BB por encima del nivel de referencia sugieren o indican una EA grave. Se ha descubierto que para una EA cuestionable (puntuación de MMSE en el intervalo de 25-28) los niveles de leptina y PDGF-BB se incrementan significativamente mientras que BDNF y RANTES no cambian significativamente. Se ha descubierto que de una EA leve (puntuación de MMSE en el intervalo de 20-25) a una EA moderada (puntuación de MMSE en el intervalo de 10-20), el nivel de leptina no desciende mientras que los niveles para RANTES, BDNF y PDGF-BB descienden. En consecuencia, en algunas realizaciones (como se define por las puntuaciones de MMSE anteriores del ejemplo 7), se indica una EA leve en ensayos cuantitativos cuando los niveles de leptina y/o PDGF-BB se incrementan significativamente mientras que BDNF y RANTES no cambian significativamente en comparación con una EA cuestionable como referencia. En consecuencia, en algunas realizaciones, (como se define por las puntuaciones de MMSE anteriores del ejemplo 7), se indica una EA moderada cuando la leptina no desciende mientras que los niveles para RANTES, BDNF y PDGF descienden en comparación con una EA leve como referencia. En consecuencia, se proporcionan en el presente documento procedimientos que comprenden comparar valores medidos para niveles de RANTES y leptina en una muestra de fluido biológico de dicho paciente con valores de referencia para RANTES y leptina; comparar valores medidos para niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), leptina, y RANTES, en una muestra de fluido biológico de dicho paciente con valores de referencia para BDNF, leptina, y RANTES; comparar valores medidos para niveles de leptina y factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico de dicho paciente con valores de referencia para leptina y PDGF-BB. En consecuencia, se divulgan procedimientos para estratificar la enfermedad de Alzheimer (EA) en un individuo, que comprende comparar valores medidos para los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico de dicho paciente con valores de referencia para BDNF y PDGF-BB. En algunos ejemplos, los procedimientos comprenden además comparar valores medidos para niveles de leptina y Rantes con valores de referencia para leptina y Rantes, en el que los valores de referencia para BDNF, PDGF-BB, leptina y Rantes son para muestras de individuos con puntuaciones de MMSE de 25 a 28, en el que un incremento en los niveles de leptina y PDGF-BB y en el que los niveles de BDNF y RANTES permanecen sustancialmente iguales indican EA leve, como por una puntuación de MMSE de 20-25.
- Se divulgan procedimientos que comprenden además comparar valores medidos para niveles de leptina y Rantes con valores de referencia para leptina y Rantes, en el que los valores de referencia para BDNF, PDGF-BB, leptina y Rantes son para muestras de individuos con puntuaciones de MMSE de 20-25, en el que una disminución en los niveles de Rantes, BDNF, y PDGF y en el que los niveles de leptina permanecen sustancialmente iguales indican EA moderada, como se indica por una puntuación de MMSE de 10-20. Un biomarcador de la EA que permanezca "sustancialmente igual" significa que no existe un cambio significativo, y que los valores son aproximadamente los mismos. En algunas realizaciones, sustancialmente el mismo es un cambio de menos de aproximadamente un 12 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %. En algunas realizaciones, un cambio significativo significa no estadísticamente significativo usando procedimientos estándar en la técnica. Los procedimientos descritos anteriormente también son aplicables a los procedimientos para evaluar la progresión de la EA. Se entiende que la función cognitiva indicada por los

marcadores en el presente documento puede ser por otras medidas con resultados o indicios que corresponde a aproximadamente el mismo nivel de función cognitiva que las puntuaciones de MMSE proporcionadas en el presente documento.

5 La presente invención también proporciona procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de
 Alzheimer ("EA"), que comprende comparar un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en
 una muestra de fluido biológico periférico como se define en las reivindicaciones de un individuo con un nivel de
 referencia para el biomarcador para cada biomarcador medido, en los que el al menos un biomarcador de
 diagnóstico de la EA es IGFBP-2 y uno cualquiera o más de las proteínas enumeradas en la tabla 7 y tiene una
 10 correlación positiva estadísticamente significativa con puntuaciones de MMSE que es comparable a la correlación de
 BDNF y/o leptina con puntuaciones de MMSE, y en los que el al menos biomarcador de diagnóstico de la EA no se
 correlaciona estadísticamente con la edad. Un biomarcador de diagnóstico de la EA que tiene una correlación
 positiva estadísticamente significativa con puntuaciones de MMSE que es comparable a BDNF y/o correlación con
 leptina con puntuaciones de MMSE significa que el biomarcador es un marcador de diagnóstico de la EA. En algunos
 15 ejemplos, el biomarcador de diagnóstico de la EA adicional se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g;
 IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1;
 TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF-b3; TNF-b;
 MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R
 y en otros ejemplos se selecciona del grupo de biomarcadores que consisten en el factor de crecimiento fibroblástico
 20 básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico
 derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6),
 interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína
 inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α),
 neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral
 soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1
 25 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), y
 factor de necrosis tumoral beta (TNF- β).

Los resultados de la comparación, entre el/los valor(es) medido(s) y el/los valor(es) de referencia se usan para
 diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de EA o DCL, para estratificar pacientes con EA de acuerdo con la gravedad
 de su enfermedad, o para monitorizar la progresión de EA en un paciente con EA. En consecuencia, si la
 30 comparación indica una diferencia entre el/los valor(es) medido(s) y el/los valor(es) de referencia que sea
 sugestiva/indicativa de EA o DCL, entonces se realiza, o se ayuda en, el diagnóstico apropiado. Por el contrario, si la
 comparación del/de los nivel(es) medido(s) con el/los nivel(es) de referencia no indica diferencias que sugieran o
 indiquen un diagnóstico de EA o DCL, entonces no se realiza, o no se ayuda en, el diagnóstico apropiado. Asimismo,
 cuando la comparación de un nivel medido para leptina en una muestra derivada de un paciente con EA disminuye
 35 en comparación con el valor de referencia, se realiza o se ayuda en el diagnóstico de progresión de la EA del
 paciente. De forma similar, cuando la comparación de niveles de BDNF y niveles de PDGF-BB en una muestra
 obtenida de un paciente con EA indica o sugiere un estadio particular de EA, se realiza o se ayuda en el diagnóstico
 del estadio particular de EA (leve, moderada o grave).

Como se entenderá por los expertos en la técnica, cuando, en la práctica de procedimientos de de la EA de la
 40 invención (es decir, procedimientos de diagnóstico o de ayuda en el diagnóstico de la EA), se usa más de un
 biomarcador de diagnóstico de la EA pero los marcadores no sugieren ni indican unánimemente un diagnóstico de
 EA, la sugestión o indicación de la "mayoría" (por ejemplo, cuando el procedimiento utiliza cinco biomarcadores de
 diagnóstico de la EA, de los que 3 sugieren/indican EA, el resultado se consideraría como sugerencia o indicativo de
 un diagnóstico de EA para el individuo) se considera el resultado del ensayo. Sin embargo, en algunas realizaciones
 45 en las que se obtienen valores medidos para al menos dos biomarcadores de diagnóstico de la EA y uno de los
 valores medidos es para leptina, el valor medido para leptina debe ser menor que el valor de referencia para indicar
 o sugerir un diagnóstico de EA. Como se apreciará por un experto en la técnica, los procedimientos divulgados en el
 presente documento pueden incluir el uso de cualquiera de una variedad de marcadores biológicos (que pueden ser
 o no marcadores de la EA) para determinar la integridad y/o características de la(s) muestra(s) biológica(s). Por
 50 ejemplo, los niveles de leptina, que, en general, son mayores en mujeres, se pueden medir como un marcador de
 género.

En determinadas realizaciones de la invención, los niveles para biomarcadores de la EA se obtienen de un individuo
 en más de un punto temporal, Dicho muestreo en "serie" es muy adecuado para los aspectos de la invención
 relacionados con la monitorización de la progresión de la EA en un paciente con EA. El muestreo en serie se puede
 55 realizar sobre cualquier línea temporal deseada, tal como mensualmente, trimestralmente (es decir, cada tres
 meses), bianualmente, anualmente, bienalmente, o con menor frecuencia. La comparación entre los niveles medidos
 y el nivel de referencia se puede llevar a cabo cada vez que se mide una nueva muestra, o los datos con relación a
 los niveles se pueden guardar para análisis menos frecuentes.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, las muestras de fluido biológico periférico como se define en las
 60 reivindicaciones se recogen normalmente de individuos que se sospecha que tienen la EA, o que desarrollan la EA o
 DCL. La invención también contempla muestras de individuos para los que se desea una evaluación cognitiva. De
 forma alternativa, los individuos (u otros implicados, por ejemplo en investigación) y/o médicos pueden desear dichas

evaluaciones sin indicación alguna de EA, sospecha de EA, ni riesgo de EA. Por ejemplo, un individuo normal puede desear dicha información. De la forma más común, dichos individuos son de 65 años o mayores, aunque los individuos de los que se toman muestras de fluido biológico, tales como muestras de fluido biológico periférico, para su uso en los procedimientos de la invención pueden ser tan sólo de 35 a 40 años de edad, cuando se sospecha una EA de inicio temprano o EA familiar.

También se divulgan procedimientos de rastreo para agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL sometiendo a ensayo agentes candidatos potenciales para determinar su actividad en la modulación de los biomarcadores de la EA. El ensayo de rastreo se puede realizar *in vitro* y/o bien *in vivo*. Los agentes candidatos identificados en los procedimientos de rastreo descritos en el presente documento pueden ser útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de EA y/o DCL.

La probabilidad P de que el compuesto sea más predictivo que cualquier subconjunto de marcadores presentes en el compuesto se puede expresar matemáticamente como:

$$P = 1 - (1 - P_1) (1 - P_2) (1 - P_3) \dots (1 - P_n)$$

Donde la probabilidad P_1 , P_2 , P_n representa la probabilidad de que el marcador individual pueda predecir fenotipos clínicos, y donde $1 - P_n$ representa el complemento de esa probabilidad. Por lo tanto, cualquier subconjunto del compuesto tendrá siempre un valor menor para P.

Las concentraciones relativas en suero, LCR, u otros fluidos de los biomarcadores citados en la tabla 7 como un compuesto, o colectivo, o cualquier subconjunto de un compuesto de este tipo, compuesto de 5 (cinco) o más elementos es más predictivo que la concentración absoluta de cualquier marcador individual para predecir fenotipos clínicos, detección de enfermedad, estratificación, monitorización, y tratamiento de EA, PD, demencia frontotemporal, enfermedad cerebrovascular, esclerosis múltiple, y neuropatías.

Biomarcadores de diagnóstico de la EA

Los mecanismos inmunitarios son una parte esencial del sistema de defensa del huésped y típicamente la característica predominante en la respuesta inflamatoria. Un número creciente de estudios están descubriendo vínculos interesantes entre el sistema inmunitario y el SNC. Por ejemplo, ha quedado claro que el SNC no está totalmente protegido por la vigilancia inmunitaria y que varias células inmunitarias pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Los leucocitos invasores pueden atacar antígenos diana en el SNC o producir factores de crecimiento que podrían proteger a las neuronas contra la degeneración (Hohlfeld *et al*, 2000, *J. Neuroimmunol* 107,161-166). Estas respuestas están provocadas por una variedad de mediadores, incluyendo pero sin limitarse a, citocinas, quimiocinas, factores neurotróficos, colectinas, quininas, y proteínas de fase aguda en los sistemas inmunitario e inflamatorio, en comunicación intercelular a través de las neuronas, células gliales, células endoteliales y leucocitos. Sin quedar vinculado a ninguna teoría, se plantea como hipótesis que las citocinas, quimiocinas, factores neurotróficos, colectinas, quininas, y proteínas de fase aguda enumerados en la tabla 7 se expresan diferencialmente en suero asociado con enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, y neuropatías. Las citocinas son un grupo heterogéneo de mediadores de polipéptidos que se han asociado con la activación de numerosas funciones, incluyendo el sistema inmunitario y las respuestas inflamatorias. Las citocinas periféricas también penetran en la barrera hematoencefálica directamente por medio de mecanismos de transporte activo o indirectamente por medio de estimulación del nervio vago. Las citocinas pueden actuar de manera autocrina, afectando al comportamiento de la célula que libera la citocina, o de manera paracrina, afectando al comportamiento de células adyacentes. Algunas citocinas pueden actuar de manera endocrina, afectando al comportamiento de células distantes, aunque esto depende de su capacidad para entrar en la circulación o de su semivida. Las familias de citocinas incluyen, pero no se limitan a, interleucinas (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-1ra y de IL-2 a IL-18), factores de necrosis tumoral (TNF-alfa y TNF-beta), interferones (INF-alfa, beta y gamma), factores estimuladores de colonias (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3 y algunas de las otras IL), y factores de crecimiento (EGF, FGF, PDGF, TGF alfa, TGF beta, BMP, GDF, CTGF, y ECGF).

Los inventores han descubierto una colección de marcadores bioquímicos presentes en fluidos corporales periféricos que se pueden usar para evaluar la función cognitiva, incluyendo el diagnóstico o la ayuda en el diagnóstico de EA. Estos "marcadores de diagnóstico de la EA" incluyen, pero no se limitan a, GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG, PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF-b3; TNF-b MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En otros ejemplos, estos "biomarcadores de diagnóstico de la EA" son: factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de

metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). En otros ejemplos, los marcadores de diagnóstico de la EA incluyen uno o más de leptina, RANTES, PDFG-BB y BDNF.

Los biomarcadores de diagnóstico de la EA descubiertos por los inventores son todas moléculas conocidas. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) se describe, por ejemplo, en Rosenthal *et al.*, 1991, *Endocrinology* 129(3):1289-94. El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) se describe, por ejemplo, en Abraham *et al.*, 1986, *EMBOJ.* 5(10):2523-28. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) se describe, por ejemplo, en Gray *et al.*, 1983, *Nature* 303(5919):722-25. El factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6) se describe, por ejemplo, en Maries *et al.*, 1989, *Oncogene* 4(3):335-40. La interleucina-3 (IL-3) se describe, por ejemplo, en Yang *et al.*, 1986, *Cell* 47(1):3-10. El receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R) se describe, por ejemplo, en Taga *et al.*, 1989, *Cell* 58(3):573-81. La leptina (también conocida como "ob") se describe, por ejemplo, en Masuzaki *et al.* 1995, *Diabetes* 44(7):855-58. La proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ) se describe, por ejemplo, en Wang *et al.*, 1998, *J. Clin. Immunol.* 18(3):214-22. La cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α) se describe, por ejemplo, en Yoshimura *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* 268 (21), 15461-68, y Yoshikawa *et al.*, 1999, *Arch. Biochem. Biophys.* 363(2):356-60. El péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2) se describe, por ejemplo, en Walz *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.* 305:39-46. La neurotrofina-3 (NT-3) se describe, por ejemplo, en Hohn *et al.*, 1990, *Nature* 344(6264):339-41. El factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB) se describe, por ejemplo, en Collins *et al.*, 1985, *Nature* 316(6030):748- 50. El RANTES se describe, por ejemplo, en Schall *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141(3):1018-25. El factor de células madre (SCF) se describe, por ejemplo, en Zsebo *et al.*, 1990, *Cell* 63(1):213-24. El receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII) se describe, por ejemplo, en Schall *et al.*, 1990, *Cell* 61(2):361-70. El factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3) se describe, por ejemplo, en ten Dijke *et al.*, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 85 (13):4715-19. El inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1) se describe, por ejemplo, en Docherty *et al.*, 1985, *Nature* 318(6041):66-69 y Gasson *et al.*, 1985, *Nature* 315(6022):768-71. El inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2) se describe, por ejemplo, en Stetler-Stevenson *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265(23):13933-38. El factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) se describe, por ejemplo, en Gray *et al.*, 1984, *Nature* 312(5996):721-24. La trombopoyetina (TPO) se describe, por ejemplo, en Foster *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(26):13023-27.

Aunque los inventores han descubierto niveles aceptables de sensibilidad y especificidad con biomarcadores de diagnóstico de la EA individuales para la práctica de procedimientos de diagnóstico de la EA, la eficacia (por ejemplo, sensibilidad y/o especificidad) de los procedimientos de los procedimientos de diagnóstico de la EA de la presente invención, en general, se potencian cuando se utilizan al menos dos biomarcadores de diagnóstico de la EA. En algunos ejemplos, los procedimientos de los procedimientos de diagnóstico de la EA de la presente invención, en general, se potencian cuando se utilizan al menos cuatro biomarcadores de diagnóstico de la EA. Se pueden seleccionar múltiples biomarcadores de diagnóstico de la EA de los biomarcadores de diagnóstico de la EA divulgados en el presente documento por una variedad de procedimientos, incluyendo el "valor q" y/o seleccionando de la diversidad de agrupaciones. Se pueden seleccionar biomarcadores de diagnóstico de la EA en base al "valor q", un valor estadístico que los inventores derivaron cuando identificaron los biomarcadores de diagnóstico de la EA (véase la tabla 3 en el ejemplo 1). Los "valores q" para la selección de biomarcadores de diagnóstico de la EA varían desde menos de aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 0,05 y en algunos ejemplos, varían desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 0,05. De forma alternativa (o adicional), se pueden seleccionar biomarcadores de diagnóstico de la EA para preservar la diversidad de agrupaciones. Los inventores han separado los biomarcadores de diagnóstico de la EA en varias agrupaciones (véase la tabla 1). Sobre esto, las agrupaciones se forman por medidas cualitativas para cada biomarcador que se correlacionan de la forma más próxima. Como se usa en el presente documento, "correlacionar" o "correlación" es un cambio simultáneo en el valor de dos variables aleatorias numéricamente valoradas tales como puntuaciones de MMSE y concentraciones de cuantitativas de proteínas o concentraciones cualitativas de proteínas. Como se usa en el presente documento, "discriminar" o "discriminatorio" se refiere a la diferencia cuantitativa o cualitativa entre dos o más muestras para una variable dada. La agrupación próxima a una agrupación de este tipo es una agrupación que se correlaciona de la forma más próxima con la agrupación. Las correlaciones entre biomarcadores y entre agrupaciones se pueden representar por un árbol jerárquico generado por agrupamiento no supervisado usando un programa informático basado en la Web pública denominado wCLUTO disponible en cluto.cgb.umn.edu/cgi-bin/wCluto/wCluto.cgi. Si se selecciona más de un biomarcador de diagnóstico de la EA para someterlo a prueba, en algunos ejemplos, los biomarcadores de diagnóstico de la EA seleccionados son al menos parcialmente diversos (es decir, los biomarcadores de diagnóstico de la EA representan al menos dos agrupaciones diferentes, por ejemplo, un conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA que comprende leptina, BDNF y/o PDFG-BB de la agrupación 4 en la tabla 1 y RANTES de la agrupación 3 de la tabla 1), y en algunos casos, los biomarcadores de diagnóstico de la EA son completamente diversos (es decir, no hay dos de los biomarcadores de diagnóstico de la EA seleccionados de la misma agrupación). En consecuencia, la invención proporciona varias realizaciones diferentes para ayudar en el diagnóstico de la EA.

60

Tabla 1

Agrupación	Biomarcador
0	bFGF
1	TPO
2	FGF-6 IL-3 sIL-6R MIP-1d sTNF RII TNF-b
3	RANTES TIMP-1 TIMP-2
4	BDNF EGF leptina(OB) MSP- α NAP-2 NT-3 PDGF-BB SCF TGF-b3

5 En algunas realizaciones, se obtiene el nivel de un único biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico y se compara el nivel medido con un nivel de referencia para ayudar en el diagnóstico de la EA. Cuando se obtiene el nivel medido para un único biomarcador de diagnóstico de la EA para la práctica de la invención, el nivel medido es para RANTES en la muestra de fluido biológico periférico.

En otras realizaciones, se obtienen los niveles de al menos dos biomarcadores de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico y se comparan con niveles de referencia para cada uno de los marcadores.

10 En consecuencia, la invención proporciona procedimientos para ayudar en el diagnóstico de EA midiendo los niveles de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, o 20 biomarcadores de diagnóstico de la EA y comparando los niveles medidos con niveles de referencia como se define en las reivindicaciones. Las realizaciones ejemplares utilizan 2, 3, 4 o 5 biomarcadores de diagnóstico de la EA. También se divulgan en el presente documento procedimientos para ayudar en el diagnóstico de EA midiendo los niveles de al menos leptina, RANTES, BDGF, y PDGF-BB.

15 Para las realizaciones que utilizan más de un biomarcador de diagnóstico de la EA (es decir, las realizaciones en las que se obtienen valores medidos para más de un biomarcador de diagnóstico de la EA), las combinaciones ejemplares de biomarcadores de diagnóstico de la EA mostrados en la tabla 3 incluyen (1) leptina en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA (es decir, leptina y BDNF, leptina y bFGF, leptina y EGF, leptina y FGF-6, leptina y IL-3, leptina y sIL-6R, leptina y MIP-1 δ , leptina y MSP- α , leptina y NAP-2, leptina y NT-3, leptina y PDGF-BB, leptina y RANTES, leptina y SCF, leptina y sTNF RII, leptina y TGF- β 3, leptina y TIMP-1, leptina y TIMP-2, leptina y TNF- β , y leptina y TPO), (2) RANTES en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA (es decir, RANTES y BDNF, RANTES y bFGF, RANTES y EGF, RANTES y FGF-6, RANTES y IL-3, RANTES y sIL-6R, RANTES y leptina, RANTES y MIP-1 δ , RANTES y MSP- α , RANTES y NAP-2, RANTES y NT-3, RANTES y PDGF-BB, RANTES y SCF, RANTES y sTNF RII, RANTES y TGF- β 3, RANTES y TIMP-1, RANTES y TIMP-2, RANTES y TNF- β , y RANTES y TPO); (3) PDGF-BB y cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA (es decir, PDGF-BB y BDNF, PDGF-BB y bFGF, PDGF-BB y EGF, PDGF-BB y FGF-6, PDGF-BB y IL-3, PDGF-BB y sIL-6R, PDGF-BB y leptina, PDGF-BB y MIP-1 δ , PDGF-BB y MSP- α , PDGF-BB y NAP-2, PDGF-BB y NT-3, PDGF-BB y RANTES, PDGF-BB y SCF, PDGF-BB y sTNF RII, PDGF-BB y TGF- β 3, PDGF-BB y TIMP-1, PDGF-BB y TIMP-2, PDGF-BB y TNF- β , y PDGF-BB y TPO); (4) BDNF en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA (es decir, BDNF y bFGF, BDNF y EGF, BDNF y FGF-6, BDNF y IL-3, BDNF y sIL-6R, BDNF y leptina, BDNF y MIP-1 δ , BDNF y MSP- α , BDNF y NAP-

20
25
30

2, BDNF y NT-3, BDNF y PDGF-BB, BDNF y RANTES, BDNF y SCF, BDNF y sTNR RII, BDNF y TGF- β 3, BDNF y TIMP-1, BDNF y TIMP-2, BDNF y TNF- β , y BDNF y TPO); (5) RANTES, PDGF-BB, y NT-3; (6) leptina, PDGF-BB, y RANTES; (7) BDNF, PDGF-BB, y RANTES; (8) BDNF, leptina, y RANTES; (9) BDNF, leptina, y PDGF-BB; (10) PDGF-BB, EGF, y NT-3; (11) PDGF-BB, NT-3, y leptina; (12) BDNF, leptina, PDGF-BB, RANTES; y (13) RANTES, PDGF-BB, NT-3, EGF, NAP-2, y leptina. Combinaciones ejemplares adicionales de biomarcadores de diagnóstico de la EA incluyen (14) leptina en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA divulgados en el presente documento (es decir, leptina y GCSF, leptina y IFN- γ , leptina y IGFBP-1, leptina y BMP-6, leptina y BMP-4, leptina y Eotaxina-2, leptina y IGFBP-2, leptina y TARC, leptina y ANG, leptina y PARC, leptina y Acrp30, leptina y AgRP(ART), leptina y ICAM-1, leptina y TRAIL R3, leptina y uPAR, leptina y IGFBP-4, leptina y IL-1Ra, leptina y AXL, leptina y FGF-4, leptina y CNTF, leptina y MCP-1, leptina y MIP-1b, leptina y VEGF-B, leptina y IL-8, leptina y FAS y leptina y EGF-R), (15) RANTES en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA divulgados en el presente documento (es decir, RANTES y GCSF, RANTES y IFN- γ , RANTES y IGFBP-1, RANTES y BMP-6, RANTES y BMP-4, RANTES y Eotaxina-2, RANTES y IGFBP-2, RANTES y TARC, RANTES y ANG, RANTES y PARC, RANTES y Acrp30, RANTES y AgRP(ART), RANTES y ICAM-1, RANTES y TRAIL R3, RANTES y uPAR, RANTES y IGFBP-4, RANTES y IL-1Ra, RANTES y AXL, RANTES y FGF-4, RANTES y CNTF, RANTES y MCP-1, RANTES y MIP1b, RANTES y VEGF-B, RANTES y IL-8, RANTES y FAS y RANTES y EGF-R), (16) PDGF-BB en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA divulgados en el presente documento (es decir, PDGF-BB y GCSF, PDGF-BB y IFN- γ , PDGF-BB y IGFBP-1, PDGF-BB y BMP-6, PDGF-BB y BMP-4, PDGF-BB y Eotaxina-2, PDGF-BB y IGFBP-2, PDGF-BB y TARC, PDGF-BB y ANG, PDGF-BB y PARC, PDGF-BB y Acrp30, PDGF-BB y AgRP(ART), PDGF-BB y ICAM-1, PDGF-BB y TRAIL R3, PDGF-BB y uPAR, PDGF-BB y IGFBP-4, PDGF-BB y IL-1Ra, PDGF-BB y AXL, PDGF-BB y FGF-4, PDGF-BB y CNTF, PDGF-BB y MCP-1, PDGF-BB y MIP1b, PDGF-BB y VEGF-B, PDGF-BB y IL-8, PDGF-BB y FAS y PDGF-BB y EGF-R), (17) BDNF en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de diagnóstico de la EA divulgados en el presente documento (es decir, BDNF y GCSF, BDNF y IFN- γ , BDNF y IGFBP-1, BDNF y BMP-6, BDNF y BMP-4, BDNF y Eotaxina-2, BDNF y IGFBP-2, BDNF y TARC, BDNF y ANG, BDNF y PARC, BDNF y Acrp30, BDNF y AgRP(ART), BDNF y ICAM-1, BDNF y TRAIL R3, BDNF y uPAR, BDNF y IGFBP-4, BDNF y IL-1Ra, BDNF y AXL, BDNF y FGF-4, BDNF y CNTF, BDNF y MCP-1, BDNF y MIP1b, BDNF y VEGF-B, BDNF y IL-8, BDNF y FAS y BDNF y EGF-R).

Niveles de medida de biomarcadores de la EA

30 Existen varias pruebas estadísticas para identificar biomarcadores que varían significativamente entre los subconjuntos, incluyendo la prueba t convencional. Sin embargo, ya que el número de biomarcadores medido se incrementa, en general, es ventajoso el uso de una técnica más sofisticada, tal como SAM (véase, Tusher *et al.*, 2001, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 98(9):5116-21). Otras técnicas útiles incluyen la recolección en árboles (Hastie *et al.*, *Genome Biology* 2001,2:research0003.1- 0003.12), mapas de autoorganización (Kohonen, 1982b, *Biological Cybernetics* 43(1):59-69), conjunto de elementos frecuentes (Agrawal *et al.*, 1993 "*Mining association rules between sets of items in large databases*"). En el Proc. de la conferencia de ACM SIGMOD sobre gestión de datos, páginas 207-216, Washington, D.C., Mayo 1993), redes bayesianas (Gottardo, *Statistical analysis of microarray data, A Bayesian approach. Biostatistics* (2001),1,1, p. 1-37), y los paquetes informáticos disponibles comercialmente CART y MARS.

40 La técnica SAM asigna una puntuación para cada biomarcador en base al cambio en la expresión relativa a la desviación estándar de medidas repetidas. Para biomarcadores con puntuaciones mayores de un valor umbral ajustable, el algoritmo usa permutaciones de las medidas repetidas para estimar la probabilidad de que un biomarcador particular haya sido identificado por cambio (calculado como un "valor q"), o una tasa de falso positivo que se usa para la precisión de las medidas. La técnica SAM se puede llevar a cabo usando el programa informático disponible públicamente denominado análisis de significación de micromatrices (véase www-stat.class.stanford.edu/~ibs/clickwrap/sam.html).

50 Un biomarcador se considera "identificado" como útil para ayudar en el diagnóstico, diagnóstico, estratificación, monitorización, y/o predicción de cuando es significativamente diferente entre los subconjuntos de muestras biológicas periféricas sometidas a prueba. Los niveles de un biomarcador son "significativamente diferentes" cuando la probabilidad de que el biomarcador particular se haya identificado por cambio es menor de un valor predeterminado. El procedimiento de cálculo de dicha probabilidad dependerá del procedimiento exacto utilizado para comparar los niveles entre los subconjuntos (por ejemplo, si se usa SAM, el valor q dará la probabilidad de identificación errónea, y el valor p dará la probabilidad si se usa la prueba t (o un análisis estadístico similar)). Como se entenderá por los expertos en la técnica, el valor predeterminado variará dependiendo del número de biomarcadores medidos por muestra y el número de muestras utilizado. En consecuencia, el valor predeterminado puede variar desde hasta un 50 % hasta sólo un 20, 10, 5, 3, 2, o un 1 %.

60 Como se describe en el presente documento, el nivel de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA se mide en una muestra biológica de un individuo. El/Los nivel(es) de biomarcadores de la EA se puede medir usando cualquier tecnología de medida disponible que puede determinar el nivel del biomarcador de la EA en una muestra biológica. La medida puede ser cuantitativa o bien cualitativa, siempre que la medida pueda indicar si el nivel del biomarcador de la EA en la muestra de fluido biológico periférico está por encima o por debajo del valor de referencia.

- El nivel medido puede ser una medida primaria del nivel de un biomarcador particular (una medida de la cantidad del propio biomarcador (datos cuantitativos, tales como en el ejemplo 7), tal como por detección del número de moléculas de biomarcador en la muestra) o puede ser una medida secundaria del biomarcador (una medida a partir de la que se puede deducir, aunque no necesariamente, la cantidad del biomarcador (datos cualitativos, tales como el ejemplo 4), tal como una medida en la actividad enzimática (cuando el biomarcador es una enzima) o una medida de ARNm que codifica el biomarcador). Los datos cualitativos también se pueden derivar u obtener de medidas primarias.
- Aunque algunos formatos de ensayo permitirán las pruebas de muestras de fluido biológico periférico sin un procesado previo de la muestra, se espera que la mayoría de las muestras de fluido biológico periférico se procesen antes de las pruebas. En general, el procesado toma la forma de la eliminación de células (nucleadas y no nucleadas), tales como eritrocitos, leucocitos, y plaquetas en muestras de sangre, y también pueden incluir la eliminación de determinadas proteínas, tales como determinadas proteínas de cascada de la coagulación de la sangre. En algunos ejemplos, la muestra de fluido biológico periférico se recoge en un recipiente que comprende EDTA.
- Comúnmente, los niveles de biomarcadores de la EA se medirán usando tecnología de medida basada en afinidad. "Afinidad" en relación con un anticuerpo es un término bien entendido en la técnica y significa la extensión, o fuerza, de unión de un anticuerpo con el compañero de unión, tal como un biomarcador de diagnóstico de la EA como se describe en el presente documento (o epítipo del mismo). La afinidad se puede medir y/o expresar de varias formas conocidas en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, constante de disociación de equilibrio (KD o Kd), constante de disociación de equilibrio aparente (KD' o Kd'), y CI_{50} (cantidad necesaria para efectuar una inhibición de un 50 % en un ensayo de competición; usado de forma intercambiable en el presente documento con " I_{50} "). Se entiende que, para los fines de la presente invención, una afinidad es una afinidad promedio para una población dada de anticuerpos que se unen a un epítipo. Los valores de K_D' informados en el presente documento en términos de mg IgG por ml o mg/ml indican mg Ig por ml de suero, aunque se puede usar plasma.
- La tecnología de medida basada en afinidad utiliza una molécula que se une específicamente al biomarcador de la EA que se está midiendo (un "reactivo de afinidad", tal como un anticuerpo o aptámero), aunque se pueden usar otras tecnologías, tales como tecnologías basadas en espectroscopía (por ejemplo, espectroscopía de desorción-ionización por láser asistida por matriz de tiempo de vuelo, o MALDI-TOF) o ensayos que miden la bioactividad (por ejemplo, ensayos que miden la mitogenicidad de factores de crecimiento).
- Las tecnologías basadas en afinidad incluyen ensayos basados en anticuerpos (inmunoensayos) y ensayos que utilizan aptámeros (moléculas de ácido nucleico que se unen específicamente a otras moléculas), tales como ELONA. Adicionalmente, también se contemplan ensayos que utilizan tanto anticuerpos como aptámeros (por ejemplo, un ensayo de formato tipo sándwich que utiliza un anticuerpo para la captura y un aptámero para la detección).
- Si se emplea tecnología de inmunoensayo, se puede usar cualquier tecnología de inmunoensayo que mida cuantitativa o cualitativamente el nivel de un biomarcador de la EA en una muestra biológica. La tecnología de inmunoensayo adecuada incluye radioinmunoensayo, ensayo inmunofluorescente, inmunoensayo de enzimas, ensayo quimioluminiscente, ELISA, inmuno-PCR, y ensayo de transferencia Western.
- Asimismo, en los procedimientos de la invención se pueden usar ensayos basados en aptámeros que midan cuantitativa o cualitativamente el nivel de un biomarcador de la EA en una muestra biológica. En general, los aptámeros se pueden sustituir por anticuerpos en casi todos los formatos de inmunoensayo, aunque los aptámeros permiten formatos de ensayo adicionales (tales como la amplificación de aptámeros unidos usando tecnología de amplificación de ácidos nucleicos tal como PCR (patente de los EE. UU. N.º 4,683,202) o amplificación isotérmica con cebadores compuestos (patentes de los EE. UU. N.º 6.251.639 y 6.692.918).
- En la técnica se conoce una amplia variedad de ensayos basados en afinidad. Los ensayos basados en afinidad utilizarán al menos un epítipo derivado del biomarcador de la EA de interés, y muchos formatos de los ensayos basados en afinidad utilizan más de un epítipo (por ejemplo, en ensayos de formato tipo "sándwich" están implicados dos o más epítipos; para capturar el marcador se usa al menos un epítipo, y para detectar el marcador se usa al menos un epítipo diferente).
- Los ensayos basados en afinidad pueden ser de formatos de competición o reacción directa, utilizan formatos de tipo sándwich, y además pueden ser heterogéneos (por ejemplo, que utilizan soportes sólidos) u homogéneos (por ejemplo, que tienen lugar en una única fase) y/o utilizar inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de reactivo de afinidad marcado (por ejemplo, anticuerpo, polipéptido o aptámero); los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes. También se conocen ensayos que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de éstos son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como ensayos ELISA y ELONA. En el presente documento, en los ejemplos denominados como "datos cuantitativos" las concentraciones de biomarcador se obtuvieron usando ELISA. El biomarcador o bien reactivo específico para el biomarcador se puede unir a una superficie y los niveles se pueden medir directa o indirectamente.

En un formato heterogéneo, el ensayo utiliza dos fases (típicamente sólido y líquido acuoso). Típicamente, un reactivo específico de biomarcador de la EA se une a un soporte sólido para facilitar la separación del biomarcador de la EA de la masa de muestra biológica. Después de la reacción, durante un tiempo suficiente para permitir la formación de los complejos de reactivo de afinidad/biomarcador de la EA, típicamente el soporte sólido o superficie que contiene el anticuerpo se lava antes de la detección de polipéptidos unidos. El reactivo de afinidad en el ensayo para la medida de biomarcadores de la EA puede estar dispuesto sobre un soporte (por ejemplo, sólido o semisólido); de forma alternativa, los polipéptidos en la muestra se pueden inmovilizar sobre un soporte o superficie. Los ejemplos de soportes que se pueden usar son nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microvaloración), poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, en láminas o pocillos de microvaloración), látex de poliestireno (por ejemplo, en perlas o placas de microvaloración), poli(fluoruro de vinilidino), papel diazotizado, membranas de nailon, perlas activadas, vidrio y perlas de proteína A. Los formatos tanto estándar como competitivos para estos ensayos son conocidos en la técnica. En consecuencia, se proporcionan en el presente documento complejos que comprenden al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA unido a un reactivo específico para el biomarcador, en los que dicho reactivo se une a una superficie. También se proporcionan en el presente documento complejos que comprenden al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA unido a un reactivo específico para el biomarcador, en los que dicho biomarcador se une a una superficie.

Los ensayos heterogéneo de tipo matriz son adecuados para medir los niveles de biomarcadores de la EA cuando los procedimientos de la invención se practican utilizando múltiples biomarcadores de la EA. Comúnmente, los ensayos de tipo matriz usando en la práctica de los procedimientos de la invención utilizarán un sustrato sólido con dos o más reactivos de captura específicos para diferentes biomarcadores de la EA unidos al sustrato un patrón predeterminado (por ejemplo, una rejilla). La muestra de fluido biológico periférico se aplica al sustrato y los biomarcadores de la EA en la muestra se unen por los reactivos de captura. Después de la retirada de la muestra (y del lavado apropiado), los biomarcadores de la EA unidos se detectan usando una mezcla de reactivos de detección apropiados que se unen específicamente a los diversos biomarcadores de la EA. La unión del reactivo de detección se lleva a cabo comúnmente usando un sistema visual, tal como un sistema a base de tinte fluorescente. Debido a que los reactivos de captura están dispuestos sobre el sustrato en un patrón predeterminado, los ensayos de tipo matriz proporcionan la ventaja de una detección de múltiple biomarcadores de la EA sin la necesidad de un sistema de detección multiplexado.

En un formato homogéneo, el ensayo tiene lugar en una única fase (por ejemplo, fase líquida acuosa). Típicamente, la muestra biológica es incubada con un reactivo de afinidad específico para el biomarcador de la EA en solución. Por ejemplo, puede ser bajo condiciones en las que precipitará cualquiera de los complejos de reactivo de afinidad/anticuerpo que se forman. Los formatos tanto estándar como competitivo para estos ensayos son conocidos en la técnica.

En un formato estándar (reacción directa), el nivel del complejo de biomarcador de la EA/reactivo de afinidad se monitoriza directamente. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, determinando la cantidad del reactivo de detección marcado que se forma que está unido a complejos de biomarcador de la EA/reactivo de afinidad. En un formato competitivo, la cantidad de biomarcador de la EA en la muestra se deduce monitorizando el efecto competitivo en la unión de una cantidad conocida de biomarcador de la EA marcado (u otro ligando competitivo) en el complejo. Las cantidades de unión o de formación de complejos se pueden determinar de forma cualitativa o cuantitativa.

Los procedimientos descritos en la presente patente se pueden implementar usando cualquier dispositivo que pueda implementar los procedimientos. Los ejemplos de dispositivos que se pueden usar incluyen pero no se limitan a dispositivos computacionales electrónicos, incluyendo ordenadores de todos los tipos. Cuando los procedimientos descritos en la presente patente se implementan en un ordenador, el programa informático que se puede usar para configurar el ordenador para llevar a cabo las etapas de los procedimientos puede estar contenido en un medio legible por ordenador que pueda contener el programa informático. Los ejemplos de medio legible por ordenador que se pueden usar incluyen pero no se limitan a disquetes, CD-ROM, DVD, ROM, RAM, y otros dispositivos de almacenamiento por ordenador. El programa informático que se puede usar para configurar el ordenador para llevar a cabo las etapas de los procedimientos también se puede proporcionar en una red electrónica, por ejemplo, en internet, la red mundial www, una intranet, u otra red.

En un ejemplo, los procedimientos descritos en la presente patente se pueden implementar en un sistema que comprende un procesador un medio legible por ordenador que incluye un medio de código del programa para hacer que el sistema lleve a cabo las etapas de los procedimientos descritos en la presente patente. El procesador puede ser un procesador que puede llevar a cabo las operaciones necesarias para la implementación de los procedimientos. El medio de código del programa puede ser cualquier código que, cuando se implemente en el sistema, pueda hacer que el sistema lleve a cabo las etapas de los procedimientos descritos en la presente patente. Los ejemplos de medios de código de programa incluyen pero no se limitan a instrucciones para llevar a cabo los procedimientos descritos en la presente patente escritos en un lenguaje informático de alto nivel, tal como C++, Java, o Fortran; instrucciones para llevar a cabo los procedimientos descritos en la presente patente escritas en un lenguaje informático de bajo nivel tal como un lenguaje ensamblador; o instrucciones para llevar a cabo los procedimientos descritos en la presente patente en una forma ejecutable por ordenador tal como un lenguaje máquina compilado y enlazado.

Los complejos formados que comprenden un biomarcador de la EA y un reactivo de afinidad se detectan por cualquiera de varias técnicas conocidas, conocidas en la técnica, dependiendo del formato del ensayo y la preferencia del usuario. Por ejemplo, los reactivos de afinidad no marcados se pueden detectar con tecnología de amplificación de ADN (por ejemplo, para aptámeros y anticuerpos marcados con ADN) o anticuerpos "secundarios" marcados que se unen al reactivo de afinidad. De forma alternativa, el reactivo de afinidad puede estar marcado, y la cantidad de complejo se puede determinar directamente (como para reactivo de afinidad marcado con enzima, perla o tinte (fluorescente o visible)) o indirectamente (como para reactivos de afinidad "etiquetado" con biotina, etiquetas de expresión, y similares). Los ejemplos proporcionados en el presente documento denominados como matrices de anticuerpos basadas en filtros de "datos cualitativos" usando quimioluminiscencia se usaron para obtener medidas para los biomarcadores.

Como se entenderá por los expertos en la técnica, el modo de detección de la señal dependerá del sistema de detección exacto utilizado en el ensayo. Por ejemplo, si se utiliza un reactivo de detección radiomarcado, la señal se medirá usando una tecnología que pueda cuantificar la señal de la muestra biológica o que pueda comparar la señal de la muestra biológica con la señal de una muestra de referencia, tal como recuento de centelleo, autorradiografía (típicamente combinado con densitometría de barrido), y similares. Si se usa un sistema de detección quimioluminiscente, entonces, típicamente, la señal se detectará usando un luminómetro. Los procedimientos para detectar la señal a partir de sistemas de detección son bien conocidos en la técnica y no es necesario describirlos adicionalmente en este punto.

Cuando se mide más de un biomarcador de la EA, la muestra biológica se puede dividir en varias alícuotas, usándose las alícuotas separadas para medir diferentes biomarcadores de la EA (aunque también se contempla la división de la muestra biológica en múltiples alícuotas para permitir múltiples determinaciones de los niveles del biomarcador de la EA en una muestra particular). De forma alternativa, se puede someter a prueba la muestra biológica (o una alícuota de la misma) para determinar los niveles de múltiples biomarcadores de la EA en una única reacción usando un ensayo que pueda medir los niveles individuales de diferentes biomarcadores de la EA en un único ensayo, tal como un ensayo de tipo matriz o un ensayo que utiliza tecnología de detección multiplexada (por ejemplo, un ensayo que utiliza reactivos de detección marcados con diferentes marcadores de tintes fluorescentes).

En la técnica, es común realizar medidas 'repetidas' cuando se miden biomarcadores. Las medidas repetidas se obtienen de forma ordinaria dividiendo una muestra en múltiples alícuotas, y midiendo por separado el/los biomarcador(es) en secciones separadas en el mismo sistema de ensayo. Las medidas repetidas no son necesarias para los procedimientos de la invención, pero muchas realizaciones de la invención utilizarán pruebas repetidas, en particular pruebas por duplicado y triplicado.

Niveles de referencia

El nivel de referencia usado para la comparación con el nivel medido para un biomarcador de la EA puede variar, dependiendo del aspecto de la invención que se practica, como se entenderá del análisis anterior. Para procedimientos de diagnóstico de la EA, típicamente el "nivel de referencia" es un nivel de referencia predeterminado, tal como un promedio de niveles obtenidos a partir de una población que no padece EA o DCL, pero en algunos casos, el nivel de referencia puede ser un nivel medio o de mediana de un grupo de individuos que incluye pacientes con EA. En algunos casos, el nivel de referencia predeterminado se deriva de (por ejemplo, es la media o la mediana de) los niveles obtenidos a partir de una población de edad coincidente.

Para procedimientos de diagnóstico de DCL (es decir, procedimientos de diagnóstico o de ayuda en el diagnóstico de DCL), típicamente, el nivel de referencia es un nivel de referencia predeterminado, tal como un promedio de niveles obtenidos a partir de una población que no padece EA o DCL, pero en algunos casos, el nivel de referencia puede ser un nivel medio o de la mediana de un grupo de individuos que incluye pacientes con DCL y/o EA. En algunos casos, el nivel de referencia predeterminado se deriva de (por ejemplo, es la media o la mediana de) los niveles obtenidos a partir de una población de edad coincidente.

Para procedimientos de monitorización de la EA (por ejemplo, procedimientos de diagnóstico o de ayuda en el diagnóstico de la progresión de la EA en un paciente con EA), el nivel de referencia puede ser un nivel predeterminado, tal como un promedio de niveles obtenidos a partir de una población que no padece EA o DCL, una población que se ha diagnosticado con DCL o EA, y, en algunos casos, el nivel de referencia puede ser un nivel medio o de la mediana de un grupo de individuos que incluye pacientes con DCL y/o EA. De forma alternativa, el nivel de referencia puede ser un nivel de referencia histórico para el paciente particular (por ejemplo, un nivel de leptina que se obtuvo de una muestra derivada del mismo individuo, pero en un punto temporal temprano), en algunos casos, el nivel de referencia predeterminado se deriva de (por ejemplo, es la media o la mediana de) los niveles obtenidos de una población de edad coincidente.

Para los procedimientos de estratificación de EA (es decir, procedimientos de estratificación de pacientes con EA en estadios de EA leve, moderada y grave), normalmente, el nivel de referencia es un nivel de referencia predeterminado que es la media o la mediana de los niveles a partir de una población que se ha diagnosticado con EA o DCL (preferentemente, una población diagnosticada con EA). En algunos casos, el nivel de referencia predeterminado se deriva de (por ejemplo, es la media o la mediana de) los niveles obtenidos de una población de

edad coincidente.

De forma ideal, las poblaciones de edad coincidente (a partir de las que se pueden obtener los valores de referencia) son de la misma edad que el individuo que se está sometiendo a prueba, pero también son aceptables poblaciones de edad aproximadamente coincidente. Las poblaciones de edad aproximadamente coincidente pueden estar dentro de los 1, 2, 3, 4 o 5 años de la edad del individuo sometido a prueba, o pueden ser grupos de edades diferentes que engloban la edad del individuo que se está sometiendo a prueba. Las poblaciones de edad aproximadamente coincidente pueden ser de incrementos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años (por ejemplo, un grupo de "incremento de 5 años" que sirve como fuente para los valores de referencia para un individuo de 62 años de edad podría incluir individuos de 58-62 años de edad, individuos de 59-63 años de edad, individuos de 60-64 años de edad, individuos de 61-65 años de edad, o individuos de 62-66 años de edad).

Comparación de niveles de biomarcadores de la EA

El procedimiento de comparación de un valor medido y un valor de referencia se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente apropiada para el tipo de valor medido y valor de referencia para el biomarcador de la EA en cuestión. Como se analiza anteriormente, la 'medida' se puede realizar usando técnicas de medida cuantitativa o cualitativa, y el modo de comparación de un valor medido y un valor de referencia puede variar dependiendo de la tecnología de medida empleada. Por ejemplo, cuando se usa un ensayo colorimétrico cualitativo para medir los niveles de biomarcadores de la EA, se pueden comparar los niveles comparando visualmente la intensidad del producto de reacción coloreado, o comparando los datos de medias densitométricas o espectrométricas del producto de reacción coloreado (por ejemplo, comparando los datos numéricos o datos gráficos, tales como histogramas, derivados del dispositivo de medida). Sin embargo, se espera que los valores medidos usados en los procedimientos de la invención sean comúnmente valores cuantitativos (por ejemplo, medidas cuantitativas de concentración, tales como nanogramos de biomarcador de la EA por mililitro de muestra, o una cantidad absoluta). Al igual que con las medidas cualitativas, se puede realizar la comparación revisando los datos numéricos, revisando las representaciones de los datos (por ejemplo, revisando las representaciones gráficas tales como gráficos de barras o de líneas).

En general, se considera que un valor medido es sustancialmente igual o mayor que un valor de referencia si es al menos un 95 % del valor del valor de referencia (por ejemplo, un valor medido de 1,71 se consideraría sustancialmente igual a un valor de referencia de 1,80). Se considera que un valor medido es menor que un valor de referencia si el valor medido es menor de un 95 % del valor de referencia (por ejemplo, un valor medido de 1,7 se consideraría menor de un valor de referencia de 1,80).

El procedimiento de comparación puede ser una revisión manual (tal como una revisión visual por el profesional del procedimiento) o puede ser automatizada. Por ejemplo, un dispositivo de ensayo (tal como un luminómetro para medir señales quimioluminiscente) puede incluir sistemas de circuitos y programas que le permiten comparar un valor medido con un valor de referencia para un biomarcador de la EA. De forma alternativa, se puede usar un dispositivo separado (por ejemplo, un ordenador digital) para comparar el/los valor(es) medido(s) y el/los valor(es) de referencia. Los dispositivos automatizados para la comparación pueden incluir valores de referencia almacenados para el/los biomarcadores de la EA que se están midiendo, o pueden comparar el/los valor(es) medido(s) con valores de referencia que se derivan de muestras de referencia medidas de forma contemporánea.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la invención utilizan una comparación 'simple' o 'binaria' entre el/los nivel(es) medido(s) y el/los nivel(es) de referencia (por ejemplo, la comparación ente un nivel medido y un nivel de referencia determina si el nivel medido es mayor o menor que el nivel de referencia). Para los biomarcadores de diagnóstico de la EA, una comparación que muestra que el valor medido para el biomarcador es menor que el valor de referencia indica o sugiere un diagnóstico de EA. Para los procedimientos con relación al diagnóstico de DCL, una comparación que muestra que el valor medido para RANTES es menor que el valor de referencia indica o sugiere un diagnóstico de EA. En las realizaciones con relación al diagnóstico de DCL que utilizan adicionalmente un valor medido para leptina, una comparación que muestra que RANTES es menos que el valor de referencia mientras que leptina es sustancialmente igual a o mayor que el nivel de referencia sugiere o indica un diagnóstico de DCL.

Como se describe en el presente documento, las muestras de fluido biológico se pueden medir de forma cuantitativa (valores absolutos) o cualitativos (valores relativos). Los niveles de biomarcadores de la EA respectivos para una evaluación dada se pueden o no superponer. Como se describe en el presente documento, para algunas realizaciones, los datos cualitativos indican un nivel dado de dificultad cognitiva (EA leve, moderada o grave) (que se puede medir por puntuaciones de MMSE) y en otras realizaciones, los datos cuantitativos indican un nivel dado de dificultad cognitiva. Como se muestra en el ejemplo 4 y bajo las condiciones proporcionadas en el ejemplo 4 (datos cualitativos), en las realizaciones con relación a la estratificación de EA, una comparación que muestra niveles de BDNF menores que el nivel de referencia sugiere o indica una EA leve, mientras que una comparación que muestra niveles de BDNF mayores que el nivel de referencia sugiere una EA más avanzada (es decir, EA moderada o grave), y entre las muestras con niveles de BDNF mayores que el nivel de referencia, las que también tienen niveles de PDGF-BB por debajo del nivel de referencia sugieren o indican una EA moderada, mientras que las muestras que también tienen niveles de PDGF-BB por encima del nivel de referencia sugieren o indican una EA grave. En las realizaciones con relación a la estratificación de EA mostrada en el ejemplo 7 (datos cuantitativos), una comparación

que muestra niveles de BDNF menores que el nivel de referencia, donde el nivel de referencia es normal, sugiere o indica una EA leve, mientras que una comparación que muestra niveles de BDNF menores que el nivel de referencia, donde el nivel de referencia es una EA leve, sugiere una EA más avanzada (es decir, EA moderada, grave), mientras que las muestras con niveles de leptina iguales al nivel de referencia, donde el nivel de referencia es una EA leve, las que tienen niveles de RANTES por debajo del nivel de referencia sugieren o indican una EA moderada, mientras que las muestras con niveles de leptina iguales al nivel de referencia, donde el nivel de referencia es una EA moderada, las que tienen niveles de PDGF-BB, RANTES, o BDNF menores que el nivel de referencia sugieren o indican una EA grave.

Sin embargo, en determinados aspectos de la invención, la comparación se realiza para determinar la magnitud de la diferencia entre los valores medidos y de referencia (por ejemplo, comparando la diferencia en 'veces' o en porcentaje entre el valor medido y el valor de referencia). Una diferencia en veces que es aproximadamente igual a o mayor que la diferencia en veces mínima divulgada en el presente documento sugiere o indica un diagnóstico de EA, DCL, una progresión de DCL a EA, o una progresión de EA leve EA a EA moderada, según sea apropiado para el procedimiento particular que se está practicando. Se puede determinar una diferencia en veces midiendo la concentración absoluta de una proteína y comparando esta con el valor absoluto de una referencia, o se puede medir una diferencia en veces por la diferencia relativa entre un valor de referencia y un valor de muestra, donde ningún valor es una medida de la concentración absoluta, y/o donde ambos valores se miden simultáneamente. Una diferencia en veces puede estar en el intervalo de un 10 % a un 95 %. Un ELISA mide el contenido o la concentración absoluta de una proteína a partir de la que se determina un cambio en veces en comparación con la concentración absoluta de la misma proteína en la referencia. Una matriz de anticuerpos mide la concentración relativa a partir de la que se determina un cambio en veces. En consecuencia, la magnitud de la diferencia entre el valor medido y el valor de referencia que sugiere o indica un diagnóstico particular dependerá del biomarcador de la EA particular que se está midiendo para producir el valor medido y el valor de referencia usado (que a su vez depende del procedimiento que se está practicando). Las tablas 2A-2B enumeran los valores de diferencia en veces mínima para los biomarcadores de la EA para su uso en procedimientos de la invención que utilizan una diferencia en veces al hacer la comparación entre el valor medido y el valor de referencia. En las realizaciones que utilizan valores de diferencia en veces, una diferencia en veces de aproximadamente la diferencia en veces indicada en la tabla 2A sugiere un diagnóstico de EA, donde el cambio en veces es un valor negativo. Por ejemplo, como se describe en el presente documento, los niveles de BDNF (medidos por ELISA) disminuyen en pacientes con EA con EA leve, y los niveles de BDNF disminuyen además a medida que se intensifica la gravedad de la EA. Como se muestra en la tabla 6, un cambio en veces de BDNF de un -46 % significa una reducción de los niveles de BDNF en un 46 %. Como se muestra en la tabla 2A, para medidas cualitativas usando anticuerpos, un cambio en veces de BDNF de 0,60 significa una reducción en los niveles de BDNF en aproximadamente un 60 %. La tabla 2B proporciona información adicional con respecto a los cambios en veces.

Tabla 2A	
Biomarcador	Cambio en veces (como valor negativo o disminución)
BDNF	0,60
bFGF	0,75
EGF	0,60
FGF-6	0,70
IL-3	0,80
sIL-6R	0,75
leptina	0,55
MIP-1 δ	0,60
MSP- α	0,80
NAP-2	0,75
NT-3	0,75
PDGF-BB	0,60
RANTES	0,75
SCF	0,80
sTNF-RII	0,75
TGF- β 3	0,80
TIMP-1	0,75
TIMP-2	0,80
TNF- β	0,70
TPO	0,75

Tabla 2B

Proteína	Cambio en veces relativo (n = S1)	valor q	Cambio en veces absoluto (n=187)	valor p
MIP-1d	-0,54291	0,0165		
PDGF-BB	-0,53687	0,0165	-0,135	0,891
LEPTINA(OB)	-0,47625	0,0165	-0,357	0,0018
IL-6R	-0,6763	0,0165		
BDNF	-0,53628	0,0165	-0,355	0,0006
TIMP-1	-0,71622	0,0165		
RANTES	-0,68299	0,0165	-0,184	0,0144
EGF	-0,55182	0,0165		
TIMP-2	-0,75011	0,0165		
NAP-2	-0,67257	0,0165		
sTNF RII	-0,70029	0,0165		
TNF-b	-0,64998	0,0165		
TPO	-0,71405	0,0165		
FGF-6	-0,66467	0,0165		
NT-3	-0,69805	0,0165		
bFGF	-0,67351	0,0165		
IL-3	-0,75802	0,0165		
SCF	-0,73041	0,0165		
TGF-63	-0,76912	0,0165		
MSP-a	-0,76466	0,0165		

Como es evidente para los expertos en la técnica, cuando se toman medidas repetidas para los biomarcadores sometidos a prueba, el valor medido que se comparará con el valor de referencia es un valor que tiene en cuenta las medidas repetidas. Las medidas repetidas se pueden tomar en cuenta usando media o la mediana de los valores medidos como el "valor medido".

5

Agentes potenciales de rastreo para determinar la actividad de la modulación de biomarcadores de la EA

También se divulgan procedimientos de rastreo para agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL sometiendo a ensayo agentes candidatos potenciales para determinar su actividad en la modulación de los biomarcadores de la EA. El ensayo de rastreo se puede realizar *in vitro* y/o bien *in vivo*. Los agentes candidatos identificados en los procedimientos de rastreo descritos en el presente documento pueden ser útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de EA y/o DCL.

10

Los procedimientos de rastreo utilizan los biomarcadores de la EA descritos en el presente documento y polinucleótidos biomarcadores de la EA como "dianas del fármaco". Los agentes potenciales se someten a prueba para determinar su actividad en la modulación de una diana del fármaco en un sistema de ensayo. Como se entenderá por los expertos en la técnica, el modo de prueba para determinar la actividad de modulación dependerá del biomarcador de la EA y la forma de la diana del fármaco usado (por ejemplo, proteína o gen). Una amplia variedad de ensayos adecuados son conocidos en la técnica.

15

Cuando la propia proteína biomarcadora de la EA es la diana del fármaco, los agentes potenciales se someten a prueba para determinar la actividad en los niveles de modulación o la actividad en la propia proteína. La modulación de los niveles de un biomarcador de la EA se puede llevar a cabo, por ejemplo, incrementando o reduciendo la semivida de la proteína biomarcadora. La modulación de la actividad de un biomarcador de la EA se puede llevar a cabo incrementando o reduciendo la disponibilidad del biomarcador de la EA para unirse a su(s) receptor(es) o ligando(s) relacionado(s).

20

Cuando un polinucleótido biomarcador de la EA es una diana del fármaco, el agente potencial se somete a prueba para determinar la actividad en la modulación de la síntesis del biomarcador de la EA. El modo exacto de prueba para la actividad moduladora de un agente potencial dependerá, por supuesto, de la forma del polinucleótido biomarcador de la EA seleccionado para la prueba. Por ejemplo, si la diana del fármaco es un polinucleótido biomarcador de la EA, típicamente, la actividad moduladora se somete a prueba midiendo el ARNm transcrito del gen (modulación transcripcional) o midiendo la proteína producida como consecuencia de dicha transcripción (modulación transcripcional). Como se entenderá por los expertos en la técnica, muchos formatos de ensayo utilizarán una forma modificada del gen biomarcador de la EA donde una secuencia heteróloga (por ejemplo, que codifica un marcador de expresión tal como una enzima o una etiqueta de expresión tal como oligo-histidina o una secuencia derivada de otra proteína, tal como myc) se condensa con (o incluso reemplaza) la secuencia que codifica la proteína biomarcadora de la EA. Dicha(s) secuencia(s) heteróloga (s) permite(n) la detección conveniente de niveles de proteína transcrita a partir de la diana del fármaco.

25

30

35

Los agentes potenciales para su uso en los procedimientos de rastreo pueden ser compuestos químicos y/o complejos de cualquier clase, incluyendo moléculas tanto orgánicas como inorgánicas (y complejos de las mismas).

Como se entenderá en la técnica, las moléculas orgánicas son las rastreadas más comúnmente para determinar la actividad moduladora de biomarcadores de la EA. En algunas situaciones, los agentes potenciales para la prueba excluirán la proteína biomarcadora de la EA diana.

5 Los ensayos de rastreo pueden ser de cualquier formato conocido en la técnica, incluyendo ensayos *in vitro* libres de células, ensayos de cultivo celular, ensayos de cultivo de órgano, y ensayos *in vivo* (es decir, ensayos que utilizan modelos animales de EA y DCL). En consecuencia, se divulga una variedad de realizaciones para agentes potenciales de rastreo para identificar agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL.

10 Se rastrean agentes potenciales para identificar los agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL en un ensayo libre de células. Se incuba cada agente potencial con la diana del fármaco en un entorno libre de células, y se mide la modulación del biomarcador de la EA. Los entornos libres de células útiles en los procedimientos de rastreo de la invención incluyen lisados de células (particularmente útiles cuando la diana del fármaco es un gen biomarcador de la EA) y fluidos biológicos tales como sangre completa o fluidos fraccionados derivados de ella tales como plasma y suero (particularmente útiles cuando la proteína biomarcadora de la EA es la diana del fármaco).
15 Cuando la diana del fármaco es un gen biomarcador de la EA, la modulación medida puede ser la modulación de la transcripción o de la traducción. Cuando la diana del fármaco es la proteína biomarcadora de la EA, la modulación puede ser de la semivida de la proteína o de la disponibilidad de la proteína biomarcadora de la EA para unirse a su receptor o ligando relacionado.

20 Se rastrean agentes potenciales para identificar los agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL en un ensayo basado en células. Se incuba cada agente potencial con células cultivadas, y se mide la modulación del biomarcador de la EA diana. Las células cultivadas son astrocitos, células neuronales (tales como neuronas del hipocampo), fibroblastos, o células gliales. Cuando la diana del fármaco es un gen biomarcador de la EA, se puede medir la modulación transcripcional o transicional. Cuando la diana del fármaco es la proteína biomarcadora de la EA, también se añade la proteína biomarcadora de la EA a la mezcla de ensayo, y se mide la modulación de la semivida de la proteína o de la disponibilidad de la proteína biomarcadora de la EA para unirse a su receptor o
25 ligando relacionado.

Además, los aspectos se refieren a agentes potenciales de rastreo para identificar agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL en ensayos basados en cultivo de órganos. En este formato, se incuba cada agente potencial con todo el órgano o bien una parte de un órgano (tal como una parte de tejido cerebral, tal como un corte de cerebro) derivado de un animal no humano y se mide la modulación del biomarcador de la EA diana. Cuando la
30 diana del fármaco es un gen biomarcador de la EA, se mide la modulación transcripcional o traduccional. Cuando la diana del fármaco es la proteína biomarcadora de la EA, también se añade la proteína biomarcadora de la EA a la mezcla de ensayo, y se mide la modulación de la semivida de la proteína o de la disponibilidad de la proteína biomarcadora de la EA para unirse a su receptor relacionado.

35 Aspectos adicionales se refieren a agentes potenciales de rastreo para identificar agentes candidatos para el tratamiento de EA y/o DCL utilizando ensayos *in vivo*. En este formato, se administra cada agente potencial a un animal no humano y se mide la modulación del biomarcador de la EA diana. Dependiendo de la diana del fármaco particular y del aspecto del tratamiento de EA y/o DCL que se pretende afrontar, el animal usado en dichos ensayos puede ser un animal "normal" (por ejemplo, ratón C57) o bien un animal que es un modelo de EA o DCL. Varios modelos animales de EA son conocidos en la técnica, incluyendo el ratón 3xTg-EA (Caccamo *et al.*, 2003, Neuron
40 39(3):409-21), ratones que sobreexpresan la proteína precursora beta amiloide humana (APP) y genes presenilinas (Westaway *et al.*, 1997, Nat. Med 3(1):67-72), y otros (véase, Higgins *et al.*, 2003, Behav. Pharmacol. 14(5-6):419-38). Cuando la diana del fármaco es un gen biomarcador de la EA, se mide la modulación transcripcional o traduccional. Cuando la diana del fármaco es la proteína biomarcadora de la EA, se mide la modulación de la semivida del biomarcador de la EA diana o de la disponibilidad de la proteína biomarcadora de la EA para unirse a
45 su receptor o ligando relacionado. El modo exacto de medir la modulación del biomarcador de la EA diana, por supuesto, dependerá de la identidad del biomarcador de la EA, el formato del ensayo, y la preferencia del facultativo. Una amplia variedad de procedimientos son conocidos en la técnica para medir la modulación de la transcripción, traducción, semivida de la proteína, disponibilidad de la proteína, y otros aspectos que se pueden medir. En vista del conocimiento común de estas técnicas, no es necesario describirlas adicionalmente en este punto.

50 Kits

Se divulgan kits para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Los kits pueden comprender al menos un reactivo específico para un biomarcador de la EA, y pueden incluir además instrucciones para llevar a cabo un procedimiento descrito en el presente documento. Los kits también pueden comprender muestras de referencia de biomarcadores de la EA, que son útiles como valores de referencia. Los
55 "marcadores de diagnóstico de la EA" para su uso en kits proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En otros ejemplos, los "biomarcadores de diagnóstico de la EA"
60 para su uso en kits proporcionados en el presente documento incluyen pero no se limitan son: factor de crecimiento

fibroblástico básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). En otros ejemplos, los kits comprenden cualquiera de uno, dos, tres o cuatro de los marcadores de diagnóstico de la EA leptina, RANTES, PDGF-BB y BDNF.

10 Más comúnmente, los kits comprenden al menos dos reactivos de afinidad específicos de biomarcadores de la EA, en los que el reactivo es específico para un biomarcador de la EA diferente.

Los kits comprenden al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, o al menos 10 reactivos específicos para un biomarcador de la EA. El/Los reactivo(s) específico(s) para un biomarcador de la EA es un reactivo de afinidad.

15 Los kits que comprenden un único reactivo específico para un biomarcador de la EA, en general, tendrán el reactivo encerrado en un recipiente (por ejemplo, un vial, ampolla, u otro recipiente de almacenamiento adecuado), aunque también se contemplan kits que incluyen el reactivo unido a un sustrato (por ejemplo, una superficie interna de un recipiente de reacción de ensayo). Asimismo, los kits que incluyen más de un reactivo también pueden tener los reactivos en recipientes (por separado o en una mezcla) o pueden tener los reactivos unidos a un sustrato.

20 El/Los reactivo(s) específicos de biomarcadores de la EA se marcarán con un marcador detectable (tal como un tinte fluorescente o una enzima detectable), o se modificarán para facilitar la detección (por ejemplo, se biotinilan para permitir la detección con un sistema de detección basado en avidina o estreptavidina). El biomarcador del reactivo específico de la EA no se unirá o se modificará directamente.

25 Determinados kits también incluirán uno o más agentes para la detección de un reactivo específico de biomarcadores de la EA unido. Como será evidente para los expertos en la técnica, la identidad de los agentes de detección dependerá del tipo de reactivo(s) específico(s) de biomarcadores de la EA incluidos en el kit, y el sistema de detección deseado. Los agentes de detección incluyen anticuerpos específicos para el reactivo específico de biomarcadores de la EA (por ejemplo, anticuerpos secundarios), cebadores para la amplificación de un reactivo específico de biomarcadores de la EA que se basa en nucleótidos (por ejemplo, aptámero) o de una "etiqueta" de nucleótido unida al reactivo específico de los biomarcadores de la EA, conjugados de avidina o estreptavidina para la detección de reactivo(s) específico(s) de los biomarcadores de la EA modificados con biotina, y similares. Los sistemas de detección son bien conocidos en la técnica, y no es necesario describirlos adicionalmente en este punto. En consecuencia, se divulgan en el presente documento kits para identificar un individuo con dificultad cognitiva leve (DCL), que comprenden al menos un reactivo específico para RANTES; e instrucciones para llevar a cabo el procedimiento. En algunos ejemplos, los kits comprenden además un reactivo específico para leptina. En otros ejemplos, se proporcionan en el presente documento kits para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un paciente con EA, que comprenden al menos un reactivo específico para leptina; e instrucciones para llevar a cabo el procedimiento. También se divulgan en el presente documento kits para estratificar un paciente con la enfermedad de Alzheimer (EA), que comprenden al menos un reactivo específico para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); al menos un reactivo específico para el factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF- BB); e instrucciones para llevar a cabo el procedimiento.

35 En los kits de la invención también se pueden incluir un sustrato modificado u otro sistema para la captura de biomarcadores de la EA, en particular cuando el kit se diseña para su uso en un ensayo de formato tipo sándwich. El sistema de captura puede ser cualquier sistema de captura útil en un sistema de ensayo de biomarcadores de la EA, tal como una placa multipocillo recubierta con un reactivo específico de los biomarcadores de la EA, perlas recubiertas con un reactivo específico de biomarcadores de la EA y similares. Los sistemas de captura son bien conocidos en la técnica, y no es necesario describirlos adicionalmente en este punto.

40 Los kits pueden incluir los reactivos en forma de una matriz. La matriz incluye al menos dos reactivos diferentes específicos para biomarcadores de la EA (cada reactivo específico para un biomarcador de la EA diferente) unido a un sustrato en un patrón predeterminado (por ejemplo, una rejilla). En consecuencia, la presente invención proporciona matrices que comprenden "marcadores de diagnóstico de la EA" que incluyen, pero no se limitan a, GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG, PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF-b3; TNF-b MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. En otros ejemplos, los "biomarcadores de diagnóstico de la EA" incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1 δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES,

receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). En otros ejemplos, las matrices comprenden cualquiera de uno, dos, tres o cuatro de los marcadores de diagnóstico de la EA leptina, RANTES, PDFG-BB y BDNF. La localización de los diferentes reactivos específicos de biomarcadores de la EA (los "reactivos de captura") permite la medida de niveles de varios biomarcadores de la EA diferentes en la misma reacción. Los kits que incluyen los reactivos en forma de matriz están, comúnmente, en un formato de tipo sándwich, de modo que dichos kits también pueden comprender reactivos de detección. Normalmente, el kit incluirá diferentes reactivos de detección, cada reactivo de detección específico para un biomarcador de la EA diferente. Normalmente, los reactivos de detección en dichas realizaciones son reactivos específicos para los mismos biomarcadores de la EA que los reactivos unidos al sustrato (aunque, típicamente, los reactivos de detección se unen a una parte o sitio diferente sobre la diana del biomarcador de la EA que los reactivos unidos a sustrato), y, en general, son reactivos de detección del tipo de afinidad. Al igual que con los reactivos de detección para cualquier otro ensayo de formato, los reactivos de detección se pueden modificar con un resto detectable, se pueden modificar para permitir la unión de un resto detectable separado, o pueden no modificarse. Los kits de tipo matriz que incluyen reactivos de detección que no están modificados o bien que están modificados para permitir la unión de un resto detectable separado también pueden contener restos detectables adicionales (por ejemplo, restos detectables que se unen al reactivo de detección, tal como anticuerpos marcados que se unen a reactivos de detección no modificados o estreptavidina modificada con un resto detectable para detectar reactivos de detección modificados con biotina).

Las instrucciones relacionadas con el uso del kit para llevar a cabo la invención, en general, describen cómo se usa el contenido del kit para llevar a cabo los procedimientos de la invención. Las instrucciones pueden incluir información como requisitos de la muestra (por ejemplo, forma, procesamiento previo al ensayo, y tamaño), etapas necesarias para medir el/los biomarcador(es) de la EA, e interpretación de los resultados.

Típicamente, las instrucciones suministradas en los kits son instrucciones escritas en un prospecto o etiqueta (por ejemplo, una lámina de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles a máquina (por ejemplo, instrucciones realizadas en un disco de almacenamiento óptico o magnético). En determinadas realizaciones, las instrucciones legibles por máquina comprenden un programa informático para un ordenador digital programable para comparar los valores medidos obtenidos usando los reactivos incluidos en el kit.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no están destinados a limitar el alcance de la invención de ningún modo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Biomarcadores de diagnóstico de la EA

Se compararon niveles de expresión de proteína en plasma para 120 proteínas en 32 casos de suero recogido de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (con una media de edad de 74) con 19 casos de suero recogido de sujetos de control (también con una media de edad de 74). Los sujetos con la enfermedad de Alzheimer se diagnosticaron clínicamente con EA por un neurólogo, y tuvieron puntuaciones en el mini examen del estado mental (MMSE) que variaron de 26-14.

Se sometieron a ensayo muestras de plasma usando un sustrato de filtro de nitrocelulosa. Se diluyeron las muestras de plasma 1:10 en tampón fosfato y se incubaron con el sustrato de captura (una membrana de nitrocelulosa salpicada con anticuerpos de captura). Se incubaron las muestras con el sustrato de captura durante dos horas a temperatura ambiente, después de decantaron del sustrato de captura. Se lavó dos veces el sustrato con 2 ml de tampón de lavado (1X PBS; Tween-20 al 0,05 %) a temperatura ambiente, después se incubó con anticuerpos de detección biotinilados durante dos horas a temperatura ambiente. Se decantó la solución de anticuerpo de captura y se lavó el sustrato dos veces durante 5 minutos con tampón de lavado. A continuación, se incubó el sustrato lavado con conjugado de peroxidasa de rábano picante/estreptavidina durante 45 minutos, tiempo tras el que se decantó la solución conjugada y se lavaron las membranas con tampón de lavado dos veces durante 5 minutos. Se transfirió el sustrato sobre una pieza de papel de filtro, se incubó en solución de tampón de detección de quimioluminiscencia potenciada (ECL) adquirida de Raybiotech, Inc. Se detectó la quimioluminiscencia y se cuantificó con una cámara de imágenes de quimioluminiscencia. Se normalizaron las intensidades de señal para las proteínas estándar transferidas en el sustrato y se usaron para calcular los niveles relativos de biomarcadores. En otros ejemplos, se normalizaron las intensidades de señal para la mediana y se usaron para calcular niveles relativos de biomarcadores.

Los niveles relativos de biomarcadores en plasma se compararon entre los grupos de control y de EA revelando 46 biomarcadores discriminatorios: GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF- β 3; TNF- β MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Un agrupamiento no supervisado (esto es, el algoritmo del agrupamiento no sabe qué casos son de EA y cuáles son normales) de los 46 marcadores discriminatorios da como resultado el agrupamiento de las muestras en 2 grupos o agrupaciones, una agrupación de

muestras de control, y una agrupación de muestras de EA. Se calculó la sensibilidad como el número de muestras de EA clasificadas correctamente en la agrupación de EA/número total de muestras de EA, que es 29/32 o un 90,6 %. Se calculó la especificidad como el número total muestras de control clasificadas correctamente en la agrupación de control/número total de controles, que es (14/19 = 73,6 %).

- 5 Se compararon los niveles de biomarcadores entre los grupos de control y de EA, revelando 20 biomarcadores (mostrados en la tabla 3) que se regulan diferencialmente (cada uno disminuye en EA en comparación con el control) entre los dos grupos. Se realizó el análisis estadístico para hallar la probabilidad de que el hallazgo de niveles diferenciales sea un error (el valor "q") para un biomarcador cualquiera. Los biomarcadores con niveles diferentes y valores q asociados (mostrados como valores en porcentaje) se muestran en la tabla 3 (el cambio en veces indica el cambio en veces entre los niveles en muestras de control frente a muestras de EA). Se calculó la sensibilidad como el número de muestras de EA muestras en la agrupación de EA/ número total de las muestras de EA, que es 29/32 o un 90,6 %. Se calculó la especificidad como el total de EA previsto correctamente / total de EA previsto (29/34 = 85 %).

Tabla 3

Biomarcador cualitativo	Cambio en veces (como valor negativo o disminución)	valor q (%)
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	0,536	1,656
Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)	0,673	1,656
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	0,561	1,656
Factor de crecimiento fibroblástico-6 (FGF-6)	0,664	1,656
Interleucina-3 (IL-3)	0,758	1,656
Receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6 R)	0,676	1,656
Leptina (también conocida como ob)	0,476	1,656
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MTP-1δ)	0,542	1,656
MSP-a	0,764	1,656
NAP-2	0,672	1,656
Neurotrofina-3 (NT-3)	0,698	1,656
Factor de crecimiento derivado de plaquetas, dímero BB (PDGF-BB)	0,536	1,656
RANTES	0,682	1,656
Factor de células madre (SCF)	0,730	1,656
sTNF RII	0,700	1,656
Factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-β3)	0,769	1,656
Inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1)	0,716	1,656
Inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2)	0,750	1,656
Factor de necrosis tumoral beta (TNF-β)	0,649	1,656
TPO	0,714	1,656

15 **Ejemplo 2: Árboles de decisión de datos de marcadores de diagnóstico de la EA**

Después de un análisis adicional de los datos del ejemplo 1, se formularon dos árboles de decisión diferentes para el diagnóstico de EA usando biomarcadores de diagnóstico de la EA.

- 20 El primer árbol de decisión utiliza niveles de sIL-6R, IL-8, y TIMP-1. Las reglas que forman el árbol de decisión son: (1) Si sIL-6R ≤ 5,18 y IL-8 es ≤ 0,957, la indicación es normal; (2) si sIL-6R ≤ 5,18 y IL-8 > 0,957, la indicación es EA; (3) si sIL-6R > 5,18 y TIMP-1 ≤ 7,978, la indicación es EA; y (4) si sIL-6R > 5,18 y TIMP-1 es > 7,978, la indicación es normal, donde los valores expresados son concentraciones relativas.

- 25 Se midió la precisión de este árbol de decisión usando una característica de prueba de validación cruzada de 10 veces en CART para generar tasas de clasificación errónea para estudiar muestras y muestras de prueba. Se calculó la sensibilidad a partir de puntuaciones de prueba como el número de muestras de EA previsto correctamente como EA / número total de muestras de EA (29/32 = 0,905). Se calculó la especificidad a partir de puntuaciones de prueba como el total de casos previsto correctamente de EA/ número total de casos previsto de EA (29/33 = 0,878).

- 30 Se formuló un segundo árbol de decisión usando niveles de BDNF, TIMP-1 y MIP-1δ. Las reglas que forman el árbol de decisión son: (1) Si BDNF > 4,476, la indicación es normal; (2) si BDNF ≤ 4,476 y TIMP-1 ≤ 8,942, la indicación es EA; (3) si BDNF ≤ 4,476, TIMP-1 > 8,942, y MIP-1δ ≤ 1,89, la indicación es EA; y (4) si BDNF < 4,476, TIMP-1 > 8,942, y MIP-1δ > 1,89, la indicación es normal. Se midió la precisión de este árbol de decisión usando una característica de prueba de validación cruzada de 10 veces en CART para generar tasas de clasificación errónea para estudiar muestras y muestras de prueba. Se calculó la sensibilidad a partir de puntuaciones de prueba como el número de muestras de EA previsto correctamente como EA / número total de muestras de EA (0,875). Se calculó la especificidad a partir de puntuaciones de prueba como el total de casos previsto correctamente de EA/ número total de casos previsto de EA (0,82).

Ejemplo 3: Diagnóstico de DCL (no forma parte de la presente invención)

Se midieron niveles de RANTES y leptina en 18 muestras de sujetos de control (media de edad = 74) y 6 muestras de pacientes diagnosticados con dificultad cognitiva leve (DCL). Los pacientes con DCL habían sido diagnosticados por un neurólogo, y tenían una puntuación AULT-A7 de menos de 5 y puntuaciones de mini examen del estado mental (MMSE) que variaban de 30-28. Los sujetos de control tenían una puntuación AULT-A7 mayor de o igual a 5 y una puntuación de MMSE que variaba de 30-28.

Se midieron niveles de RANTES y leptina usando un kit ELISA de R&D systems de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se normalizaron los valores de expresiones de ELISA sin tratar dividiendo cada valor entre la mediana de todas las muestras. El análisis de los datos mostró que (a) la leptina no disminuye en pacientes con DCL en comparación con sujetos de control (en las seis muestras de DCL, leptina era en realidad un 11 % mayor que en los sujetos de control), y (b) una distribución bimodal de RANTES, donde los pacientes con DCL tenían niveles de RANTES de entre 1,043 y 1,183 (los niveles de los sujetos de control eran $\leq 1,043$ o bien $>1,183$). Sin embargo, una inspección más detallada de los datos ha llevado a creer que los sujetos de control con RANTES $\leq 1,043$ se habían clasificado incorrectamente como normales (y se deberían haber diagnosticado como DCL).

La reclasificación de los sujetos de control con RANTES $\leq 1,043$ como pacientes con DCL permite la creación de una regla simple: si RANTES $\leq 1,183$ y leptina $\geq 0,676$, la indicación es DCL. La sensibilidad y la especificidad, calculadas como se describe en el ejemplo 2, fueron de un 83,3 % y un 88,88 %, respectivamente.

Ejemplo 4: Monitorización y estratificación de pacientes con EA (no forma parte de la presente invención)

Se midieron los niveles de RANTES, leptina, PDGF-BB, y BDNF en muestras de suero recogidas de 36 pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer, (media de edad de 74) usando kits ELISA de R&D systems de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se normalizaron los valores de expresiones de ELISA sin tratar dividiendo cada valor entre la mediana de todas las muestras. Se agruparon las muestras en tres clases en base a la puntuación de MMSE: Clase 1 (EA leve), MMSE 27-22; Clase 2 (EA moderada), MMSE 21-16; y Clase 3 (EA grave), MMSE 15-12.

Tras el análisis de los datos de ELISA, se formuló un árbol de decisión usando BDNF y PDGF-BB. Las reglas que forman el árbol de decisión son: (1) si BDNF $\leq 0,626$, la indicación es EA leve; (2) si BDNF $> 0,626$ y PDGF-BB $\leq 0,919$, la indicación es EA moderada; y (3) si BDNF $> 0,626$ y PDGF-BB $> 0,919$, la indicación es EA grave. Los valores expresados son concentraciones relativas que se han normalizado a la mediana. El promedio de los niveles normalizados para leptina fueron: Clase I = 0,886; clase II = 0,757; clase III = 0,589. El promedio de los niveles normalizados para BDNF fue: Clase I = 0,595; clase II = 0,956; clase III = 1,23. Cuando se aplica a un conjunto de datos de "prueba", el árbol de decisión produjo un porcentaje de estratificación correcta de un 58 %, 47 %, y un 57 % de las muestras de prueba en las categorías leve, moderada, y grave.

Ejemplo 5: Cuatro marcadores discriminatorios (no forma parte de la presente invención)

Las concentraciones absolutas en plasma de sólo 4 marcadores discriminatorios, BDNF, PDGF-BB, leptina, y RANTES medidos por ELISA se usaron para clasificar las muestras. Se adquirieron los kits de ELISA de R&D Systems, y se obtuvieron medidas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Por ejemplo, para RANTES, se siguió el siguiente protocolo.

1. Añadir 50 μ l de estándares, especímenes o controles a los pocillos apropiados.
2. Añadir 50 μ l de conjugado de biotina anti-RANTES a cada pocillo.
3. Incubar los pocillos a 37 °C durante 1 hora.
4. Aspirar y lavar los pocillos 4x con tampón de lavado de trabajo.
5. Añadir 100 μ l de conjugado de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo.
6. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Aspirar y lavar los pocillos 4x con tampón de lavado de trabajo.
8. Añadir 100 μ l de cromógeno estabilizado a cada pocillo.
9. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos a oscuras.
10. Añadir 100 μ l de solución de parada a cada pocillo
11. Leer la absorbancia a 450 nm.

Siguiendo el protocolo anterior, se realizó un agrupamiento no supervisado de BDNF, PDGF-BB, leptina, y RANTES usando el programa informático de agrupamiento basado en la red públicamente disponible wCLUTO en

cluto.ccg.umn.edu/cgi-bin/wCluto/wCluto.cgi. En este caso, el agrupamiento de las 4 proteínas dio como resultado el agrupamiento de las muestras en 2 grupos o agrupaciones, una agrupación de muestras de control y una agrupación de muestras de EA. Se calculó la sensibilidad como el número de muestras de EA clasificadas correctamente en la agrupación de EA/número total de muestras de EA, que es 21/24 o un 87,5 %. Se calculó la especificidad como el número total muestras de control clasificadas correctamente en la agrupación de control/número total de controles, que es 20/24 = 83,3 %.

Adicionalmente, se correlacionaron los niveles absolutos de biomarcadores en plasma (medidos por ELISA) para BDNF, PDGF-BB, y leptina, con las puntuaciones de MMSE (intervalo 12-30). Se pudo identificar la EA en puntuaciones de MMSE en un intervalo de 12-28 y se identificaron muestras de control en puntuaciones de MMSE en el intervalo de 25-30. La tabla 4 muestra las correlaciones y su significación estadística (valor p). Las correlaciones superior e inferior muestran si el extremo superior del intervalo de puntuaciones de MMSE y concentraciones de biomarcadores o el extremo inferior del intervalo de puntuaciones de MMSE y concentraciones de biomarcadores están más correlacionados. Por lo tanto, las correlaciones muestran que los niveles mayores de BDNF y leptina se correlacionan significativamente con las mejores puntuaciones de MMSE, y que el incremento en la concentración de BDNF y leptina desde un punto de referencia o una recogida más temprana es una indicación de mejora en la cognición medida por el MMSE. De forma simultánea, o por sí mismo, el descenso de los niveles de PDGF-BB en hombres se correlaciona significativamente con las mejores puntuaciones de MMSE, y una disminución en la concentración de la muestra de PDGF-BB en hombres comparada con una recogida anterior en esos hombres, es una indicación de mejora en la cognición medida por el MMSE.

Los resultados muestran (tabla 4) la correlación entre la concentración de plasma de 3 proteínas discriminatorias para EA con la puntuación de MMSE de los sujetos y la correlación entre concentraciones de proteínas que son discriminatorias para EA. No se produjo correlación entre la puntuación de MMSE y la edad entre los sujetos con EA y no se produjo correlación entre la edad y la concentración de BDNF, PDGF-BB, o leptina en plasma ente sujetos con EA. Los valores p muestran que las correlaciones son estadísticamente significativas. El recuento muestra el número de casos. El BDNF tiene una correlación positiva estadísticamente significativa con puntuaciones de MMSE. El PDGF-BB tiene una correlación negativa estadísticamente significativa con puntuaciones de MMSE en hombres. La leptina tiene una correlación positiva estadísticamente significativa con puntuaciones de MMSE. Este experimento demuestra que se pueden usar las concentraciones de plasma para PDGF-BB, leptina, y BDNF para monitorizar la progresión del deterioro cognitivo.

Tabla 4

	Correlación	Recuento	Valor Z	Valor P	95 % inferior	95 % superior
BDNF para MMSE	0,184	165	2,373	0,0176	0,032	0,328
BDNF para MMSE (mujeres)	0,229	91	2,18	0,0289	0,024	0,415
PDGF-BB para MMSE (varones)	-0,207	74	-1,769	0,0768	-0,416	0,023
leptina para MMSE	0,193	164	2,478	0,0132	0,041	0,336
BDNF para PDGF-BB	0,700	181	11,575	0,0001	0,617	0,768
PDGF-BB para RANTES	0,563	181	8,5	0,0001	0,454	0,655
BDNF para RANTES	0,714	181	11,9	0,0001	0,634	0,779

Los controles y los casos de EA eran de edad coincidente y tenían una media de edad de 74. La puntuación de MMSE media para los casos de EA (n= 24) fue de 20, mientras que la puntuación de MMSE media para los casos de control (n=24) fue de 30. Se realizó la clasificación de las muestras con agrupamiento no supervisado de concentración de proteínas. La precisión total de la clasificación fue de un 85,4 %. Estos resultados demostraron que se pueden usar las concentraciones de proteína en plasma para BDNF, PDGF-BB, leptina, y RANTES, medidas por ELISA para discriminar con precisión entre EA y los controles.

Ejemplo 6: Validación de las concentraciones medias de proteínas en EA y controles por ELISA (no forma parte de la presente invención).

Las concentraciones de proteínas para las proteínas, leptina, BDNF y RANTES, en muestras de plasma de EA (n=95) a controles de edad coincidente (n=88) se muestran en las figuras 1A-1C. Una de las cuatro proteínas que se midieron fue el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). La concentración media de BDNF en plasma de EA fue de 8,1 ng/ml (EE+/- 0,4) comparada con la media de plasma de control 10,8 ng/ml (EE+/- 0,68) y se descubrió que la diferencia era estadísticamente muy significativa (valor p = 0,0006). También se descubrió que las concentraciones de BDNF fueron inferiores en otras formas de demencia (5,74 ng/ml, n=20) a EA. Se descubrió que la concentración media de una segunda proteína leptina en plasma de EA era de 10,9 ng/ml (EE+/- -1,06) comparada con la media de plasma de control 17,4 ng/ml (EE+/- -1,8) y se descubrió que la diferencia era estadísticamente muy significativa (valor p = 0,0018). La concentración media de una tercera proteína Rantes en plasma de EA era de 66,3 ng/ml (EE+/- 2,4) comparada con muestras de control 74,5 ng/ml (EE+/- -3,2) y se

descubrió que la diferencia era estadísticamente significativa (valor p = 0,0403). No se observaron diferencias en las medias de las concentraciones para RANTES, PDGF-BB, y BDNF entre sujetos con EA con puntuaciones de MMSE \geq 20 (n=54) y con $<$ 20 (n=41).

Ejemplo 7: Concentraciones absolutas de biomarcadores en plasma (no forman parte de la presente invención)

Adicionalmente, se midieron las concentraciones absolutas de biomarcadores en plasma para BDNF, y se compararon las concentraciones medias para los controles con DCL (dificultad cognitiva leve), MMSE 25- 28, MMSE 20-25, y MMSE 10-20. Para los propósitos de este experimento, el índice usado en el siguiente ejemplo es: EA cuestionable es = puntuación de MMSE en el intervalo de 25-28; EA leve = puntuación de MMSE en el intervalo de 20-25; y EA moderada = puntuación de MMSE en el intervalo de 10-20 y EA grave = puntuación de MMSE en el intervalo de 10-20. Para el propósito del ejemplo 7, a todos los individuos evaluados como que presentaban EA cuestionable un médico les diagnosticó que presentaban EA. La figura 2 muestra que las concentraciones medias de BDNF en plasma para MMSE 25-28; MMSE 20-25; MMSE 10-20 son significativamente menores que la concentración media en los controles (Normal, media de edad 74) y la concentración media de BDNF en DCL es significativamente mayor que en los controles y todos los casos de EA. Fig. 2.

Prueba t independiente para BDNF plasma

Variable de grupo: estadio

Diferencia hipotética = 0

Criterios de inclusión: Trazas desde todas las del centro

	Dif. media	DF	Valor t	Valor P
DCL, leve	6349,252	47	3,050	0,0038
DCL, moderada	6828,574	31	2,651	0,0125
DCL, normal	3961,358	86	1,442	0,1529
DCL, cuestionable	7547,218	17	2,550	0,0207
leve, moderada	479,322	68	0,460	0,6467
leve, normal	-2387,894	123	2,270	0,0250
leve, cuestionable	1197,966	54	0,969	0,3369
moderada, normal	-2867,216	107	-2,270	0,0319
moderada, cuestionable	718,644	38	0,475	0,6372
normal, cuestionable	3585,860	93	1,993	0,0492

Info. grupo para BDNF plasma

Variable de grupo: estadio

Criterios de inclusión: Trazas desde todas las del centro

	Recuento	Media	Varianza	D.E.	E.E.
DCL	6	14879,833	85932530,967	9269,980	3784,454
Leve	43	8530,581	15299257,963	3911,427	596,487
Moderada	27	8051,259	22317487,815	4724,139	909,161
Normal	82	10918,476	39478328,993	6283,178	693,861
Cuestionable	13	7332,615	15122872,923	3888,814	1078,563

Adicionalmente, se compararon las concentraciones absolutas de BDNF, en muestras de plasma recogidas de cuatro centros de Alzheimer para determinar las diferencias de género en la media de las concentraciones entre EA (mujeres) y control (varones) y EA (varones) y control (varones). La fig. 3 muestra que existe una diferencia de un 40 % en la concentración de BDNF en mujeres con EA comparada con las mujeres de control y la diferencia es estadísticamente muy significativa (valor p = 0.004). Se descubrió que la diferencia en la media de la concentración de BDNF para todos los casos de EA comparada con el caso de control era estadísticamente muy significativa (valor p = 0,0006).

Prueba t independiente para BDNF plasma

Variable de grupo: Enfermedad

División por: sexo

Diferencia hipotética = 0

Exclusión de fila: Todas las del centro

	Dif. media	DF	Valor t	Valor P
EA, Control: Total	-2974,140	187	-3,482	0,0006
EA, Control: M	-3939,353	87	-2,924	0,0044
EA, Control: V	-1348,601	92	-1,165	0,2469

Los resultados para los totales pueden no estar de acuerdo con los resultados para las células individuales debido a

los valores que faltan para las variables de división.

Info. grupo para BDNF plasma
Variable de grupo: Enfermedad
División por: sexo
Exclusión de fila: Todas las del centro

	Recuento	Media	Varianza	D. E.	E.E.
EA: Total	106	5596,113	24323422,844	4931,878	479,026
EA M	38	5775,921	25121499,318	5012,133	813,076
EA: V	62	3396,774	24336564079	4923,210	626,516
Control: Total	83	8570,253	46322420,606	6806,058	747,062
Control: M	51	9715,275	50173107,603	7003,298	991,860
Control: V	32	6745,375	36011373,274	6000,948	1060,828

Los resultados para los totales pueden no estar de acuerdo con los resultados para las células individuales debido a los valores que faltan para las variables de división.

- 5 Adicionalmente, se midieron las concentraciones absolutas de biomarcadores en plasma para RANTES en muestras de plasma recogidas de cuatro centros de Alzheimer diferentes, y se compararon las concentraciones medias para los controles con DCL (dificultad cognitiva leve), MMSE 25-28; (MMSE 20-25, MMSE 10-20 y MMSE 10-20. A continuación se describe el índice. Se encontró que todas las diferencias medias entre la EA leve en comparación con la EA moderada, EA leve en comparación con Normal, EA leve en comparación con EA grave, EA moderada en comparación con Normal, EA cuestionable en comparación con Normal, EA normal en comparación con EA grave, eran estadísticamente significativas. Fig. 4.
- 10

Prueba t independiente para RANTES ELISA

Variable de grupo: estadio
Diferencia hipotética = 0
Exclusión de fila: Todas las del centro

	Dif. media	DF	Valor t	Valor P
DCL, leve	84,789	64	0,007	0,9945
DCL, moderada	12454,688	51	1,042	0,3022
DCL, normal	-10422,892	106	-0,866	0,3884
DCL, cuestionable	9682,438	29	0,682	0,5007
DCL, grave	50349,200	10	1,647	0,1305
leve, moderada	12369,899	97	1,814	0,0728
leve, normal	-10507,681	152	-1,775	0,0780
leve, cuestionable	9597,649	75	1,081	0,2830
leve, grave	50264,411	56	2,031	0,0470
moderada, normal	-22977,580	139	-3,606	0,0004
moderada, cuestionable	-2772,250	62	-0,315	0,7535
moderada, grave	37894,512	43	1,647	0,1069
normal, cuestionable	20105,330	117	2,353	0,0203
normal, grave	60772,092	98	2,395	0,0185
cuestionable, grave	40666,762	21	1,624	0,1192

Info. grupo para RANTES ELISA
Variable de grupo: estadio
Exclusión de fila: Todas las del centro

	Recuento	Media	Varianza	D. E.	E. E.
DCL	10	54919,200	1729660285,733	41589,185	13151,655
Leve	56	54834,411	1203622609,701	34693,265	4636,082
Moderada	43	42464,512	1036226732,256	32190,476	4909,002
Normal	98	65342,092	1275358885,672	35712,167	3607,474
Cuestionable	21	45236,762	1201710117,890	34665,691	7564,674
Grave	21	4570,000	2976800,000	1725,341	1220,000

- 15 Adicionalmente, se midieron las concentraciones absolutas de biomarcadores en plasma para leptina en muestras de plasma recogidas de cuatro centros de Alzheimer diferentes, y se compararon las concentraciones medias para los controles con DCL (dificultad cognitiva leve), MMSE 25-28; MMSE 20-25, MMSE 10-20 y MMSE 10-20. Se encontró que todas las diferencias medias entre EA cuestionable en comparación con DCL, EA leve en comparación con Normal, EA leve en comparación con EA cuestionable, EA cuestionable en comparación con Normal, y EA

moderada en comparación con Normal eran estadísticamente significativas. Fig. 5.

Prueba t independiente para leptina ELISA

Variable de grupo: estadio

Diferencia hipotética = 0

Exclusión de fila: Todas las del centro

	Dif. media	DF	Valor t	Valor P
DCL, leve	4164,889	64	1,338	0,1856
DCL, moderada	4707,044	51	1,061	0,2939
DCL, normal	-650,092	105	-0,123	0,9022
DCL, cuestionable	7793,348	29	2,000	0,0550
DCL, grave	8187,800	10	0,739	0,4767
leve, moderada	542,155	97	0,272	0,7860
leve, normal	-4814,981	151	-2,117	0,0359
leve, cuestionable	3628,458	75	1,897	0,0617
leve, grave	4022,911	56	0,734	0,4661
moderada, normal	-5351,136	138	-1,963	0,0516
moderada, cuestionable	3086,303	62	1,085	0,2822
moderada, grave	3480,756	43	0,403	0,6892
normal, cuestionable	8443,439	116	2,369	0,0195
normal, grave	8837,892	97	0,778	0,4383
cuestionable, grave	394,452	21	0,078	0,9383

Info. grupo para leptina ELISA

Variable de grupo: estadio

Exclusión de fila: Todas las del centro

	Recuento	Media	Varianza	D. E.	E. E.
DCL	10	15727,300	225300738,678	15010,021	4746,585
Leve	56	11562,411	58790550,756	7667,500	1024,613
Moderada	43	11020,256	145797834,909	12074,677	1841,371
Normal	97	16377,392	255125297,032	15972,642	1621,776
Cuestionable	21	7933,952	471333192,348	6916,154	1509,229
Grave	2	7539,500	16125520,504	4015,659	2839,500

- 5 Adicionalmente, se midieron las concentraciones absolutas de biomarcadores en plasma para PDGF-BB en muestras de plasma recogidas de cuatro centros de Alzheimer diferentes, y se compararon las concentraciones medias para los controles con DCL (dificultad cognitiva leve), MMSE 25-28; MMSE 20-25, MMSE 10-20 y MMSE 10-20. Se encontró que todas las diferencias medias entre la EA cuestionable en comparación con EA leve, EA leve en comparación con EA grave, EA moderada en comparación con EA grave, Normal en comparación con EA cuestionable, y Normal en comparación con EA grave eran estadísticamente significativas. Fig. 6.

10

Prueba t independiente para PDGF-BB ELISA

Variable de grupo: estadio

Diferencia hipotética = 0

Exclusión de fila: Todas las del centro

	Dif. media	DF	Valor t	Valor P
DCL, leve	-62,275	58	-0,286	0,7756
DCL, moderada	81,595	44	0,411	0,6831
DCL, normal	-42,865	103	-0,210	0,8343
DCL, cuestionable	191,571	28	0,810	0,4246
DCL, grave	637,000	9	1,072	0,3117
leve, moderada	143,869	86	1,285	0,2023
leve, normal	19,410	145	0,199	0,8426
leve, cuestionable	253,846	70	1,812	0,0742
leve, grave	699,275	51	1,745	0,0871
moderada, normal	-124,439	131	-1,201	0,2320
moderada, cuestionable	109,977	56	0,869	0,3885
moderada, grave	555,405	37	1,716	0,0945
normal, cuestionable	234,436	115	1,761	0,0799
normal, grave	679,865	96	1,696	0,0931
cuestionable, grave	445,429	21	1,278	0,2153

Info. grupo para PDGF-BB ELISA

Variable de grupo: estadio

Exclusión de fila: Todas las del centro

	Recuento	Media	Varianza	D. E.	E. E.
DCL	9	731,000	650139,000	806,312	268,771
Leve	51	793,275	315391,883	561,598	78,639
Moderada	37	649,405	204231,470	451,920	74,295
Normal	96	773,865	318171,171	564,067	57,570
Cuestionable	21	539,429	233024,657	482,726	105,340
Grave	2	94,000	648,000	25,456	18,000

Adicionalmente, se midieron las concentraciones absolutas de biomarcadores en plasma para BDNF en muestras de plasma recogidas de cuatro centros de Alzheimer diferentes, y se compararon las concentraciones medias para los controles para DCL (dificultad cognitiva leve), EA cuestionable (MMSE 25-28), leve Se encontró que todas las diferencias medias entre DCL en comparación con EA moderada, DCL EA en comparación con EA cuestionable, EA leve en comparación con Normal, EA leve EA en comparación con EA grave, moderada en comparación con Normal, Normal en comparación con EA cuestionable, y Normal en comparación con grave eran estadísticamente significativas. Fig. 7.

5

Prueba t independiente para BDNF plasma
 Variable de grupo: estadio
 Diferencia hipotética = 0
 Exclusión de fila; Todas las del centro

	Dif. media	DF	Valor t	Valor P
DCL, leve	2819,186	64	1,433	0,1568
DCL, moderada	4071,016	51	1,877	0,0663
DCL, normal	124,278	106	0,053	0,9578
DCL, cuestionable	4535,757	29	1,806	0,0813
DCL, grave	8660,400	10	1,202	0,2370
leve, moderada	1251,831	97	1,262	0,2098
leve, normal	-2694,908	152	-2,638	0,0092
leve, cuestionable	1716,571	75	1,447	0,1520
leve, grave	5841,214	56	1,726	0,0898
moderada, normal	-3946,7391	139	-3,431	0,0008
moderada, cuestionable	464,741	62	0,360	0,7199
moderada, grave	4589,384	43	1,265	0,2128
normal, cuestionable	4411,480	117	2,868	0,0049
normal, grave	8536,122	98	1,781	0,0781
cuestionable, grave	4124,643	21	1,321	0,2006

Info. grupo para BDNF plasma
 Variable de grupo: estadio
 Exclusión de fila: Todas las del centro

	Recuento	Media	Varianza	D. E.	E. E.
DCL	10	9511,900	96113654,322	9803,757	3100,220
Leve	56	6692,714	22509096,208	4744,375	633,994
Moderada	43	5440,884	25765123,534	5075,936	774,073
Normal	98	9387,622	45504479,969	6745,701	681,419
Cuestionable	21	4976,143	18681976,129	4322,265	943,196
Grave	2	851,500	63724,500	252,437	178,500

Se ha descubierto que para una EA cuestionable (puntuación de MMSE en el intervalo de 25-28) los niveles de leptina y PDGF-BB se incrementan significativamente mientras que BDNF y RANTES no cambian significativamente. Se ha descubierto que de una EA leve (puntuación de MMSE en el intervalo de 20-25) a una EA moderada (puntuación de MMSE en el intervalo de 10-20), el nivel de leptina no desciende mientras que los niveles para RANTES, BDNF y PDGF-BB descienden.

Ejemplo 8 (no forma parte de la presente invención)

En un intento de identificar las proteínas que se alteran en el sistema inmunitario periférico en la EA, se midieron los niveles de expresión de 120 citocinas, quimiocinas, y factores de crecimiento en plasma de 32 pacientes con EA y 19 controles de edad coincidente sin demencia, usando micromatrices manchadas de anticuerpos sobre filtros. El análisis estadístico identificó 20 proteínas como significativamente diferentes entre la EA y los controles. Seis de ellas incluyendo el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y NT-3, y PDGF-BB, EGF, FGF-6, bFGF, TGF-b3 tienen una actividad neurotrófica conocida y se redujeron significativamente en plasma de EA. Los niveles de BDNF se correlacionaron con una mejor función cognitiva en el mini examen del estado mental (MMSE). Las medidas de BDNF en plasma de dos cientos casos de EA y controles usando ELISA de tipo sándwich comercial mostraron una reducción altamente significativa de un 25 % en los casos de EA. En consistencia con los datos de la matriz, las reducciones en los niveles de BDNF en plasma se asociaron con una disminución en la función de memoria. El BDNF es crítico para el mantenimiento, la supervivencia y la función neuronal. Sin quedar vinculado a ninguna teoría, la disminución en los niveles en sangre de neurotrofinas y BDNF puede estar relacionada con la neurodegeneración y la disfunción cognitiva en la EA.

Ejemplo 9: Biomarcadores adicionales

Adicionalmente, los niveles cualitativos de biomarcadores para GDNF, SDF-1, IGFBP3, FGF-6, TGF-b3, BMP-4, NT-3, EGF, BDNF, IGFBP-2 se correlacionaron con las puntuaciones de MMSE (intervalo 12-30) para la EA (intervalo de MMSE 12-28) y las muestras de control (intervalo de MMSE 25-30). La tabla 5 muestra las correlaciones y su significación estadística (valor p). Las correlaciones superior e inferior muestran si el extremo superior del intervalo de puntuaciones de MMSE y concentraciones de biomarcadores o el extremo inferior del intervalo de puntuaciones de MMSE y concentraciones de biomarcadores están más correlacionados. Una correlación negativa quiere decir que las puntuaciones de MMSE se incrementan con la disminución en los niveles de biomarcador y viceversa. Una

correlación positiva quiere decir que las puntuaciones de MMSE se incrementan con el incremento en los niveles de biomarcador.

Tabla 5

	Correlación	Recuento	Valor Z	Valor P	95 % inferior	95 % superior
GDNF para MMSE	-0,258	42	-1,646	0,0997	-0,521	0,05
SDF-1 para MMSE	-0,363	42	-2,375	0,0175	-0,601	-0,066
IGFBP-3 para MMSE	0,293	42	1,886	0,0593	-0,012	0,548
FGF-6 para MMSE	0,471	42	3,192	0,0014	0,195	0,687
TGF-b3 para MMSE	0,317	42	2,049	0,0405	0,014	0,566
BMP-4 para MMSE	0,294	42	1,845	0,0583	-0,011	0,545
NT-3 para MMSE	0,327	42	2,118	0,0342	0,025	0,574
EGF para MMSE	0,409	42	2,711	0,0067	0,12	0,634
BDNF para MMSE	0,464	42	3,139	0,0017	0,187	0,673
IGFBP-2 para MMSE (mujeres)	0,498	24	2,5	0,0123	0,118	0,75

5 Ejemplo 10

Este ejemplo muestra la tabla 6, un resumen de marcadores cuantitativos para la identificación y estratificación de la EA.

Tabla 6

Referencias	Muestras	Biomarcador en plasma	% diferencia en muestras	Valor de P
Normal	EA cuestionable	BDNF	-46 %	0,0049
Normal	EA cuestionable	leptina	-52 %	0,0195
Normal	EA cuestionable	RANTES	-31 %	0,0203
Normal	EA cuestionable	PDGF-BB	-30 %	0,0799
Normal	EA leve	BDNF	-29 %	0,0092
Normal	EA leve	leptina	-29 %	0,0359
Normal	EA leve	RANTES	-16 %	0,0780
Normal	EA moderada	BDNF	-42 %	0,0008
Normal	EA moderada	leptina	-33 %	0,0359
Normal	EA moderada	RANTES	-35 %	0,0004
Normal	EA grave	BDNF	-90 %	0,0781
Normal	EA grave	RANTES	-93 %	0,0185
Normal	EA grave	PDGF-BB	-89 %	0,0931
EA cuestionable	EA leve	leptina	45 %	0,0617
EA cuestionable	EA leve	PDGF-BB	46 %	0,0742
EA leve	EA moderada	RANTES	-23 %	0,0780
EA leve	EA grave	BDNF	-87 %	0,0898
EA leve	EA grave	RANTES	-92 %	0,0470
EA leve	EA grave	PDGF-BB	-88 %	0,0871
EA cuestionable	DCL	BDNF	91 %	0,0813
EA cuestionable	DCL	leptina	98 %	0,0550
DCL	EA leve	BDNF	-42 %	0,0038

- 10 En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), que comprenden comparar un nivel medido de al menos 4 biomarcadores de diagnóstico de la EA, en los que dichos biomarcadores comprenden BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES, en una muestra de fluido biológico de un individuo con un nivel de referencia para cada biomarcador de diagnóstico de la EA. En consecuencia, se divulgan procedimientos en los que el BDNF disminuido en al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 % o aproximadamente un 30 % en comparación con un nivel de referencia de BDNF, indica dificultad cognitiva, tal como, por ejemplo, una indicación de la EA. En consecuencia, se divulgan procedimientos en los que la leptina disminuida en al menos aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 % o aproximadamente un

30 % en comparación con un nivel de referencia de leptina, indica dificultad cognitiva, tal como, por ejemplo, una indicación de la EA. En consecuencia, se divulgan procedimientos en los que RANTES disminuido en al menos aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 15 % en comparación con un nivel de referencia de RANTES, indica dificultad cognitiva, tal como, por ejemplo, una indicación de la EA. En consecuencia, se divulgan procedimientos en los que PDGF-BB disminuido en al menos aproximadamente un 80%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 90% en comparación con un nivel de referencia de PDGF-BB, indica dificultad cognitiva, tal como, por ejemplo, una indicación de la EA grave.

Tabla 7

Proteína	Nombres alternativos	Clase	ID de la proteína
alfa-1 glucoproteína ácida		fase aguda	
alfa-1 antitripsina		fase aguda	
Ceruloplasmina		fase aguda	
Haptoglobina		fase aguda	
Hemopexina		fase aguda	
Hemoxigenasa		fase aguda	
inhibidor del activador de plasminógeno 1	PAI-1	fase aguda	
Amiloide A sérico	SAA	fase aguda	
Amiloide P sérico	SAP	fase aguda	
ligando 4-11313	4-1BBL/CD137L	Apoptosis	P41273
BAFF	TALL-1	Apoptosis	Q9Y275
receptor de TRAIL soluble 3	TRAIL sR3/ TNFRS10C	Apoptosis	014755
receptor de TRAIL soluble 4	TRAIT SR4/TNFRS10D	Apoptosis	Q9UBN6
Ligando de muerte relacionado con TNF 1a	TRDL-1a/ APRIL	Apoptosis	AF046888
TNFSF-14	LIGHT	Apoptosis	043557
TRAIL	Apo2L	Apoptosis	P50591
BCA-1	BLC	quimiocina	043927
CCL-28	CCK-1	quimiocina	
quimiocina atractora de linfocitos T cutáneos	CTACK, CCL27	quimiocina	Qgz1X0
ENA-78		quimiocina	P42830
Eotaxina-1		quimiocina	P51671
Eotaxina-2	MPIF-2	quimiocina	000175
Eotaxina-3	CCL26	quimiocina	Q9Y258
Fractalcina	neurotactina	quimiocina	P78423
Proteínas quimiotácticas de granulocitos 2	GCP-2	quimiocina	P80162
GRO alfa	MGSA	quimiocina	P09341
GRO beta	MIP-2alfa	quimiocina	P19875
GRO gamma	MIP-2beta	quimiocina	P19876
quimiocina CC por infiltrado hematogéno 1	HCC-1	quimiocina	Q16627
quimiocina CC por infiltrado hematogéno 4	HCC-4/ CCL16	quimiocina	015476
I-309	TCA-3/ CCL-1	quimiocina	P22362
proteína inducible por IFN gamma 10	IP-10	quimiocina	P02778
Quimiocina de linfocitos T alfa inducible por IFN	I-TAC/ CXCL11	quimiocina	AF030514
interleucina-8	IL-8/NAP-1	quimiocina	P10145
quimiotaxina derivada de células leucocitarias 2	LECT2	quimiocina	
Lungquina	CXCL-15/WECHE	quimiocina	
Linfotactina	Lptn/ATAC	quimiocina	P47992 MIP-1 alfa/ pLD78/
proteína inflamatoria de macrófagos 1alfa	CCL3	quimiocina	P10147
proteína inflamatoria de macrófagos 1beta	NIP-1 beta/ ACT-2/ CCLA	quimiocina	P13236
proteína inflamatoria de macrófagos 1d	MIP-1d/ CCL15/ LKN-1	quimiocina	

ES 2 411 455 T3

(continuación)

Proteína	Nombres alternativos	Clase	ID de la proteína
proteína inflamatoria de macrófagos 1gamma	MIP-1gamma/ CCL9/MIP-3alfa/ CCL20	quimiocina	
proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa	LARC	quimiocina	P78556
proteína inflamatoria de macrófagos 3 beta	MIP-3beta/ ELC/CCL19	quimiocina	Q99731
quimiocina derivada de macrófagos	MDC/STCP-1	quimiocina	000626
proteína quimioattractora de monocitos 1	MCP-1/CCL2	quimiocina	P13500
proteína quimioattractora de monocitos 2	MCP=2/ CCL8	quimiocina	P78388
proteína quimioattractora de monocitos 3	MCP-3/ CCL7	quimiocina	P80098
proteína quimioattractora de monocitos 4	MCP-4/ CCL13	quimiocina	Q99616
proteína quimioattractora de monocitos 5	MCP-5/ CCL12	quimiocina	
monocina inducida por IFN gamma	MIG	quimiocina	Q07325
quimiocina asociada a mucosa	MEC	quimiocina	AF266504
factor inhibidor del progenitor mieloides	MPIF/ CKbeta8/ CCL23	quimiocina	
proteína básica de plaquetas	PBP/ CTAP-III/ NAP-2	quimiocina	P02775
factor plaquetario 4	PF-4/ CXCLA	quimiocina	P02776
quimiocina reguladora de la activación pulmonar	PARC/ CCL18/ MIP-4	quimiocina	
RANTES	CCL5	quimiocina	P13501
quimiocina del tejido linfático secundario	SLC / 6CKine	quimiocina	000585
factor derivado de células estromales 1	SDF-1/CXCL12	quimiocina	P48061
quimiocina regulada por la activación del timo	TARC/CCL174	quimiocina	Q92593
quimiocina expresada en el timo	TECK/ CCL25	quimiocina	015444
Clq		colectina	
lectina de unión a manosa	MBL	colectina	
proteína tensioactiva A	SP-A	colectina	
proteína tensioactiva D	SP-D	colectina	
inhibidor C1		complemento	
C3a		complemento	
proteína de unión a Cob	C4BP	complemento	
C5a		complemento	
complemento C3	C3	complemento	
Complemento (C5)	C5	complemento	
complemento C8	C8	complemento	
complemento C9	C9	complemento	
factores aceleradores de la degradación	DAF	complemento	
Factor H		complemento	
inhibidor de membrana de la lisis reactiva	MIRL/ CD59	complemento	
Properdina		complemento	
receptor de complemento soluble 1	sCR1	complemento	
receptor de complemento soluble 2	sCR2	complemento	
cardiotrofina-1	CT-1	citocina	Q16619
CD27		citocina	P26842
CD27L	CD70	citocina	P32970
CD30	Ki-1	citocina	P28908
CD30L	TNFSF8	citocina	P32971
CD40L	TRAP/CD154	citocina	P29965
interferón alfa	IFNalfa	citocina	P01562
interferón beta	IFNbeta	citocina	P01574
interferón gamma	IFNgamma	citocina	P01579
interferón omega	IFNomega	citocina	P05000

ES 2 411 455 T3

(continuación)

Proteína	Nombres alternativos	Clase	ID de la proteína
gen sensible a interferón 15	ISG-15	citocina	P05161
leptina	OB	citocina	P41159
factor inhibidor de leucemia	LIF/CNDF	citocina	P15018
Limfotoxina	LT/ TNF beta	citocina	P01374
factor estimulador de colonias de macrófagos	M-CSF/ CSF-1	citocina	P09603
proteína estimuladora de macrófagos alfa	MSPalfa/HGF1	citocina	P26927
proteína estimuladora de macrófagos beta	MSPbeta/ HGF1	citocina	P26927
factor de inhibición de la migración	MIF/GIF	citocina	P14174
oncostatina M	OSM	citocina	P13725
RANKL	TRANCE/TNFSF-11	citocina	014788
complejo IL6 R soluble	SIL6RC (gp130 + sIL6R)	citocina	
ligando Fas soluble	SCD95L	citocina	P48023
receptor TNF tipo I	TNF-RI p55	citocina	P19438
receptor TNF tipo II	TNF-R p75	citocina	P20333
TNFSF-18	GITRL/AITRL	citocina	095852
factor de necrosis tumoral alfa	TNP-alfa/Apo3L/DR3-L/TNFSF-12	citocina	P01375
TWEAK		citocina	043508
factor de crecimiento fibroblástico ácido	aFGF	Factor de crecimiento	P05230
activina beta A		Factor de crecimiento	P08476
proteína relacionada con agouti	AGRP	Factor de crecimiento	AAB52240
Amfiregulina	AR/SDGF	Factor de crecimiento	P15514
factor de tipo angopoyetina	ALF	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento fibroblástico básico	bFGF	Factor de crecimiento	P09038
Betacelulina		Factor de crecimiento	P35070
proteína morfogénica ósea 2	BMP2	Factor de crecimiento	P12643
proteína morfogénica ósea 4	BMP4	Factor de crecimiento	
proteína morfogénica ósea 5	BMP5	Factor de crecimiento	
proteína morfogénica ósea 6	BMP6	Factor de crecimiento	
proteína morfogénica ósea 7	BMP7	Factor de crecimiento	
cripto-1	CRGF	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento epidérmico	EGF	Factor de crecimiento	P01133
Eritropoyetina	Epo	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 17	FGF-17	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 18	FGF 18	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 19	FGF-19	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 2	FGF-2	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 4	BGF-4	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 6	FGF-6	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 7	FGF-7/ KGF	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 8	FGF-8	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento de fibroblastos 9	FGF-9	Factor de crecimiento	
ligando Flt3	Fit L	Factor de crecimiento	P49771
Folistatina	FSP	Factor de crecimiento	
factor estimulador de colonias de granulocitos	G-CSF	Factor de crecimiento	P09919
CSF granulocitos/macrófagos	GM-CSF	Factor de crecimiento	P04141
factor de crecimiento y diferenciación 11	GDF-11	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento y diferenciación 15	GDF-15	Factor de crecimiento	
gen específico de detención del crecimiento 6	Gas-6	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	HB-EGF	Factor de crecimiento	Q99075.
factor de crecimiento de hepatocitos	HGF/SF	Factor de crecimiento	P14210

ES 2 411 455 T3

(continuación)

Proteína	Nombres alternativos	Clase	ID de la proteína
hepatopoyetina A	HPTA/HRG alfa/ neuregulina	Factor de crecimiento	
heregulina alfa	NDF/HRG beta/ neuregalina/	Factor de crecimiento	
heregulina beta	NDF	Factor de crecimiento	
proteína de unión a IGF 1	IGFBP-1	Factor de crecimiento	
proteína de unión a IGF 2	IGFBP-2	Factor de crecimiento	
proteína de unión a IGF 3	IGFBP-3	Factor de crecimiento	
proteína de unión a IGF 4	IGFBP-4	Factor de crecimiento	
inhibina A		Factor de crecimiento	
inhibina B		Factor de crecimiento	
factor de crecimiento insulinoide IA	IGF-IA	Factor de crecimiento	P01343
factor de crecimiento insulinoide IB	IGF-IB	Factor de crecimiento	P05019
factor de crecimiento insulinoide II	IGF-II	Factor de crecimiento	P01344
lectina específica de galactosa en macrófagos 1	MAC-1	Factor de crecimiento	
Neuritina		Factor de crecimiento	
Neurturina		Factor de crecimiento	
orexina A		Factor de crecimiento	
Osteonectina	SPARC	Factor de crecimiento	
Osteoprotegrina	TNFRSF11B	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento placentario	PGIF	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa	PDGF-A	Factor de crecimiento	P04085
factor de crecimiento derivado de plaquetas beta	PDGF-B	Factor de crecimiento	P01127
proteína de zona del embarazo		Factor de crecimiento	
Prolactina	PRL	factor de crecimiento	P01236
factor derivado de neuronas motoras y sensoriales	SMDF	factor de crecimiento	
receptor GM-CSF soluble	sGM-CSF R	Factor de crecimiento	P15509
factor de células madre	SLF/SCF/kit/ligando/MGF	factor de crecimiento	P21583
trombopoyetina	ligando TPO/c-MPL	Factor de crecimiento	P40225
linfoproteína estromal tímica	TSLP	Factor de crecimiento	
Timopoyetina	Tpo	Factor de crecimiento	
factor de crecimiento transformante alfa	TGF-alfa	Factor de crecimiento	P01135
factor de crecimiento transformante beta 1	TGF-beta I	Factor de crecimiento	P01137
factor de crecimiento transformante beta 2	TGF-beta2	Factor de crecimiento	P08112
factor de crecimiento transformante beta 3	TGF-beta3	Factor de crecimiento	P10600
factor de crecimiento vascular endotelial	VEGF	Factor de crecimiento	P15692
antagonista del receptor de interleucina 1	ILiRa	interleucina	P18510
interleucina-10	IL-10	interleucina	P22301
interleucina-11	IL-11	interleucina	P20809
interleucina-12p35	IL-12p35	interleucina	P29459
interleucina-12p40	IL-12p40	interleucina	P29460
interleucina-13	IL-13	interleucina	P35225
interleucina-14	IL-14	interleucina	L15344
interleucina-15	IL-15	interleucina	P40933
interleucina-16	IL-16	interleucina	Q14005
interleucina-17	IL-17	interleucina	Q16552
interleucina-18	IL-18	interleucina	Q14116
interleucina-1alfa	IL-1 alfa	interleucina	P01583
interleucina-1beta	IL-1 beta	interleucina	P01584
interleucina-2	IL-2	interleucina	P01585
interleucina-3	IL-3	interleucina	P08700
interleucina-4	IL-4	interleucina	P05112
interleucina-5	IL-5	interleucina	P05113

ES 2 411 455 T3

(continuación)

Proteína	Nombres alternativos	Clase	ID de la proteína
interleucina-6	IL-6	interleucina	P05231
interleucina-7	IL-7	interleucina	P13232
interleucina-9	Sir9	interleucina	P15248
receptor de interleucina-1 soluble I	sIL1R/ CD121a	interleucina	P14778
receptor de interleucina-1 soluble II	sIL1R/CD121b	interleucina	P27930
receptor de interleucina-2 soluble	IL-2R /CD25	interleucina	P01589
receptor de interleucina-5 soluble	SIL-5R/CD125	interleucina	Q01344
receptor de interleucina-6 soluble	SIL-6R/CD126	interleucina	P08887
receptor de interleucina-7 soluble	SIL-7R/CD127	interleucina	P16871
receptor de interleucina-9 soluble	SIL-9R	interleucina	PQ01113
AD7C	NTP	neuronal	AF010144
alfa sinucleína		neuronal	AAH13293
GAP-43		neuronal	
Neurofilamento		neuronal	
Sinaptogamina		neuronal	
Sinaptofisina		neuronal	
tau P199		neuronal	
factor neurotrófico derivado del cerebro	BDNF	neurotrofina	P23560
factor neurotrófico ciliar	CNTF	neurotrofina	P26441
factor neurotrófico derivado de la glía	GDNF	neurotrofina	P39905
factor de crecimiento nervioso	NGF	neurotrofina	P01138
neurotrofina 3	NT-3	neurotrofina	P20783
neurotrofina 4	NT-4	neurotrofina	P34130
receptor CNTF soluble	sCNTFR	neurotrofina	P26992
alfa2-macroglobulina	alfa 2M	otros	
proteína asociada con Alzheimer	ALZAS	otros	
proteína beta amiloide	Abeta 1-x	otros	
apolipoproteína A	apoA	otros	
apolipoproteína B	apoB	otros	
apolipoproteína D	apoD	otros	
apolipoproteína E	apoE	otros	
apolipoproteína J	apoD/clusterina	otros	
proteína reactiva C	CrP	otros	
proteína de células Clara	CC16	otros	
proteína ácido fibrilar de la glía	GFAP	otros	
Melanotransferrina		otros	
receptor de transferrina soluble	TfR	otros	
Trombomodulina		otros	
Trombospondina	Tsp	otros	
transglutaminasa tisular		otros	
Transferrina		otros	
alfa 1-antiquimotripsina	ACT	proteasa	NP001076
Clr		proteasa	
Cls		proteasa	
complemento C2	C2	proteasa	
Factor B		proteasa	
Factor D	adipsina	proteasa	
Factor I		proteasa	
Calicreína		proteasa	
serina proteasa asociada a MBL 1	MASP-1	proteasa	
serina proteasa asociada a MBL 2	MASP-2	proteasa	
Neuroserpina		proteasa	AAH18043
inhibidor de proteasa leucocitaria secretora	SLPI	proteasa	

(continuación)

Proteína	Nombres alternativos	Clase	ID de la proteína
Angiogenina			
Angiostatina		vascular	P00747
Endostatina		vascular	
Endotelina		vascular	
selectina B soluble	s E selectina	vascular	
inhibidor del crecimiento endotelial vascular	VEGI	vascular	

En el presente documento se describen los siguientes aspectos:

- 5 1. Un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), que comprende comparar un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico de un individuo con un nivel de referencia para el biomarcador, en el que el biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP- 4; Eotaxina-2; IGFBP- 2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina (OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP- Id; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R.
- 10 2. El procedimiento del aspecto 1 en el que dicho biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-β3), y factor de necrosis tumoral beta (TNF-β).
- 20 3. El procedimiento del aspecto 1, en el que dicho marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, sIL-6R, IL-8, leptina, MIP-1δ, PDGF-BB, y TIMP-1.
4. El procedimiento del aspecto 3, en el que dicho marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en sIL-6R, IL- 8, y TIMP-1.
- 25 5. El procedimiento del aspecto 3, en el que dicho marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, MIP-1δ, y TIMP-1.
6. El procedimiento del aspecto 1 en el que dicho marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.
7. El procedimiento del aspecto 1, que comprende comparar el nivel de medida de al menos dos biomarcadores de diagnóstico de la EA con un nivel de referencia para los biomarcadores.
- 30 8. El procedimiento del aspecto 7, en el que uno dichos al menos dos biomarcadores de diagnóstico de la EA es leptina.
9. El procedimiento del aspecto 7, en el que uno de dichos al menos dos biomarcadores de diagnóstico de la EA es BDNF.
- 35 10. El procedimiento del aspecto 7 en el que los biomarcadores de diagnóstico de la EA se seleccionan del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.
11. El procedimiento del aspecto 1, que comprende comparar el nivel medido de al menos tres biomarcadores de diagnóstico de la EA con un nivel de referencia para los biomarcadores.
12. El procedimiento del aspecto 1, que comprende comparar el nivel medido de al menos cuatro biomarcadores de diagnóstico de la EA con un nivel de referencia para los biomarcadores.
- 40 13. El procedimiento del aspecto 12, que comprende comparar el nivel medido de al menos BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES con un nivel de referencia para los biomarcadores.
14. El procedimiento del aspecto 1, en el que la comparación del valor medido con un valor de referencia para cada biomarcador de diagnóstico de la EA medido comprende calcular la diferencia en veces entre el valor medido y el valor de referencia.

15. El procedimiento del aspecto 14, que comprende además comparar la diferencia en veces para cada biomarcador de diagnóstico de la EA medido con un valor de diferencia en veces mínima.
- 5 16. Un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), que comprende: comparar un nivel medido de al menos 4 biomarcadores de diagnóstico de la EA, en el que dichos biomarcadores comprenden BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES, en una muestra de fluido biológico de un individuo con un nivel de referencia para cada biomarcador de diagnóstico de la EA.
17. El procedimiento del aspecto 16 en el que BDNF disminuye al menos aproximadamente un 20 % en comparación con un nivel de referencia de BDNF.
- 10 18. El procedimiento del aspecto 16 en el que leptina disminuye al menos aproximadamente un 25 % en comparación con un nivel de referencia de leptina.
19. El procedimiento del aspecto 16 en el que RANTES disminuye al menos aproximadamente un 16 % en comparación con un nivel de referencia de RANTES.
20. El procedimiento del aspecto 16 en el que PDGF-BB disminuye al menos aproximadamente un 85 % en comparación con un nivel de referencia de PDGF-BB en un individuo normal está asociado con EA grave.
- 15 21. El procedimiento del aspecto 1, en el que dicha muestra de fluido biológico es una muestra de fluido biológico periférico.
22. El procedimiento del aspecto 16 o 21, en el que dicha muestra de fluido biológico periférico es sangre, suero o plasma.
- 20 23. El procedimiento del aspecto 1 o 16, que comprende además obtener un nivel medido de dicho biomarcador de la EA en dicha muestra de fluido biológico.
24. Un procedimiento para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un paciente, que comprende comparar un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico de un individuo con un nivel de referencia para el biomarcador, en el que el biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP- 4; Eotaxina-2; IGFBP- 2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina (OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R.
- 25 25. El procedimiento del aspecto 24 en el que dicho biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), receptor de interleucina 6 soluble (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-β3), y factor de necrosis tumoral beta (TNF-β).
- 30 26. El procedimiento del aspecto 24, en el que el marcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.
- 35 27. El procedimiento del aspecto 24, en el que el marcador de diagnóstico de la EA es leptina.
28. El procedimiento del aspecto 27, que comprende además medir un nivel para leptina en dicha muestra de fluido biológico, produciendo de este modo dicho valor medido para leptina.
- 40 29. El procedimiento del aspecto 24, en el que dicho valor de referencia es un valor obtenido de una muestra de fluido biológico del mismo paciente con EA en un punto temporal temprano.
- 45 30. El procedimiento del aspecto 24 en el que la muestra de fluido biológico es una muestra de fluido biológico periférico.
31. Un procedimiento para estratificar la enfermedad de Alzheimer (EA) en un individuo, que comprende comparar valores medidos para los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB) en una muestra de fluido biológico de dicho paciente con valores de referencia para BDNF y PDGF-BB.
- 50 32. En procedimiento del aspecto 31, en el que dicha muestra de fluido biológico es una muestra de fluido

periférico, incluyendo sangre, suero o plasma.

- 5 33. El procedimiento del aspecto 31, que comprende además comparar valores medidos para niveles de leptina y Rantes con valores de referencia para leptina y Rantes, en el que los valores de referencia para BDNF, PDGF-BB, leptina y Rantes son para muestras de individuos con puntuaciones de MMSE de 25 a 28, en el que un incremento en los niveles de leptina y PDGF-BB y en el que los niveles de BDNF y RANTES permanecen sustancialmente iguales indican EA leve, como se indica por una puntuación de MMSE de 20-25.
- 10 34. El procedimiento del aspecto 31, que comprende además comparar valores medidos para niveles de leptina y Rantes con valores de referencia para leptina y Rantes, en el que los valores de referencia para BDNF, PDGF-BB, leptina y Rantes son para muestras de individuos con puntuaciones de MMSE de 20-25, en el que una disminución en los niveles de Rantes, BDNF, y PDGF y en el que los niveles de leptina permanecen sustancialmente iguales indican EA moderada, como se indica por una puntuación de MMSE de 10-20.
- 15 35. Un procedimiento de identificación de un agente candidato para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprenden: someter a ensayo un agente candidato potencial para determinar su actividad en la modulación de un biomarcador de la EA, dicho biomarcador de la EA se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R.
- 20 36. El procedimiento del aspecto 35 en el que el biomarcador de la EA se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), soluble interleucina- 6 receptor (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas I (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-β3), factor de necrosis tumoral beta (TNF-β).
- 25 37. El procedimiento del aspecto 35 que comprende someter a ensayo un agente candidato potencial para determinar su actividad en la modulación de un conjunto de biomarcadores de la EA, en el que dicho conjunto comprende BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.
- 30 38. El procedimiento del aspecto 35 en el que dicho ensayo se realiza *in vivo*.
39. Un kit que comprende:
- 35 al menos un reactivo específico para al menos un marcador de diagnóstico de la EA, dicho al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MEP-1d; IL-3; FGF- 6; IL-6R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R e instrucciones para llevar a cabo el procedimiento del aspecto 1.
- 40 40. El kit del aspecto 39, en el que dicho biomarcador de diagnóstico de la EA se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas homodimérico BB (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 6 (FGF-6), interleucina-3 (IL-3), soluble interleucina- 6 receptor (sIL-6R), leptina (también conocida como ob), proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta (MIP-1δ), cadena alfa de la proteína estimuladora de macrófagos (MSP-α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido activador neutrófilo 2 (NAP-2), RANTES, receptor del factor de necrosis tumoral soluble 2 (sTNF RII), factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), inhibidor tisular de metaloproteasas I (TIMP-1), inhibidor tisular de metaloproteasas 2 (TIMP-2), factor de crecimiento transformante beta 3 (TGF-β3), factor de necrosis tumoral beta (TNF-β).
- 45 41. El kit del aspecto 39, que comprende al menos un reactivo específico para cada uno de al menos dos marcadores de diagnóstico de la EA.
- 50 42. El kit del aspecto 39, que comprende al menos un reactivo específico para cada uno de al menos tres marcadores de diagnóstico de la EA.
43. El kit del aspecto 39, que comprende al menos un reactivo específico para cada uno de al menos cuatro marcadores de diagnóstico de la EA.
- 55 44. El kit de uno cualquiera del aspecto 41, 42 o 43, en el que los marcadores de diagnóstico de la EA se seleccionan del grupo que consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.

45. El kit del aspecto 44, en el que el reactivo específico para el biomarcador de diagnóstico de la EA es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que es específico para dicho biomarcador de diagnóstico de la EA.
46. El kit del aspecto 39, que comprende además al menos un reactivo específico para un biomarcador que mide características de la muestra.
- 5 47. Una superficie que comprende unida a ella, al menos un reactivo específico para cada biomarcador de diagnóstico de la EA en un conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA, en el que dicho conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA comprende BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.
48. Una superficie que comprende unida a ella,
- 10 a. al menos un reactivo específico para cada biomarcador de diagnóstico de la EA en un conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA, en el que dicho conjunto de biomarcadores de diagnóstico de la EA consiste en BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES; y
- b. al menos un reactivo específico para un biomarcador que mide características de la muestra.
49. La superficie del aspecto 47 o 48, en la que dicho reactivo específico para dicho biomarcador de diagnóstico de la EA es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que es específico para dicho biomarcador de diagnóstico de la EA.
- 15 50. Una combinación que comprende la superficie del aspecto 48 o 49 y una muestra de fluido biológico periférico de un individuo.
51. La combinación del aspecto 50, en el que dicho individuo es al menos de 60, 65, 70, 75, 80 u 85.
52. El procedimiento del aspecto 1 que comprende además la etapa de obtener un valor para la comparación del nivel medido con el nivel de referencia.
- 20 53. El procedimiento del aspecto 13, que comprende además la etapa de obtener un valor para la comparación del nivel medido con el nivel de referencia.
54. Un formato legible por ordenador que comprende los valores obtenidos por el procedimiento del aspecto 52 o 53.
- 25 55. Un conjunto de valores de referencia para biomarcadores de diagnóstico de la EA que comprende BDNF, PDGF- BB, leptina y RANTES.
56. Un conjunto de reactivos específicos para biomarcadores de diagnóstico de la EA, en el que dichos biomarcadores comprenden BDNF, PDGF-BB, leptina y RANTES.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer ("EA"), que comprende comparar un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico de un individuo con un nivel de referencia para el biomarcador, en el que el biomarcador de diagnóstico de la EA es IGFBP-2 (proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 2), en el que dicho nivel de referencia comprende:
- (a) un nivel promedio obtenido de una población que no padece la EA; o
- (b) un nivel medio o de la mediana de un grupo de individuos incluyendo pacientes con EA;
- y en el que dicha muestra de fluido biológico periférico es una muestra de sangre u orina.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA es IGFBP-2 y uno o más de (a) IFN- γ (interferón-gamma); IGFBP-1 (proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 1); BMP-6 (proteína morfogenética ósea 6); BMP-4 (proteína morfogenética ósea 4); Eotaxina-2; GCSF (factor estimulador de colonias de granulocitos); TARC (quimiocina regulada por activación y timo); RANTES; ANG (angiotensinógeno); PARC (quimiocina regulada por activación y pulmonar); Acrp30 (proteína relacionada con el complemento de adipocitos de 30 kDa); AgRP(ART) (proteína relacionada con agouti (transcritos relacionados con agouti)); TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasa 1); TIMP-2 (inhibidor tisular de metaloproteinasa 2); ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1); TRAIL R3 (receptor 3 del ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral); uPAR (receptor activador de plasminógeno de tipo urocinasa); IGFBP-4 (proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 4); leptina(OB); PDGF-BB (factor de crecimiento derivado de plaquetas BB); EGF (factor de crecimiento epidérmico); BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro); NT-3 (neurotrofina 3); NAP-2 (péptido de activación de neutrófilos 2); IL-1ra (antagonista del receptor de interleucina 1); MSP- α (proteína estimuladora de macrófagos alfa); SCF (factor de células madre); TGF- β 3 (factor de crecimiento transformante, beta 3); TNF- β (factor de necrosis tumoral beta); MIP-1 δ (proteína inflamatoria de macrófagos 1 delta); IL-3 (interleucina 3); FGF-6 (factor de crecimiento fibroblástico 6); IL-6 R (interleucina-6 receptor); sTNF RII (receptor II del factor de necrosis tumoral soluble); AXL; bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico); FGF-4 (factor de crecimiento fibroblástico 4); CNTF (factor neurotrófico ciliar); MCP-1 (proteína quimioattractora de monocitos 1); MIP-1 β (proteína inflamatoria de macrófagos 1 beta); TPO (trombopoyetina); VEGF-B (factor de crecimiento endotelial vascular B); IL-8 (interleucina 8); FAS; y EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico), o (b) una cualquiera o más de las proteínas enumeradas en la tabla 7.
3. Un procedimiento para monitorizar la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un paciente con EA, que comprende comparar un nivel medido de al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en una muestra de fluido biológico periférico de un individuo con EA con un nivel de referencia para el biomarcador, en el que el biomarcador de diagnóstico de la EA es IGFBP-2, en el que dicho nivel de referencia:
- (a) comprende además un valor obtenido de una muestra de fluido biológico periférico del mismo paciente con EA en un punto temporal temprano; o
- (b) se determina de forma contemporánea usando un conjunto de muestras de individuos con EA que incluye la muestra del individuo;
- y en el que dicha muestra de fluido biológico periférico es una muestra de sangre u orina.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA es IGFBP-2 y una o más de IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; GCSF; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; leptina(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF- β 3; TNF- β ; MIP-1 δ ; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1B; TPO; VEGF- B; IL-8; FAS; y EGF-R.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que el individuo con EA:
- (i) es un individuo con EA cuestionable y puntuado con o que lograría una puntuación de 25-28 en la prueba MMSE;
- (ii) es un individuo con EA leve y puntuado con o que lograría una puntuación de 22-27 en la prueba MMSE;
- (iii) es un individuo con EA moderada y puntuado con o que lograría una puntuación de 16-21 en la prueba MMSE;
- (iv) es un individuo con EA grave y puntuado con o que lograría una puntuación de 12-15 en la prueba MMSE.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende comparar los niveles medidos de al menos dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince o veinte biomarcadores de diagnóstico de la EA con niveles de referencia para

los biomarcadores.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de suero o plasma.
- 5 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además obtener un nivel medido de dicho al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en dicha muestra de fluido biológico periférico.
9. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que comprende además la etapa de obtener un valor para la comparación del nivel medido con el nivel de referencia.
- 10 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la diferencia en los valores medidos del al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en muestras de individuos con EA en relación con muestras de individuos sin EA se determina por un procedimiento que comprende análisis de significación de micromatrices (SAM), preferentemente en el que la diferencia en los niveles medidos del uno o más biomarcadores de diagnóstico de la EA determinada por SAM tiene un intervalo de valor q de desde 0,0001 hasta 0,05.
- 15 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la diferencia en los valores medidos del al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en muestras de individuos con EA en relación con muestras de individuos sin EA se determina por un procedimiento que comprende una prueba t, preferentemente en el que la diferencia se mide en términos de un valor p.
- 20 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la comparación de los valores medidos comprende un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en análisis de significación de micromatrices, recolección en árboles, CART, MARS, mapas de autoorganización, conjunto de elementos frecuentes, y redes bayesianas.
- 25 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la determinación del nivel de referencia comprende:

determinar un valor medio de los valores medidos del al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en las muestras de fluido biológico periférico de un grupo de individuos con EA;

determinar un valor medio de los valores medidos del al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en las muestras de fluido biológico periférico de un grupo de individuos sin EA; y

30 encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios de los valores medidos del al menos un biomarcador de diagnóstico de la EA en las muestras de fluido biológico periférico entre los dos grupos.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el grupo de individuos con EA y el grupo de individuos sin EA son poblaciones de edad coincidente.

35

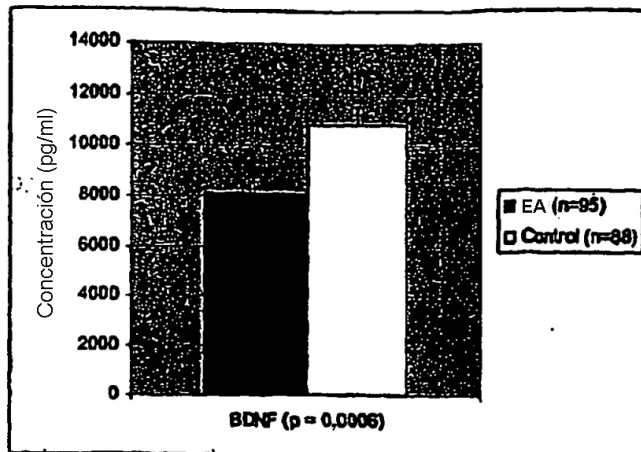


Figura 1A

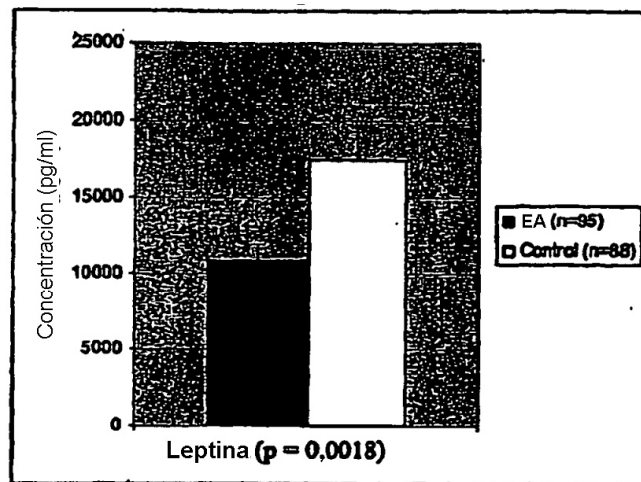


Figura 1B

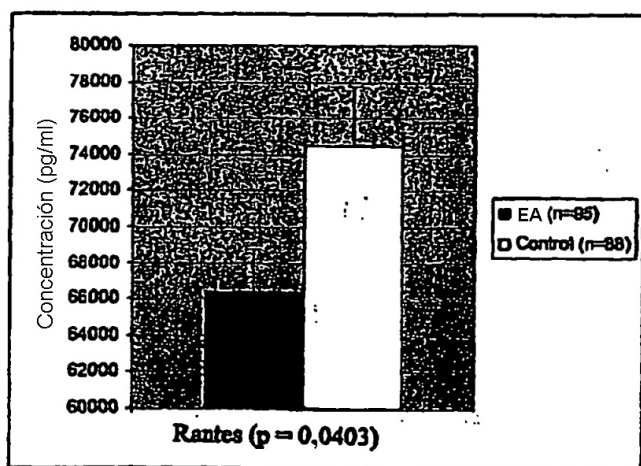


Figura 1C

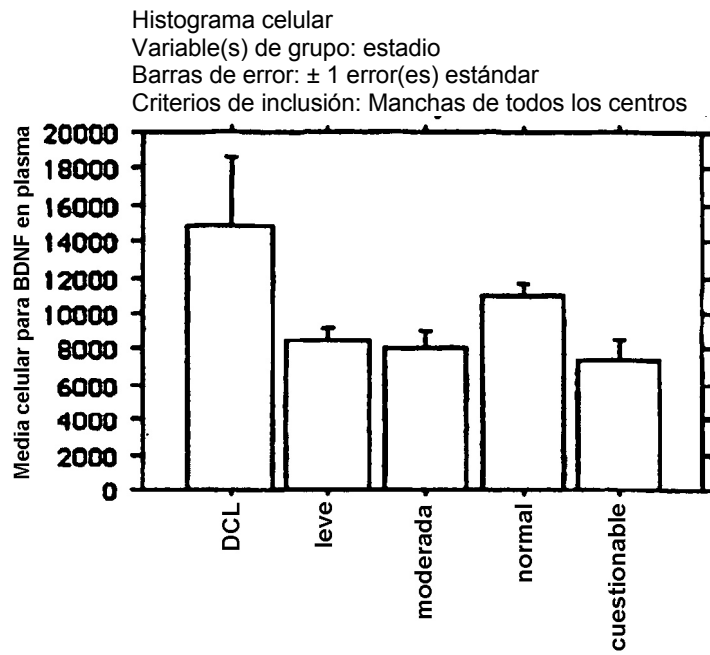


Fig. 2

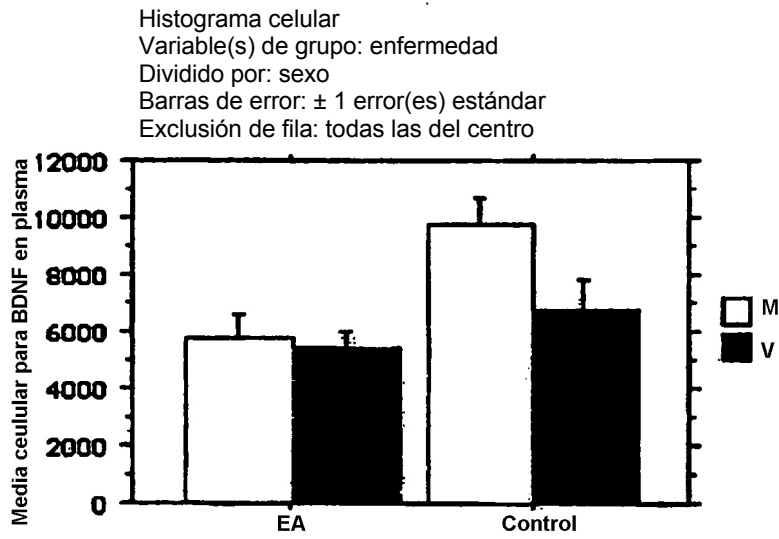


Fig. 3

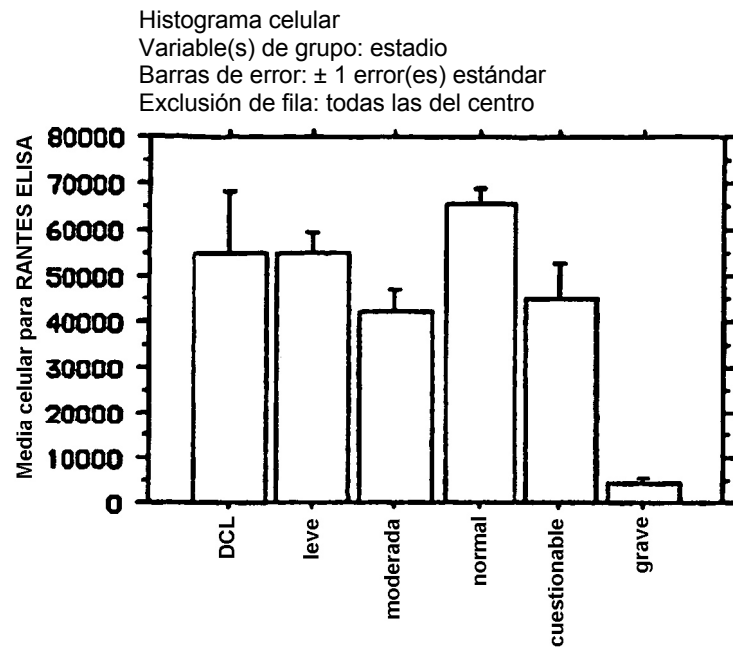


Fig. 4

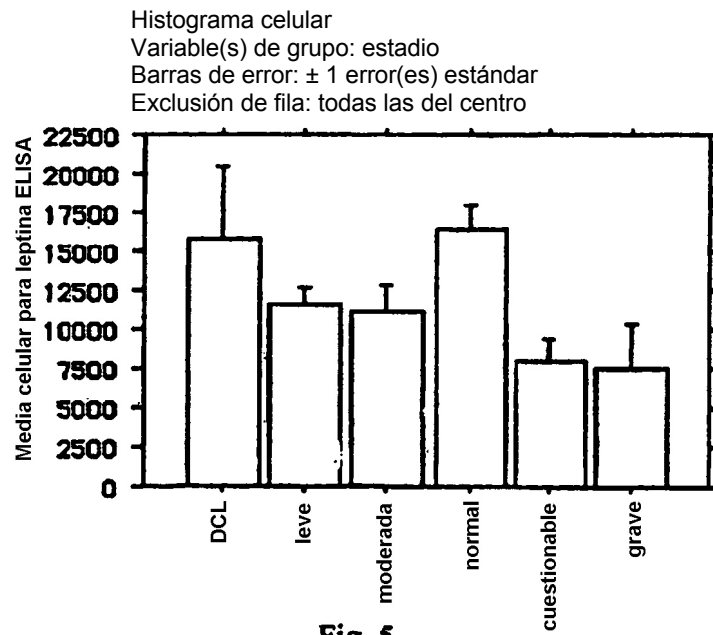


Fig. 5

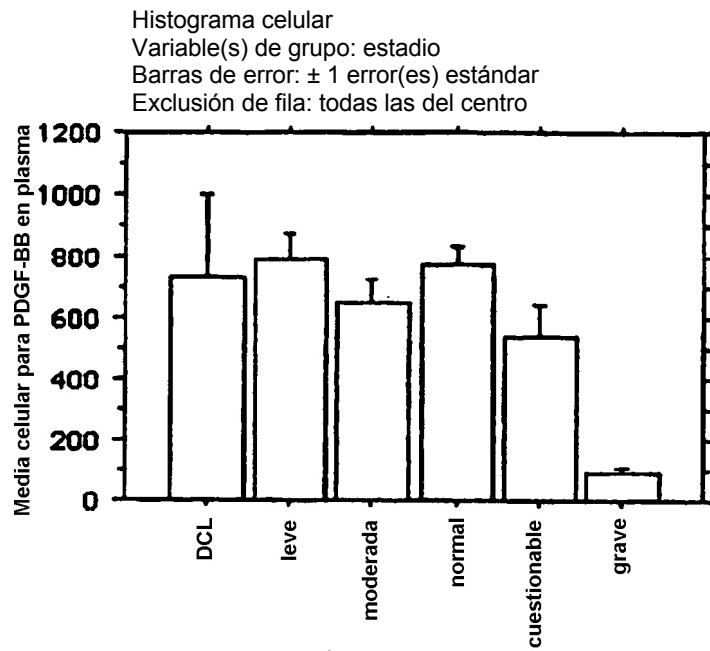


Fig. 6

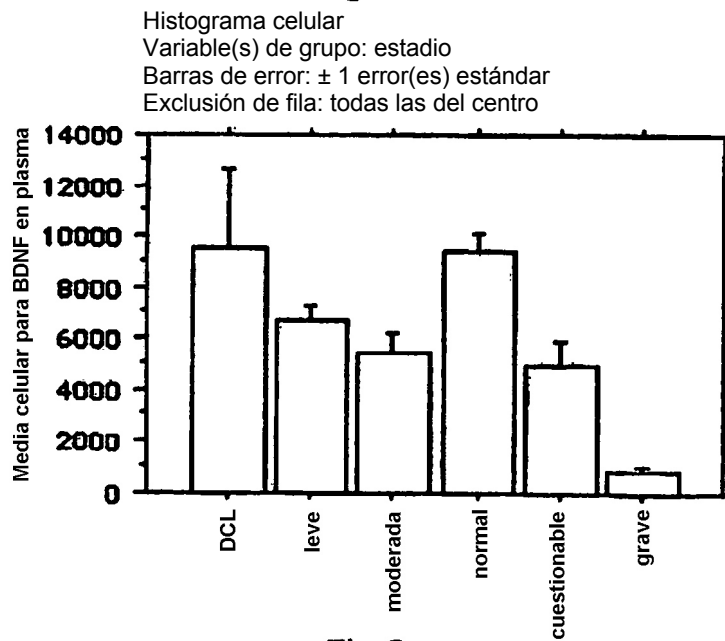


Fig. 7