

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 973**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2006 E 06749116 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 1886112**

54 Título: **Métodos para medir in vivo biomoléculas procedentes del sistema nervioso**

30 Prioridad:

06.04.2005 US 668634 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2014

73 Titular/es:

**WASHINGTON UNIVERSITY IN ST. LOUIS
(100.0%)
One Brookings Drive
St. Louis, MO 63110, US**

72 Inventor/es:

**BATEMAN, RANDALL JOHN y
HOLTZMAN, DAVID MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 498 973 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

Métodos para medir *in vivo* biomoléculas procedentes del sistema nervioso

5 **Campo de la invención**

[0001] La invención describe métodos para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades y trastornos neurológicos y neurodegenerativos, y procesos asociados. La invención se refiere a un método para medir el metabolismo de biomoléculas procedentes del sistema nervioso central en un sujeto *in vivo*.

10

Antecedentes de la invenciónEnfermedad de Alzheimer

15 [0002] La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y es un problema de salud pública creciente. Actualmente se estima que hay 5 millones de personas afectadas en los Estados Unidos, con un incremento esperado de 13 millones para el año 2050 (Herbert et al 2001, Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 15(4):169-173). La EA, como otras enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), se caracteriza por alteraciones de la producción, acumulación y aclaramiento de proteínas. En la EA, la desregulación del metabolismo
20 de la proteína beta-amiloide (A β), está indicada por una acumulación masiva de esta proteína en los cerebros de aquellos que tienen la enfermedad. La EA conduce a una pérdida de la memoria, de la función cognitiva y, finalmente, de la independencia. Esto acarrea una pesada carga personal y financiera al paciente y a la familia. Debido a la severidad y al incremento de la prevalencia de esta enfermedad en la población, es urgente que se desarrollen mejores tratamientos.

25

[0003] Actualmente existen algunos medicamentos que modifican los síntomas, sin embargo no existen tratamientos que modifiquen la enfermedad. Los tratamientos que modifican la enfermedad probablemente serán los más efectivos cuando se den antes de la aparición del daño cerebral permanente. Sin embargo, en el momento que se hace el diagnóstico clínico de la EA, ya ha ocurrido una pérdida neuronal extensa (Price et al. 2001, Archiv. Neurol. 58(9):1395-1402). Por lo tanto, un modo de identificar a aquellos que tienen riesgo de desarrollar EA sería lo que más ayudaría a prevenir o retrasar la aparición de la EA. Actualmente, no existen medios para identificar los cambios fisiopatológicos que ocurren en la EA antes de la aparición de síntomas clínicos o de medir eficazmente los efectos de los tratamientos que podrían prevenir la aparición o ralentizar la progresión de la enfermedad. En el documento US 2003/0228259 se mide el metabolismo de A β en orina.

35

[0004] Existe la necesidad, por lo tanto, de un método sensible, exacto y reproducible para medir el metabolismo *in vivo* de las biomoléculas en el SNC. En particular, es necesario un método para medir la tasa de síntesis y la tasa de aclaramiento fraccional *in vivo* de las proteínas asociadas con una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, el metabolismo de A β en la EA.

40

Sumario de la invención

[0005] La presente solicitud se define en su más amplio sentido en las reivindicaciones anexas. Un aspecto de la invención es la provisión de un método *in vitro* para medir el metabolismo *in vivo* de una proteína en un sujeto que
45 ha recibido un resto marcado que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y de incorporarse en dicha proteína cuando dicha proteína se sintetiza en el sistema nervioso central del sujeto, comprendiendo el método:

a. detectar la cantidad de proteína marcada con el resto y la cantidad de proteína no marcada en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de LCR una fracción proteica sintetizada en el SNC y marcada detectablemente con el resto, y una fracción proteica no marcada con el resto, donde la cantidad de proteína marcada y la cantidad de proteína no marcada se detecta usando espectrometría de masas;

50

b. determinar la proporción de proteína marcada respecto a la proteína no marcada;

55

c. calcular la tasa de síntesis fraccional (TSF) de proteína marcada y/o la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de proteína marcada a partir de la proporción determinada mediante el paso (b) en las muestras a lo largo del tiempo;

60 en el que la tasa de síntesis fraccional (FSR) de proteína marcada se calcula a partir de las proporciones determinadas mediante el paso (b) en múltiples muestras desde el momento en el que la proteína marcada es detectable y mientras se incrementa la tasa de proteína marcada respecto a la no marcada en las muestras, determinada mediante el paso (b); y/o la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de la proteína marcada se calcula a partir de las proporciones determinadas en el paso (b) en múltiples muestras después de que la proporción de
65 proteínas marcadas respecto a las proteínas no marcadas disminuya en el LCR del sujeto;

en el que la TSF y/o la TAF es directamente proporcional al metabolismo en el SNC de la proteína.

Breve descripción de las figuras

5 [0006]

La **Figura 1** representa un esquema que ilustra el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) en beta-amiloide (A β) dentro de una célula. Las leucinas (L), uno de los posibles sitios de marcaje, se indican en negro. La secuencia de aminoácidos de A β se muestra en la parte inferior, con los sitios de digestión por tripsina indicados para demostrar los fragmentos que se analizaron por espectrometría de masas.

La **Figura 2** representa una gráfica de espectrometría de masas que muestra la separación de los péptidos beta-amiloides. Los péptidos A β se inmunoprecipitaron de LCR humano con el anticuerpo anti-A β de dominio central, m266, y la A β eluida se sometió a espectrometría de masas. Los picos de la espectrometría de masas están marcados con sus variantes peptídicas correspondientes: A β ₃₈, A β ₃₉, A β ₄₀ y A β ₄₂.

La **Figura 3** presenta las gráficas de espectrometría de masas que ilustran la variación en el peso molecular del fragmento A β ₁₇₋₂₈ marcado con ¹³C. En el panel A, se recogieron y se inmunoprecipitaron medios no marcados de una línea celular de neuroglioma humano que produce A β *in vitro*. Después, los péptidos beta-amiloides se escindieron con tripsina en los sitios 5, 16 y 28 (véase la Figura 1) produciendo las dos envueltas de fragmentos que se muestran a las masas de 1325 y 1336. Obsérvese que las dos masas de las envueltas de los fragmentos A β , A β ₁₇₋₂₈ (1325) y A β ₆₋₁₆ (1336) muestran la distribución estadística de los isótopos naturales en A β no marcado. También, obsérvese que no hay señal a una masa de 1331, donde debería estar la señal del marcaje. En el panel B, se recogieron medios de células humanas de neuroglioma cultivadas durante 24 horas en presencia de ¹³C₆-leucina y se inmunoprecipitó y se escindió A β con tripsina para producir las envueltas de los fragmentos que se muestran a las masas de 1325, 1331 y 1336. Obsérvese la variación de la masa (flecha) de A β ₁₇₋₂₈ de 1325 a 1331, que demuestra el marcaje con ¹³C₆-leucina (A β ^{*}₁₇₋₂₈). A β ₆₋₁₆ no contiene leucina, así que no está marcado ni su masa se modifica. Una cantidad minoritaria de of A β ₁₇₋₂₈ permanece sin marcar.

La **Figura 4** representa una gráfica que muestra una curva patrón del marcaje de A β *in vitro*. Se hizo una dilución seriada de una muestra de medio de cultivo marcado para generar una curva patrón para ensayar la linealidad y la variabilidad de la técnica de medición. La A β se precipitó del medio, se digirió con tripsina, y los fragmentos se analizaron en un espectrómetro de masas con cromatografía líquida de inyección por electronebulización (LC-ESI) y los iones de los espectros de masa en tándem se cuantificaron usando un programa informático diseñado de manera personalizada. El programa informático sumó tanto los iones tándem marcados como los no marcados y calculó la proporción de A β marcada respecto del total. El porcentaje de A β marcada frente al valor predicho se muestra con una línea de regresión lineal. Obsérvese el buen ajuste lineal, además de la baja desviación.

La **Figura 5** representa un esquema que ilustra el protocolo de marcaje *in vivo*. Se muestra un diagrama de un participante con un catéter intravenoso en la vena antecubital y un catéter lumbar en el espacio intratecal entre L3-4. En un catéter IV, se infundió leucina marcada con ¹³C₆ a una tasa de 1,8 a 2,5 mg/kg/h durante 9 o 12 horas, después de un bolo inicial de 2 mg/kg. Se obtuvieron 12 ml de plasma a través del otro catéter IV cada hora durante las primeras 16 horas y cada dos horas de allí en adelante, tal como se representa. Se obtuvieron seis ml de LCR a través del catéter lumbar cada hora. Cada muestra se procesó después mediante inmunoprecipitación de A β , digestión con tripsina, y análisis de LC-ESI-MS para determinar el porcentaje de A β marcada en cada punto de tiempo.

La **Figura 6** representa gráficas de espectrometría de masas que demuestran los iones de MS/MS de la proteína beta-amiloide marcada y no marcada. Se recogió LCR humano después de la infusión intravenosa de ¹³C₆-leucina. Se muestran los espectros representativos de A β ₁₇₋₂₈ (LVFFAEDVGSNK) no marcada (a) y marcada (b). Los espectros se obtuvieron usando análisis de MS/MS del ión parental de A β ₁₇₋₂₈ no marcado a m/z 663,3 o del ión parental de A β ₁₇₋₂₈ marcado a m/z 666,3. Obsérvese que los iones de MS/MS que contienen ¹³C-leucina (A β ₁₇) tienen una variación en la masa de 6 Daltons, lo que demuestra el marcaje de leucina. Los iones de A β sin leucina en la posición 17 no están marcados y no tienen la modificación en la masa de 6 Daltons.

La **Figura 7** representa una gráfica que muestra una curva patrón del marcaje de A β *in vivo*. Se hizo una dilución seriada de una muestra de LCR humano marcado en LCR humano sin marcar para generar una curva patrón para cuantificar la exactitud y la precisión de la técnica de medición para la A β marcada *in vivo* en LCR humano. La A β se precipitó del LCR, se digirió con tripsina, y los fragmentos de A β se analizaron en un espectrómetro de masas LC-ESI y los iones de los espectros de masas en tándem se cuantificaron usando un programa informático diseñado de manera personalizada. El programa informático sumó tanto los iones en tándem marcados como los no marcados y calculó la proporción de marcados respecto de la A β total. El porcentaje de A β marcada predicho frente al valor medido se muestra con una línea de regresión lineal. Obsérvese el buen ajuste lineal.

La **Figura 8** representa una gráfica que ilustra las curvas del metabolismo de A β de tres participantes. Cada participante empezó la infusión de leucina marcada a tiempo cero y continuó durante 9 (cuadrados) o 12 (triángulos y círculos) horas. Cada hora se obtuvieron muestras de LCR a través de un catéter lumbar. A β se inmunoprecipitó y se digirió con tripsina. El porcentaje de A β marcada se determinó midiendo los iones de los espectros de masa en tándem en un espectrómetro de masas LC-ESI tal como se describe anteriormente.

La **Figura 9** representa una gráfica que ilustra la proporción entre leucina marcada en el LCR y la sangre de un

participante durante un estudio de 36 horas. Los niveles de leucina marcada en LCR y plasma alcanzaron un estado cercano al estacionario antes de que hubiera transcurrido una hora desde el bolo inicial de 2 mg/kg. Después, la infusión de leucina marcada en el torrente sanguíneo se paró a las 9 horas, habiendo un decaimiento exponencial de los niveles de leucina marcada. El nivel plasmático de leucina fue aproximadamente un 4 % más alto que los niveles de leucina marcada en el LCR durante el periodo de infusión.

La Figura 10 representa una gráfica que ilustra la proporción media de A β marcada respecto a la no marcada en el LCR de 6 participantes a lo largo de 36 horas. Se promediaron las curvas de metabolismo de la A β marcada respecto a la no marcada y se mostró la media para cada punto de tiempo +/- EEM. Cada participante se marcó durante 9 o 12 horas, mientras que el muestreo se realizó cada hora a partir de 0 a 12, 24, o 36 horas. No hubo incorporación detectable del marcaje durante las 4 primeras horas, seguido de un incremento en el porcentaje de A β marcada que se estabilizó hasta llegar a niveles de leucina marcada cercanos al estado estacionario (~10 %) antes de disminuir por encima de las 12 horas del estudio.

La Figura 11 representa gráficas que muestran las curvas del metabolismo de A β de 3 participantes con una infusión de marcaje de 9 horas y un muestreo de 36 h. Los paneles A-C representan el cálculo de la tasa de síntesis fraccional (TSF), que se calculó a partir de la pendiente del incremento de A β marcada dividido entre el valor predicho de estado estacionario. El valor predicho de estado estacionario se estimó como la media de la leucina marcada en LCR medida durante el marcaje. Se definió el inicio de la pendiente después de un tiempo de retardo de 4 horas cuando no había incremento de A β marcada y la finalización 9 horas más tarde (rombos sólidos). Los paneles D-F muestran el cálculo de la tasa de aclaramiento fraccional (TAF), que se calculó a partir de la pendiente del logaritmo neperiano del porcentaje de A β marcada desde las 24 a las 36 horas (rombos sólidos).

La Figura 12 representa una gráfica que ilustra el promedio de TSF y FCR. Se muestra el promedio de la TSF de A β de 6 participantes y el promedio de la TAF de A β de 3 participantes junto con la desviación típica.

25 Descripción detallada de las realizaciones preferentes

I. Métodos para controlar el metabolismo *in vivo* de biomoléculas procedentes del sistema nervioso

[0007] La presente invención proporciona un método *in vitro* para medir el metabolismo *in vivo* de una proteína en un sujeto que ha recibido un resto marcado que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica e incorporarse en dicha proteína tal como dicha proteína se sintetiza en el sistema nervioso central del sujeto, comprendiendo el método:

a. detectar la cantidad de proteína marcada con el resto y la cantidad de proteína no marcada en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de LCR una fracción proteica sintetizada en el SNC y marcada detectablemente con el resto, y una fracción proteica no marcada con el resto, donde la cantidad de proteína marcada y la cantidad de proteína no marcada se detectan usando espectrometría de masas;

b. determinar la proporción de proteína marcada respecto a la proteína no marcada;

c. calcular la tasa de síntesis fraccional (TSF) de la proteína marcada y/o la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de la proteína marcada a partir de la proporción determinada mediante el paso (b) en las muestras a lo largo del tiempo;

en el que la tasa de síntesis fraccional (FSR) de la proteína marcada se calcula a partir de las proporciones determinadas mediante el paso (b) en múltiples muestras desde el momento en el que la proteína marcada es detectable y mientras se incrementa la proporción de proteína marcada respecto a la no marcada en múltiples muestras, determinada mediante el paso (b); y/o la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de la proteína marcada se calcula a partir de las proporciones determinadas en el paso (b) en múltiples muestras después de que la proporción de proteínas marcadas respecto a las no marcadas disminuya en el LCR del sujeto; en el que la TSF y/o TAF es directamente proporcional al metabolismo en el SNC de la proteína.

(a) Enfermedades degenerativas

[0008] La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad debilitante que se caracteriza por placas amiloides en el sistema nervioso central (SNC) que resultan de un incremento de la producción, disminución del aclaramiento o ambos de la proteína beta amiloide (A β). Los inventores han desarrollado un método para medir el metabolismo *in vivo* de A β en un humano mediante la medición *in vivo* de las tasas de síntesis y de aclaramiento de A β en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o plasma (por razones de comparación). Las tasas de síntesis y de aclaramiento *in vivo* de A β pueden usarse entonces para evaluar si un sujeto tiene una alteración de la síntesis de o del aclaramiento de A β en comparación con un grupo control. Dicha comparación puede permitir el diagnóstico de EA en su curso temprano, es decir, antes de la aparición de síntomas clínicos y de un daño cerebral significativo. Además, la presente invención proporciona medios para determinar si la apolipoproteína E (ApoE) causa un cambio en el metabolismo de A β . Esta determinación puede proporcionar nuevas perspectivas acerca de por qué genotipos particulares de ApoE son un factor de riesgo para la AE.

[0009] Los expertos en la materia apreciarán que, aunque la EA es la enfermedad de ejemplo que puede diagnosticarse o controlarse mediante el método de la invención, este no se limita a la EA. Está previsto que el método de la invención pueda usarse en el diagnóstico y tratamiento de varias enfermedades, trastornos o procesos neurológicos y neurodegenerativos, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Parkinson, ictus, demencias fronto-temporales (DFT), enfermedad de Huntington, paresia supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), trastornos y demencias relacionadas con la edad, esclerosis múltiple, enfermedades priónicas (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiiforme bovina o enfermedad de las vacas locas, y tembladeras), enfermedad de cuerpos de Lewy, y esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig). También está previsto que el método de la invención pueda usarse para estudiar la fisiología normal, el metabolismo y la función del SNC.

[0010] Las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas son más comunes en sujetos de avanzada edad. Por ejemplo, el 10 % de las personas por encima de los 65 años de edad tiene EA, mientras que el 45 % de las personas por encima de la edad de 85 padecen EA. Debido a la prevalencia de las enfermedades neurológicas y neurodegenerativas dentro de la población humana en envejecimiento y a los costes sanitarios asociados con estas enfermedades, está previsto que se mida el metabolismo de biomoléculas *in vivo* en un sujeto humano y, en particular, en un sujeto humano de avanzada edad. Como alternativa, el metabolismo de biomoléculas *in vivo* puede medirse en otros sujetos mamíferos. En otra realización, el sujeto es un animal de compañía tal como un perro o un gato. En otra realización alternativa, el sujeto es un animal de granja tal como una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja o una cabra. En otra realización alternativa más, el sujeto es un animal de zoológico. En otra realización, el sujeto es un animal de experimentación tal como un primate no humano o un roedor.

(b) Biomolécula

[0011] La presente invención proporciona un método *in vitro* para medir el metabolismo de una proteína procedente del sistema nervioso *in vivo*, que es una proteína sintetizada en el SNC. Por ejemplo, la proteína a medir puede ser, pero no se limita a, beta-amiloide (A β) y sus variantes, proteína precursora de amiloide (APP), apolipoproteína E (isoformas 2, 3, o 4), apolipoproteína J, Tau (otra proteína asociada con EA), proteína ácida fibrilar glial, alfa-2 macroglobulina, sinucleína, S100B, Proteína Básica de la Mielina (implicada en la esclerosis múltiple), priones, interleucinas, y factor de necrosis tumoral (TNF). Otras proteínas que pueden ser dianas incluyen proteínas que interaccionan con neuronas GABAérgicas, neuronas noradrenérgicas, neuronas histaminérgicas, neuronas serotoninérgicas, neuronas dopaminérgicas, neuronas colinérgicas y neuronas glutamatérgicas.

[0012] En una realización ejemplar, la proteína cuyo metabolismo *in vivo* se mide puede ser la proteína beta-amiloide (A β). En una realización adicional, se pueden medir otras variantes de A β (por ejemplo, 40, 42, 38 u otras). En otra realización adicional, se pueden medir los productos de digestión de A β (por ejemplo, A β ₆₋₁₆, A β ₁₇₋₂₈)

(c) Resto marcado

[0013] Se pueden usar varios restos diferentes para marcar la proteína de interés. En términos generales, los dos tipos de restos de marcaje que se usan típicamente en el método de la invención son isótopos radiactivos e isótopos no radiactivos (estables). En una realización preferente, se pueden usar isótopos no radiactivos y medirse por espectrometría de masas. Los isótopos estables preferentes incluyen deuterio ²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁷ o ¹⁸O ³³, ³⁴ o ³⁶S, pero se ha reconocido que también serían eficaces varios isótopos estables distintos que cambian la masa de un átomo por más o menos neutrones que los que se ven en la forma nativa prevalente. Un marcaje adecuado generalmente cambiará la masa de la proteína de estudio que tal forma que pueda detectarse por un espectrómetro de masas. En una realización, el resto marcado es un aminoácido que comprende un isótopo no radiactivo (por ejemplo, ¹³C). Tal como se describe en el presente documento, se puede usar un isótopo radiactivo, y las proteínas marcadas se pueden medir con un contador de centelleo en lugar de en un espectrómetro de masas. Se pueden usar uno o más restos marcados simultánea o secuencialmente.

[0014] En una realización preferente, el resto marcado es un aminoácido. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar algunos aminoácidos para proporcionar el marcaje a una biomolécula. Generalmente, la elección del aminoácido se basa en una variedad de factores tales como: (1) El aminoácido generalmente está presente en al menos un resto de la proteína o del péptido de interés. (2) El aminoácido generalmente es capaz de alcanzar rápidamente el sitio de síntesis de la proteína y de equilibrarse rápidamente a través de la barrera hematoencefálica. La leucina es un aminoácido preferente para marcar proteínas que se sintetizan en el SNC, tal como se demuestra en los Ejemplos 1 y 2. (3) El aminoácido idealmente será un aminoácido esencial (que no se produce por el cuerpo), de modo que se puede alcanzar un mayor porcentaje de marcaje. También se pueden usar aminoácidos no esenciales; sin embargo, las mediciones probablemente serán menos exactas. (4) El marcaje del aminoácido generalmente no influye en el metabolismo de la proteína de interés (por ejemplo, dosis muy altas de leucina podrían afectar al metabolismo en el músculo). Y (5) la disponibilidad del aminoácido deseado (es decir, algunos aminoácidos son mucho más caros o difíciles de fabricar que otros). En una realización se usa ¹³C₆-fenilalanina, que contiene seis átomos de ¹³C, para marcar una proteína procedente del sistema nervioso. En una realización preferente, se usa ¹³C₆-leucina para marcar una proteína procedente del sistema nervioso. En una realización

ejemplar, se usa $^{13}\text{C}_6$ -leucina para marcar la proteína beta-amiloide.

[0015] Existen numerosas fuentes comerciales de aminoácidos marcados, tanto de isótopos no radiactivos como de isótopos radiactivos. Generalmente, los aminoácidos marcados se pueden producir biológicamente o sintéticamente.

5 Los aminoácidos que se producen biológicamente se pueden obtener a partir de un organismo (por ejemplo, queipo/alga) desarrollado en una mezcla enriquecida con ^{13}C , ^{15}N , u otro isótopo que se incorpora en los aminoácidos mientras que el organismo produce proteínas. Los aminoácidos después se separan y se purifican. Como alternativa, los aminoácidos pueden elaborarse con procesos de síntesis química conocidos.

10 **(d) Administración del resto marcado**

[0016] El resto marcado puede administrarse a un sujeto mediante varios métodos. Los métodos adecuados de administración incluyen la vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular u oral. Tal como se describe, el resto marcado es un aminoácido marcado, y el aminoácido marcado se administra mediante infusión

15 intravenosa. Tal como se describe, los aminoácidos marcados se pueden ingerir por vía oral.

[0017] El resto marcado puede administrarse lentamente a lo largo de un periodo de tiempo o como una dosis única dependiendo del tipo de análisis que se elija (por ejemplo, estado estacionario o de persecución del bolo). Para

20 alcanzar niveles de estado estacionario de la biomolécula marcada, el tiempo de marcaje generalmente debería ser de una duración suficiente para que la biomolécula marcada pueda cuantificarse de un modo fiable. Tal como se describe, el resto marcado es leucina y la leucina marcada se administra por vía intravenosa durante nueve horas. Tal como se describe, la leucina marcada se administra por vía intravenosa durante 12 horas.

[0018] Los expertos en la materia apreciarán que la cantidad (o dosis) del resto marcado puede variar y lo hará.

25 Generalmente, la cantidad depende de (y se estima por) los siguientes factores. (1) El tipo de análisis deseado. Por ejemplo, para alcanzar un estado estacionario de aproximadamente el 15 % de la leucina marcada en plasma, se requieren aproximadamente 2 mg/kg/h a lo largo de 9 h después de un bolo inicial de 2 mg/kg a lo largo de 10 min. Por el contrario, si no se requiere el estado estacionario, se puede dar inicialmente un bolo grande de leucina marcada (por ejemplo, 1 o 5 gramos de leucina marcada). (2) La proteína que se analiza. Por ejemplo, si la proteína

30 se produce rápidamente, entonces se podrá necesitar un tiempo de marcaje menor y será necesario menos marcador – quizá tan poco como 0,5 mg/kg a lo largo de 1 hora. Sin embargo, la mayoría de las proteínas tienen semividas de horas a días y, de modo más probable, se puede usar una infusión continua durante 4, 9 o 12 horas de 0,5 mg/kg a 4 mg/kg. Y (3) la sensibilidad de detección del marcaje. Por ejemplo, según aumenta la sensibilidad de detección del marcaje, puede disminuir la cantidad de marcaje necesario.

35

[0019] Los expertos en la materia apreciarán que se puede usar más de un marcador en un solo sujeto. Esto permitiría el marcaje múltiple de la misma biomolécula y podría proporcionar información de la producción o el aclaramiento de la biomolécula en diferentes tiempos. Por ejemplo, se puede dar un primer marcador a un sujeto a lo largo de un periodo de tiempo inicial, seguido de un agente farmacológico (fármaco), y luego se puede administrar

40 un segundo marcador. En general, el análisis de las muestras que se obtienen a partir de este sujeto proporcionaría una medición del metabolismo antes y después de la administración del fármaco, midiendo directamente el efecto farmacodinámico del fármaco en el mismo sujeto.

[0020] Como alternativa, se pueden usar múltiples marcadores al mismo tiempo para incrementar el marcaje de la

45 biomolécula, así como obtener marcaje para una gama más amplia de biomoléculas.

(e) Muestra biológica

[0021] Una muestra biológica debe obtenerse de un sujeto de forma que se pueda determinar el metabolismo *in vivo* de la biomolécula marcada. Las muestras biológicas descritas incluyen, pero no se limitan a, líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, saliva, transpiración y lágrimas. En la invención, las muestras biológicas se toman a partir del LCR. Tal como se describe también, las muestras biológicas se recogen a partir de la orina o a partir de la sangre.

50

[0022] El líquido cefalorraquídeo puede obtenerse mediante punción lumbar con o sin un catéter (es preferente un catéter si se hacen extracciones múltiples). La sangre puede recogerse por venopunción con o sin un catéter. La orina puede recogerse mediante la simple recolección de orina o de manera más precisa con un catéter. La saliva y las lágrimas pueden recogerse por recolección directa usando los métodos estándar de buenas prácticas de fabricación (BPM).

60

[0023] En general, cuando la biomolécula que se estudia es una proteína, la invención estipula que se tomará una primera muestra biológica a partir del sujeto antes de la administración del marcador para proporcionar una línea de base para el sujeto. Después de la administración del aminoácido o proteína marcados, generalmente se tomarían una o más muestras del sujeto. Tal como se apreciarán los expertos en la materia, el número de muestras y cuando se tomarían generalmente dependerá de varios factores tales como: el tipo de análisis, el tipo de administración, la

65

proteína de interés, la tasa de metabolismo, el tipo de detección, etc.

[0024] En un ejemplo, se toman muestras de sangre (por razones de comparación) y de LCR cada hora durante 36 horas. Como alternativa, las muestras se pueden tomar cada dos horas o incluso con menor frecuencia. En general, se pueden usar las muestras biológicas obtenidas durante las primeras 12 horas del muestreo (es decir, 12 horas después del comienzo del marcaje) para determinar la tasa de síntesis de la proteína, y las muestras biológicas tomadas durante las últimas 12 horas del muestreo (es decir, 34-36 h después del comienzo del marcaje) se pueden usar para determinar la tasa de aclaramiento de la proteína. En otra alternativa, se puede tomar una muestra después del marcaje durante un periodo de tiempo, tal como 12 horas, para estimar la tasa de síntesis, pero esto podría ser menos exacto que las muestras múltiples. En otra alternativa adicional, se pueden tomar las muestras con una diferencia de horas a días o incluso semanas dependiendo de las tasas de síntesis y de aclaramiento de la proteína.

(f) Detección

[0025] La presente invención estipula que la detección de la cantidad de proteína marcada y la cantidad de proteína no marcada en las muestras biológicas puede usarse para determinar la proporción de proteína marcada respecto a la proteína no marcada. Generalmente, la proporción de proteína marcada respecto a la no marcada es directamente proporcional al metabolismo de la proteína. Los métodos adecuados para la detección de las proteínas marcadas y no marcadas pueden variar y lo harán según la proteína que se estudie y el tipo de resto marcado que se use para marcarla. Si el resto marcado es un aminoácido marcado no radiactivamente, entonces el método de detección típicamente debería ser lo suficientemente sensible para detectar cambios en la masa de la proteína marcada con respecto a la proteína no marcada. En la presente invención se usa la espectrometría de masas para detectar diferencias entre la masa de las proteínas marcadas y no marcadas. En una realización se usa la espectrometría de masas con cromatografía de gases. En una realización alternativa se usa la espectrometría de masas MALDI-TOF. En una realización preferente, se usa la espectrometría de masas en tándem de alta resolución.

[0026] Se pueden utilizar técnicas adicionales para separar la proteína de interés de otras proteínas y biomoléculas en la muestra biológica. Como ejemplo, puede usarse la inmunoprecipitación para aislar y purificar la proteína de interés antes de analizarla por medio de espectrometría de masas. Como alternativa, se pueden usar espectrómetros de masas que tienen configuraciones de cromatografía para aislar las proteínas sin inmunoprecipitación, y después se puede medir la proteína de interés directamente. En una realización ejemplar, la proteína de interés se inmunoprecipita y después se analiza por medio de un sistema de cromatografía líquida en interfaz con una unidad de EM en tándem equipada con una fuente de ionización en electronebulización (LC-ESI-MS en tándem).

[0027] Se pueden medir múltiples proteínas simultáneamente en la misma muestra biológica. Es decir, tanto la cantidad de proteína no marcada como la marcada se pueden detectar y medir por separado o al mismo tiempo para múltiples proteínas. De esta manera, se proporciona un método útil para el cribado de cambios en la síntesis y el aclaramiento de las proteínas a gran escala (es decir, proteómica/metabolómica) y un medio sensible para detectar y medir proteínas involucradas en la fisiopatología subyacente. Se describe un medio para medir múltiples tipos de biomoléculas. En este contexto, por ejemplo, se pueden medir una proteína y un carbohidrato simultáneamente o secuencialmente.

(g) Análisis del Metabolismo

[0028] Una vez que se ha detectado la cantidad de proteína marcada y no marcada en una muestra biológica, se puede determinar la proporción o el porcentaje de proteína marcada. Si se mide la cantidad de proteína marcada y no marcada en una muestra biológica, entonces se puede calcular la proporción de proteína marcada respecto a la no marcada. El metabolismo de la proteína (tasa de síntesis, tasa de aclaramiento, tiempo de retardo, semivida, etc.) se puede calcular a partir de la proporción de proteína marcada respecto a la no marcada a lo largo del tiempo. Existen numerosas maneras adecuadas de calcular estos parámetros. La invención permite la medición de la proteína (o péptido) marcada y no marcada al mismo tiempo, de tal modo que se puede obtener la proporción de proteína marcada respecto de la no marcada, así como otros cálculos. Los expertos en la materia estarán familiarizados con los modelos cinéticos de primer orden de marcaje que se pueden usar con el método de la invención. Según la invención, se debe calcular la tasa de síntesis fraccional (TSF). La TSF es igual a la tasa inicial de incremento de la proteína marcada respecto a la proteína no marcada dividida por el enriquecimiento del precursor. Como alternativa, se calcula la tasa de aclaramiento fraccional (TAF). Tal como se describe, se pueden determinar otros parámetros, tales como el tiempo de retardo y el estado estacionario de los trazadores isotópicos y se pueden determinar y usar como mediciones del metabolismo de la proteína y de la fisiología. También, se puede realizar una modelización de los datos para ajustarlos a múltiples modelos de compartimentos para estimar la transferencia entre los compartimentos. Por supuesto, el tipo de modelo matemático elegido dependerá de los parámetros de síntesis y aclaramiento de la proteína individual (por ejemplo, modelado de un solo grupo, de múltiples grupos, de estado estacionario, de estado no estacionario, compartimentado, etc).

65

[0029] La invención estipula que la síntesis de la proteína se basa típicamente en la tasa de incremento de la proporción de proteína marcada/no marcada a lo largo del tiempo (es decir, la pendiente, la curva de ajuste exponencial, o el ajuste a un modelo compartimentado definen la tasa de síntesis de la proteína). Para esos cálculos típicamente se requiere un mínimo de una muestra (con una se podría estimar el nivel de la línea base), se prefieren dos, y se usan múltiples muestras para calcular una curva exacta de la incorporación del marcaje en la proteína (es decir, la tasa de síntesis).

[0030] A la inversa, después de que se termina la administración de un aminoácido marcado, la tasa de disminución de la proporción de proteína marcada respecto a la no marcada típicamente refleja la tasa de aclaramiento de esa proteína. Para estos cálculos, típicamente se requiere un mínimo de una muestra (se podría estimar el nivel de la línea basal), se prefieren dos, y se usan múltiples muestras para calcular una curva exacta de la disminución del marcaje de la proteína a lo largo del tiempo (es decir, la tasa de aclaramiento). La cantidad de proteína marcada en una muestra biológica a un tiempo dado refleja la tasa de síntesis (es decir, producción) o la tasa de aclaramiento (es decir, eliminación o destrucción) y se expresa habitualmente como porcentaje por hora o la masa/tiempo (por ejemplo, mg/h) de la proteína en el sujeto.

[0031] En una realización ejemplar, tal como se ilustra en los ejemplos, el metabolismo *in vivo* de la proteína beta-amiloide (A β) se mide mediante la administración de leucina marcada a un sujeto a lo largo de 9 horas y la recogida de las muestras biológicas a intervalos regulares a lo largo de 36 horas. La muestra biológica puede recogerse de plasma sanguíneo (por razones de comparación) o de LCR. La cantidad de A β marcada y no marcada en las muestras biológicas típicamente se determina mediante inmunoprecipitación seguida de LC-ESI-MS en tándem. A partir de esas mediciones, se puede determinar la proporción de A β marcada respecto a la no marcada, y esta proporción permite la determinación de los parámetros del metabolismo, es decir, la tasa de síntesis y la tasa de aclaramiento de A β .

25

Definiciones

[0032] A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicas y científicas que se usan en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias le proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos y expresiones que se usan en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (segunda edición 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª edición R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos y expresiones tienen los significados adscritos a estos a menos que se especifique lo contrario.

“Tasa de aclaramiento” se refiere a la tasa a la cual se elimina la proteína de interés.
La “Tasa de aclaramiento fraccional” o TAF se calcula como el logaritmo neperiano de la proporción de proteína marcada a lo largo de un periodo de tiempo especificado.

La “Tasa de síntesis fraccional” o TSF se calcula como la pendiente del incremento de la proporción de proteína marcada a lo largo de un periodo de tiempo especificado dividido por el valor predicho de estado estacionario del precursor marcado.

“Isótopo” se refiere a todas las formas de un elemento dado cuyos núcleos tienen el mismo número atómico pero tienen distintos números másicos porque contienen distintos números de neutrones. A modo de ejemplo no limitante, tanto ^{12}C como ^{13}C son isótopos estables del carbono.

“Tiempo de retardo” generalmente se refiere al retraso entre el tiempo en el que la proteína se marca por primera vez y cuando se detecta.

“Metabolismo” se refiere a cualquier combinación de la síntesis, transporte, degradación, modificación o tasa de aclaramiento de una proteína.

“Índice Metabólico” se refiere a una medición que comprende la tasa de síntesis fraccional (TSF) y la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de la proteína de interés. La comparación de los índices metabólicos de individuos normales y enfermos puede ayudar al diagnóstico o al control de las enfermedades neurológicas o neurodegenerativas.

Las “células procedentes del sistema nervioso” incluyen todas las células dentro de la barrera hematoencefálica, incluyendo neuronas, astrocitos, microglía, células del plexo coroidal, células ependimales, otras células de glía, etc.

“Estado estacionario” se refiere a un estado durante el cual hay un cambio insignificante en el parámetro medido a lo largo de un periodo de tiempo especificado.

“Tasa de síntesis” se refiere a la tasa a la cual se sintetiza la proteína de interés.

En estudios de trazador metabólico, un “isótopo estable” es un isótopo no radiactivo que es menos abundante que los isótopos más abundantes que existen de manera natural.

“Sujeto” tal como se usa en el presente documento significa un organismo vivo que tiene un sistema nervioso central. En particular, el sujeto es un mamífero. Los sujetos adecuados incluyen animales de experimentación, animales de compañía, animales de granja y animales de zoológico. El sujeto preferente es un humano.

65

Ejemplos

Ejemplo 1. Medición del metabolismo de la proteína beta-amiloide *in vitro*

5 Justificación

[0033] Las pruebas bioquímicas, genéticas y procedentes de los modelos animales evidencian la implicación de A β (Figura 1) como un péptido patogénico en la EA. A fin de desarrollar un método para medir el marcaje de A β *in vivo*, se diseñó un sistema *in vitro* usando cuatro pasos básicos: 1) marcar A β en un cultivo *in vitro*, 2) aislar A β de otras proteínas marcadas, 3) escindir específicamente A β en fragmentos que podrían analizarse para el marcaje, y 4) cuantificar el marcaje de los fragmentos marcados y no marcados.

Inmunoprecipitación y escisión de beta-amiloide

15 **[0034]** Primero, se desarrolló un método para aislar y medir A β no marcada a partir de fluidos biológicos. A β se inmunoprecipitó a partir de muestras de LCR o medios de cultivo celular usando un anticuerpo monoclonal de alta especificidad (m266), que reconoce el dominio central (restos 13-28) de las moléculas. Se prepararon microesferas de anticuerpos mediante unión covalente del anticuerpo m266 (generosamente proporcionado por Eli Lilly) a microesferas de CNBr sefarosa según el protocolo del fabricante a una concentración de 10 mg/ml de anticuerpo
20 m266. Las microesferas con el anticuerpo se almacenaron a 4 °C en una suspensión de PBS al 50 % y azida al 0,02 %. La mezcla de inmunoprecipitación fue de 250 μ l de RIPA 5X, 12,5 μ l de inhibidores de proteasas 100x y 30 μ l de suspensión de microesferas-anticuerpo en un tubo Eppendorf. A esta, se le añadió 1 ml de la muestra biológica y el tubo se hizo rotar durante toda la noche a 4 °C. Las microesferas se aclararon una vez con RIPA 1X y dos veces con bicarbonato de amonio 25 mM. Se secaron por aspiración después del último aclarado y se eluyó A β del complejo
25 microesfera-anticuerpo usando 30 μ l de ácido fórmico puro. Se caracterizó directamente A β (peso molecular y secuencia de aminoácidos) usando espectrometría de masas. Los resultados fueron similares a los hallazgos publicados previamente (Wang et al. 1996, J Biol. Chem. 271(50): 31894-31902), tal como se muestra en la Figura 1.

[0035] La proteína beta-amiloide puede escindirse en fragmentos más pequeños por digestión enzimática usando tripsina. La escisión de A β por medio de tripsina produce los fragmentos A β ₁₋₅, A β ₆₋₁₆, A β ₁₇₋₂₈ y A β _{29-40/42}, tal como se representa en la Figura 1.

Marcaje de beta-amiloide

35 **[0036]** Segundo, se desarrolló un método para marcar la A β de nueva síntesis. Se usó ¹³C₆-leucina como un marcaje metabólico porque se equilibra rápidamente a través de la barrera hematoencefálica por medio de transporte activo (Smith et al. 1987, J Neurochem 49(5): 1651-1658), es un aminoácido esencial, no cambia las propiedades de A β , y es segura y no radiactiva. Los isótopos estables de ¹³C no cambian las propiedades de los aminoácidos o de las proteínas; solamente se incrementa la masa un Dalton por cada marcador de ¹³C. De hecho,
40 organismos enteros han crecido en ¹³C sin ningún efecto deletéreo. La leucina marcada se incorpora en la secuencia de aminoácidos de A β en las posiciones 17 y 34 (véase la Figura 1).

[0037] Los isótopos que existen de modo natural ¹³C (1,1 % de todo el carbono) y ¹⁵N causan una distribución natural de moléculas de mayor masa molecular, incluyendo proteínas. Debido al tamaño de A β y a la presencia de
45 esos isótopos que existen de modo natural, se puede romper el péptido en péptidos más pequeños para la medición directa del marcaje. Como alternativa, se puede hacer la separación usando A β completa sin digerir.

Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas

50 **[0038]** Tercero, se desarrolló un método para cuantificar con precisión la A β marcada y la no marcada. Para esto se situó en interfaz un sistema de cromatografía líquida capilar de Waters (Milford, MA) con auto-inyector junto con LCQ-DECA de Thermo-Finnigan (San José, CA) con una fuente de ionización por electronebulización (LC-ESI-MS en tándem). Se inyectó una alícuota de 5 μ l de cada muestra en una columna capilar Vydac C-18 (columna de espectrometría de masas de 0,3 x 150 mm de 5 μ l). El fragmento A β ₁₇₋₂₈ contiene un resto de leucina y la
55 incorporación de ¹³C₆-leucina varía el peso molecular del fragmento en 6 Daltons. En modo de escaneo de iones positivos, el análisis LC-ESI-MS de la A β sintética y la inmunoprecipitada digeridas por tripsina produjo los iones esperados a masas de 1325,2 para A β ₁₇₋₂₈ y 1331,2 para A β ₁₈₋₂₈ marcada con ¹³C₆-leucina (Figuras 3A y 3B). El porcentaje de A β (A β *) marcada se calculó como la proporción de toda la MS marcada/iones de la MS de A β ₁₇₋₂₈ marcada, dividida por toda la MS no marcada/iones de la MS de A β ₁₇₋₂₈ no marcada. Se usó una hoja de cálculo
60 personalizada de Microsoft Excel con macros para calcular la proporción como la proporción de trazador respecto de la traza (TTR) de A β ₁₇₋₂₈ mediante la siguiente fórmula:

$$TTR_{A\beta} = \frac{\sum MS / MS \text{ iones } A\beta^*_{17-28}}{\sum MS / MS \text{ iones } A\beta_{17-28}}$$

[0039] Se concluyó que este método proporcionaba una “huella digital” altamente específica de A β en ambas formas marcada y no marcada, ya que cuantificaba las cantidades de cada forma y determinaba la secuencia de aminoácidos al mismo tiempo. De este modo, se alcanzó la una excelente separación y especificidad del péptido A β marcado como respecto del no marcado. La exactitud y precisión se ensayaron mediante la generación de una curva patrón a partir de diluciones seriadas de medios de cultivos marcados y no marcados (Figura 4). El ajuste lineal de un intervalo desde el 0 % al 80 % de la curva patrón de diluciones seriadas de A β marcada dio un valor de R² de 0,98 y una pendiente de 0,92. Las técnicas alternativas de medición que se evaluaron incluyen la medición directa de los iones parentales en modo selectivo de iones solamente y también el uso de un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Sin embargo, estos métodos fueron incapaces de ofrecer la sensibilidad y la especificidad que se alcanzó con la LC-ESI usando un análisis cuantitativo de espectros de masas en tándem.

Marcaje de beta-amiloide *in vitro*

[0040] Se desarrollaron células de neuroglioma humanas que producen A β (Murphy et al. 2000, J Biol. Chem. 275(34): 26277-26284) en presencia de leucina marcada con ¹³C₆ (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA) o de leucina no marcada. Se aisló A β a partir del medio por inmunoprecipitación con el anticuerpo m266 (véase lo anterior). La A β eluida se digirió con tripsina durante 4 horas a 37 °C, y se analizaron los fragmentos por LC-ESI-MS. Tal como se esperaba, el fragmento A β ₁₇₋₂₈ de la A β aislada de las células incubadas en presencia de leucina no marcada tenía un peso molecular de 1325,2 y el fragmento A β ₁₇₋₂₈ de la A β aislada de las células incubadas con leucina marcada con ¹³C₆ tenía un peso molecular 1331,2 (Figura 3B). Estos hallazgos indican que las células incorporaron la ¹³C₆-leucina en A β , confirmando que la A β sintetizada en presencia de ¹³C₆-leucina incorpora el aminoácido marcado y que el cambio de 6 Daltons en el peso molecular del péptido que contiene leucina se puede distinguir usando espectrometría de masas.

[0041] Se analizaron los medios de cultivo a las 4 horas y a las 24 horas del marcaje con ¹³C₆-leucina para determinar la cantidad relativa de marcaje que se produce como una función del tiempo. El experimento de marcaje de 4 horas reveló aproximadamente el 70 % de marcaje, mientras que el experimento de marcaje de 24 horas reveló más del 95 % del marcaje. Estos hallazgos indican que en las horas posteriores a la exposición al marcaje, la proteína precursora de amiloide (APP) incorporó el aminoácido marcado, y la A β marcada se escindió de la APP marcada y se liberó al espacio extracelular.

Ejemplo 2. Medición del metabolismo de la proteína beta-amiloide *in vivo* (se miden las muestras de sangre por razones de comparación)

Justificación

[0042] La producción y el aclaramiento de proteínas son parámetros importantes que están estrechamente regulados y reflejan la fisiología normal así como los estados de la enfermedad. Los estudios previos del metabolismo de proteínas en humanos se han centrado en las proteínas corporales totales, o en las proteínas corporales periféricas, pero no en las del sistema nervioso central (SNC). No había métodos disponibles anteriormente para cuantificar las tasas de síntesis o de aclaramiento de proteínas en el SNC de humanos. Dicho método podría ser válido para evaluar, no solamente las tasas de síntesis y aclaramiento de A β en humanos, sino también el metabolismo de una variedad de otras proteínas relevantes para las enfermedades del SNC. A fin de abordar las cuestiones críticas sobre las que subyace la patogénesis de la EA y el metabolismo de A β , se desarrolló un método para cuantificar la tasa de síntesis fraccional (TSF) y la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de A β *in vivo* en el SNC de humanos.

Participantes y muestreo

[0043] Todos los estudios en humanos se aprobaron por el comité de estudios en humanos de la Washington University y por el comité de asesoramiento del General Clinical Research Center (GCRC). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Todos los pacientes se seleccionaron de forma que tuvieran una buena salud general y no tuvieran enfermedad neurológica. Participaron siete hombres y tres mujeres (23-45 años de edad). Cada participante de la investigación ingresó en el GCRC a las 7:00 AM después de un ayuno nocturno desde las 8 PM de la tarde precedente. La cocina de investigación del GCRC proporcionó las comidas (dieta con 60 % de carbohidratos, 20 % de grasas, 20 % de proteínas, baja en leucina durante la infusión de leucina marcada) a las 9 AM, 1 PM, y 6 PM y los participantes tuvieron libre acceso a agua. Todo el consumo de alimentos y de agua se registró durante el ingreso por el personal de enfermería y el de cocina del GCRC. Se colocó un catéter intravenoso en una vena antecubital y se usó para administrar la solución de leucina marcada con el isótopo estable.

Se colocó un segundo catéter intravenoso en la vena antecubital contralateral para obtener muestras de sangre. Se insertó un catéter subaracnoideo en el interespacio L3-L4 a través de una aguja de Touhy, de tal modo que el LCR pudiera muestrearse sin realizar punciones lumbares múltiples (Williams, 2002, Neurology 58: 1859-1860). Los catéteres intravenosos los colocaron enfermeras registradas entrenadas y el catéter lumbar lo colocaron médicos entrenados con una experiencia dilatada en punción lumbar. Las muestras de sangre se obtuvieron cada hora, a no ser que el estudio fuera de 36 horas, en cuyo caso, la sangre se obtuvo cada hora durante las primeras 16 horas y cada dos horas de ahí en adelante. Las muestras de LCR se obtuvieron cada hora a lo largo del estudio. Véase el esquema del protocolo experimental *in vivo* que se presenta en la Figura 5. Se instó a los participantes a permanecer en cama excepto para usar el lavabo.

10

[0044] La $^{13}\text{C}_6$ -leucina (Cambridge Isotope Laboratories) se disolvió en una solución salina de calidad médica y después se filtró a través un filtro de 0,22 micrómetros el día antes de cada estudio. La leucina marcada se infundió por vía intravenosa usando una bomba médica IV a una tasa de 1,8 a 2,5 mg/kg/h.

15 Marcaje y cuantificación de A β *in vivo* en un participante

[0045] Para determinar si la A β marcada podría producirse y detectarse *in vivo* en un humano, un único participante se sometió a una infusión de leucina marcada de 24 h seguida de una punción lumbar para obtener LCR. La leucina marcada con $^{13}\text{C}_6$ se infundió a una tasa de 1,8 mg/kg/h en una IV. Cada hora, se obtuvieron 10 ml de plasma a través de la otra IV. Después de 24 horas de infusión continua, se realizó una única punción lumbar y se obtuvieron 30 ml de LCR. A β se inmunoprecipitó a partir de la muestra de LCR, se digirió con tripsina, y se inyectó una alícuota de 5 μl de cada muestra en una columna capilar Vydac C-18 (de MS de 0,3 x 150 mM, 5 μm). El análisis por LC-ESI-MS en modo de escaneo de iones positivos, de la A β inmunoprecipitada y la sintética digeridas con tripsina produjo los iones parentales esperados a masas de 1325,2 para A β_{17-28} y 1331,2 para A β_{17-28} marcada con leucina- $^{13}\text{C}_6$. Para obtener la secuencia de aminoácidos y abundancia de datos, estos iones parentales se sometieron a disociación inducida por colisión (DIC 28 %), y los análisis por MS en tándem de sus especies doblemente cargadas ($[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$; m/z 663,6 y 666,6) se escanearon en modo de control de reacción seleccionado (SRM), de tal modo que las series de iones y- y b- generadas se usaron para la cuantificación de la proporción de isótopos (Figura 6). Además, se midieron la $^{13}\text{C}_6$ -leucina del plasma y del LCR para determinar cantidad máxima de $^{13}\text{C}_6$ -leucina-A β esperada. Los resultados demostraron que la A β_{17-28} no marcada y A β_{17-28} marcada con ^{13}C podrían detectarse y medirse en LCR humano.

[0046] Los resultados del primer participante humano demostraron tres hallazgos significativos: 1) La $^{13}\text{C}_6$ -leucina en plasma era de un promedio del 12 % de la leucina plasmática total a una tasa de infusión por la IV de 1,8 mg/kg/hora; 2) La $^{13}\text{C}_6$ -leucina del LCR se midió en LCR demostrando un nivel similar (11,9 %) que en el plasma a las 24 horas; y 3) A β se marcó con $^{13}\text{C}_6$ -leucina en LCR humano aproximadamente el 8 % del nivel total de A β a las 24 horas.

[0047] A fin de cuantificar la exactitud y precisión de la técnica de medición de la A β marcada *in vivo* en LCR humano, se generó una curva patrón a partir de diluciones seriadas del LCR humano marcado y no marcado (Figura 7). La técnica de medición fue la misma que para la curva patrón *in vitro* (Figura 4). Se usó LC-ESI-MS para cuantificar las cantidades de A β_{17-28} marcada y no marcada en el modo de control selectivo de iones con espectrómetro de masas en tándem que registraba iones MS-2. El ajuste lineal de intervalo desde el 0 % al 8 % de la curva patrón de diluciones seriadas de A β marcada dio un valor de R^2 de 0,98 y una pendiente de 0,81. A partir de estos datos, se predijo que las muestras *in vivo* de pacientes humanos variarán probablemente del 1 al 10 % de marcaje. Obsérvese la medición del 1 % en el LCR no marcado en el eje Y, aunque se predijo un 0 %. Debido a las interferencias con la línea base del sistema de detección, no fue posible medir menos del 1 % del marcaje con este sistema. Se concluyó que A β se puede marcar *in vivo* en humanos y puede medirse con buena exactitud y precisión usando espectrometría de masas LC-ESI.

50

Farmacocinética del marcaje *in vivo*

[0048] Para asegurarse de que se alcanzaba el marcaje detectable de A β con $^{13}\text{C}_6$ -leucina y de que se mantenía durante un periodo de tiempo adecuado de tal modo que las ecuaciones del estado estacionario pudieran usarse para calcular las tasas de síntesis y de aclaramiento de A β , se determinaron los tiempos de marcaje y de muestreo óptimos. Se ensayaron un intervalo de dosis de infusión intravenosa de $^{13}\text{C}_6$ -leucina (1,8 a 2,5 mg/kg/h), duraciones (6, 9, o 12 horas) y tiempos de muestreo en LCR/sangre (de 12 a 36 horas de duración) (véase la Tabla 1).

Tabla 1: Etiquetado de los participantes y parámetros de muestreo

Número de participante	Dosis de la infusión (mg/kg/h)	Duración de la infusión, horas	LCR/muestreo en sangre, horas
1	1,8	24 horas	1 tiempo a las 24 horas

Número de participante	Dosis de la infusión (mg/kg/h)	Duración de la infusión, horas	LCR/muestreo en sangre, horas
2	1,9	12 horas	24 horas
3	2,5	12 horas	13 horas
4	2,5	9 horas	24 horas
5	2,4	6 horas	6 horas
6	2	6 horas	36 horas
7	2	6 horas	36 horas
8	2	9 horas	36 horas
9	2	9 horas	36 horas
10	2	9 horas	36 horas

[0049] Las curvas de marcaje metabólico de A β de tres participantes se presentan en la Figura 8. La leucina marcada con $^{13}\text{C}_6$ se infundió a través de una vía IV a una tasa de 1,9 (círculos), 2,5 (triángulos), o 2,5 (cuadrados) mg/kg/h durante 12 (círculos, triángulos) o 9 (cuadrados) horas. Cada hora, se obtuvieron 10 ml de plasma y 6 ml de LCR a través de la otra vía IV y del catéter lumbar, respectivamente. Hubo un tiempo de retardo de 5 horas antes de detectar aumentos significativos de A β marcada. A esto le siguieron 9 (cuadrados) o 12 (triángulos o círculos) horas de incremento de A β marcada hasta que se estabilizó durante otras 5 horas. Las 9 horas de marcaje (cuadrados) tenían niveles decrecientes de A β marcada durante las 3 últimas horas, mientras que las 12 horas de marcaje (triángulos o círculos) no mostraron una disminución de A β marcada.

[0050] Estudios adicionales revelaron que la A β marcada podía cuantificarse probablemente después de 9 o 12 horas de infusión del marcador, pero no después de 6 horas de infusión del marcador. La porción de síntesis de una curva de marcaje podría determinarse en las primeras 12 horas del muestreo; sin embargo, la porción de aclaramiento de la curva de marcaje solamente podría determinarse con 36 h de muestreo. Basándose en estos resultados, se definió que los parámetros de marcaje óptimos para A β eran de 9 horas de infusión por la IV del marcaje y 36 horas de recogida de muestras. Estos parámetros permitieron la evaluación tanto de la porción de la tasa de síntesis fraccional (TSF) como la de la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de una curva de marcaje.

20 Protocolo de marcaje *In vivo*

[0051] En los últimos tres participantes, la leucina marcada $^{13}\text{C}_6$ se administró con un bolo inicial de 2 mg/kg a lo largo de 10 minutos hasta alcanzar un estado estacionario de leucina marcada, seguido de 9 horas de infusión intravenosa continua a una tasa 2 mg/kg/h. La sangre y el LCR se muestrearon durante 36 horas en los 3 últimos participantes. Se tomaron muestras seriadas de 12 ml de sangre y 6 ml de LCR en intervalos de una a dos horas. El LCR tiene una tasa de producción de ~20 ml por hora (Fishman RA, 1992, Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system, Saunders, Filadelfia) en un adulto de talla normal y éste se repone a lo largo del procedimiento. A lo largo de un estudio de 36 horas, la cantidad total de sangre recogida fue de 312 ml y la cantidad total de LCR recogido fue de 216 ml.

[0052] Había un total de 10 participantes enrolados en el estudio, completando 8 los protocolos predefinidos e interrumpiéndose 2 estudios antes de su compleción debido a cefalea post-punción lumbar asociada al estudio (véase la Tabla 1). Dos de los 8 estudios completados tuvieron una infusión de leucina marcada de 6 horas, y los niveles de A β marcada en esos 2 participantes fueron demasiado bajos para medirlos con exactitud y no se usaron para el análisis. Por lo tanto, se notifican los resultados de los 6 estudios restantes a continuación.

Cuantificación de la leucina marcada

[0053] Se analizaron las muestras de plasma y de LCR para determinar la cantidad de leucina presente en cada fluido (Figura 9). Se cuantificaron las proporciones de leucina marcada respecto a no marcada para plasma y LCR con $^{13}\text{C}_6$ -leucina usando cromatografía de gases capilar - espectrometría de masas (GC-MS) (Yarasheski et al. 2005, Am J Physiol. Endocrinol. Metab. 288: E278-284; Yarasheski et al. 1998 Am J Physiol. 275: E577-583), que es más apropiada que la LC-ESI-MS para el análisis de aminoácidos de baja masa. La $^{13}\text{C}_6$ -leucina alcanzó niveles de estado estacionario del 14 % y del 10 % tanto en plasma como en LCR, respectivamente, en una hora. Esto confirmó que la leucina se transportaba rápidamente a través de la barrera hematoencefálica por medio de los sistemas conocidos de transporte de aminoácidos neutros (Smith et al. 1987 J Neurochem. 49(5): 1651-1658).

Dinámica de la Aβ marcada

[0054] Para cada muestra horaria de LCR que se recoge, se determinó la proporción de Aβ marcada respecto a no marcada mediante inmunoprecipitación-MS/MS, tal como se describe anteriormente. La MS/iones de la MS de Aβ₁₇₋₂₈ marcada con ¹³C se dividieron entre la MS/iones de la MS de Aβ₁₇₋₂₈ no marcada para producir una proporción de Aβ marcada respecto a Aβ no marcada (véase la fórmula de TTR anterior). La proporción media de Aβ marcada y el error típico (n=6) de tiempo se muestran en la figura 10. No hubo Aβ marcada medible durante las primeras 4 horas, seguido de un incremento desde las 5 a las 13 horas. No hubo cambios significativos desde las 13 a las 24 horas. La Aβ marcada disminuyó desde las 24 a las 36 horas.

10

Cálculo de TSF and TAF:

[0055] La tasa de síntesis fraccional (TSF) se calculó usando la fórmula estándar, que se presenta a continuación:

$$TSF = \frac{(E_{t_2} - E_{t_1})_{A\beta}}{(t_2 - t_1)} \div \text{Precursor E}$$

15

Donde $(E_{t_2} - E_{t_1})_{A\beta} / (t_2 - t_1)$ se define como la pendiente de Aβ marcada durante el marcaje y el Precursor E es la proporción de leucina marcada. TSF, en porcentaje por hora, se definió operativamente como la pendiente de la regresión lineal desde las 6 a las 15 horas dividida entre el promedio de los niveles de leucina marcada con ¹³C₆ durante la infusión (véase la Figura 11A-C). Por ejemplo, una TSF del 7,6 % por hora significa que el 7,6 % de la Aβ total se produjo cada hora.

20

[0056] La tasa de aclaramiento fraccionario (TAF) se calculó mediante el ajuste de la pendiente del logaritmo neperiano de la porción de aclaramiento de la curva de Aβ marcada, según la siguiente fórmula:

25

$$TAF = \ln \left(\frac{\Delta TTR_{A\beta}}{\Delta \text{tiempo}(\text{horas})_{24-36}} \right)$$

La TAF se definió operativamente como el logaritmo neperiano de la Aβ marcada desde las 24 a las 36 horas (Figura 11D-F). Por ejemplo, una TAF del 8,3 % por hora significa que el 8,3 % de la Aβ total se aclaró cada hora. El promedio de la TAF de Aβ para estos 6 participantes jóvenes sanos fue de 7,6 %/h y el promedio de la TSF fue del 8,3 %/h (Figura 12). Estos valores no fueron estadísticamente distintos los unos de los otros.

30

Ejemplo 3. Una técnica para medir el porcentaje de Aβ marcada en plasma (por razones de comparación)35 Justificación

[0057] El metabolismo de la Aβ plasmática probablemente tiene lugar en un compartimiento separado con diferentes tasas de metabolismo en comparación con LCR. En un modelo murino de EA, la cantidad de Aβ capturada por un anticuerpo en el plasma predijo la patología. Por lo tanto, la tasa de metabolismo de Aβ en plasma debe ser una característica definitoria de la patología en la EA. Además, el metabolismo de la Aβ plasmática puede ser un método igualmente efectivo para medir el metabolismo de Aβ en humanos en comparación con LCR. Si se prueba que es diagnóstico o predictivo de demencia, este método puede ser más viable como ensayo preclínico o clínico de EA.

40

Diseño experimental

45

[0058] Tal como se hizo para LCR en los ejemplos anteriores, se puede desarrollar un método para medir Aβ marcada y no marcada en plasma. Hay dos diferencias principales en la obtención de plasma en comparación con LCR: 1) hay ~100x menos de Aβ en plasma y 2) hay un incremento de la concentración de proteínas distintas a Aβ de aproximadamente 200x. La eficiencia y la especificidad de la inmunoprecipitación pueden optimizarse usando métodos conocidos para un experto en la técnica. Las inmunoprecipitaciones se pueden ensayar mediante un análisis con un espectrómetro de masas de trampa iónica cuadrupolar (LTQ) para identificar los números y las cantidades relativas de proteínas contaminantes. El LTQ proporciona un incremento de hasta 200 veces por encima de la sensibilidad del LC-ESI. Los resultados preliminares indican que tiene una proporción excelente de señal respecto del ruido a una dilución de 50 veces de los fragmentos de Aβ de 1 ml de LCR humano

50

55

[0059] El ensayo de los métodos optimizados se puede hacer con 5-10 ml de plasma. La Aβ marcada y no marcada puede inmunoprecipitarse, digerirse con tripsina, y analizarse mediante espectrometría de masas. Las muestras de plasma marcadas de los sujetos pueden usarse para detectar y general curvas patrón de marcaje en plasma. La muestra con mayor marcaje se puede usar para crear 5 muestras por dilución seriada. La Aβ marcada puede

cuantificarse mediante el LTQ en los iones parentales y en los iones de la espectrometría de masas en tándem, y los resultados pueden generar una curva patrón. A partir de esta curva, se puede determinar la linealidad y la variabilidad mediante un modelo de ajuste lineal. Esta curva patrón puede compararse con la curva patrón generada para el marcaje de A β en LCR humano. Las curvas de A β marcado en plasma se pueden comparar con las curvas de LCR marcado de los controles frente a los individuos con EA para determinar si los niveles plasmáticos de A β pueden detectar o predecir EA.

Resultados

- 10 **[0060]** Tal como en los datos para LCR (véase los ejemplos 1 y 2), se espera que se pueda desarrollar una técnica que pueda proporcionar mediciones reproducibles y cuantitativas de la A β marcada y la no marcada a partir de plasma humano. Se esperan curvas patrón que se acerquen a la linealidad y con baja variabilidad. Se espera que las curvas de A β marcada de los estudios *in vivo* en humanos reflejen fielmente las curvas de A β marcada del SNC/LCR humano. También que se puedan generar las TSF y TAF de la A β plasmática de los participantes.
- 15 Se espera que las tasas de aclaramiento de A β en plasma sean mucho más rápidas que en el LCR, tal como se muestra en los modelos animales después de la infusión de A β en plasma.

Enfoques alternativos

- 20 **[0061]** Si la A β plasmática marcada y la no marcada no pueden medirse con exactitud tal como se detalla anteriormente, entonces pueden usarse muestras mayores por cada tiempo con menos tiempos (20 ml cada dos horas en contraposición con 10 ml cada hora). Esto podría disminuir la resolución temporal de las mediciones, pero podría ser todavía suficiente para generar la TSF y la TAF. Si la contaminación proteica es aún un problema con el plasma, entonces serían necesarias la purificación por HPLC, gel de proteínas 2D o pasos de aclarado aún más
- 25 astringentes, que son conocidos para los expertos en la materia.

[0062] El LTQ es el espectrómetro de masas más sensible del que se dispone comercialmente y proporciona la mejor oportunidad para generar mediciones basadas en cantidades attomolares. En el presente, no existen alternativas mejores a este espectrómetro de masas; sin embargo, la sensibilidad de la espectrometría de masas mejora constantemente con las mejoras tecnológicas.

30

Ejemplo 4. Determinación del efecto del genotipo ApoE en el metabolismo de la A β de LCR (se miden las muestras de plasma por razones de comparación).

35 Justificación

[0063] El genotipo ApoE es un factor genético de riesgo bien validado para la EA. La inmunohistoquímica reveló que ApoE se co-localizaba con los depósitos extracelulares de amiloide en la EA. Además, se ha mostrado que el alelo ApoE ϵ 4 era un factor de riesgo para EA en poblaciones humanas. Se ha mostrado que el alelo ApoE ϵ 3 es protector del riesgo de EA. También se ha mostrado que el genotipo ApoE efectúa cambios de manera espectacular en la patología de EA en varios modelos murinos de EA (Games et al. 1995 Nature 373(6514): 523-527).

40

[0064] ApoE ϵ 4 incrementa de forma dosis-dependiente la densidad de los depósitos de A β en EA y en la angiopatía amiloide cerebral (AAC). ApoE se asocia con A β soluble en el LCR, plasma y en el cerebro normal y en EA. Es probable que ApoE4 esté asociada con EA y AAC a través del mecanismo común del metabolismo de A β , aunque se ha demostrado que ApoE4 está involucrada en una variedad de rutas distintas.

45

[0065] Se ha mostrado que la isoforma ApoE causa cambios dosis- y alelo-dependientes en el tiempo de aparición de la deposición de A β y en distribución de la deposición de A β en modelos de murinos de EA (Holtzman et al, 2000, Proc Natl Acad Sci 97:2892-2897; DeMattos et al 2004, Neuron 41 (2): 193-202). Se mostró que la ApoE3 humana causaba una disminución dosis-dependiente de la deposición de A β . Además, los estudios de aclaramiento han mostrado que el transporte A β desde el SNC al plasma tiene un $t_{1/2}$ de <30 minutos, el cual disminuye sin ApoE. En conjunto, esto sugiere que ApoE tiene efectos de unión y aclaramiento de A β sobre la A β del SNC.

50

55 Diseño experimental y análisis

[0066] El genotipo ApoE se puede determinar en cada participante. La capa leucocitaria (capa de glóbulos blancos de la sangre) se puede recoger a partir de plasma centrifugado y congelarse inmediatamente a -80 °C usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. El genotipo ApoE de la muestra se determina mediante análisis por PCR (Talbot et al 1994, Lancet 343 (8910): 1432-1433). El efecto de la dosis génica de ApoE2 (0, 1, o 2 copias) y de ApoE4 (0, 1, o 2 copias) se puede analizar con la variable continua de la TSF o TAF del metabolismo de A β en plasma o LCR.

60

[0067] Los métodos para el análisis estadístico se pueden hacer utilizando técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para la TSF y la TAF de A β , se puede realizar un ANOVA de dos colas o de tres

65

colas con la isoforma de ApoE humana y la edad como factores en el grupo de control y también en el grupo de EA. Si los datos no se distribuyen normalmente, se puede usar una transformación para para cumplir con los supuestos estadísticos necesarios relacionados a las distribuciones gaussianas.

5 Resultados

[0068] Se espera que ApoE4 pueda disminuir el aclaramiento de A β en comparación con ApoE3. Por el contrario, se espera que ApoE2 aumente el aclaramiento de A β en comparación con ApoE3. No se espera un cambio en la tasa de síntesis de A β basado en el genotipo ApoE. Si se detectan cambios en el metabolismo de A β , esta sería la evidencia del efecto del estado de ApoE en el metabolismo *in vivo* de A β en humanos.

Ejemplo 5. Comparación del genotipo ApoE respecto al metabolismo TRF y TAF de A β (se miden las muestras de sangre por razones de comparación).

15 Justificación

[0069] El transporte de A β del SNC al plasma podría estar afectado por el genotipo ApoE, tal como se demuestra en modelos murinos de EA. La medición de este efecto en humanos podría revelar cambios en el transporte por medio de ApoE.

20

[0070] Los datos de animales *in vivo* muestran que hay tres tipos diferentes de tasas de aclaramiento de A β en plasma frente a LCR frente a cerebro. La causa de estas indiferencias y la relación entre ellas no se entienden bien. Es probable que la expresión del genotipo ApoE juegue un papel significativo en el transporte y aclaramiento de A β del SNC al LCR y al plasma. ApoE se produce en el SNC mayoritariamente por astrocitos y está sializada y es estructuralmente distinta a la A β plasmática. Para entender mejor la relación entre estos tres compartimentos como una función del genotipo ApoE, se puede usar la técnica del Ejemplo 3 para medir el metabolismo de A β en plasma.

25

Diseño experimental y análisis

[0071] Se puede determinar el genotipo ApoE de cada participante. Se puede recoger la capa leucocitaria (capa de glóbulos blancos de la sangre) del plasma centrifugado y congelarse inmediatamente a -80 °C usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia. Estas muestras se pueden analizar usando la técnica que se usa en el Ejemplo 4. Se puede analizar efecto de la dosis génica de ApoE2 (0, 1, o 2 copias) y de ApoE4 (0, 1 o 2 copias) para la variable continua de TSF o TAF del metabolismo de A β plasmática. Los métodos para el análisis estadístico pueden hacerse usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia y tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 4.

35

Resultados

[0072] Se espera que ApoE4 pueda disminuir el aclaramiento de A β en plasma en comparación con ApoE3, y que ApoE2 pueda incrementar el aclaramiento de A β del plasma en comparación con ApoE3. No se espera observar un cambio en la tasa de síntesis de A β basada en el genotipo ApoE. Si se detectan cambios en el metabolismo de A β plasmática, sin embargo, esta podría ser la primera evaluación del efecto del estado ApoE en el metabolismo de A β en humanos.

45

Enfoques alternativos

[0073] La relación entre los compartimentos plasma, LCR y SNC con el metabolismo de A β no se entiende bien. Hay cambios en las proporciones de A β en cada compartimento dependiendo de la presencia de EA. Esto indica un efecto diferencial en la alteración del metabolismo de A β entre compartimentos. La relación del metabolismo de A β de plasma periférico en comparación con el metabolismo de A β en LCR puede ser más compleja que solamente la dependiente del genotipo ApoE. Es probable que no solamente intervenga el estado de EA, sino también otros factores para efectuar esta relación. Por lo tanto, un cambio de patrón claro en el metabolismo de A β podría no ser dependiente del genotipo ApoE.

55

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para medir el metabolismo de una proteína *in vivo* en un sujeto que ha recibido una porción marcada que es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica e incorporarse a dicha proteína cuando dicha proteína se sintetiza en el sistema nervioso central del sujeto, comprendiendo el método:
- a. detectar la cantidad de proteína marcada con la porción y la cantidad de proteína no marcada en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenida del sujeto, comprendiendo la muestra de LCR una fracción proteica sintetizada en el SNC y marcada detectablemente con la porción, y una fracción proteica no marcada con la porción, donde la cantidad de proteína marcada y la cantidad de proteína no marcada se detectan usando espectrometría de masas;
 - b. determinar la relación de proteína marcada respecto a la proteína no marcada;
 - c. calcular la relación de síntesis fraccional (TSF) de proteína marcada y/o la relación de aclaramiento fraccional (TAF) de proteína marcada a partir de la relación determinada mediante el paso (b) en las muestras a lo largo del tiempo;
- en el que la tasa de síntesis fraccional (FSR) de proteína marcada se calcula a partir de las relaciones determinadas mediante el paso (b) en múltiples muestras desde el momento en el que es detectable la proteína marcada y mientras se incrementa la relación de proteína marcada respecto a la no marcada en las múltiples muestras, determinada mediante el paso (b); y/o la tasa de aclaramiento fraccional (TAF) de la proteína marcada se calcula a partir de las relaciones determinadas en el paso (b) en múltiples muestras después de que la relación de proteína marcada respecto a la no marcada disminuye en el LCR del sujeto; en el que la TSF y/o TAF son directamente proporcionales al metabolismo en el SNC de la proteína.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la proteína es beta-amiloide y en el que, para el cálculo de la TSF, la proteína marcada es detectable 4 ó 6 horas después de la administración de la porción marcada y la relación de proteína marcada respecto a la no marcada se incrementa durante 12, 13 ó 15 después de la administración de la porción marcada; y en el que, para el cálculo de la TAF, la relación de proteína marcada respecto a la no marcada disminuye 24-36 horas después de la administración de la porción marcada.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de LCR se obtuvo mediante punción lumbar, catéter lumbar o una combinación de los mismos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste en beta-amiloide, apolipoproteína E, apolipoproteína J, sinucleína, precursor soluble de la proteína amiloide, Tau, alfa-2 macroglobulina, S100B, proteína básica de la mielina, una interleucina y TNF.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la porción marcada es un átomo, o una molécula con un átomo marcado.
6. El método según la reivindicación 5 en el que la molécula es un aminoácido.
7. El método de la reivindicación 5 ó 6, en el que el átomo es un isótopo no radiactivo seleccionado del grupo que consiste en ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S .
8. El método según las reivindicaciones 5, 6 ó 7 en el que la porción marcada es $^{13}\text{C}_6$ -leucina.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además separar la fracción proteica marcada y la fracción proteica no marcada de la muestra de LCR.
10. El método de la reivindicación 9 en el que la proteína se separa por inmunoprecipitación.

Figura 2

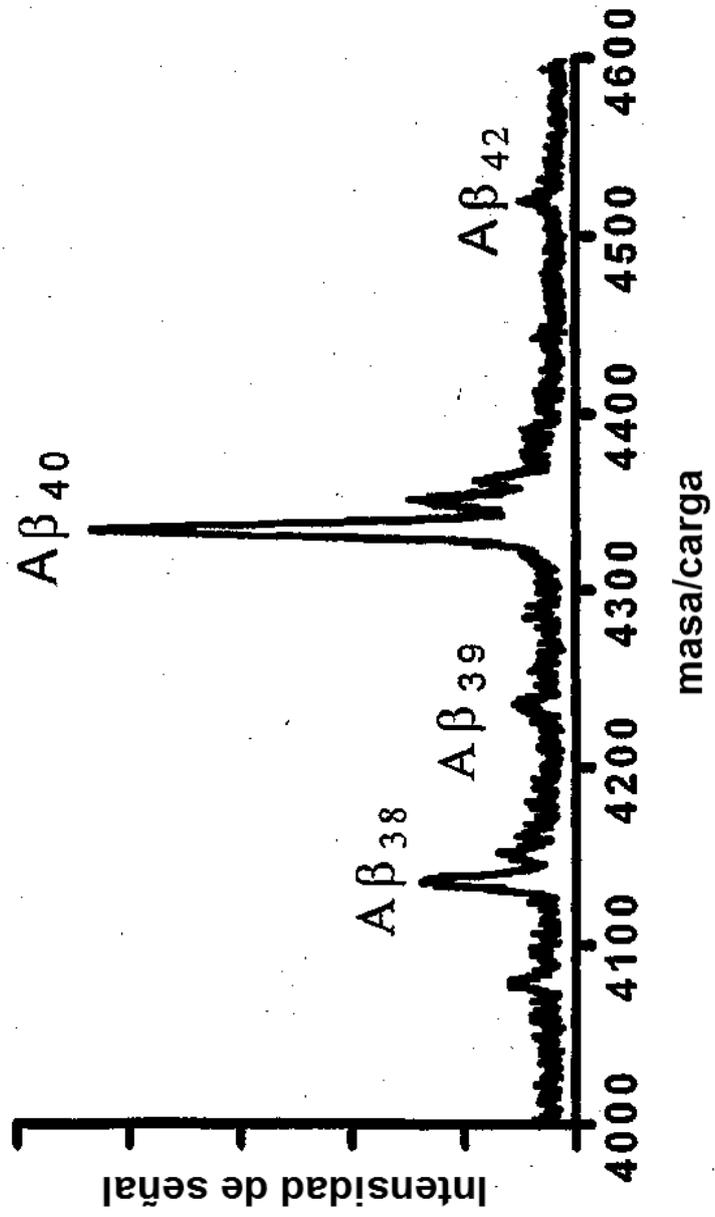


Figura 3A

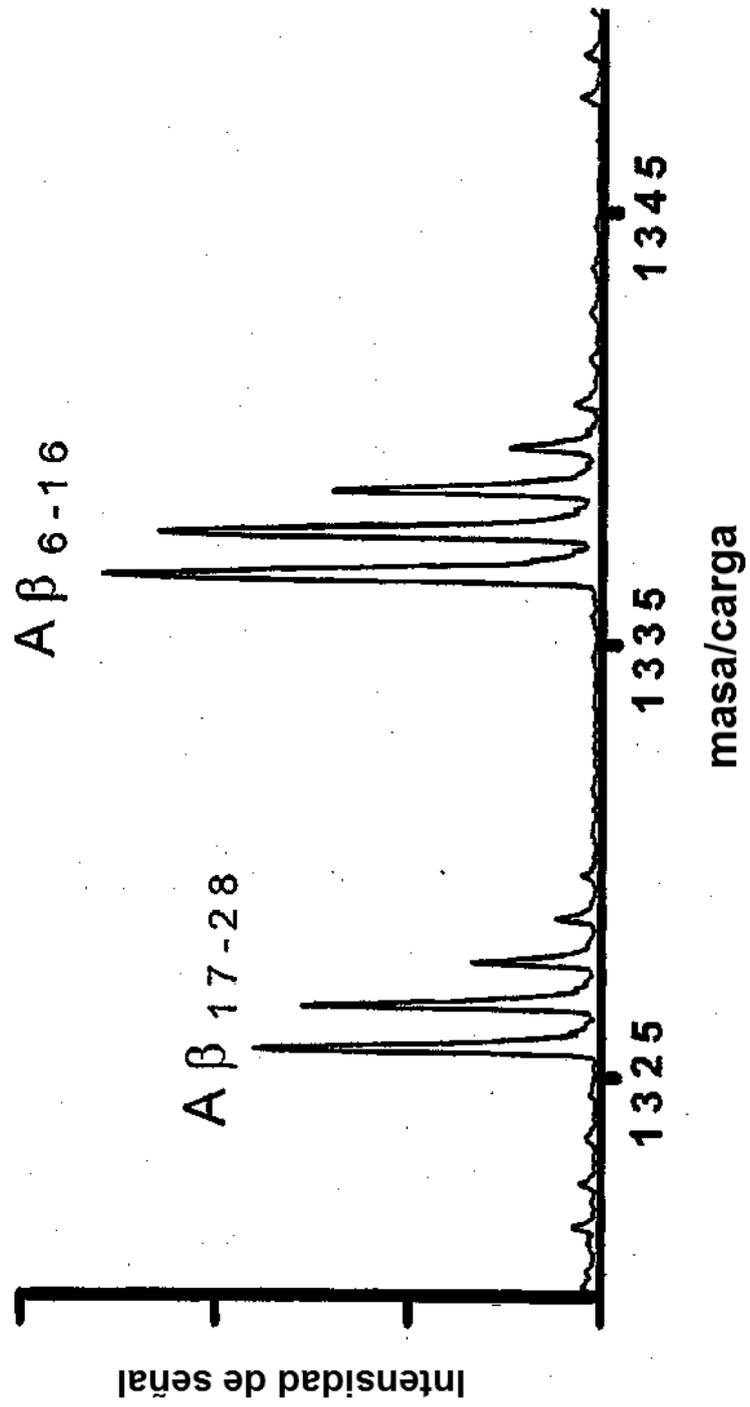


Figura 3B

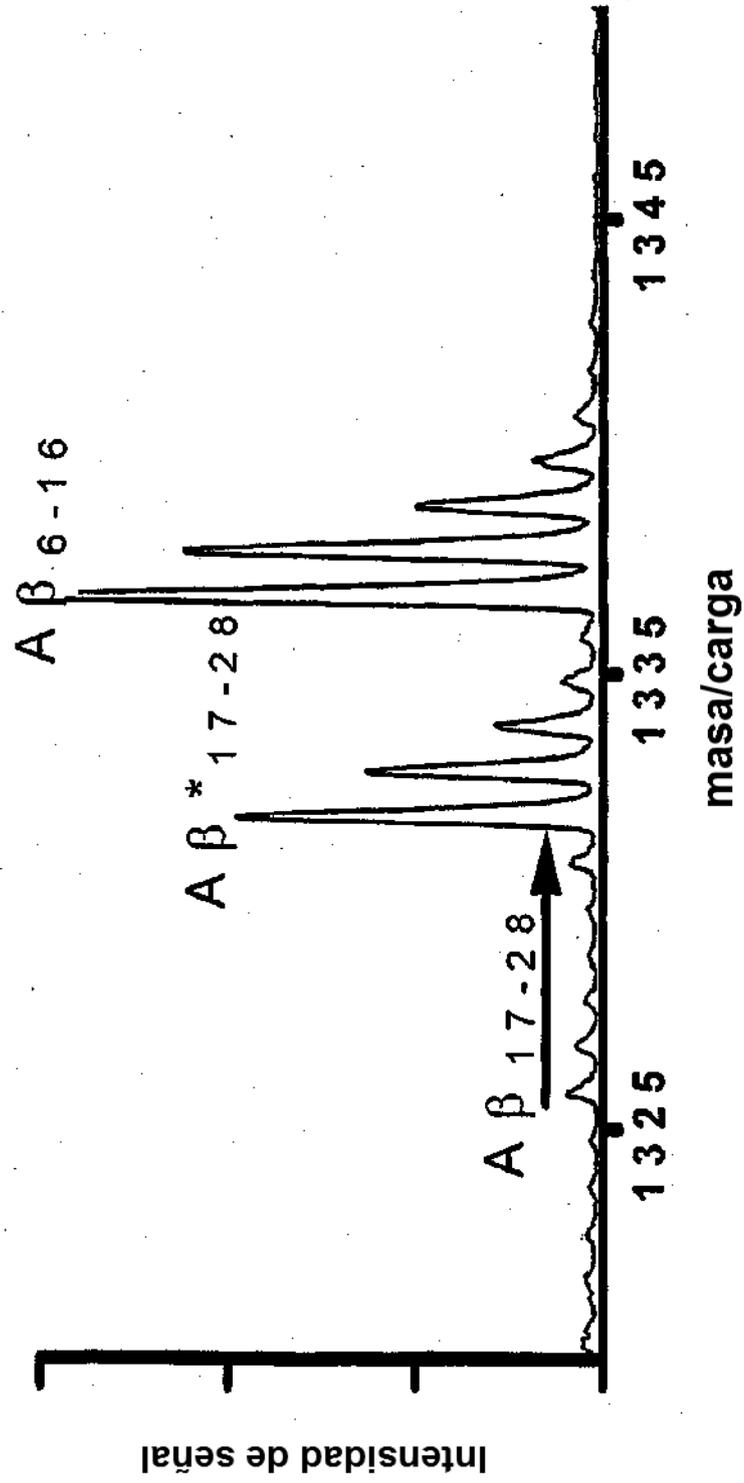
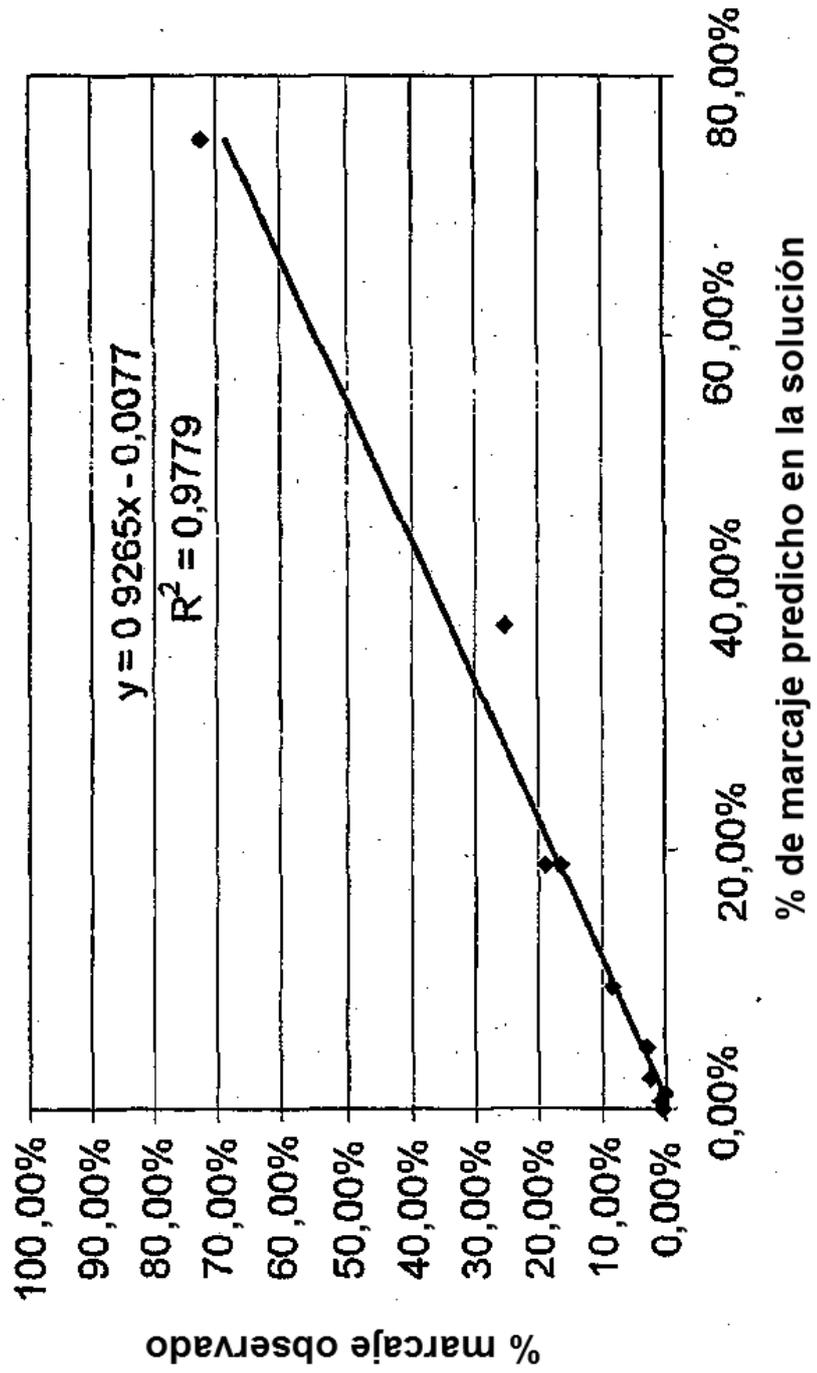


Figura 4

Gráfica de curva patrón de las series de iónicas de AB



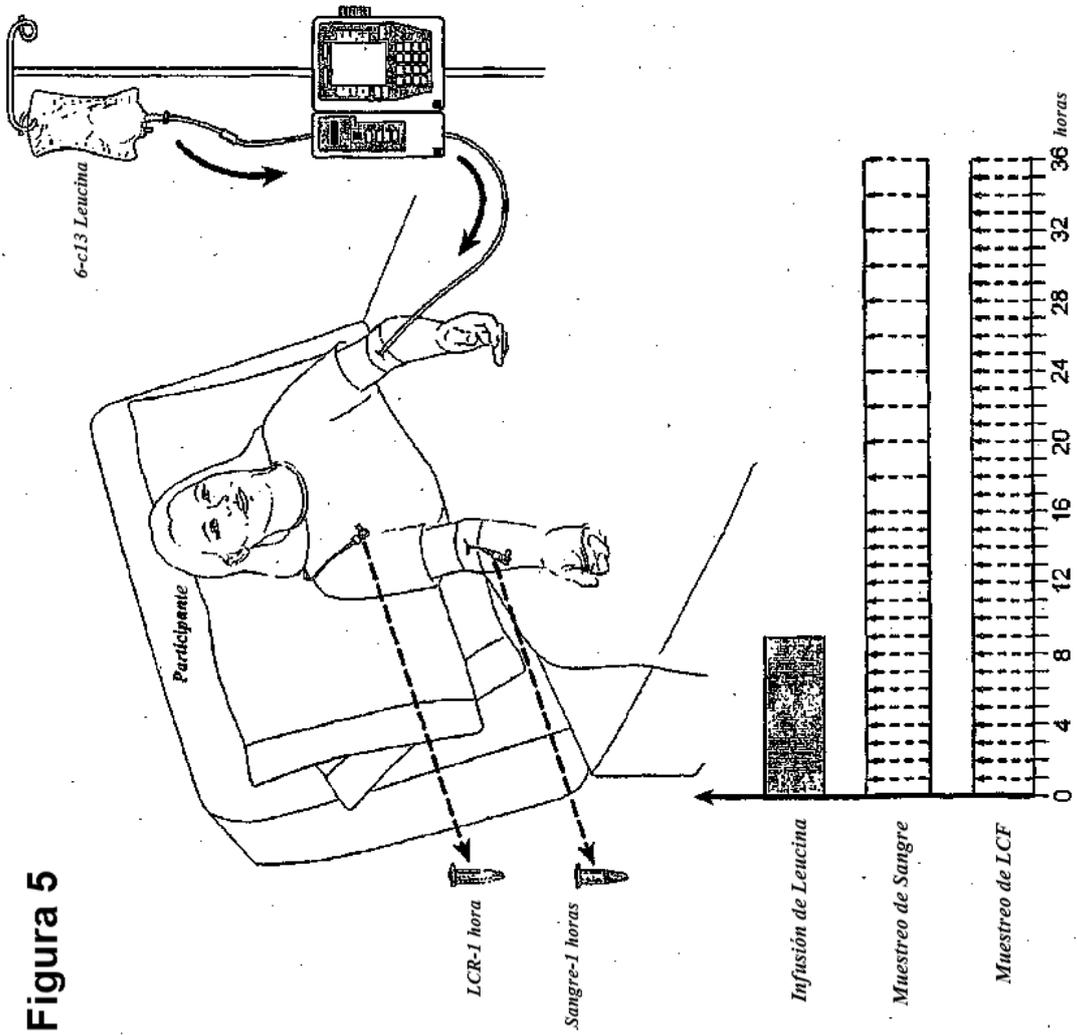


Figura 5

Figura 6A

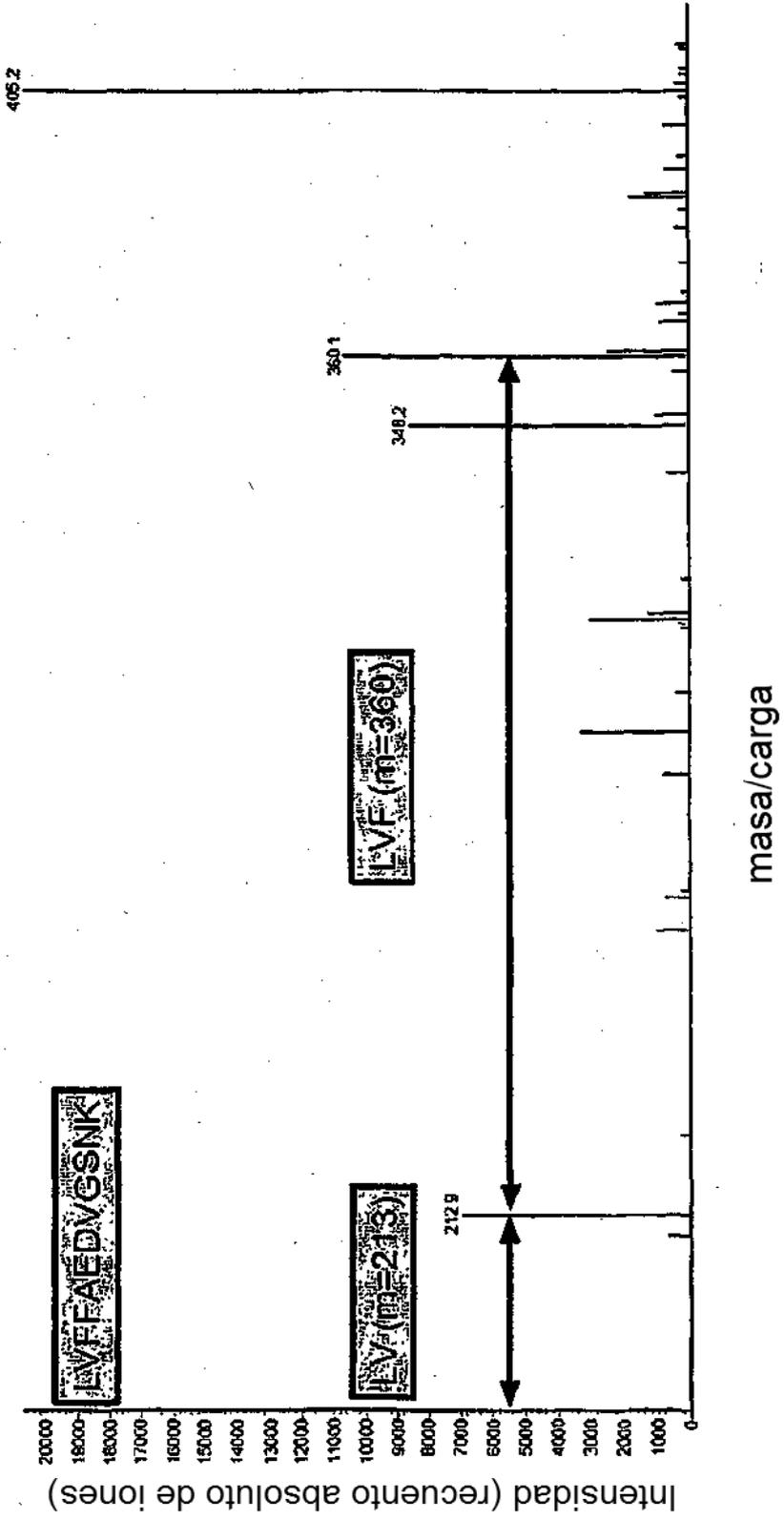


Figura 6B

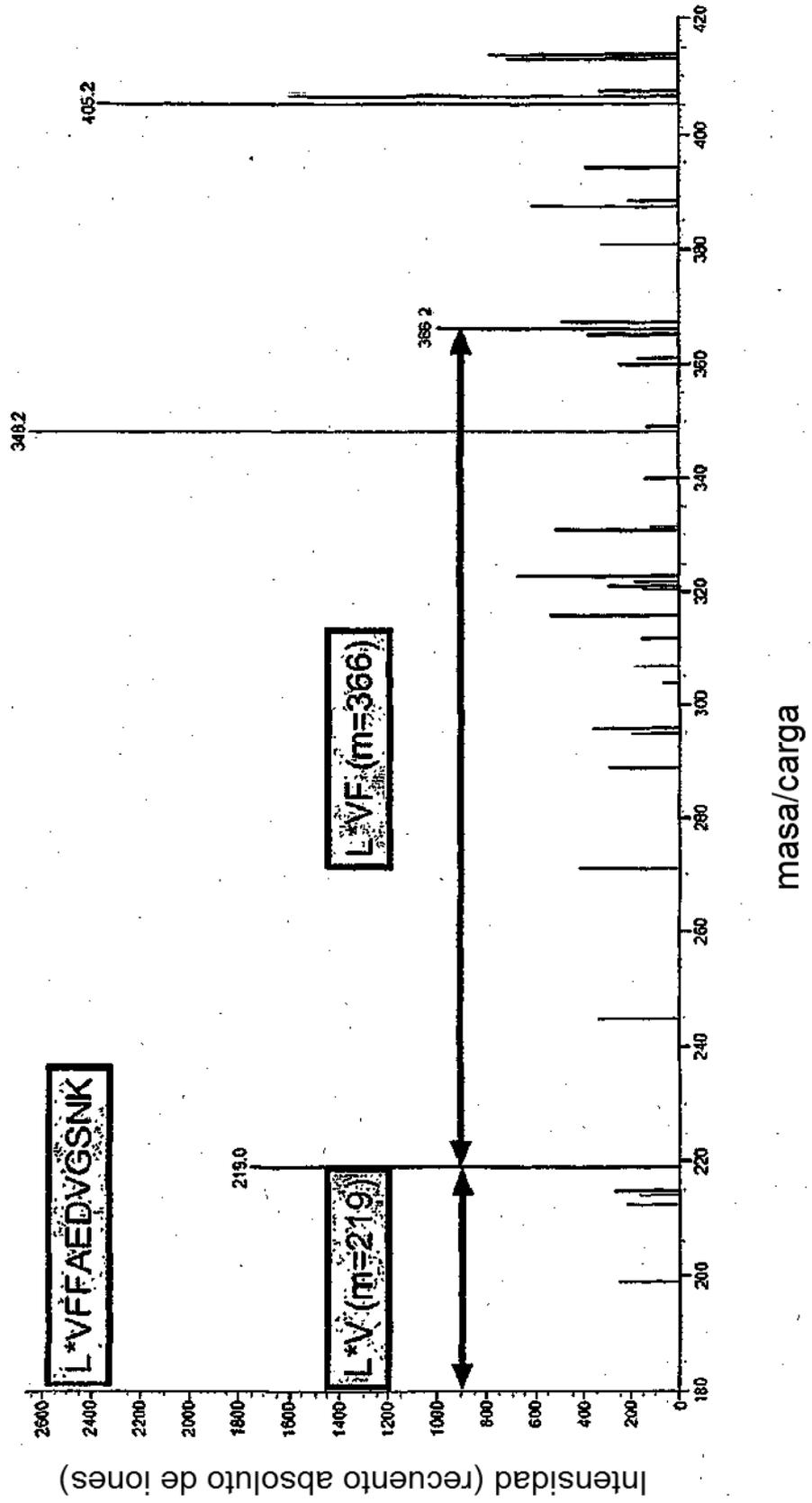


Figura 7

Curva patrón de porcentaje de beta-amiloide marcada en LCR humano

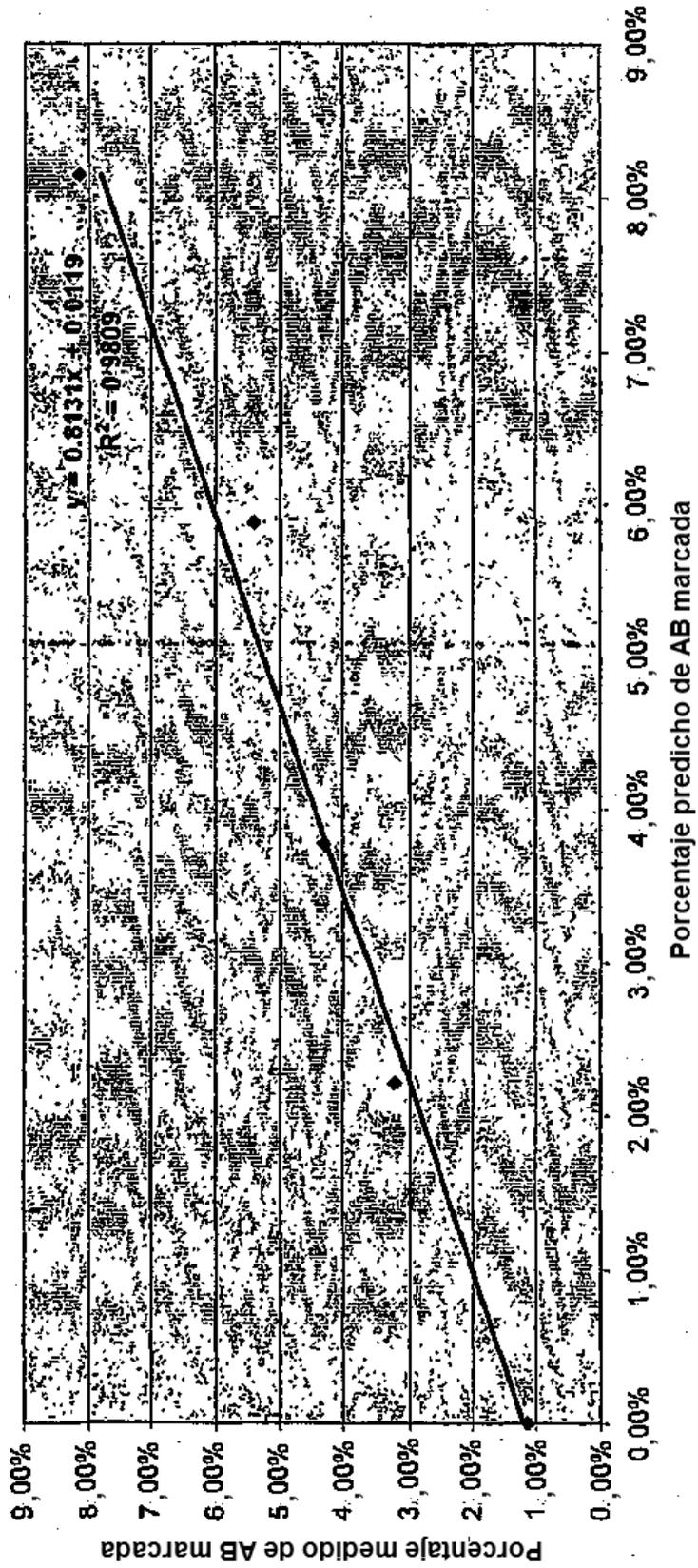
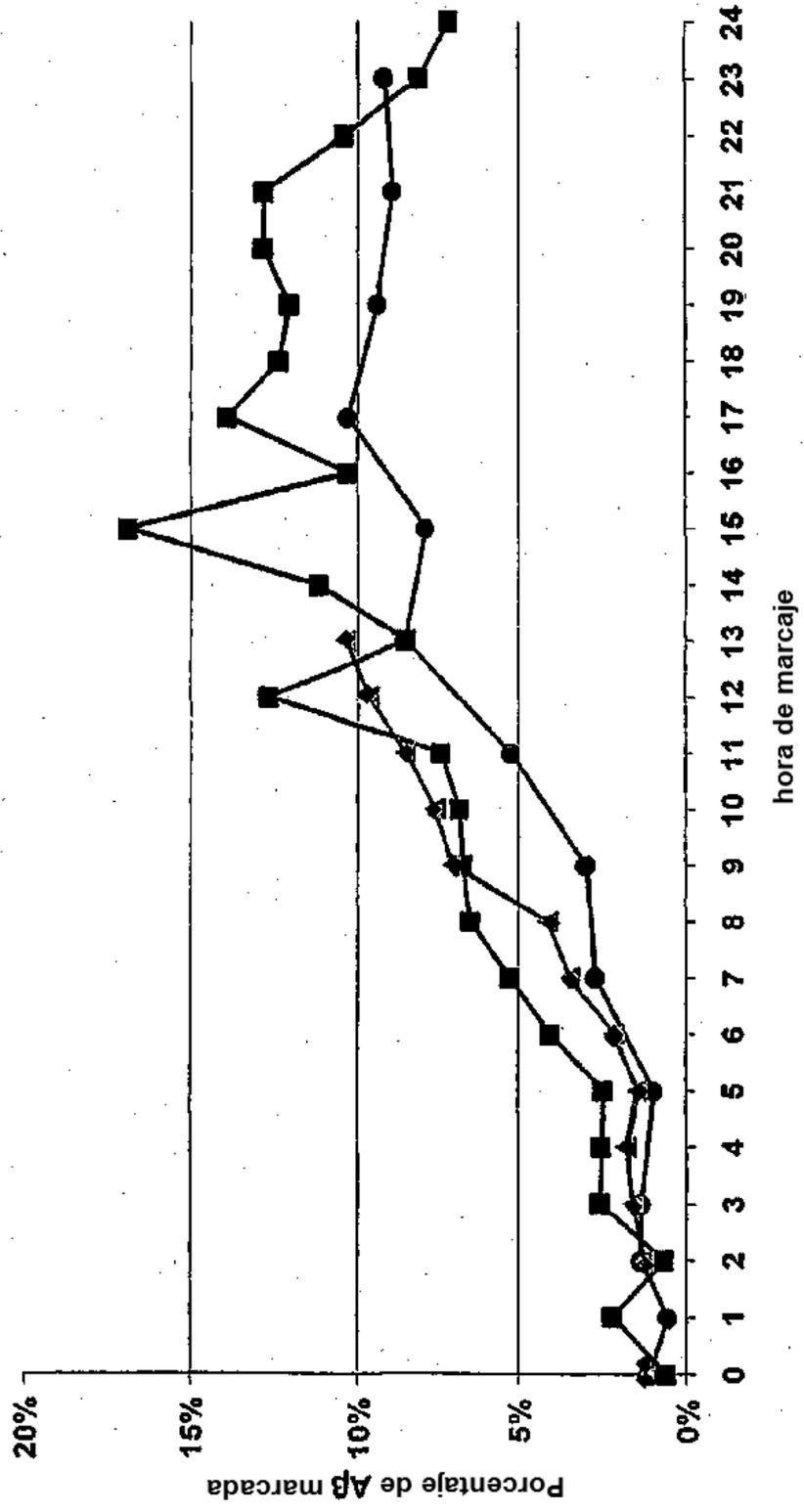


Figura 8

Tres curvas de metabolismo de $A\beta$ marcada en LCR humano



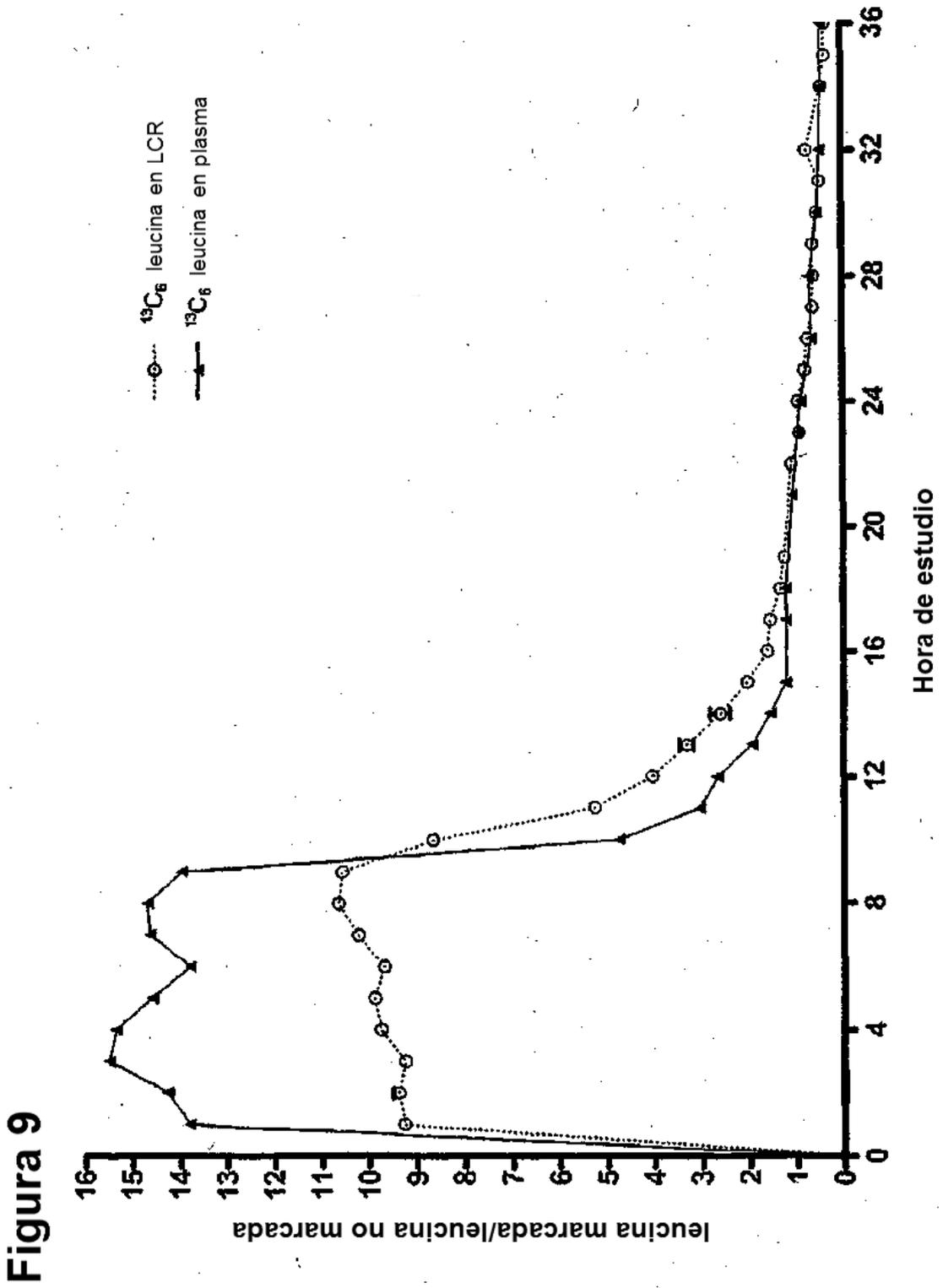


Figura 10

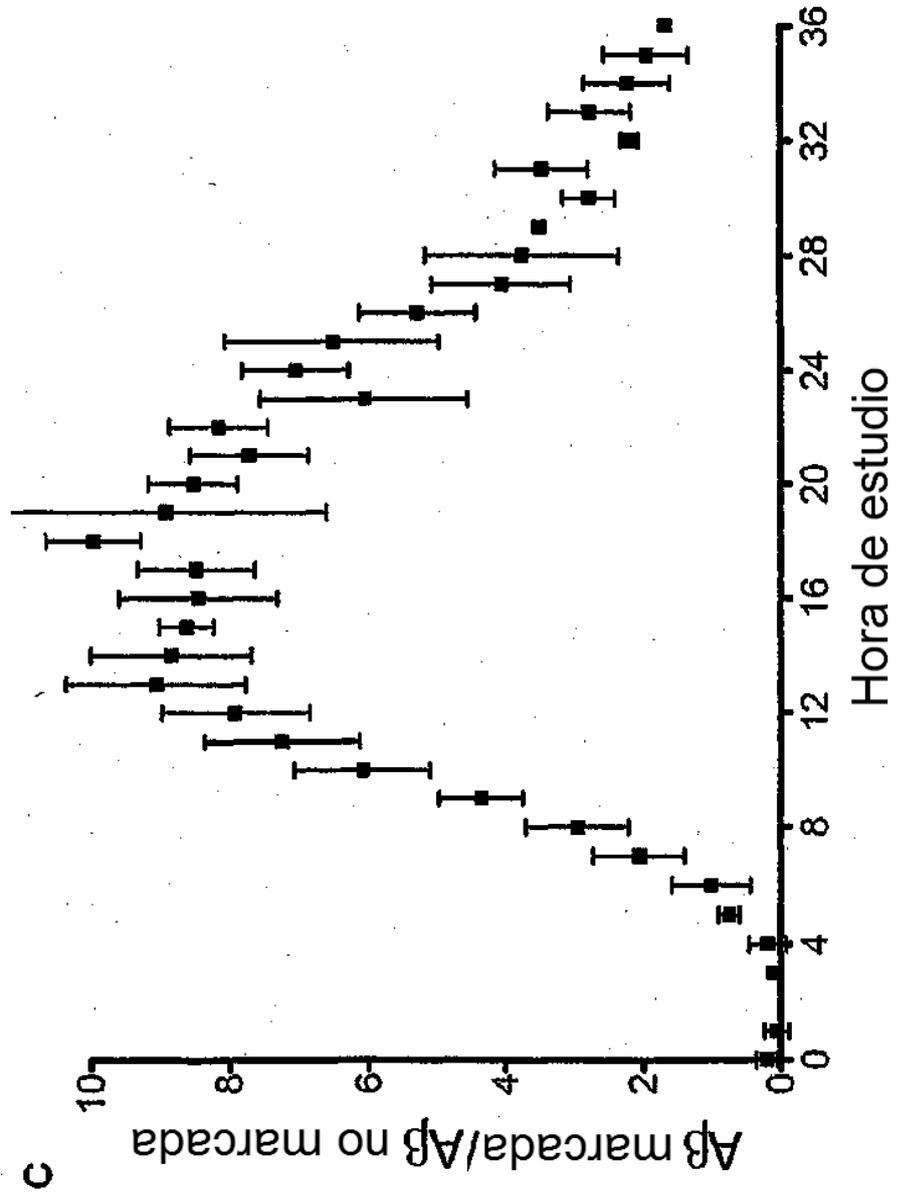


Figura 11A

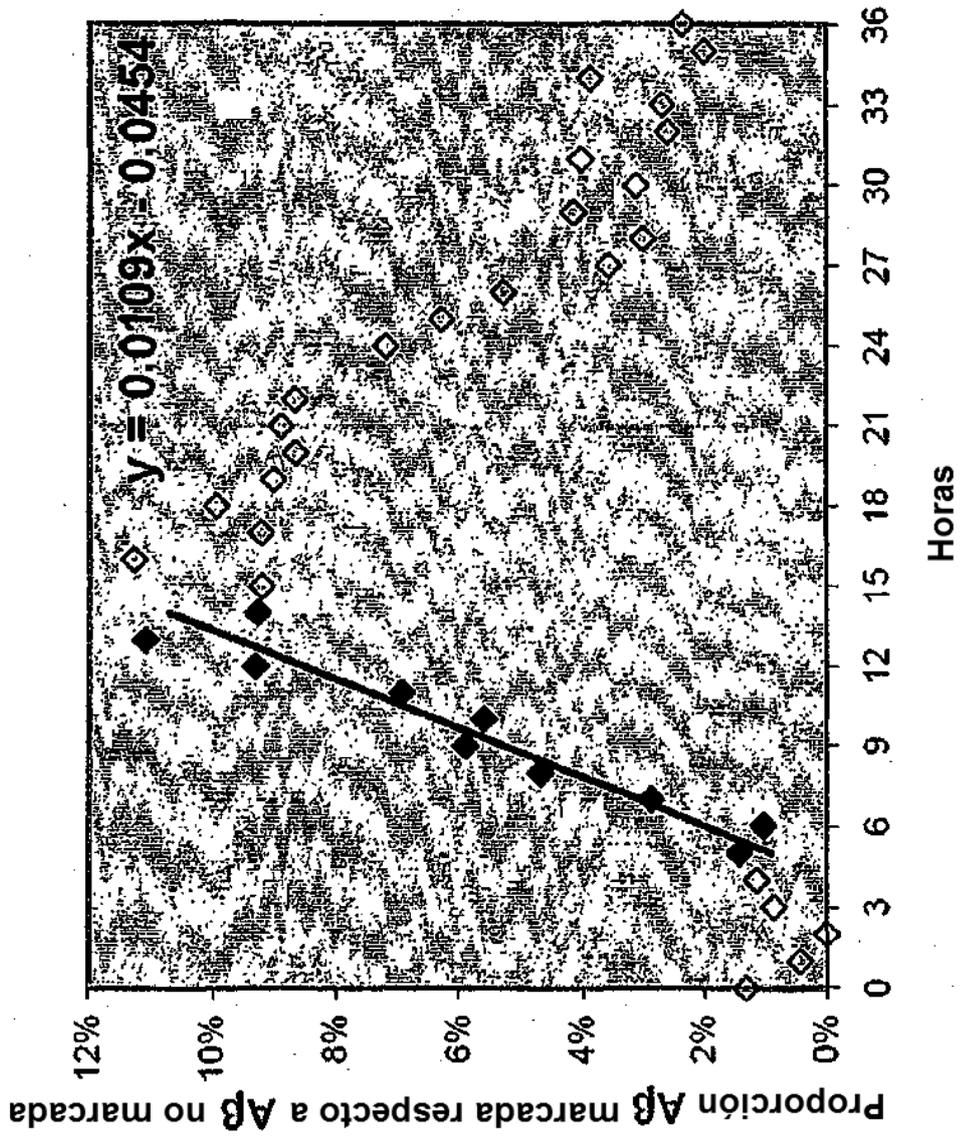


Figura 11B

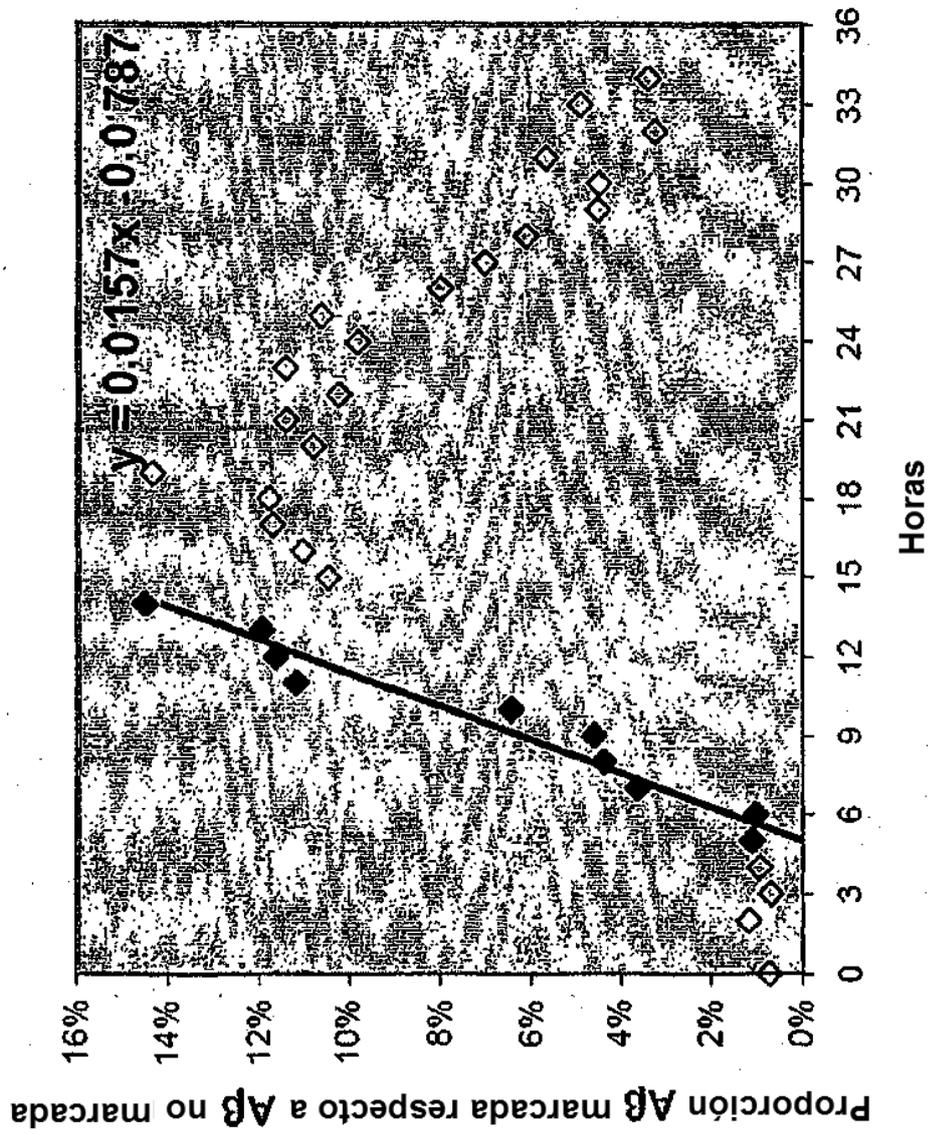


Figura 11C

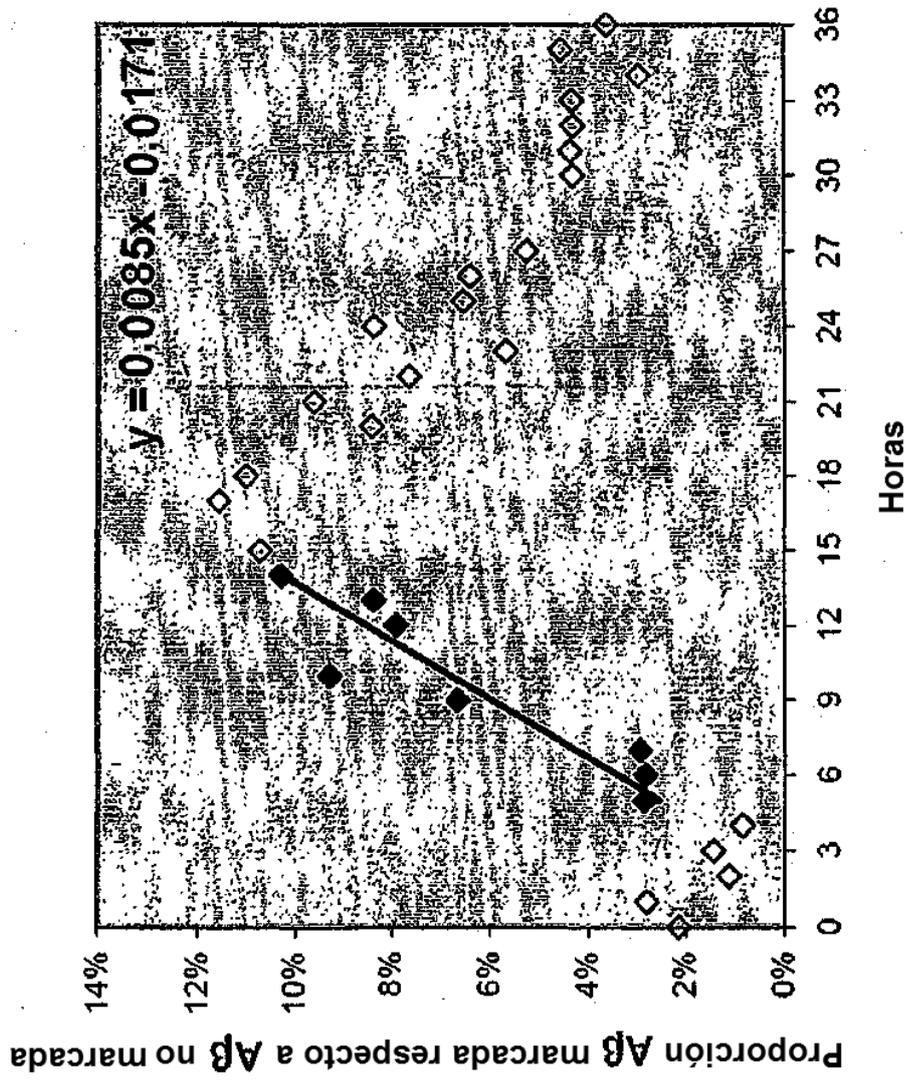


Figura 11D

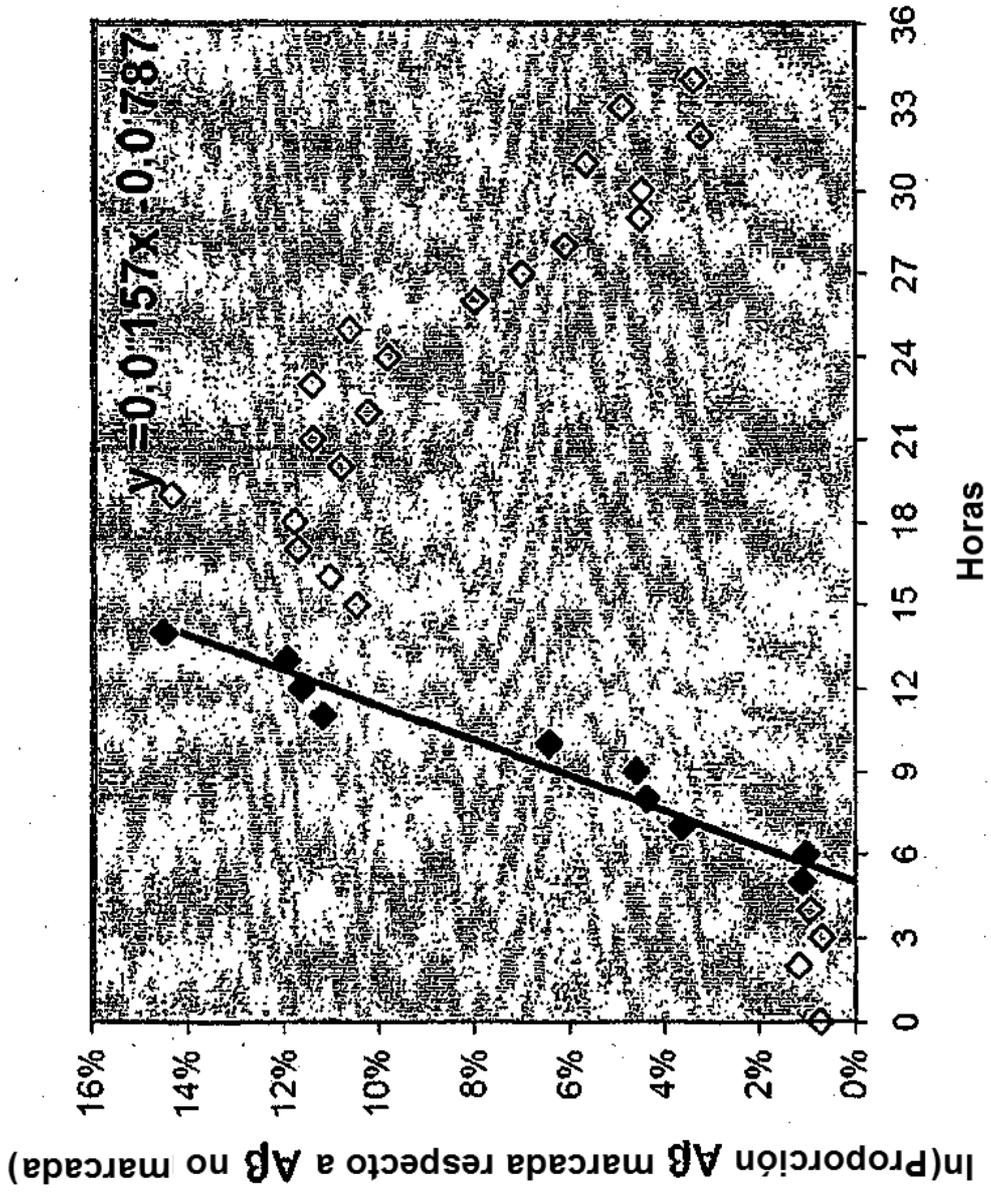


Figura 11E

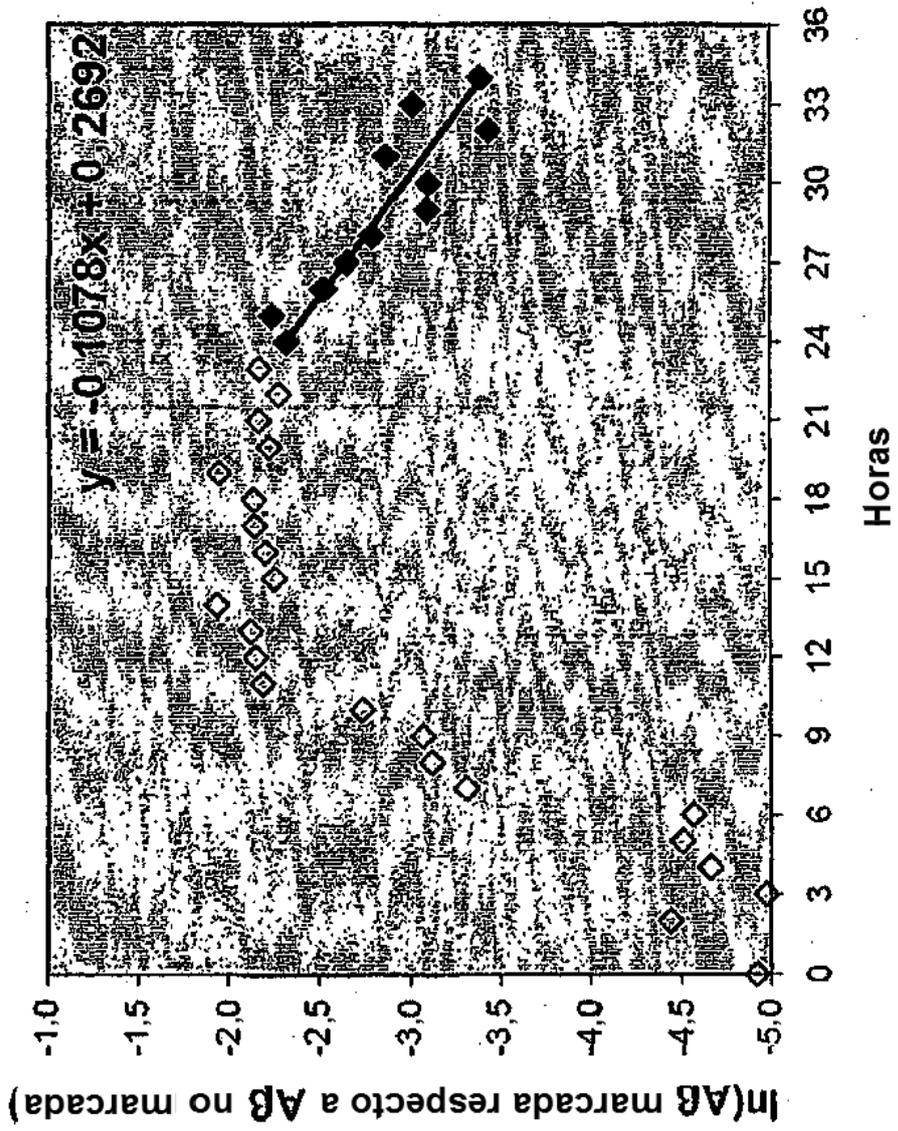


Figura 11F

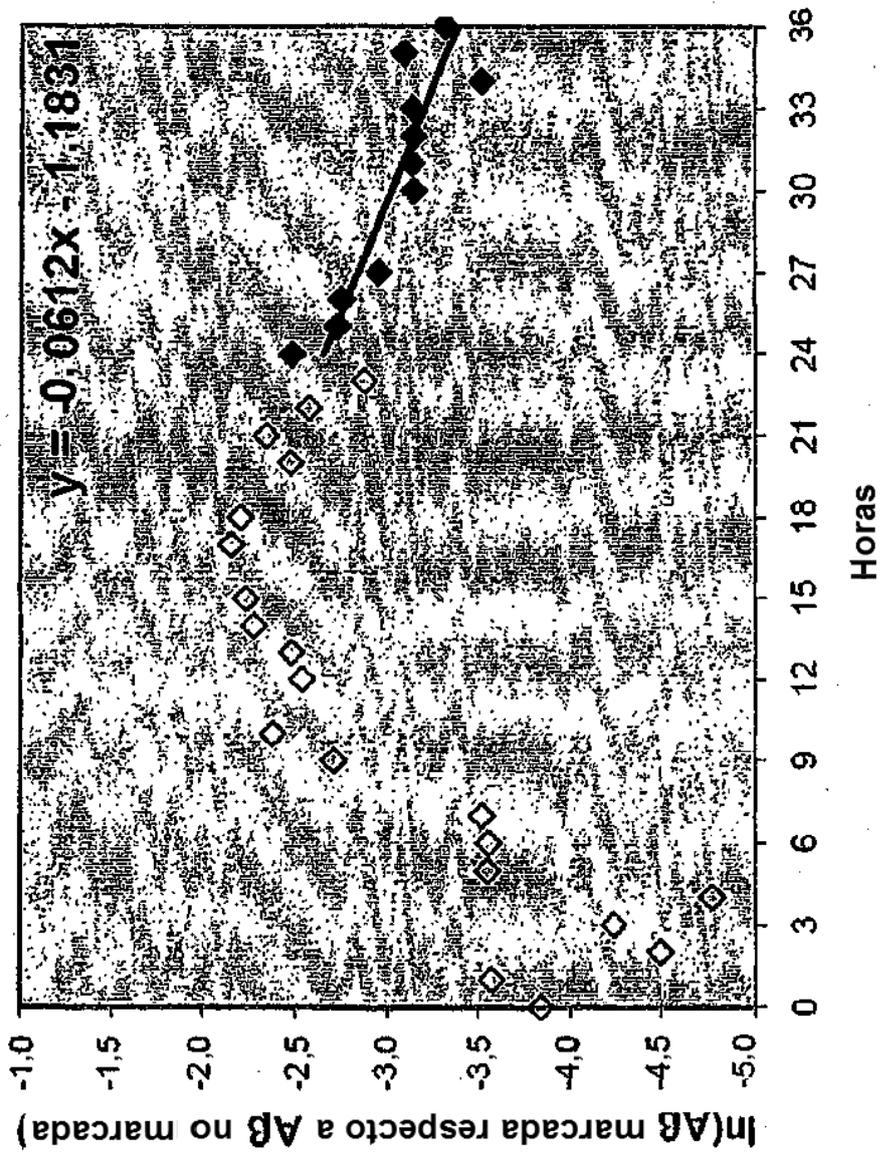
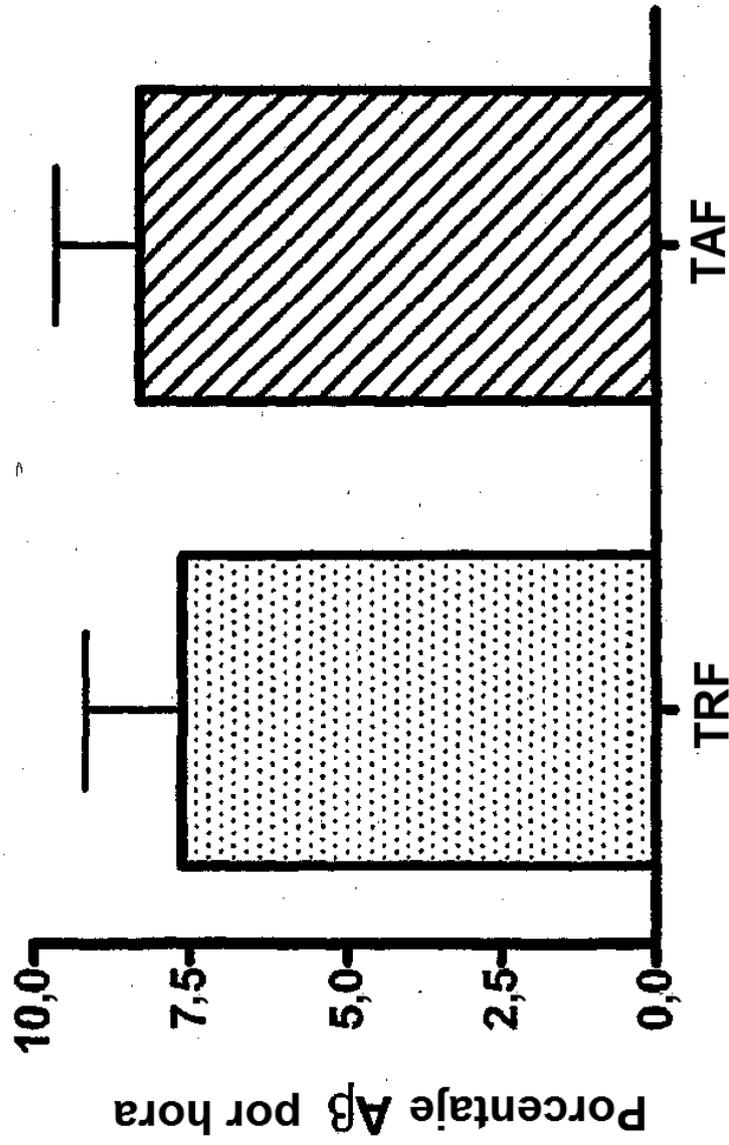


Figura 12



TRF=Tasa de síntesis fraccional 7,6 %/hora

TAF=Tasa de aclaramiento fraccional 8,3 %/hora

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- US 20030228259 A [0003]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • **HERBERT et al.** *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 2001, vol. 15 (4), 169-173 [0002]
- **PRICE et al.** *Archiv. Neurol.*, 2001, vol. 58 (9), 1395-1402 [0003]
- 20 • **SINGLETON et al.** *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 1994 [0032]
- *The Cambridge Dictionary of Science and Technology*. 1988 [0032]
- *The Glossary of Genetics*. Springer Verlag, 1991 [0032]
- 25 • **HALE ; MARHAM.** *The Harper Collins Dictionary of Biology*. 1991 [0032]
- **WANG et al.** *J Biol. Chem.*, 1996, vol. 271 (50), 31894-31902 [0034]
- **SMITH et al.** *J Neurochem*, 1987, vol. 49 (5), 1651-1658 [0036]
- 30 • **MURPHY et al.** *J Biol. Chem.*, 2000, vol. 275 (34), 26277-26284 [0040]
- **WILLIAMS.** *Neurology*, 2002, vol. 58, 1859-1860 [0043]
- **FISHMAN RA.** *Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system*. Saunders, 1992 [0051]
- **YARASHESKI et al.** *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2005, vol. 288, 278-284 [0053]
- **YARASHESKI et al.** *Am J Physiol.*, 1998, vol. 275, 577-583 [0053]
- **SMITH et al.** *J Neurochem.*, 1987, vol. 49 (5), 1651-1658 [0053]
- **GAMES et al.** *Nature*, 1995, vol. 373 (6514), 523-527 [0063]
- **HOLTZMAN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, 2892-2897 [0065]
- **DEMATOS et al.** *Neuron*, 2004, vol. 41 (2), 193-202 [0065]
- **TALBOT et al.** *Lancet*, 1994, vol. 343 (8910), 1432-1433 [0066]