

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 143**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10788121 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2507638**

54 Título: **Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

04.12.2009 GB 0921447

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

14.10.2014

73 Titular/es:

**RANDOX LABORATORIES LTD. (100.0%)
55 Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB**

72 Inventor/es:

**UMLAUF, ELLEN y
ZELLNER, MARIA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 507 143 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un método diagnóstico ex vivo en que se utiliza la cuantificación de biomarcadores periféricos de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que afecta a aproximadamente 24 millones de personas en todo el mundo. La enfermedad se caracteriza por una disfunción cognitiva y del comportamiento que resulta de una pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales del cerebro.

10 La enfermedad puede empezar muchos años antes de que sea finalmente diagnosticada. En las primeras fases, la pérdida de la memoria a corto plazo es el síntoma más común. Más adelante, los síntomas incluyen desorientación, ira, cambios del estado de ánimo, alteración del lenguaje, pérdida de la memoria a largo plazo, y el deterioro general de los sentidos y las funciones corporales.

15 La enfermedad de Alzheimer es el tipo más común de demencia en las personas mayores y afecta a casi la mitad de todos los pacientes con demencia. En consecuencia, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para la enfermedad. Entre las personas con 65 años de edad, el 2-3% muestra signos de la enfermedad, mientras que el 25-50% de las personas con 85 años de edad presenta síntomas de enfermedad de Alzheimer y un número aún mayor presenta algunos de los rasgos patológicos de la enfermedad sin los síntomas característicos. La Organización Mundial de la Salud estima que, globalmente, los años de vida potencialmente perdidos por discapacidad (DALY; del inglés, disability adjusted life years) totales excedieron de 11 millones en 2005 para la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, con un previsto aumento anual del 3,4%. En la actualidad no hay una cura conocida para la enfermedad de Alzheimer, y los tratamientos disponibles ofrecen beneficios sintomáticos relativamente pequeños y son de naturaleza paliativa.

25 La depresión es un síntoma precoz común en la enfermedad de Alzheimer y se cree que se atribuye, entre otros factores, a una suprarregulación de la enzima monoamino oxidasa (MAO). Hay dos isoformas de esta enzima, MAO-A y MAO-B. Ambas se encuentran por todas las células del sistema nervioso central (CNS; del inglés, central nervous system), donde actúan para inactivar neurotransmisores monoaminérgicos que incluyen la fenetilamina y la dopamina. La MAO-B es también abundante en plaquetas sanguíneas.

30 El inicio y la progresión de la enfermedad de Alzheimer se asocian con el desarrollo de placas de amiloide y ovillos neurofibrilares. Las placas de amiloide (también conocidas como "placas seniles") comprenden densos depósitos insolubles de beta-amiloide, una proteína derivada de la proteína precursora amiloidea (APP; del inglés, amyloid precursor protein), una proteína transmembranal.

35 Después de la proteólisis de la APP, las proteínas beta-amiloideas se agregan extracelularmente formando placas. Los ovillos neurofibrilares se forman a causa de la hiperfosforilación de tau, una proteína asociada a los microtúbulos que es abundante en el CNS. Múltiples moléculas de tau hiperfosforiladas llegan a enredarse y formar masas en el interior de los cuerpos celulares nerviosos. Dichos ovillos neurofibrilares causan que los microtúbulos se desintegren, lo que da lugar al colapso del sistema de transporte neuronal.

40 Normalmente, la enfermedad de Alzheimer se diagnostica clínicamente a partir de la historia del paciente, las observaciones de parientes y las observaciones clínicas. Sin embargo, la presencia de rasgos neurológicos y neuropsicológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer, tales como las placas de amiloide y los ovillos neurofibrilares, sólo puede ser frecuentemente determinada post mórtem.

45 La mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer no presentan herencia familiar; sin embargo, en al menos el 80% de los casos esporádicos de Alzheimer están implicados factores de riesgo genéticos. La herencia del alelo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (ApoE) se considera un factor de riesgo para el desarrollo en hasta el 50% de los casos esporádicos de Alzheimer de inicio tardío.

50 La glutatión S-transferasa omega-1 (GSTO-1) es un miembro de la familia de enzimas de tipo glutatión S-transferasa que catalizan la conjugación de glutatión reducido (GSH) con diversos sustratos hidrófobos que contienen centros electrófilos. Se sabe que el gen que codifica GSTO-1 existe en diferentes isoformas genéticas. Estas isoformas se correlacionan con la edad de inicio (AAO; del inglés, age-at-onset) de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson [Y. Li et al., Hum. Mol. Genet. (2003) 12 (24): 3259-67]. Li y sus colaboradores describieron que la GSTO-1h SNP 7-1 (rs4825, nucleótido A) está asociada con un retraso en la AAO de 6,8 años (+/- 4,41) para la enfermedad de Alzheimer y de 8,6 años (+/- 5,71) para la enfermedad de Parkinson [Y. Li et al., Neurobiol. Aging

(2006) 27 (8): 1087-93].

Babeluk et al. (Clinical Chemistry, página A223, volumen 55, nº 6, Suplemento, 2009) comunicaron que pacientes con enfermedad de Alzheimer que carecían del alelo ApoE4 mostraban una prevalencia significativa del alelo GSTO-1 de tipo silvestre en comparación con los portadores de ApoE4.

- 5 Los marcadores diagnósticos para trastornos neurológicos son especialmente importantes en el diagnóstico al principio del curso de la enfermedad, cuando los compuestos terapéuticos presentan el máximo efecto posible. Sin embargo, es difícil un diagnóstico preciso. Se dispone de pocos marcadores diagnósticos para trastornos neuronales en fase precoz, y aquellos que están disponibles se basan en el análisis de un material de muestra (por ejemplo, fluido cerebroespinal) cuya obtención es difícil y dolorosa.
- 10 En el Documento WO2006/134390 se describe un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (AD; del inglés, Alzheimer's disease) y/o la enfermedad de Parkinson (PD; del inglés, Parkinson's disease), que comprende medir el nivel de expresión de uno o más marcadores de AD o marcadores de PD especificados en una muestra de plaquetas aislada de una persona de la que se sospecha que tiene AD o PD y determinar si los niveles de expresión están alterados en comparación con los de un testigo.
- 15 Por lo tanto, existe la necesidad de identificar nuevos métodos diagnósticos en que se utilicen biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer que sean periféricamente asequibles de muestras fácilmente obtenibles de un paciente, lo que facilitaría un diagnóstico sencillo y preciso.

Sumario de la invención

20 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un método *ex vivo* para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende:

(i) determinar el nivel de expresión combinado de al menos cuatro proteínas plaquetarias en una muestra de plaquetas del paciente, seleccionadas de entre la monoamino oxidasa B, el factor XIIIa de coagulación, la tropomiosina total (α y β), la proteína 1 con repeticiones WD, y la apolipoproteína E4 (ApoE4); y

(ii) comparar el valor resultante de la operación (i) con un valor testigo,

25 en donde un resultado mayor que el valor testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer, caracterizado por que la operación (i) comprende además determinar el nivel de expresión de la glutatión S-transferasa omega-1 (GSTO-1) mutante o de tipo silvestre, en donde si el paciente tiene uno o dos alelos ApoE4 se determina entonces el nivel de expresión de la GSTO-1 mutante y si el paciente no tiene alelos ApoE4 se determina entonces el nivel de expresión de la GSTO-1 de tipo silvestre.

30 Descripción de los dibujos

En la Figura 1 se ilustra el proceso de decisión para el uso de los respectivos algoritmos de los Modelos 1, 2, 3 y 4.

En las Figuras 2a y 2b se muestran la curva ROC y el gráfico de dispersión, respectivamente, del conjunto de descubrimiento al usar el Modelo 1. En las Figuras 2c y 2d se muestran la curva ROC y el gráfico de dispersión, respectivamente, del conjunto de validación al utilizar el Modelo 1.

35 En las Figuras 3a y 3b se muestran la curva ROC y el gráfico de dispersión, respectivamente, del conjunto de descubrimiento al usar el Modelo 2. En las Figuras 3c y 3d se muestran la curva ROC y el gráfico de dispersión, respectivamente, del conjunto de validación al utilizar el Modelo 2.

En las Figuras 4a y 4b se muestran la curva ROC y el gráfico de dispersión, respectivamente, del conjunto de descubrimiento al usar el Modelo 3. En las Figuras 4c y 4d se muestran la curva ROC y el gráfico de dispersión, respectivamente, del conjunto de validación al utilizar el Modelo 3.

40 En la Figura 5 se muestra la curva ROC para el Modelo 4.

La Figura 6 es una transferencia Western 1D que muestra la idoneidad de 14-3-3 gamma como un patrón de extracción interno.

45 La Figura 7 es una comparación de la expresión aumentada de MAO-B, analizada sólo después de la determinación de proteína ($P < 0,01$) y después de la normalización con la proteína de extracción interna 14-3-3 gamma ($P < 0,00000007$).

La Figura 8 es una transferencia Western representativa para la aplicación de ERK2 como un patrón de extracción interno.

En la Figura 9 se muestra tres transferencias Western 2D de isoformas de GSTO-1.

En la Figura 10 se muestra un gráfico de dispersión para muestras de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson al usar el Modelo 1.

5 En la Figura 11 se muestra un gráfico de dispersión para muestras de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson al usar el Modelo 2.

En la Figura 12 se muestra un gráfico de dispersión para muestras de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson al usar el Modelo 3.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se basa en la sorprendente comprensión de que la expresión de las proteínas plaquetarias monoamino oxidasa B, factor XIIIa de coagulación, la tropomiosina total (tropomiosina α y tropomiosina β), proteína 1 con repeticiones WD, y apolipoproteína E4 (ApoE4) está significativamente alterada en pacientes con enfermedad de Alzheimer en comparación con testigos sanos de edad y sexo correspondientes. Por lo tanto, estas proteínas plaquetarias actúan como biomarcadores de la enfermedad. Además, se ha hallado que la glutatión S-transferasa omega-1 de tipo silvestre (wtGSTO-1; del inglés, wild-type GSTO-1) (alanina en la posición 140) está sobrerrepresentada en pacientes con enfermedad de Alzheimer que no portan ningún alelo ApoE4, mientras que la wtGSTO-1 está infrarrepresentada en pacientes con enfermedad de Alzheimer que son positivos para ApoE4.

15 La presente invención proporciona un método *ex vivo* para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende determinar el nivel de expresión de al menos cuatro proteínas plaquetarias en una muestra de plaquetas del paciente, seleccionadas de entre monoamino oxidasa B, factor XIIIa de coagulación, tropomiosina total (α y β), proteína 1 con repeticiones WD, y ApoE4, junto con GSTO-1 mutante o de tipo silvestre, y comparar el nivel de expresión combinado (medido como abundancia normalizada) con el valor testigo, en donde un resultado que sea mayor que el valor testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, unos resultados mayores que el valor testigo pueden ser utilizados para diagnosticar positivamente la enfermedad de Alzheimer.

20 El método de la invención puede ser utilizado para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, junto con otros métodos tales como la consulta del médico y la calificación mediante un minixamen del estado mental (MMSE; del inglés, mini-mental state examination).

25 Como se emplea en esta memoria, el término "paciente" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano, del que se sospecha que tiene la enfermedad de Alzheimer o una persona de la que se piensa que tiene predisposición a la enfermedad.

30 Preferiblemente, el material demuestra se aísla de un lisado de plaquetas sanguíneas obtenido, por ejemplo, usando técnicas de flebotomía estándares.

El término "isoforma" se define en esta memoria como una proteína con una función equivalente a la de otra proteína y con una secuencia similar o idéntica, pero que es codificada por un gen diferente.

35 Como se emplea en esta memoria, la expresión "producto génico" se refiere al mRNA o producto proteico que resulta de la transcripción del gen.

40 Como se emplea en esta memoria, la frase "nivel de expresión" se refiere a la cantidad de la proteína especificada (o del mRNA que codifica la proteína) en las plaquetas de la muestra. Las técnicas para determinar el nivel de expresión proteica resultarán evidentes a la persona experta e incluyen el uso de la tecnología de biochips matriciales y la diferencia bidimensional en electroforesis en gel (2D DIGE; del inglés, 2-dimensional difference in gel electrophoresis).

Preferiblemente, el nivel de expresión de proteínas plaquetarias específicas se cuantifica en términos de "abundancia normalizada", que proporciona un valor numérico que tiene en cuenta la variación natural de la concentración de proteínas plaquetarias. El valor de abundancia normalizada permite la comparación con un valor testigo conocido.

45 La expresión "biomarcador periférico" se define como una proteína que está periféricamente presente en las plaquetas sanguíneas, en donde alteraciones de la expresión periférica de la proteína reflejan cambios patológicamente significativos en el CNS, en donde tales cambios se refieren a la patología de la enfermedad de Alzheimer.

50 Como se emplea en esta memoria, el término "GSTO-1" se refiere a la proteína identificada como EC 2.5.1.18, que tiene el número de acceso primario P78417 en la base de datos UniProtKB/SwissProt (versión secuencial 2), o a variantes o isoformas de la misma.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "monoamino oxidasa" o "MAO" se refiere a la proteína identificada como EC 1.4.3.4, que es una enzima que cataliza la oxidación de monoaminas. En los seres humanos hay dos formas de MAO, MAO-A, que tiene el número de acceso primario P21397 en UniProtKB/SwissProt, y MAO-B, que tiene el número de acceso primario P27338 en UniProtKB/SwissProt. Ambas están presentes en las neuronas y la astrogliá. La MAO-A también está presente en el hígado, el tracto gastrointestinal y la placenta, mientras que la MAO-B se halla en las plaquetas sanguíneas.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "factor XIIIa de coagulación" se refiere a la proteína que tiene el número de acceso primario P00488 en UniProtKB/SwissProt y es codificada en seres humanos por el gen F13A1. El factor XIIIa de coagulación es la subunidad catalíticamente activa del factor XIII de coagulación y actúa en la cascada de la coagulación sanguínea para estabilizar los coágulos de fibrina.

La tropomiosina es una proteína ligante de actina que regula el mecanismo de la actina. Dos cadenas de tropomiosina se ensamblan en dímeros con hélices superenrolladas en paralelo y en exacta correspondencia. La tropomiosina alfa es codificada por el gen TPM1 en seres humanos y tiene el número de acceso primario P09493 en UniProtKB/SwissProt. La tropomiosina beta es codificada por el gen TPM2 en seres humanos y tiene el número de acceso primario P07951 en UniProtKB/SwissProt. Para la finalidad del método de la presente invención, las abundancias estándares de α -tropomiosina y β -tropomiosina se combinan para obtener un valor de "tropomiosina total" que luego se utiliza en el ensayo.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "proteína 1 con repeticiones WD" se refiere a la proteína que tiene el número de acceso primario O75083 en UniProtKB/SwissProt. La proteína 1 con repeticiones WD (también conocida como proteína 1 que interacciona con actina) es una proteína muy conservada en eucariontes que actúa para inducir el desensamblaje de los filamentos de actina junto con proteínas de la familia de ADF/cofilina.

El término "ApoE" es una abreviación de apolipoproteína E. Hay tres isoformas principales de ApoE, conocidas como ApoE2, E3 y E4, codificadas por los alelos ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4, respectivamente. La ApoE3 es la isoforma más común. Se sabe que la ApoE4 está asociada con la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, representando dos copias del alelo ϵ 4 un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que una o ninguna copia del alelo. Por lo tanto, los pacientes de Alzheimer pueden ser categorizados como pacientes ApoE4 y no ApoE4.

Como se detalla en la Tabla 1, la distribución de genotipos GSTO-1 depende de los genotipos ApoE3 y ApoE4 y está significativamente alterada en pacientes con enfermedad de Alzheimer y de Parkinson no ApoE4. Se ha hallado que la distribución normal de GSTO-1 de tipo silvestre (WT) en la población general es aproximadamente 40%, mientras que el 73% de los pacientes con enfermedad de Alzheimer no ApoE4 y el 71% de los pacientes con enfermedad de Parkinson no ApoE4 tienen GSTO-1 WT. Por lo tanto, se puede determinar el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer usando un análisis del fenotipo o genotipo ApoE4 en combinación con un análisis del fenotipo o genotipo GSTO-1.

Tabla 1

Enfermedad de Alzheimer	Enfermedad de Parkinson	Testigos de edad	Testigos jóvenes
ApoE3	ApoE3	ApoE3	ApoE3
73% de GST (wt)	71% de GST (wt)	34% de GST (wt)	36% de GST (wt)
ApoE4	ApoE4	ApoE4	ApoE4
38% de GST (wt)	0% de GST (wt)	43% de GST (wt)	0% de GST (wt)

Por lo tanto, la GSTO-1 de tipo silvestre es un biomarcador periférico útil de la enfermedad de Alzheimer en pacientes no ApoE4 y, como se muestra en la Tabla 1, permite la discriminación entre la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Los presentes inventores han hallado que el uso de una combinación de al menos cuatro biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer proporciona un diagnóstico más preciso que los ensayos con un solo biomarcador. En consecuencia, la presente invención proporciona un método *ex vivo* para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, que comprende las operaciones de:

(i) determinar el nivel de expresión combinado de al menos cuatro proteínas plaquetarias en una muestra de plaquetas del paciente, seleccionadas de entre la monoamino oxidasa B, el factor XIIIa de coagulación, la

tropomiosina total (α y β), la proteína 1 con repeticiones WD, y la apolipoproteína E4 (ApoE4); y (ii) comparar el valor resultante de la operación (i) con un valor testigo,

en donde un resultado mayor que el valor testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer,

5 caracterizado por que la operación (i) comprende además determinar el nivel de expresión de la glutatión S-transferasa omega-1 (GSTO-1) mutante o de tipo silvestre,

en donde si el paciente tiene uno o dos alelos ApoE4 se determina entonces el nivel de expresión de la GSTO-1 mutante

10 y si el paciente no tiene alelos ApoE4 se determina entonces el nivel de expresión de la GSTO-1 de tipo silvestre. El nivel de expresión de cada una de las proteínas plaquetarias puede ser determinado con un ensayo de proteínas que permite determinar con precisión el nivel de proteína.

15 En una realización preferida, el nivel de expresión de cada una de las proteínas plaquetarias se determina usando un biochip matricial. Se pone un biochip que tiene ligandos para las proteínas plaquetarias que se van a detectar, inmovilizados en su superficie, en contacto con una muestra de lisado celular de plaquetas del paciente y luego se lava el biochip, de modo que se identifican proteínas presentes en la muestra de acuerdo con las interacciones detectables formadas con los ligandos inmovilizados.

Con objeto de que la determinación del genotipo ApoE4 se lleve a cabo a nivel de expresión proteica, es necesario determinar tanto el nivel de proteína ApoE4 como el nivel total de ApoE.

20 Un método estándar de análisis estadístico de biomarcadores es utilizar métodos univariantes para comparar niveles de biomarcador en diversos grupos y resaltar aquellos biomarcadores cuyas concentraciones difieren significativamente entre los grupos.

25 Los biomarcadores individuales seleccionados para uso en el método de la invención son analizados mediante un análisis de la característica operativa del receptor (ROC; del inglés, receiver operating characteristic). La curva ROC es un método preferido para evaluar la precisión de un ensayo diagnóstico ya que se dirige tanto a la sensibilidad (es decir, el número de verdaderos positivos) como a la especificidad (es decir, el número de falsos positivos) del ensayo. El (los) biomarcador(es) que proporciona(n) una sensibilidad y una especificidad elevadas (tanto una sensibilidad como una especificidad de aproximadamente 80% son valores aceptados en el campo diagnóstico) forma(n) la base de la ecuación de regresión logística. El valor de la concentración proteica medida del biomarcador se introduce en la ecuación de regresión logística para obtener un valor final que puede ser utilizado para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

30 Para construir una curva ROC para múltiples biomarcadores, se obtiene una ecuación de regresión logística para la combinación de biomarcadores de interés introduciendo en la ecuación el valor medido de concentración proteica de cada uno de los biomarcadores en una muestra del paciente.

Aunque una ecuación de regresión logística es el método estadístico preferido para la presente invención, se pueden utilizar otros métodos estadísticos convencionales.

35 A modo de ejemplo, considerando dos analitos hipotéticos, A y B, la obtenida ecuación de regresión logística para el analito A y el analito B es:

$$y = 3,2027 \times \log[A] - 0,9506 \times \log[B] + 0,1548$$

en donde [A] es la concentración medida de analito A y [B] es la concentración medida de analito B en una muestra del paciente.

40 Si y está por encima del valor de corte obtenido en la curva ROC, se sustenta un diagnóstico de enfermedad de Alzheimer en un paciente. Si y está por debajo del valor de corte, no se sustenta el diagnóstico de enfermedad de Alzheimer.

45 Las expresiones "valor testigo" y "corte" se usan indistintamente en esta memoria y se refieren a un valor de referencia con que se compara el valor obtenido para la muestra del paciente de acuerdo con el método de la invención con objeto de facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

Con objeto de obtener el valor testigo, se determina el nivel de expresión de las proteínas plaquetarias enumeradas en la operación (i) del método de la invención a partir de muestras de una población de individuos sanos. Luego se aplican a los resultados las herramientas estadísticas de regresión lineal y análisis de curvas ROC con objeto de obtener un único valor de corte.

Se apreciará que el valor de corte variará de acuerdo con el tamaño de la población testigo. Al aumentar el tamaño de la población se reduce la variación biológica en la población testigo. Por lo tanto, es preferible que el valor testigo proceda de una población testigo que comprenda al menos 30 individuos sanos, preferiblemente al menos 50 individuos sanos y más preferiblemente al menos 100 individuos sanos.

- 5 Otra realización del método de la invención proporciona cuatro modelos diferentes para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer; estos se resumen en la Tabla 2. El Modelo 1 comprende un solo algoritmo. Cada uno de los Modelos 2, 3 y 4 comprende dos algoritmos que se seleccionan dependiendo de la presencia o ausencia del genotipo ApoE4. En la Figura 1 se ilustra el proceso de decisión para seleccionar el algoritmo más apropiado para una muestra de un paciente dado.

10 Modelo 1

El Modelo 1 se basa en el Algoritmo A, que es independiente de la presencia de ApoE4 (es decir, se puede aplicar este algoritmo independientemente de si un paciente tiene 0, 1 o 2 alelos de ApoE4). Se añaden conjuntamente los resultados de las mediciones de los ensayos marcados con "X".

- 15 Para cada uno de los cuatro modelos descritos en esta memoria, se pueden aplicar factores de ponderación a los valores de expresión de cada uno de los biomarcadores, y estos pueden diferir para los diferentes biomarcadores y dependiendo de si el ensayo se lleva a cabo usando un biochip o 2D DIGE.

En su forma más sencilla, usando un factor de ponderación de 1 para todos los biomarcadores, el resultado para un sujeto de ensayo se determinaría usando el Modelo 1, aplicando el cálculo siguiente:

- 20 $1 \times \text{abundancia normalizada (MAO-B)} + 1 \times \text{abundancia normalizada (tropomiosina total)} + 1 \times \text{abundancia normalizada (factor XIIIa de coagulación)} + 1 \times \text{abundancia normalizada (wtGSTO-1)} + 1 \times \text{abundancia normalizada (ApoE4)}$.

Luego se compara el resultado con el valor testigo. Un resultado mayor que el testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer en el paciente.

Modelo 2

- 25 En el Modelo 2 se utilizan dos algoritmos diferentes que tienen en cuenta la sobrerrepresentación de wtGSTO-1 en pacientes con enfermedad de Alzheimer no ApoE4. El uso del respectivo algoritmo depende de la presencia o ausencia de ApoE4 en el paciente, considerando por ello la sobrerrepresentación de GSTO-1 wt en pacientes no ApoE4. Si el alelo ApoE4 está ausente de la muestra del paciente se utiliza el Algoritmo A. En caso contrario se utiliza el Algoritmo B. El resultado se obtiene aplicando un factor de ponderación a la abundancia normalizada de cada biomarcador, como se explicó anteriormente para el Modelo 1.

Modelo 3

- 35 En el Modelo 3 también se utilizan dos algoritmos diferentes. Similarmente al Modelo 2, si el alelo ApoE4 está ausente del genoma del paciente se aplica entonces el Algoritmo A. Si el paciente porta 1 o 2 alelos ApoE4 se aplica entonces el Algoritmo C. El resultado se obtiene aplicando un factor de ponderación a la abundancia normalizada de cada biomarcador, como se explicó anteriormente para el Modelo 1.

Modelo 4

El Modelo 4 es similar a los Modelos 2 y 3 ya que se usan diferentes algoritmos (es decir, D o E) dependiendo de la presencia o ausencia de ApoE4 en el genoma del paciente. Sin embargo, en el Modelo 4 se incluye un biomarcador adicional, la proteína 1 con repeticiones WD.

- 40 El valor resultante calculado al usar los algoritmos del Modelo 1, 2, 3 o 4 se compara con un valor testigo predeterminado con objeto de facilitar el diagnóstico de la enfermedad. En el Ejemplo 1 se proporciona una explicación de cómo se pueden determinar valores testigo.

Tabla 2

Modelo	Algoritmo	Aplicado a pacientes	El algoritmo contiene:						ApoE4
			Abundancia normalizada de (2D-DIGE)						
			MAO-B	Tropomiosina total	Factor XIIIa de coagulación	Proteína 1 con repeticiones WD	GSTO-1 wt	GSTO-1 mutante	
1	A	todos	X	X	X	-	X	-	X
2	A	ApoE4 neg.	X	X	X	-	X	-	X
	B	ApoE4 pos.	X	X	X	-	-	-	X
3	A	ApoE4 neg.	X	X	X	-	X	-	X
	C	ApoE4 pos.	X	X	X	-	-	X	X
4	D	ApoE4 neg.	X	X	X	X	X	-	X
	E	ApoE4 pos.	X	X	X	X	-	X	X

X: el respectivo ensayo está incluido en el algoritmo

-: el respectivo ensayo no está incluido en el algoritmo

- 5 Cada uno de los algoritmos descritos en los Modelos 1-4 anteriores puede también comprender un factor de ponderación basado en el número de alelos de ApoE4 presentes en el genoma del paciente. Si el paciente porta uno o dos alelos de ApoE4, se añade un valor de +1 o +2, respectivamente, al valor de abundancia normalizada total para todas las proteínas plaquetarias que se incluyen en un algoritmo dado. Luego se compara el valor resultante con el testigo con objeto de que se realice un diagnóstico. Alternativamente, si el paciente no tiene alelos de ApoE4 no se añade entonces ningún factor de ponderación adicional al valor de abundancia normalizada total.
- 10 De acuerdo con la presente invención, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer puede verse facilitado al comparar con un valor testigo el nivel de expresión total de cada uno de los biomarcadores en la muestra de plaquetas aislada. El diagnóstico de la enfermedad se puede llevar a cabo en combinación con otros factores tales como observaciones clínicas y la historia del paciente, y mediante referencia a resultados de ensayos previos del paciente.
- 15 Sin embargo, puesto que las plaquetas tienen diferente concentración en la sangre, también varía la concentración de las proteínas plaquetarias. Los coeficientes de variación para las concentraciones de plaquetas en plasma rico en plaquetas y en plaquetas filtradas por gel son 38% y 32%, respectivamente, y la correlación de la cuenta de plaquetas a la concentración de plaquetas es insatisfactoria ($K = 0,58$ para una normalización analítica de biomarcadores plaquetarios mediante la cuenta de plaquetas). Esto hace que la concentración de proteínas plaquetarias en una muestra de sangre sea un indicador poco fiable para la determinación de cambios patológicos en el cerebro y se requieran operaciones adicionales para normalizar las concentraciones de las proteínas plaquetarias.
- 20 Por lo tanto, en la presente invención se utilizan preferiblemente patrones de extracción internos que permiten la cuantificación precisa de la expresión de proteínas plaquetarias en términos de "abundancia normalizada".
- 25 En una realización preferida, el patrón de extracción interno procede del proteoma de plaquetas humanas y está presente en una muestra, o muestra testigo, de lisado de plaquetas de un paciente.
- Como se emplea en esta memoria, la expresión "variación biológica baja" se refiere a proteínas de extracto celular con un valor de CV inferior a 0,18.
- 30 Como se emplea en esta memoria, la expresión "normalizar la variación biológica natural" se refiere al uso de un valor de referencia que corresponde a la concentración de una proteína que varía de forma insignificante entre

muestras, frente a la cual se puede determinar de forma precisa la concentración de proteínas con mayor variación natural entre muestras.

5 Se identificaron candidatos proteicos para patrones de extracción internos analizando la variación biológica de 908 proteínas diferentes del proteoma plaquetario de 110 individuos, usando análisis bioinformático, espectrometría de masas y PAGE 2D. En la Tabla 3 se enumeran candidatos con una baja variación biológica, identificados en geles con pHs en el intervalo de 4-7. En la Tabla 4 se enumeran candidatos con una baja variación biológica, identificados en geles con pHs en el intervalo de 6-9.

Tabla 3

Nombre de la proteína	Nº de acceso de SwissProt	CV-todos
14-3-3 gamma	P61981	0,084
Peroxirredoxina-6	P30041	0,086
Proteína 2 unida a receptor de factor de crecimiento	P62993	0,088
Subunidad beta de la proteína de bloqueo terminal de actina F (Cap Z beta)	P47756	0,088
Subunidad catalítica de la serina/treonina-proteína fosfatasa PP1-alfa	P62136	0,089
Proteína ligera 6 de miosina	P60660	0,092
Miembro 2 de la familia RP/EB de proteínas asociadas a microtúbulos	Q15555	0,092
Inhibidor beta de la disociación de Rab GDP (Rab GDI beta)	P50395	0,093
Proteína interactiva 6 en la muerte celular programada (proteína interactiva PDCD6)	Q8WUM4	0,095
Proteína alfa de fijación a NSF soluble (SNAP-alpha)	P54920	0,095
Subunidad beta 1 de la proteína G(I)/G(S)/G(T) ligante de nucleótidos de guanina	P62873	0,095
Proteína 14-3-3 theta	P27348	0,099
Proteína 14-3-3 zeta/delta	P63104	0,099
Mortalina GRP75	P38646	0,104
Proteína disulfuro isomerasa A6	Q15084	0,112
Integrina α -IIb	P08514	0,143
Proteína 1 de ensamblaje del nucleosoma	P55209	0,177

10 **Tabla 4**

Nombre de la proteína	Nº de acceso de SwissProt	CV-todos
Profilina 1	P07737	0,074

Nombre de la proteína	Nº de acceso de SwissProt	CV-todos
Ciclofilina A	P62937	0,082
Ciclofilina A	P62937	0,092
Triosa fosfato isomerasa	P60174	0,103
Proteína cinasa 1 activada por mitógenos (ERK2)	P28482	0,103
Proteína 3 del canal selectivo de aniones y dependiente del voltaje	Q9Y277	0,112
Fructosa bifosfato aldolasa A	P04075	0,115
Calponina 2 (calponina H2; músculo liso) (calponina neutra)	Q99439	0,115
Tirosil-tRNA sintetasa; citoplasmática	P54577	0,120
Proteína fosfatasa 3 de especificidad dual	P51452	0,121
Subunidad 2 del complejo proteico 2/3 relacionado con actina	O15144	0,125
Isocitrato deshidrogenasa	P48735	0,128
Proteína-L-isoaspartato (D-aspartato) O-metiltransferasa	P22061	0,128
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P04406	0,129
Subunidad alfa tipo 2 del proteasoma	P25787	0,129
Subunidad alfa tipo 4 del proteasoma	P25789	0,137
Subunidad alfa tipo 7 del proteasoma	O14818	0,147
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	P04406	0,155

Las proteínas se pueden identificar de acuerdo con sus números de acceso primario de SwissProt. El número de acceso de SwissProt permite identificar el producto de mRNA que codifica cada proteína.

5 La base de conocimientos de proteínas UniProtKB/SwissProt es una base de datos de secuencias proteicas anotadas, establecida por la fusión de las bases de datos de proteínas con bases de conocimiento SwissProt y UniProt. Es mantenida en forma de colaboración por el Swiss Institute for Bioinformatics (SIB), el European Bioinformatics Institute (EBI) y la National Biomedical Research Foundation. La emisión de UniProtKB/SwissProt a la que se hace referencia en esta memoria es v55.2, de 8 de abril de 2008, y se puede acceder a ella en <http://expasy.org/sprot>.

10 Todas las proteínas que derivan de este mRNA están dentro del alcance de la invención, es decir, todas las variantes y las modificaciones postraduccionales.

En una realización preferida de la invención, el patrón proteico de extracción interno es la proteína 14-3-3 gamma.

15 La expresión de las proteínas plaquetarias específicas en una muestra de un paciente de acuerdo con la invención se cuantifica preferiblemente en términos de abundancia normalizada, preferiblemente utilizando un sistema de biochips matriciales. Por ejemplo, se puede poner un biochip en contacto con una muestra de lisado celular de plaquetas del paciente y lavar luego la superficie, de modo que se identifican proteínas presentes en la muestra de acuerdo con las interacciones formadas con ligandos inmovilizados en la superficie del biochip. Las interacciones de ligando-proteína producen señales de quimioluminiscencia que pueden ser rápidamente detectadas y analizadas utilizando un sistema para obtención de imágenes, tal como una cámara superenfriada con dispositivo de carga

5 acoplada (CCD; del inglés, charge-coupled device), para cuantificar simultáneamente los analitos individuales. Las operaciones de adición de la muestra al biochip y el subsiguiente lavado, de incubación y del reactivo de visualización pueden estar totalmente automatizadas o ser de aplicación manual. Los resultados de la medición de la expresión de proteínas plaquetarias son sometidos a dos procedimientos de normalización consecutivos. El primero implica un procedimiento para la corrección de la variación técnica de las señales que se obtienen con el sistema de biochips matriciales, tales como las validaciones de la corrección de fondo, del punto de referencia y del punto de corrección.

10 Las comparaciones de las señales de la muestra desconocida con las curvas de calibración proporcionan las concentraciones de proteínas de la muestra desconocida. La concentración de plaquetas en sangre completa y en las muestras aisladas varía entre los individuos y, por consiguiente, afecta a la concentración de proteína biomarcadora de AD en las muestras. Por lo tanto, es necesario un segundo procedimiento de normalización, el cálculo de la abundancia normalizada de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer. Se miden una o más proteínas patrón de extracción internas (seleccionadas de las Tablas 3 y 4) en paralelo con los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer. El valor de abundancia normalizada corresponde a la relación entre los niveles de expresión del biomarcador de la enfermedad de Alzheimer y del patrón de extracción interno, o de la suma de múltiples patrones de extracción internos.

15 Alternativamente, se pueden determinar los niveles de expresión usando un análisis por 2D DIGE y calculando la abundancia normalizada de las respectivas bandas del gel usando un software tal como el software DeCyder 6.5 (GE Healthcare).

20 En el sistema de 2D DIGE hay también dos procedimientos consecutivos utilizados para obtener la abundancia normalizada de una proteína. El primer procedimiento (la normalización) implica el cálculo de un factor de normalización calculando un histograma de datos a partir de las relaciones de las bandas entre las imágenes primarias y secundarias del gel. Se ajusta al histograma una curva de distribución normal, y el resultante centro de la curva modelo es el factor de normalización. Luego se normalizan los volúmenes de las bandas en el mapa de bandas primario usando el factor de normalización

$$C': V1i' = V1i \times 10 C'(ii)$$

en donde V1i' es el volumen normalizado de la banda i en la imagen primaria del gel y V1i es el volumen de la banda i en la imagen primaria del gel.

30 El segundo procedimiento implica el uso de un patrón interno que normalmente es una colección de todas las muestras examinadas en el estudio y está presente en cada gel de DIGE bidimensional. La relación volumétrica normalizada para cada imagen de patrón de los diferentes geles se ajusta al valor 1,0. La relación de expresión para cada banda de la muestra se relaciona luego con su correspondiente banda de patrón en el mismo gel, lo que hace posible comparar relaciones entre bandas proteicas correspondientes en los diferentes geles.

35 El valor de abundancia normalizada resultante es la relación entre el volumen normalizado de la banda proteica y el volumen normalizado de la banda de patrón interno, descrita en términos de factor de cambio.

Los cálculos anteriormente mencionados pueden ser modificados mediante el uso del Log₁₀ de los valores normalizados con objeto de facilitar el cambio de escala en representaciones gráficas y análisis estadísticos.

Los siguientes ejemplos no restrictivos ilustran aspectos de la invención.

40 **Ejemplo 1: Análisis de ensayos con un solo biomarcador y ensayos que comprenden tres, cuatro y cinco biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

Se recogieron muestras en dos fases y se dividieron en un conjunto de descubrimiento y un conjunto de validación. Se midió la abundancia normalizada de cada proteína plaquetaria usando 2D-DIGE y se generaron curvas ROC con objeto de obtener los valores de corte óptimo, corte real, sensibilidad y especificidad para cada biomarcador. En la Tabla 5 se muestran los resultados para cada uno de estos ensayos con una sola proteína.

45 **Tabla 5**

Ensayo individual	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
MAO-B	Descubrimiento	0,847	0,714-0,980	< 0,001	1,072	1,072	89	80
	Validación	0,826	0,689-0,964	< 0,001	1,048	1,072	75,1	80

Ensayo individual	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Tropomiosina total	Descubrimiento	0,797	0,655-0,940	0,002	1,802	1,802	83,3	65
	Validación	0,704	0,539-0,869	0,027	1,748	1,802	56,5	76,2
Factor XIIIa de coagulación	Descubrimiento	0,761	0,601-0,921	0,006	1,036	1,036	78	65
	Validación	0,717	0,551-0,883	0,019	0,929	1,036	47,4	79
ApoE4	Descubrimiento	0,797	0,647-0,947	0,002	0,5	0,5	67	90
	Validación	0,744	0,585-0,904	0,008	0,5	0,5	58	91
GSTO-1 wt	Descubrimiento	0,574	0,387-0,760	0,438	0,875	0,875	78	50
	Validación	0,61	0,432-0,788	0,233	0,805	0,875	47,4	57,1
GSTO-1 mt	Descubrimiento	0,368	0,189-0,548	0,165	N/A	N/A	N/A	N/A
	Validación	0,486	0,300-0,673	0,882	N/A	N/A	N/A	N/A

Se desarrollaron algoritmos para analizar simultáneamente combinaciones de tres y cuatro biomarcadores, con objeto de obtener valores de corte (testigo), para uso como valores de referencia en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Estos algoritmos se resumen en la Tabla 6.

5 **Tabla 6**

Combinación de marcadores	El algoritmo contiene				
	Abundancias normalizadas de (2D-DIGE)				Genotipaje: alelos de ApoE4
	MAO-B	Tropomiosina total	Factor XIIIa de coagulación	GSTO-1 wt	
Comb. 1 de 3 marcadores	X	–	–	X	X
Comb. 2 de 3 marcadores	X	X	–	–	X
Comb. 3 de 3 marcadores	X	–	X	–	X
Comb. 4 de 3 marcadores	X	X	–	X	–
Comb. 5 de 3 marcadores	X	–	X	X	–
Comb. 6 de 3 marcadores	X	X	X	–	–
Comb. 7 de 3 marcadores	–	X	–	X	X
Comb. 8 de 3 marcadores	–	–	X	X	X
Comb. 9 de 3 marcadores	–	X	X	–	X
Comb. 10 de 3 marcadores		X	X	X	–
Comb. 1 de 4 marcadores	X	X	–	X	X

	El algoritmo contiene				
	Abundancias normalizadas de (2D-DIGE)				
Comb. 2 de 4 marcadores	X	–	X	X	X
Comb. 3 de 4 marcadores	X	X	X	–	X
Comb. 4 de 4 marcadores	X	X	X	X	–
Comb. 5 de 4 marcadores	–	X	X	X	X

5 Se ajustó un umbral teórico por encima del cual todos los valores indican un diagnóstico de AD positivo. Se compararon los valores calculados para cada algoritmo con el umbral teórico, y los resultados mayores que el umbral correspondían a un diagnóstico positivo para la enfermedad de Alzheimer. Luego se compararon estos diagnósticos con el diagnóstico real de dos grupos de ensayo (grupo de AD y grupo testigo). Mediante esta comparación se determinaron los falsos positivos y los falsos negativos y se calcularon los valores de especificidad y sensibilidad. Cada punto de la curva ROC corresponde a un umbral (valor testigo) con especificidad y sensibilidad específicas.

10 Para obtener la curva ROC completa, se aumentó continuamente el valor del umbral teórico y se determinaron la especificidad y la sensibilidad para cada umbral. El punto de la curva ROC más próximo a la esquina superior izquierda del gráfico corresponde al corte óptimo, es decir, a los valores de sensibilidad y especificidad máximos. La distancia de cada punto desde la esquina superior izquierda (0,1) en la curva ROC se calculó usando la fórmula: **distancia = $\sqrt{[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]}$** .

15 El punto con el mínimo valor de distancia corresponde al valor testigo con la especificidad y la sensibilidad mejores. En la Tabla 7 se muestran los resultados derivados de las curvas ROC.

Finalmente, se elaboraron los algoritmos de los Modelos 1-4. Estos tienen en cuenta la expresión de los siete biomarcadores de la invención (véase la Tabla 2).

20 Se generaron curvas ROC para estas combinaciones de biomarcadores y se calcularon los valores testigo a partir de los gráficos de dispersión resultantes (véanse las Figuras 2 a 4). Además, en los Modelos 2 y 3 se tiene en cuenta el hallazgo de que la GSTO-1 de tipo silvestre está sobrerrepresentada en los pacientes con enfermedad de Alzheimer que no portan ningún alelo ApoE4, mientras que la wtGSTO-1 está infrarrepresentada en los pacientes con enfermedad de Alzheimer positivos para ApoE4.

25 En la Tabla 8 se muestran los resultados para los Modelos 1-3. Cuando se evalúan los datos, son deseables unos valores elevados para el área bajo la curva (AUC; del inglés, area under the curve) ROC y unos valores elevados de especificidad y sensibilidad, ya que indican los ensayos más precisos. Se resaltan los valores para el "corte real"; estos son los valores testigo usados en el método de la invención para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

30 Como se puede ver por los resultados de la Tabla 8, el Modelo 3 tiene los mayores valores de AUC (0,949) y es el ensayo más preciso. Es probable que el Modelo 3 proporcione mejores resultados que el Modelo 1 porque tiene en cuenta las diferencias entre los pacientes con AD positivos para ApoE4 y negativos para ApoE4 en cuanto al genotipo GSTO-1.

35 En el Modelo 3, sólo se utiliza el algoritmo A para los sujetos de ensayo negativos para ApoE4. Para diagnosticar en sujetos positivos para ApoE4 se requiere un segundo algoritmo que se ajuste mejor a los sujetos de ensayo positivos para ApoE4. Por lo tanto, hay dos algoritmos (A y C) en el Modelo 3 y se utiliza cada uno sólo para un grupo particular de sujetos de ensayo (personas de ensayo negativas para ApoE4 o personas de ensayo positivas para ApoE4), lo que aumenta la precisión del diagnóstico de la AD.

40 El Modelo 4 comprende los algoritmos D y E (negativo para ApoE4 y positivo para ApoE4, respectivamente). Estos algoritmos difieren de los A-C en que incluyen la proteína plaquetaria "proteína 1 con repeticiones WD". En la Tabla 9 se muestran los factores de ponderación para cada proteína, obtenidos utilizando un valor de corte de 8,1. La curva ROC (AUC) se muestra como Figura 5.

Tabla 7

Algoritmo	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Comb. 1 de 3 marcadores	descubrimiento	0,853	0,733-0,973	< 0,001	2,669	2,669	88,9	75,0
	validación	0,882	0,755-1,000	< 0,001	2,503	2,669	73,7	85,7
Comb. 2 de 3 marcadores	descubrimiento	0,911	0,803-1,000	< 0,001	3,449	3,449	83,3	90,0
	validación	0,895	0,775-1,000	< 0,001	3,128	3,449	79,0	90,5
Comb. 3 de 3 marcadores	descubrimiento	0,897	0,794-1,000	< 0,001	2,192	2,192	88,9	80,0
	validación	0,88	0,774-0,989	< 0,001	2,090	2,192	84,2	85,7
Comb. 4 de 3 marcadores	descubrimiento	0,814	0,680-0,948	0,001	4,285	4,285	77,8	75,0
	validación	0,764	0,618-0,911	0,004	3,569	4,285	36,8	85,7
Comb. 5 de 3 marcadores	descubrimiento	0,731	0,568-0,893	0,015	3,349	3,349	72,2	65,0
	validación	0,794	0,652-0,937	0,001	2,710	3,349	36,8	85,7
Comb. 6 de 3 marcadores	descubrimiento	0,875	0,761-0,989	< 0,001	4,011	4,011	88,9	75,0
	validación	0,83	0,696-0,964	< 0,001	3,675	4,011	52,6	95,2
Comb. 7 de 3 marcadores	descubrimiento	0,903	0,804-1,000	< 0,001	3,719	3,719	83,3	90,0
	validación	0,832	0,699-0,965	< 0,001	3,112	3,719	47,4	85,7
Comb. 8 de 3 marcadores	descubrimiento	0,856	0,740-0,972	< 0,001	2,297	2,297	88,9	70,0
	validación	0,815	0,672-0,957	0,001	1,969	2,297	73,7	71,4
Comb. 9 de 3 marcadores	descubrimiento	0,906	0,708-1,000	< 0,001	3,547	3,547	83,3	100,0
	validación	0,857	0,734-0,981	< 0,001	3,060	3,547	49,4	90,5
Comb. 10 de 3 marcadores	descubrimiento	0,814	0,680-0,948	0,001	4,076	4,076	77,8	70,0
	validación	0,727	0,570-0,884	0,014	3,543	4,076	47,4	76,2
Comb. 1 de 4 marcadores	descubrimiento	0,908	0,819-0,998	< 0,001	5,137	5,137	77,8	90,0
	validación	0,885	0,771-0,998	< 0,001	4,117	5,137	94,7	81,0

ES 2 507 143 T3

Algoritmo	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Comb. 2 de 4 marcadores	descubrimiento	0,864	0,752-0,976	< 0,001	3,454	3,454	93,3	70,0
	validación	0,872	0,748-0,997	< 0,001	2,931	3,454	81,3	81,0
Comb. 3 de 4 marcadores	descubrimiento	0,919	0,821-1,000#	< 0,001	4,559	4,559	83,3	95,0
	validación	0,887	0,771-1,000	< 0,001	4,040	4,559	64,8	90,5
Comb. 4 de 4 marcadores	descubrimiento	0,853	0,734-0,971	< 0,001	5,213	5,213	83,3	70,0
	validación	0,805	0,665-0,944	< 0,001	4,507	5,213	57,9	85,7
Comb. 5 de 4 marcadores	descubrimiento	0,922	0,826-1,000	< 0,001	5,070	5,070	77,8	100,0
	validación	0,847	0,720-0,974	< 0,001	3,787	5,070	35,3	90,5

Tabla 8

Ensayo único o Modelo	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
MAO-B	descubrimiento	0,847	0,714-0,980	< 0,001	1,072	1,072	89,0	80,0
	validación	0,826	0,689-0,964	< 0,001	0,48	1,072	75,1	80,0
Tropomiosina total	descubrimiento	0,797	0,655-0,940	0,002	1,802	1,802	83,3	65,0
	validación	0,704	0,539-0,869	0,027	1,748	1,802	56,5	76,2
Factor XIIIa de coagulación	descubrimiento	0,761	0,601-0,921	0,006	1,036	1,036	78,0	65,0
	validación	0,717	0,551-0,883	0,019	0,929	1,036	47,4	79,0
ApoE4	descubrimiento	0,797	0,647-0,947	0,002	0,500	0,500	67,0	90,0
	validación	0,744	0,585-0,904	0,008	0,500	0,500	58,0	91,0
GSTO-1 wt	descubrimiento	0,574	0,387-0,760	0,438	0,875	0,875	78,0	50,0
	validación	0,610	0,432-0,788	0,233	0,805	0,875	47,4	57,1
GSTO-1 mutante	descubrimiento	0,368	0,189-0,548	0,165	N/A	N/A	N/A	N/A
	validación	0,486	0,300-0,673	0,882	N/A	N/A	N/A	N/A
GSTO-1 mutante (reflejada)	descubrimiento	0,632	0,452-0,812	0,165	1,29*	1,29*	72,2	50,0
	validación	0,514	0,328-0,700	0,882	0,675	1,29*	47,4	57,1
Comb. 1 de 3 marcadores	descubrimiento	0,853	0,733-0,973	< 0,001	2,669	2,669	88,9	75,0
	validación	0,882	0,755-1,000	< 0,001	2,503	2,669	73,7	85,7
Comb. 2 de 3 marcadores	descubrimiento	0,911	0,803-1,000	< 0,001	3,449	3,449	83,3	90,0
	validación	0,895	0,775-1,000	< 0,001	3,128	3,449	79,0	90,5
Comb. 3 de 3 marcadores	descubrimiento	0,897	0,794-1,000	< 0,001	2,192	2,192	88,9	80,0
	validación	0,88	0,774-0,989	< 0,001	2,090	2,192	84,2	85,7
Comb. 4 de 3 marcadores	descubrimiento	0,814	0,680-0,948	0,001	4,285	4,285	77,8	75,0
	validación	0,764	0,618-0,911	0,004	3,569	4,285	36,8	85,7
Comb. 5 de 3	descubrimiento	0,731	0,568-0,893	0,015	3,349	3,349	72,2	65,0

ES 2 507 143 T3

Ensayo único o Modelo	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
de 3 marcadores	validación	0,794	0,652-0,937	0,001	2,710	3,349	36,8	85,7
Comb. 6 de 3 marcadores	descubrimiento	0,875	0,761-0,989	< 0,001	4,011	4,011	88,9	75,0
	validación	0,83	0,696-0,964	< 0,001	3,675	4,011	52,6	95,2
Comb. 7 de 3 marcadores	descubrimiento	0,903	0,804-1,000	< 0,001	3,719	3,719	83,3	90,0
	validación	0,832	0,699-0,965	< 0,001	3,112	3,719	47,4	85,7
Comb. 8 de 3 marcadores	descubrimiento	0,856	0,740-0,972	< 0,001	2,297	2,297	88,9	70,0
	validación	0,815	0,672-0,957	0,001	1,969	2,297	73,7	71,4
Comb. 9 de 3 marcadores	descubrimiento	0,906	0,708-1,000	< 0,001	3,547	3,547	83,3	100,0
	validación	0,857	0,734-0,981	< 0,001	3,060	3,547	49,4	90,5
Comb. 10 de 3 marcadores	descubrimiento	0,814	0,680-0,948	0,001	4,076	4,076	77,8	70,0
	validación	0,727	0,570-0,884	0,014	3,543	4,076	47,4	76,2
Comb. 1 de 4 marcadores	descubrimiento	0,908	0,819-0,998	< 0,001	5,137	5,137	77,8	90,0
	validación	0,885	0,771-0,998	< 0,001	4,117	5,137	94,7	81,0
Comb. 2 de 4 marcadores	descubrimiento	0,864	0,752-0,976	< 0,001	3,454	3,454	83,3	70,0
	validación	0,872	0,748-0,997	< 0,001	2,931	3,454	81,3	81,0
Comb. 3 de 4 marcadores	descubrimiento	0,919	0,821-1,000#	< 0,001	4,559	4,559	83,3	95,0
	validación	0,887	0,771-1,000	< 0,001	4,404	4,559	64,8	90,5
Comb. 4 de 4 marcadores	descubrimiento	0,853	0,734-0,971	< 0,001	5,213	5,213	83,3	70,0
	validación	0,805	0,665-0,944	0,001	4,507	5,213	57,9	85,7
Comb. 5 de 4 marcadores	descubrimiento	0,922	0,826-1,000	< 0,001	5,070	5,070	77,8	100,0
	validación	0,847	0,720-0,974	< 0,001	3,787	5,070	35,3	90,5
Modelo 1	descubrimiento	0,929	0,835-1,000	< 0,001	5,535	5,535	89,0	80,0

Ensayo único o Modelo	Conjunto de muestras	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
	validación	0,875	0,757-0,992	< 0,001	4,760	5,535	65,8	90,5
Modelo 2	descubrimiento	0,907	0,815-0,999	< 0,001	5,405	5,405	83,3	80,0
	validación	0,860	0,739-0,980	< 0,001	4,525	5,405	47,4	92,4
Modelo 3	descubrimiento	0,949	0,880-1,000	< 0,001	5,535	5,535	89,0	90,0
	validación	0,925	0,831-1,000	< 0,001	5,270	5,535	83,0	95,2

Tabla 9

Proteína plaquetaria			Estimación del factor de ponderación	Error estándar
ApoE4			-1,87244	3,93421
Monoamino oxidasa B			2,46031	1,32922
Factor XIIIa de coagulación			0,07643	0,06608
Proteína 1 que contiene repeticiones WD			-0,59423	0,34092
Banda 1 de tropomiosina 2			0,20222	0,31999
Tropomiosina 1	0,71958	0,47836		
Banda 2 de tropomiosina 2			-0,81031	0,53019
Glutación S transferasa de tipo silvestre (ApoE4 negativa)			0,36094	0,22099
Glutación S transferasa mutante (ApoE4 positiva)			1,69013	1013201

- 5 Sin embargo, se ha de advertir que estos modelos y algoritmos fueron optimizados para datos de 2D DIGE, y se presentan en esta memoria para ilustrar y no para limitar la presente invención. Un modelo optimizado y unos algoritmos optimizados para datos de biochips pueden diferir de los datos de 2D DIGE. El principio del modelo puede seguir siendo el mismo, pero la ponderación de los biomarcadores de AD particulares muy probablemente diferirá.

Ejemplo 2: Selección de 14-3-3 gamma como un patrón proteico de extracción interno

- 10 Se analizaron en una transferencia Western 1D 12,5 µg de proteína plaquetaria de 24 pacientes con enfermedad de Alzheimer y 24 testigos de sexo y edad correspondientes. Los resultados se ilustran en la Figura 6 y muestran que la señal de MAO-B es más intensa en las muestras de plaquetas de los pacientes con enfermedad de Alzheimer que en las muestras testigo, mientras que la intensidad de la señal para 14-3-3 gamma es igual en todas las muestras. Como se muestra en la Figura 7, midiendo la señal de MAO-B de 12,5 µg de proteína plaquetaria sin ninguna normalización sólo se puede detectar un aumento poco significativo ($P < 0,01$) en las muestras de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, después de la normalización con 14-3-3 gamma la significación aumenta a $P < 0,00000007$, lo que demuestra que la precisión con que se puede cuantificar una proteína en una muestra aumenta enormemente con la aplicación de un patrón de extracción interno.

- 20 En la Figura 8 se muestra una transferencia Western representativa para la aplicación de ERK2 como un patrón de extracción interno. La señal para la expresión de MAO-B en plaquetas de pacientes con enfermedad de Alzheimer

es más intensa en comparación con la señal de las muestras testigo, mientras que las señales para 14-3-3 gamma y ERK2 resultan inalteradas en todas las muestras de plaquetas.

Ejemplo 3: Verificación del polimorfismo de GSTO-1 en la enfermedad de Alzheimer

5 El análisis mediante electroforesis 2D en gel reveló tres isoformas de GSTO-1 con valores de pI de 6,19, 5,87 y 5,64 (Figura 9). Estas isoformas muestran distintos patrones de expresión en los tres grupos: pacientes con AD, pacientes con PD y testigos de edad y sexo correspondientes. Muestras de plaquetas de pacientes con enfermedad de Alzheimer no ApoE, filtradas por gel, revelaron una significativa suprarregulación de la isoforma de GSTO-1 con pI de 6,19 (aumentada en un 35%), mientras que la isoforma de GSTO-1 con pI de 5,87 está infrarregulada en un 60%.

10 Los resultados de la Figura 9 representan dos polimorfismos de sentido erróneo en el exón 4 de GSTO-1 (Ala140Asp y Glu155Δ). La banda de GSTO-1 con pI de 6,19 corresponde a WT. La banda con pI de 5,87 representa una isoforma donde Ala140 ha sido sustituida por Asp (Ala140Asp). La banda con pI de 5,64 puede referirse a una modificación postraducciona de origen desconocido. Las iguales expresiones de las bandas de GSTO-1 con pI de 6,19 y pI de 5,87 corresponden a una isoforma WT y una isoforma que comprende la sustitución Ala140Asp, respectivamente. Una banda exclusiva a un pI de 5,87 representa un genotipo GSTO-1 Asp/Asp homocigótico en la posición de aminoácido 140. Alternativamente, se puede observar en individuos que portan una deleción de Glu155Δ en un alelo y un genotipo GSTO-1 Ala140Asp en el otro alelo. Sólo se detectará el polipéptido que porta Asp 140 ya que el polipéptido que porta la deleción Glu155Δ podría no expresarse o resultar rápidamente degradado.

20 **Ejemplo 4: Discriminación entre enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson**

El método de la presente invención se puede emplear para discriminar entre pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y aquellos que padecen la enfermedad de Parkinson (PD), y en la Tabla 10 se presenta la comparación entre muestras de pacientes con AD y muestras de pacientes con PD.

25 En la Figura 10 se muestra un gráfico de dispersión para un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (grupo de descubrimiento de AD) y un grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson. Se obtuvo este resultado aplicando el algoritmo del Modelo 1 a muestras de plaquetas procedentes de un grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson y un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con el método de la invención. La media calculada para los pacientes con enfermedad de Alzheimer en la fase de descubrimiento fue $6,92 \pm 1,25$ (desviación estándar; del inglés, *standard deviation*), y $5,00 \pm 0,74$ (SD) para los pacientes con enfermedad de Parkinson. El corte fue ajustado a 5,535, que es el valor de corte determinado para el conjunto de descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer para el Modelo 1 (véanse las Figuras 2a y 2b). Como se puede ver en el gráfico de dispersión resultante, hay una clara distinción entre los resultados de los dos grupos de pacientes.

30 Similarmente, en la Figura 11 se muestra un gráfico de dispersión para un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (grupo de descubrimiento de AD) y un grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson, que se obtuvo aplicando el Modelo 2 a muestras de plaquetas procedentes de los dos grupos de pacientes. La media calculada para los pacientes con enfermedad de Alzheimer en la fase de descubrimiento fue $6,12 \pm 0,82$ (SD), y $4,87 \pm 0,83$ (SD) para los pacientes con enfermedad de Parkinson. El corte fue ajustado a 5,405, que es el valor de corte determinado para el conjunto de descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer para el Modelo 2 (véanse las Figuras 3a y 3b). De nuevo hubo una clara distinción entre las distribuciones de los puntos en el gráfico de dispersión para cada grupo de pacientes.

35 En la Figura 12 se muestra un gráfico de dispersión para un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (grupo de descubrimiento de AD) y un grupo de pacientes con enfermedad de Parkinson, que se obtuvo aplicando el Modelo 3 a muestras de plaquetas procedentes de los dos grupos de pacientes. La media calculada para los pacientes con enfermedad de Alzheimer en la fase de descubrimiento fue $6,28 \pm 0,93$ (SD), y $5,01 \pm 0,77$ (SD) para los pacientes con enfermedad de Parkinson. El corte fue ajustado a 5,535, que es el valor de corte determinado para el conjunto de descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer para el Modelo 3 (véanse las Figuras 4a y 4b). Este resultado muestra que los tres Modelos del método de la invención se pueden aplicar en un ensayo diagnóstico para discriminar entre enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

Tabla 10

AD frente a PD	AUC de la curva ROC	CI al 95%	Significación	Corte óptimo	Corte real	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Ensayos únicos, combinaciones o Modelos							
MAO-B	0,981	0,944-1,00	< 0,001	0,998	1,072	89,0	100,0
Tropomiosina total	0,722	0,538-0,906	0,042	2,027	1,802	82,0	50,0
Factor XIIIa de coagulación	0,769	0,575-0,962	0,014	1,007	1,036	75,2	83,3
ApoE4	0,773	0,605-0,941	0,013	0,500	0,5	66,7	83,3
wtGSTO-1	0,519	0,278-0,759	0,866	0,870	0,875	76,3	50,0
GSTO-1 mutante reflejada	0,546	0,325-0,768	0,672	1,3249*	1,29*	41,7	72,2
Comb. 1 de 3 marcadores	0,894	0,776-1,000	< 0,001	2,665	2,669	88,3	75,0
Comb. 2 de 3 marcadores	0,903	0,783-1,000	< 0,001	3,430	3,449	83,0	100,0
Comb. 3 de 3 marcadores	0,894	0,768-1,000	< 0,001	2,080	2,192	87,7	75,0
Comb. 4 de 3 marcadores	0,787	0,618-0,956	0,009	4,284	4,285	77,7	66,7
Comb. 5 de 3 marcadores	0,764	0,583-0,945	0,016	3,314	3,349	72,2	66,7
Comb. 6 de 3 marcadores	0,903	0,787-1,000	< 0,001	4,105	4,011	88,9	82,4
Comb. 7 de 3 marcadores	0,852	0,714-0,990	0,001	3,750	3,720	83,3	77,9
Comb. 8 de 3 marcadores	0,787	0,625-0,949	0,009	2,880	2,297	85,3	66,7
Comb. 9 de 3 marcadores	0,880	0,714-1,000	0,001	3,421	3,547	79,4	100,0
Comb. 10 de 3 marcadores	0,711	0,523-0,898	0,054	4,880	5,070	39,6	91,7
Comb. 1 de 4 marcadores	0,912	0,775-1,000	< 0,001	4,803	5,137	74,5	91,7
Comb. 2 de 4 marcadores	0,880	0,760-1,000	0,001	3,750	3,454	82,6	75,0
Comb. 3 de 4 marcadores	0,931	0,821-1,000	< 0,001	4,241	4,559	81,4	100,0
Comb. 4 de 4 marcadores	0,801	0,644-0,958	0,006	4,893	5,213	78,8	58,3
Comb. 5 de 4 marcadores	0,875	0,749-1,00	0,001	5,031	5,070	73,0	91,7
Modelo 1	0,940	0,862-1,00	< 0,001	5,623	5,535	88,9	70,7
Modelo 2	0,843	0,704-0,981	0,002	5,869	5,405	83,3	66,7
Modelo 3	0,917	0,815-1,000	< 0,001	5,764	5,535	86,9	66,7

REIVINDICACIONES

1 Un método *ex vivo* para facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente, que comprende:

5 (i) determinar el nivel de expresión combinado de al menos cuatro proteínas plaquetarias en una muestra de plaquetas del paciente, seleccionadas de entre la monoamino oxidasa B, el factor XIIIa de coagulación, la tropomiosina total (α y β), la proteína 1 con repeticiones WD, y la apolipoproteína E4 (ApoE4); y

(ii) comparar el valor resultante de la operación (i) con un valor testigo,

en donde un resultado mayor que el valor testigo es indicativo de enfermedad de Alzheimer,

caracterizado por que la operación (i) comprende además determinar el nivel de expresión de la glutatión S-transferasa omega-1 (GSTO-1) mutante o de tipo silvestre,

10 en donde si el paciente tiene uno o dos alelos ApoE4 se determina entonces el nivel de expresión de la GSTO-1 mutante,

y si el paciente no tiene alelos ApoE4 se determina entonces el nivel de expresión de la GSTO-1 de tipo silvestre.

15 2. Un método según la Reivindicación 1, en donde la variación biológica en la expresión de las proteínas plaquetarias se normaliza por referencia a la expresión de una o más proteínas identificadas en la Tabla 3 o la Tabla 4.

3. Un método según la Reivindicación 2, en donde la proteína empleada para normalizar la variación biológica es la proteína 14-3-3 gamma.

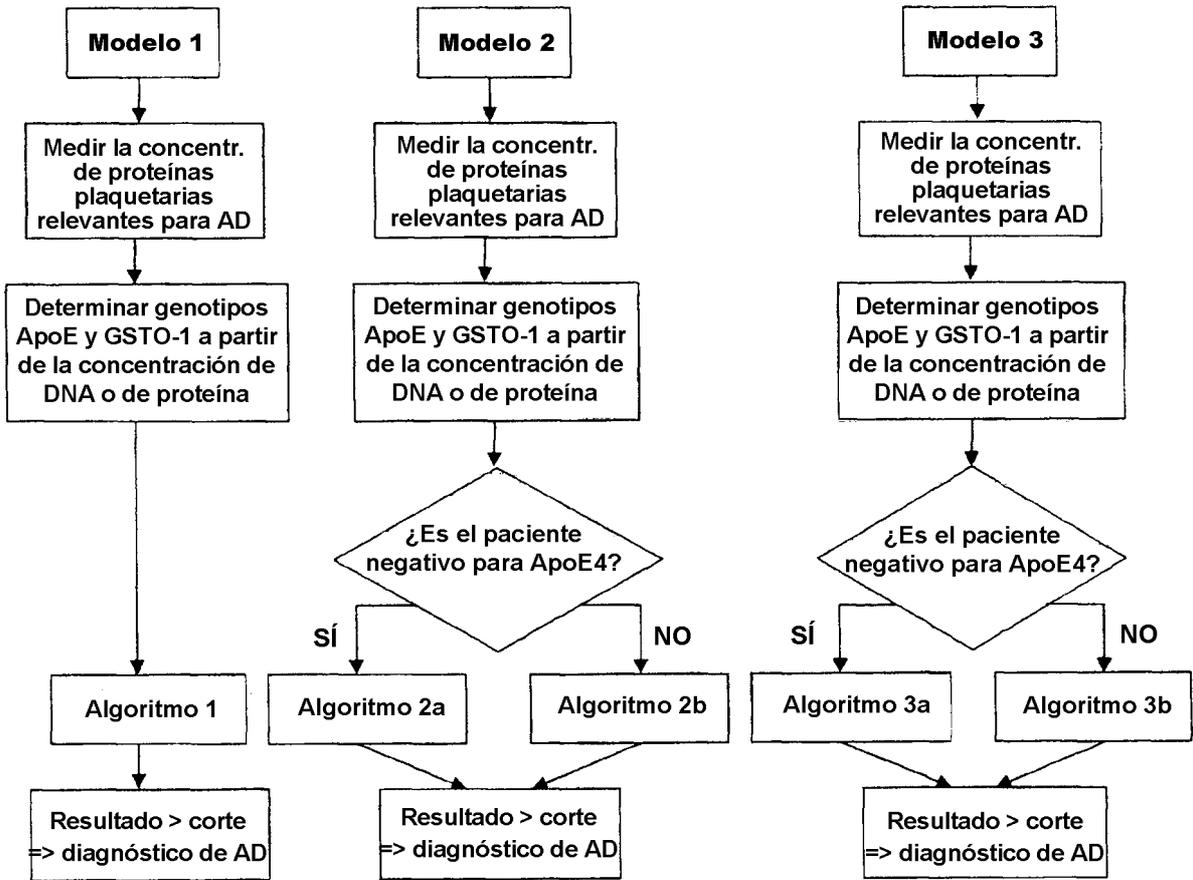


Figura 1

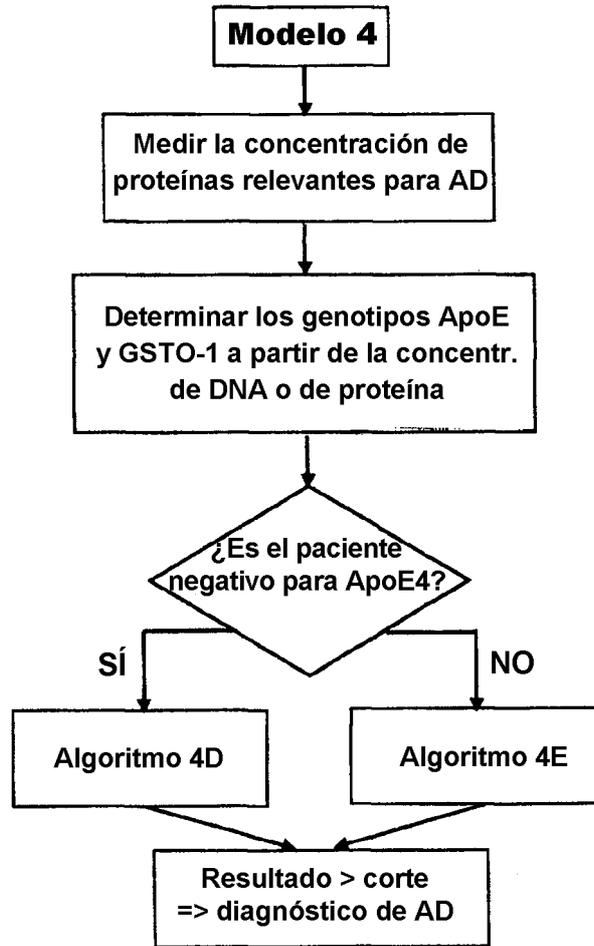


Figura 1B

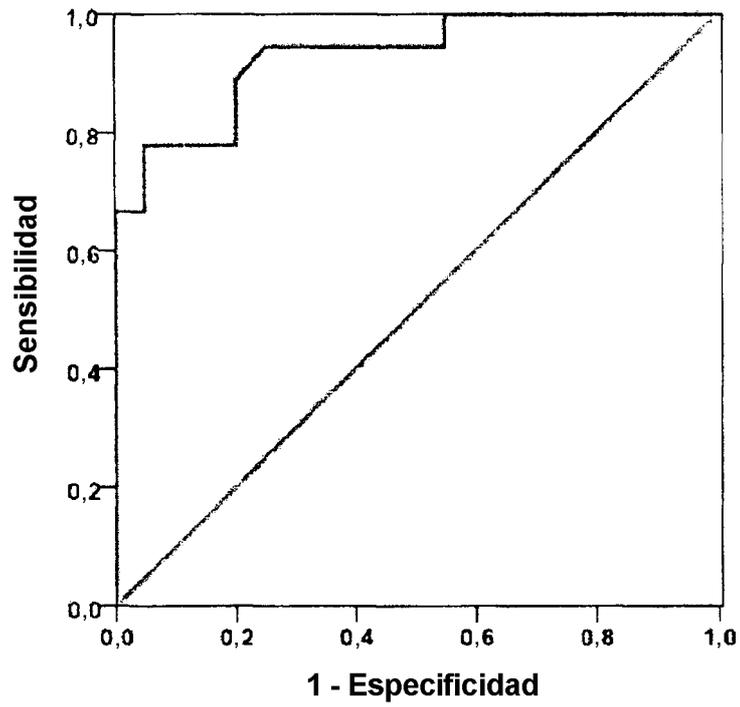


Figura 2a

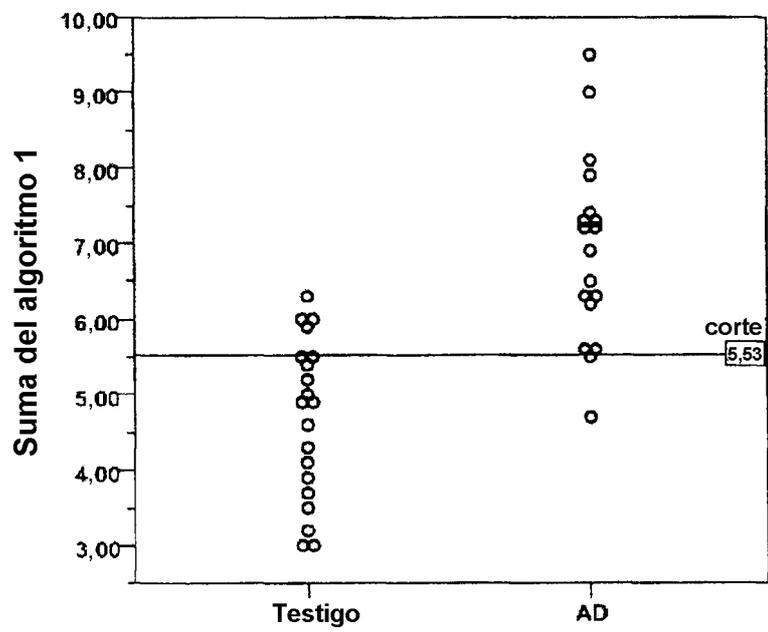


Figura 2b

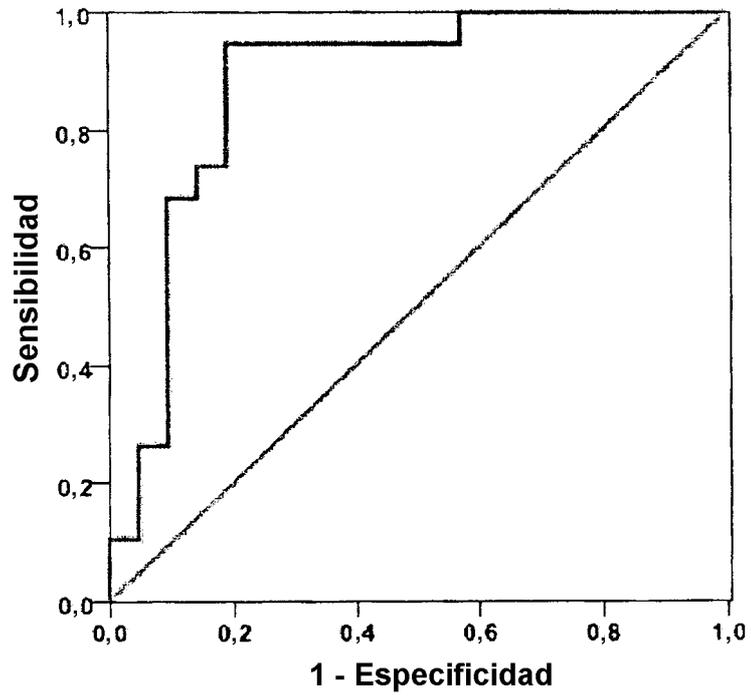


Figura 2c

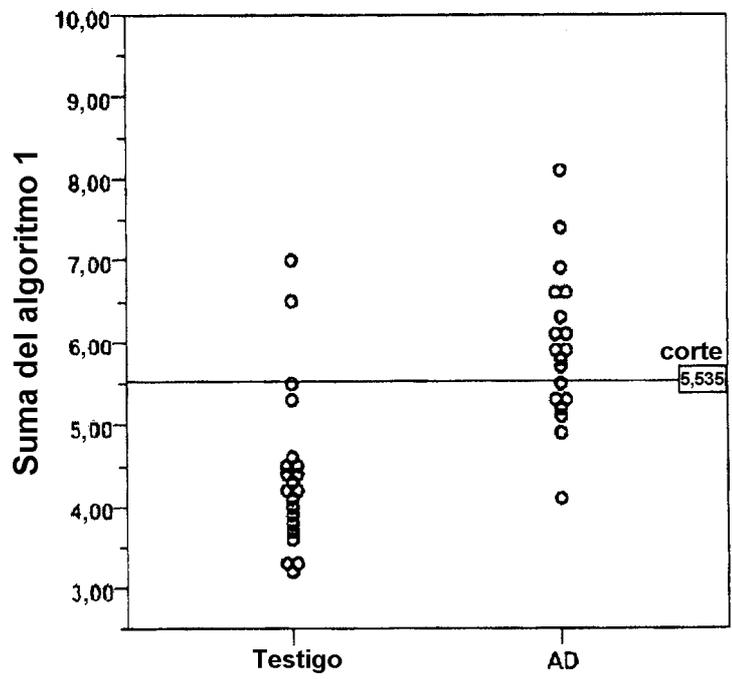


Figura 2d

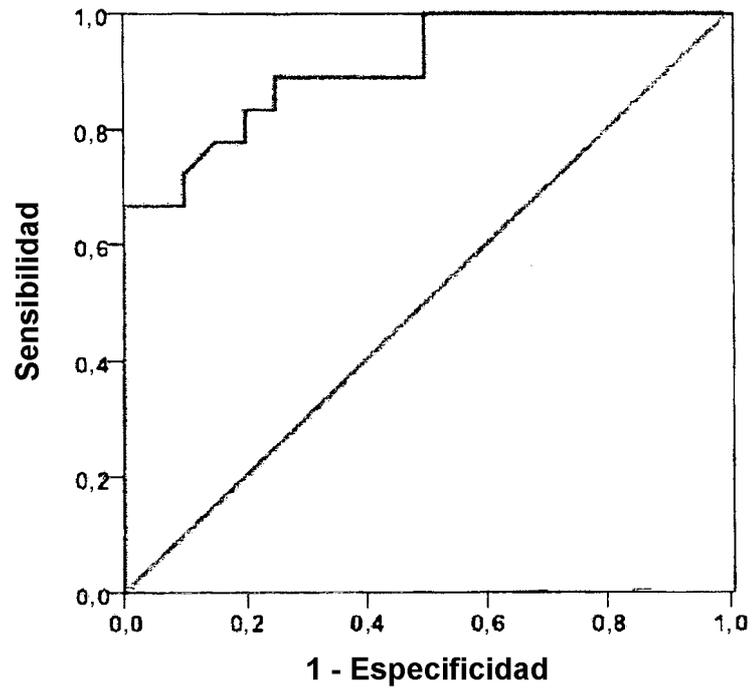


Figura 3a

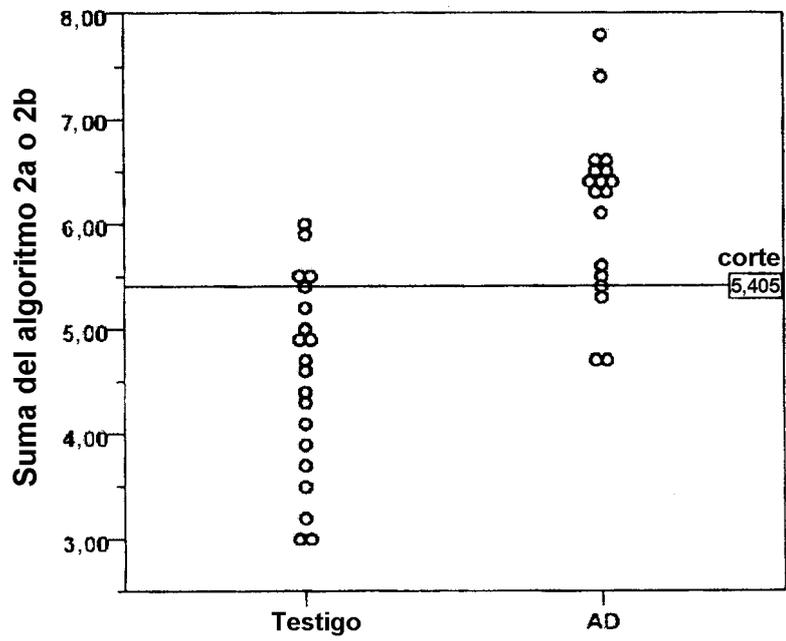


Figura 3b

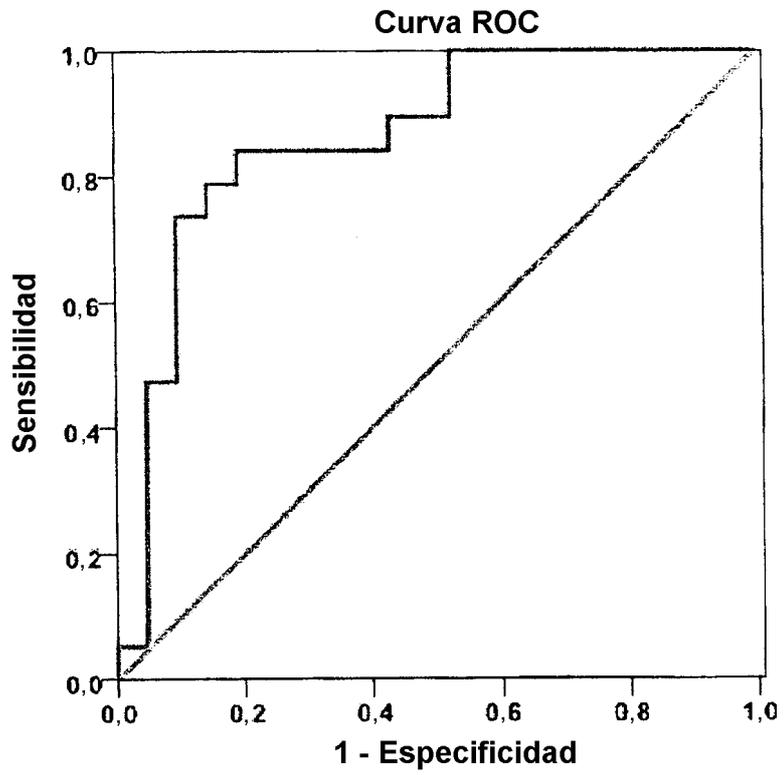


Figura 3c

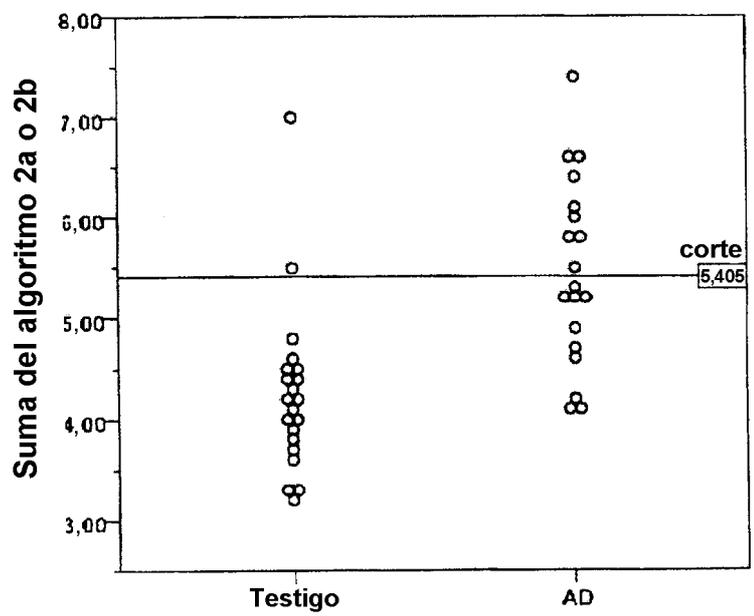


Figura 3d

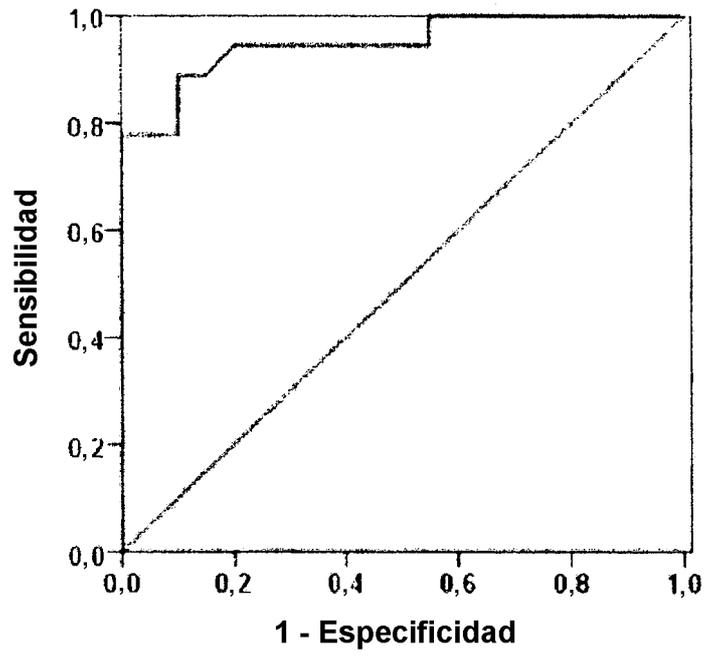


Figura 4a

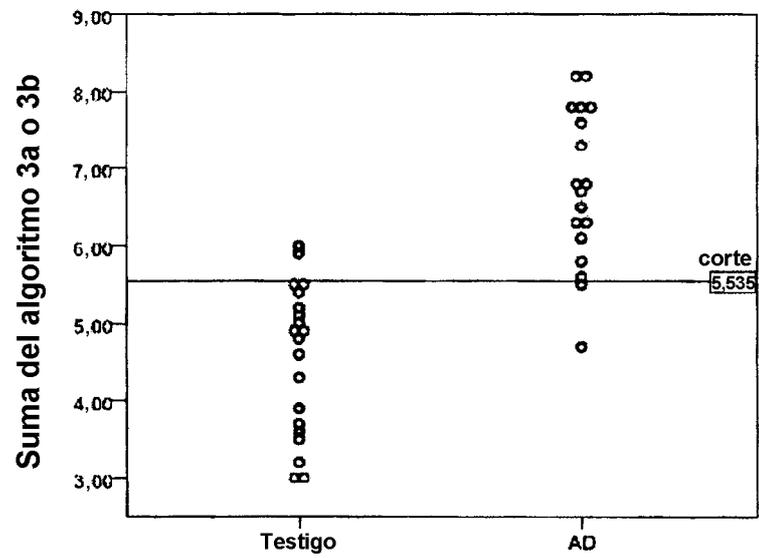


Figura 4b

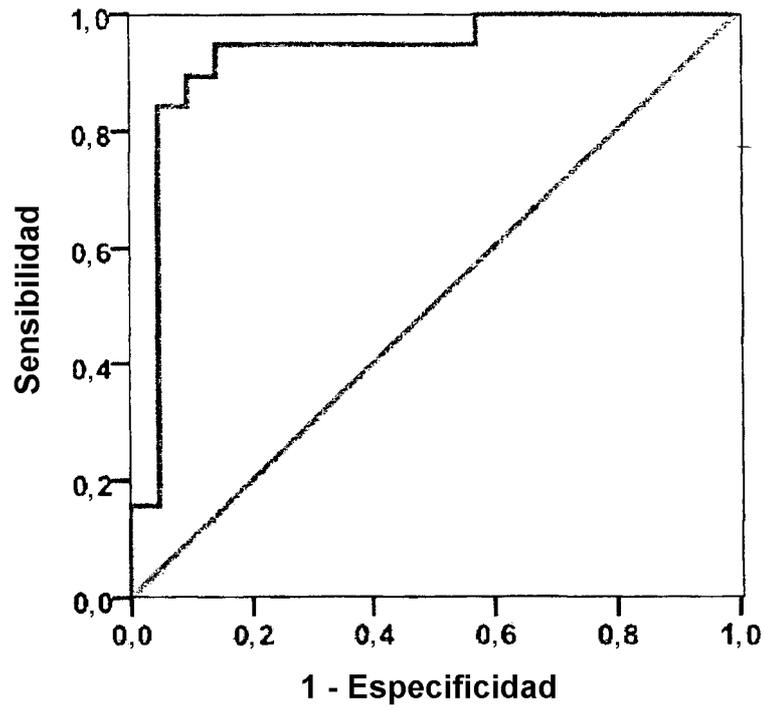


Figura 4c

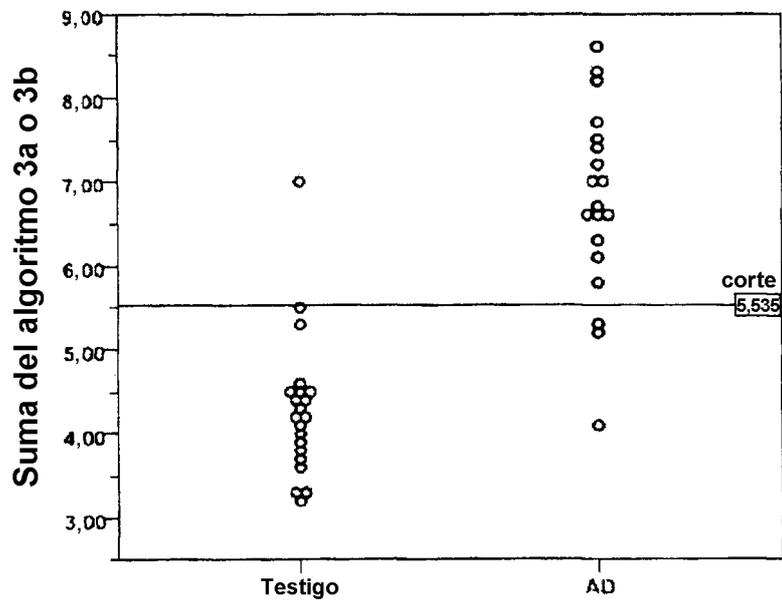


Figura 4d

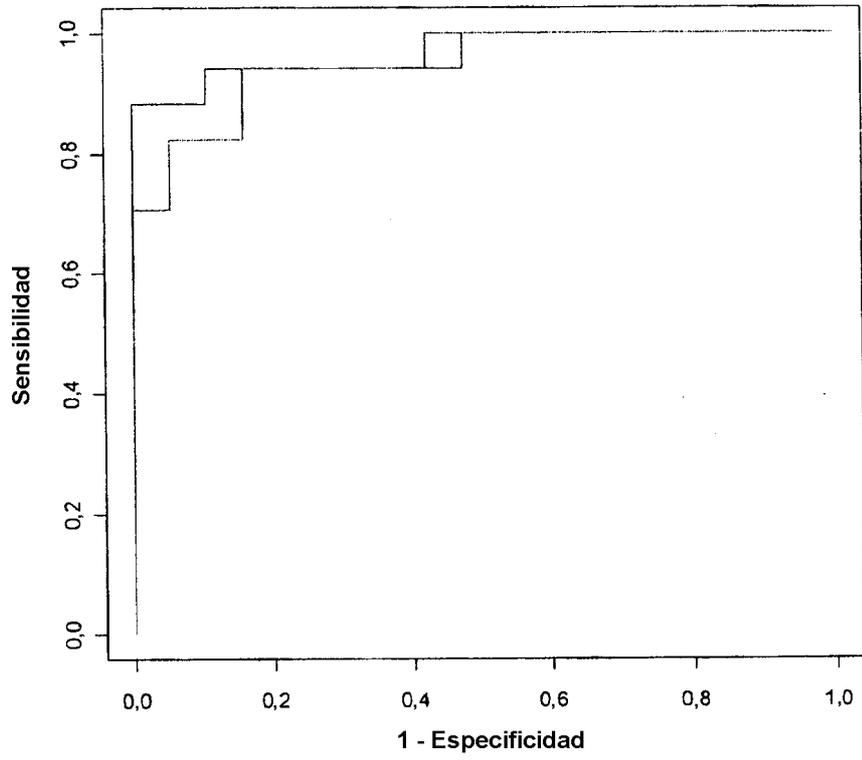


Figura 5

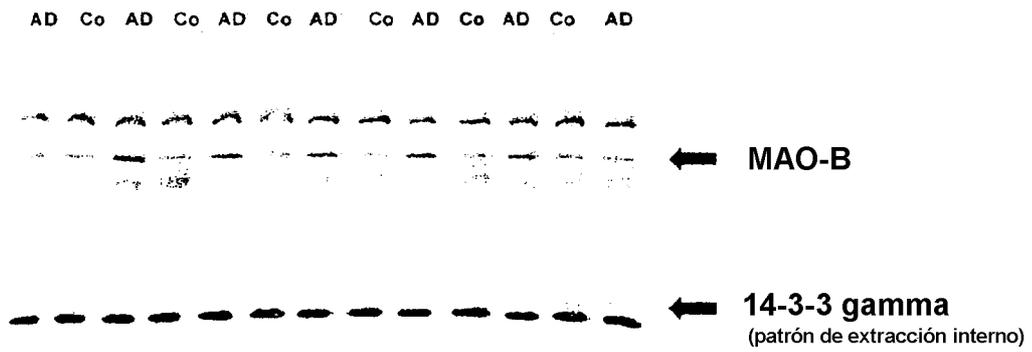


Figura 6

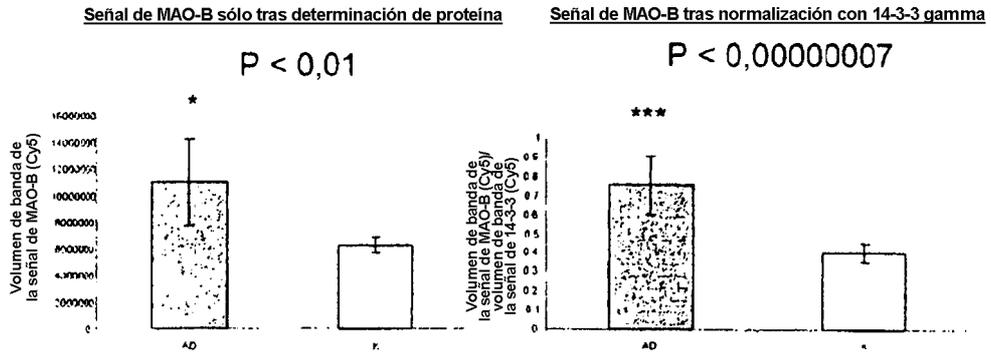


Figura 7

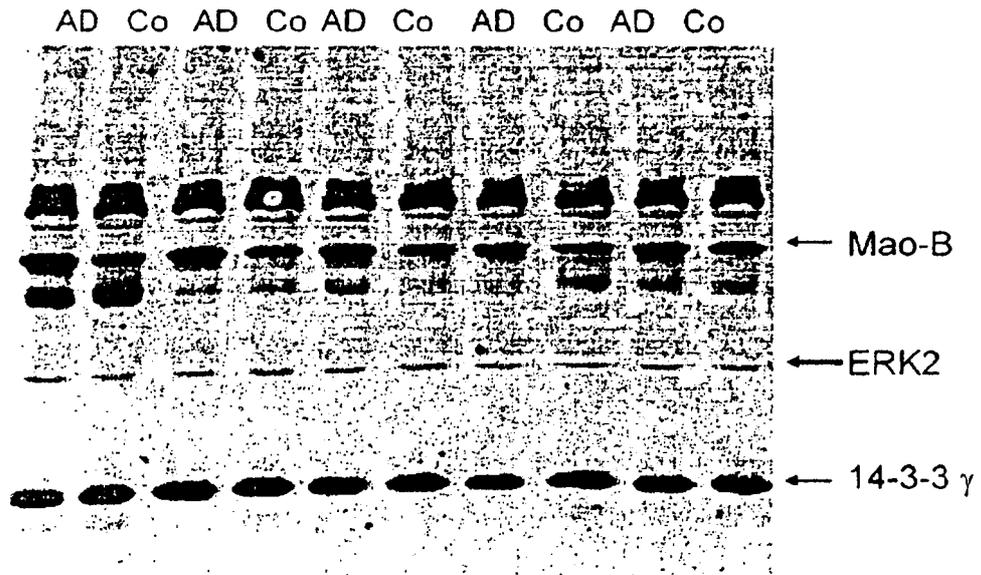


Figura 8

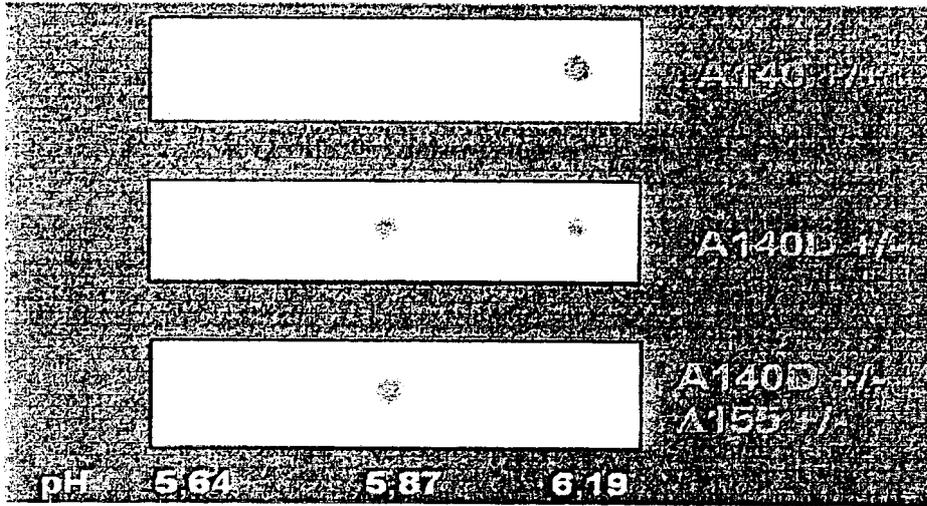


Figura 9

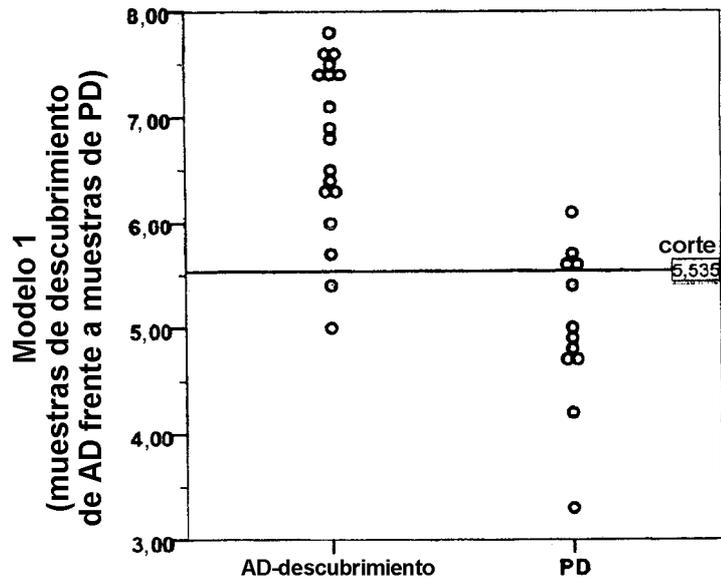


Figura 10

