

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 436**

51 Int. Cl.:

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009 E 09831209 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2373988**

54 Título: **Métodos para medir las concentraciones de biomoléculas**

30 Prioridad:

05.12.2008 US 120326 P

05.12.2008 US 120329 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2015

73 Titular/es:

**C2N DIAGNOSTICS (100.0%)
Center For Emerging Technologies 4041 Forest
Park Avenue
Saint Louis, MO 63108, US**

72 Inventor/es:

**WEST, TIM y
PAOLETTI, ANDREW COREY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 436 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 las concentraciones de biomoléculas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere en general a métodos para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, trastornos neurológicos y neurodegenerativos y procesos asociados.

INFORMACIÓN GENERAL

10 La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y es un problema creciente de la salud pública. Actualmente se estima que afecta a 5 millones de personas en los Estados Unidos, con un aumento previsto a 13 millones para el año 2050 (Herbert et al, 2001, Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 15(4): 169-173). La EA, como otras enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (SNC), se caracteriza por alteraciones en la producción, la acumulación y el aclaramiento de proteínas. En la EA, un trastorno en la regulación del metabolismo de la proteína beta-amiloide ($A\beta$), se indica por una acumulación masiva de esta proteína en los cerebros de las personas con la enfermedad. La EA conduce a una pérdida de memoria, de función cognitiva y en última instancia de independencia y muerte. La enfermedad tiene un fuerte impacto personal y financiero sobre el paciente, la familia y la sociedad. Debido a la gravedad y el aumento de la prevalencia de esta enfermedad en la población, es urgente que se desarrollen tratamientos mejores.

20 Actualmente, existen algunas medicaciones que modifican los síntomas, sin embargo, no hay tratamientos que modifiquen la enfermedad. Los tratamientos que modifican la enfermedad probablemente serán más eficaces cuando se administren antes de la aparición de un daño cerebral irreversible. Sin embargo, en el momento en el que se realiza un diagnóstico clínico de EA, ya se ha producido una gran pérdida neuronal (Price et al., 2001, Arch. Neurol. 58(9): 1395-1402). Por lo tanto, una manera de identificar los sujetos que tienen riesgo de desarrollar EA sería más útil para prevenir o retrasar la aparición de la EA. Actualmente, no hay medios para identificar los cambios fisiopatológicos que se producen en la EA, antes de la aparición de los síntomas clínicos o para medir eficazmente los efectos de tratamientos que pueden prevenir la aparición de la enfermedad o retrasar su progresión.

30 Por lo tanto, existe una necesidad de un método sensible, exacto y reproducible para cuantificar biomoléculas en un sujeto. Las tecnologías anteriores utilizadas para una cuantificación absoluta incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISAs), que utilizan anticuerpos para capturar y medir las concentraciones. Sin embargo, los ELISAs cuantifican la concentración total o dependen de anticuerpos específicos de isoformas para la cuantificación y pueden, en su mayor parte, ser utilizados para medir la concentración de una sola especie por ensayo. Los anticuerpos son altamente específicos de las especies proteicas y las conformaciones de las proteínas a las que se unen, y la dependencia de dos anticuerpos que se unen a la proteína de interés puede conducir a una alta variabilidad interensayos e intraensayos en las concentraciones descritas de ensayos ELISA. Por tanto, se necesita un método para medir la cuantificación absoluta de las concentraciones de una o varias biomoléculas en fluidos y tejidos biológicos *in vivo*, en donde las biomoléculas están asociadas con el diagnóstico y/o la progresión de enfermedades.

40 Los documentos US2004/0229283, EP1 686 372 y WO 2008/145763 describen métodos para determinar la cantidad de un polipéptido diana en una mezcla de polipéptidos, empleando un patrón interno marcado. El documento US 2008/0145941 describe métodos para un diagnóstico rápido de trastornos neurológicos. Rüfenacht P. et al., J. Mass Spectrometry 2005; 40: 193-201 describen un análisis cuantitativo de péptidos A-beta en cerebros de ratones mediante espectrometría de masas empleando patrones de A-beta marcados.

COMPENDIO DE LA INVENCION

45 Entre los diversos aspectos de la presente invención se encuentra proporcionar un método para el cálculo de la concentración de una o varias biomoléculas en un sujeto. El método incluye proporcionar una muestra de un sujeto al que se ha administrado previamente uno o varios aminoácidos marcados, en donde los aminoácidos marcados se han incorporado en una proteína o péptido sintetizado en el SNC, de modo que la muestra comprende una fracción marcada de una proteína o péptido sintetizado en el SNC y una fracción sin marcar de una proteína o péptido sintetizado en el SNC, y poner en contacto una muestra del sujeto con un Patrón de Cuantificación, en donde el Patrón de Cuantificación es una concentración conocida de una biomolécula marcada de interés. El método incluye además aislar la biomolécula de interés a partir de la muestra y determinar una proporción entre las biomoléculas marcadas y sin marcar en la muestra, que se utiliza de este modo para calcular la concentración de biomolécula sin marcar en la muestra. En una realización, el método incluye además normalizar la concentración calculada con una curva de calibración, en donde la curva de calibración se genera mediante la determinación de dos o más proporciones entre biomoléculas sin marcar y el Patrón de Cuantificación, siendo conocida la concentración de la biomolécula sin marcar.

En esta memoria se describe un método *in vivo* para cuantificar la concentración de una o varias biomoléculas en un sujeto. El método incluye la administración de uno o varios aminoácidos marcados al sujeto, en donde los aminoácidos marcados se incorporan en una biomolécula de interés en el sujeto. El método incluye además la obtención de una muestra de fluido o tejido biológico a partir del sujeto, en donde la muestra incluye una fracción de biomolécula marcada y una fracción de biomolécula sin marcar. Después la muestra se pone en contacto con un Patrón de Cuantificación, en donde el Patrón de Cuantificación incluye una concentración conocida de una biomolécula marcada con un resto que tiene un peso molecular que difiere del uno o varios aminoácidos marcados administrados al sujeto. La proporción entre las biomoléculas marcadas y el Patrón de Cuantificación y la proporción entre las biomolécula sin marcar y el Patrón de Cuantificación se pueden usar entonces para calcular las concentraciones de ambas biomoléculas marcadas y sin marcar, respectivamente. En una realización, el cálculo de la concentración de biomolécula sin marcar comprende multiplicar la concentración del Patrón de Cuantificación con la proporción determinada entre la biomolécula sin marcar y el Patrón de Cuantificación. En otra realización, el cálculo de la concentración de la biomolécula marcada comprende multiplicar la concentración del Patrón de Cuantificación con la proporción determinada entre biomoléculas marcadas y el Patrón de Cuantificación. En aún otra realización, las concentraciones calculadas de biomoléculas sin marcar y marcadas se normalizan con cada una de sus curvas de calibración individuales, en donde la curva de calibración se genera mediante la determinación de dos o más proporciones entre las biomoléculas sin marcar y marcadas y el Patrón de Cuantificación, conociéndose la concentración de biomoléculas sin marcar y marcadas.

En esta memoria se describe un método para medir el metabolismo *in vivo* de una o varias biomoléculas producidas en el sistema nervioso central de un sujeto. El método comprende administrar un resto marcado al sujeto, en donde el resto marcado es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y de incorporarse en la(s) biomolécula(s) cuando una o varias biomoléculas se producen en el sistema nervioso central del sujeto. El método comprende además obtener una muestra del sistema nervioso central del sujeto, en donde la muestra del sistema nervioso central es un tejido o fluido del sistema nervioso central. La muestra del sistema nervioso central comprende una fracción de biomolécula marcada en la que el resto marcado se incorpora en una o varias biomoléculas, y una fracción de biomolécula sin marcar en la que el resto marcado no se incorpora en una o varias biomoléculas. La etapa final del procedimiento comprende detectar la cantidad de biomolécula marcada y la cantidad de biomolécula sin marcar para cada una de las biomoléculas, en donde la proporción entre biomolécula marcada y biomolécula sin marcar para cada biomolécula es directamente proporcional al metabolismo de dicha biomolécula en el sujeto.

En esta memoria se describe un método para determinar si un agente terapéutico afecta al metabolismo de una biomolécula producida en el sistema nervioso central de un sujeto. El método comprende la administración de un agente terapéutico y un resto marcado al sujeto, en donde el resto marcado es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica e incorporarse en la biomolécula a medida que se produce en el sistema nervioso central del sujeto. El método comprende además obtener una muestra biológica del sujeto, en donde la muestra biológica comprende una fracción de biomolécula marcada en la que el resto marcado se incorpora en la biomolécula, y una fracción de biomolécula sin marcar en la que el resto marcado no se incorpora en la biomolécula. La siguiente etapa del procedimiento comprende detectar la cantidad de biomoléculas marcadas y la cantidad de biomoléculas sin marcar, en donde la proporción entre biomoléculas marcadas y biomoléculas sin marcar es directamente proporcional al metabolismo de la biomolécula en el sujeto. La etapa final del procedimiento comprende comparar el metabolismo de la biomolécula en el sujeto con un valor de control adecuado, en donde un cambio del valor de control indica que el agente terapéutico afecta al metabolismo de la biomolécula en el sistema nervioso central del sujeto.

En esta memoria se describe un kit para realizar los métodos de la invención. En una realización, se proporciona un kit para el diagnóstico y/o la vigilancia de la progresión o el tratamiento de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa en un sujeto. El kit incluye uno o varios restos marcados (por ejemplo, aminoácidos marcados) y un medio para la administración de uno o varios aminoácidos al sujeto. El kit puede incluir además un medio para obtener una muestra biológica a intervalos de tiempo regulares a partir del sujeto. En ciertas realizaciones, el kit también incluirá instrucciones para detectar y determinar la proporción entre las biomoléculas marcadas y sin marcar de interés a lo largo del tiempo y para calcular la concentración de la biomolécula no marcada. En una realización, las instrucciones describirán métodos para comparar la concentración calculada con ciertos patrones y/o controles, tal y como se describe en esta memoria.

El resto marcado puede incluir un isótopo no radiactivo que se selecciona a partir del grupo que consiste en ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S . En una realización, el resto marcado es un aminoácido marcado, tal como un aminoácido esencial. Aminoácidos esenciales ejemplares incluyen, pero no se limitan a leucina, isoleucina y fenilalanina. Por tanto, en una realización, el resto marcado es $^{13}\text{C}_x$ -leucina, en donde $x = 1$ a 6. En otra realización, el resto marcado es un aminoácido marcado en ^{15}N . En otra realización, el resto marcado es una fenilalanina marcada en $^{13}\text{C}_x$, en donde $x = 1$ a 9. En otra realización, el resto marcado es una isoleucina marcada en $^{13}\text{C}_x$, en donde $x = 1$ a 6. En otra realización, el resto marcado es una isoleucina marcada en $^{13}\text{C}_x$ y una fenilalanina marcada en $^{13}\text{C}_y$, en donde $x = 1$ a 6, e $y = 1$ a 9.

La biomolécula es un péptido o una proteína que se sintetiza en el sistema nervioso central (SNC), tal como beta-amiloide (A β), alfa-sinucleína, Tau, apolipoproteína E, apolipoproteína J, proteína precursora amiloide (APP), alfa-2-macroglobulina, S100B, proteína básica de mielina, TDP-43, superóxido dismutasa-1, huntingtina, una interleucina y

TNF. En aspectos de la invención en los que se someten a ensayo dos o varias biomoléculas, las biomoléculas pueden ser isoformas de la misma proteína. Por tanto, en una realización, la biomolécula puede ser una o varias entre Aβ 1-16, Aβ 1-17, Aβ 1-37, Aβ 1-38, Aβ 1-39, Aβ 1-40, Aβ 1-41, Aβ 1-42 y Aβ 1-43.

Otros aspectos y características de la invención se describen con más detalle a continuación.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una representación gráfica que muestra los resultados de una cromatografía de los diferentes péptidos trípticos Aβ (Abeta) aislados a partir de medios de cultivos celulares que muestran los picos de Aβ 17-28, Aβ 29-37, Aβ 29-38, Aβ 29-39, Aβ 29-40 y Aβ 29-42.

10 La Figura 2 es una representación gráfica que muestra las curvas de calibración de los medios. Se analizaron las proporciones con marcado para cada una de las diferentes isoformas 29-x de Aβ (Abeta), así como el péptido 17-28, en medios con diferente porcentaje de marcado. TTR representa la proporción entre marcador y sustrato natural que se marca (TTR, del inglés "tracer to tracee ratio").

Las Figuras 3 y 4 son representaciones gráficas que muestran que un Patrón de Cuantificación se puede utilizar para calcular la proporción entre péptidos endógenos y péptidos adicionados.

15 La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la concentración absoluta de Aβ (Abeta) tal y como se mide en muestras de medios procedentes de células secretoras de Aβ.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el marcado de biomoléculas con isótopos estables conduce a pequeñas diferencias en el peso molecular de las biomoléculas, pero no altera las propiedades físicas o químicas de las biomoléculas. Utilizando las técnicas proporcionadas en este documento, el análisis de biomoléculas se puede utilizar para diagnosticar y/o tratar un sujeto que tiene un trastorno neurológico o neurodegenerativo o tiene riesgo de desarrollarlo. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos y kits útiles para calcular la concentración de una o varias biomoléculas de interés en un sujeto.

25 En esta memoria se describe un método para evaluar si un agente terapéutico afecta a la tasa de producción o de aclaramiento de biomoléculas en el sujeto, en donde las biomoléculas son relevantes para enfermedades neurológicas o neurodegenerativas. Por consiguiente, el método se puede utilizar para determinar las dosis óptimas y/o los regímenes de dosificación óptimos del agente terapéutico. Además, el método se puede utilizar para determinar qué sujetos responden mejor a un agente terapéutico particular. Por ejemplo, los sujetos con una producción incrementada de la biomolécula pueden responder mejor a un agente terapéutico, mientras que los sujetos con un aclaramiento disminuido de la biomolécula pueden responder mejor a otro agente terapéutico. Alternativamente, los sujetos con un genotipo particular pueden responder mejor a un agente terapéutico particular que aquellos con un genotipo diferente. Finalmente, al permitir una cuantificación específica de las isoformas, el método se puede utilizar para determinar si un agente terapéutico puede modular la producción de una biomolécula cambiando la producción de una isoforma a otra isoforma de la misma biomolécula.

35 Tal y como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el, ella" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o varios métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento, que serán evidentes para los expertos en la técnica después de leer esta descripción y etc.

40 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entendiéndolo comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la puesta en práctica o en los ensayos de la invención se puede utilizar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

45 El término "sujeto" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier individuo o paciente sobre el que se llevan a cabo los métodos objeto. Generalmente, el sujeto es humano, aunque como será apreciado por los expertos en la técnica, el sujeto puede ser un animal. Por tanto, otros animales, que incluyen mamíferos tales como roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsteres y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja incluyendo vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc. y primates (incluyendo monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) están incluidos dentro de la definición de sujeto. Además, el término "sujeto" puede referirse a un cultivo de células, en el que los métodos de la invención se llevan a cabo *in vitro* para evaluar, por ejemplo, la eficacia de un agente terapéutico.

50 Tal como se usa en este documento, los términos y expresiones "muestra" y "muestra biológica" se refieren a cualquier muestra adecuada para los métodos proporcionados por la presente invención. Una muestra de células utilizada en el presente método se puede obtener a partir de muestras tisulares o de un fluido corporal de un sujeto, o un tejido obtenido por un procedimiento de biopsia (por ejemplo, una biopsia por punción) o un procedimiento

quirúrgico. En ciertas realizaciones, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de fluido corporal, por ejemplo, líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, plasma, orina, saliva y lágrimas.

Como se describe en el presente documento, el marcado de biomoléculas con isótopos estables conduce a pequeñas diferencias en el peso molecular de las biomoléculas, pero no altera las propiedades físicas o químicas de las biomoléculas. Por lo tanto, las biomoléculas se unirán a los anticuerpos y se extraerán por elución en una columna de cromatografía líquida de una manera idéntica. Instrumentos sensibles, tales como los espectrómetros de masas, proporcionan la capacidad de medir pequeñas diferencias de peso entre biomoléculas marcadas y sin marcar.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para calcular la concentración de una biomolécula en un sujeto. El método incluye poner en contacto una muestra del sujeto con un Patrón de Cuantificación. Tal y como se emplea en esta memoria, un "Patrón de Cuantificación" se refiere a una concentración conocida de una biomolécula marcada, que tiene un peso molecular distinto de otras biomoléculas marcadas o sin marcar que pueden existir en la muestra. A continuación, un dispositivo de medición sensible, tal como un espectrómetro de masas, un espectrómetro de masas en tándem o una combinación de ambos, se utiliza para medir la proporción entre las biomoléculas marcadas y sin marcar. Dado que las propiedades físicas de las biomoléculas marcadas y sin marcar son idénticas, la proporción medida por el espectrómetro de masas es idéntica a la proporción en la muestra original. Por lo tanto, mediante la adición de una cantidad conocida de una o varias biomoléculas, cada una marcada con un solo marcador isotópico, la invención proporciona la capacidad de cuantificar la cantidad de esas biomoléculas que tienen una composición isotópica diferente.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término "biomolécula" se refiere a cualquier molécula orgánica en un organismo vivo. Biomoléculas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, péptidos, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. En la presente invención, la biomolécula es un péptido, tal como una proteína, que se sintetiza en el sistema nervioso central (SNC) del sujeto. Proteínas ejemplares que se pueden medir pero que no están limitadas a las mismas, pueden incluir β -amiloide (A β) y sus variantes, proteína precursora de amiloide soluble (APP), apolipoproteína E (isoformas 2, 3 o 4), apolipoproteína J (también llamada clusterina), Tau (asociada con la enfermedad de Alzheimer), fosfo Tau, proteína ácida glial fibrilar, alfa-2 macroglobulina, alfa-sinucleína, S100B, proteína básica de la mielina (implicada en la esclerosis múltiple), priones, interleucinas, TDP-43, superóxido dismutasa-1, huntingtina, factor de necrosis tumoral (TNF), proteína de choque térmico 90 (HSP90), y combinaciones de las mismas. Biomoléculas adicionales que pueden ser diana incluyen productos de, o proteínas o péptidos que interactúan con, neuronas GABAérgicas, neuronas noradrenérgicas, neuronas histaminérgicas, neuronas serotonérgicas, neuronas dopaminérgicas, neuronas colinérgicas y neuronas glutaminérgicas. La proteína cuya concentración se puede medir *in vivo*, puede ser una proteína apolipoproteína E. La proteína cuya concentración se puede medir *in vivo*, puede ser alfa-sinucleína. En la invención, la proteína cuya concentración se mide *in vivo* puede ser A β o sus variantes o isoformas. Isoformas ejemplares de A β cuyas concentraciones se pueden medir incluyen, pero no se limitan a, A β 1-16, A β 1-17, A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, A β 1-41, A β 1-42 y A β 1-43.

A modo de ejemplo y no como una limitación, se observa que existen varias isoformas que son únicas en el extremo C-terminal de A β en el LCR. La digestión con tripsina de estos péptidos proporciona un péptido 29-x que es único para cada isoforma, véase la Tabla 1. Por lo tanto, la cuantificación de la isoforma 29-x permite el cálculo de la concentración de estas isoformas en el fluido biológico inicial.

Tabla 1: Ubicación de los sitios de escisión de tripsina en las principales isoformas de A β . Los péptidos C-terminales (29-x, GAIL...) son los péptidos que difieren entre las distintas isoformas.

A β 37	DAEFR_HDSGYEVHHQK_LVFFAEDVGSNK_GAIIGLMVG	SEQ ID NO: 1
A β 38	DAEFR_HDSGYEVHHQK_LVFFAEDVGSNK_GAIIGLMVGG	SEQ ID NO: 2
A β 39	DAEFR_HDSGYEVHHQK_LVFFAEDVGSNK_GAIIGLMVGGV	SEQ ID NO: 3
A β 40	DAEFR_HDSGYEVHHQK_LVFFAEDVGSNK_GAIIGLMVGGVV	SEQ ID NO: 4
A β 42	DAEFR_HDSGYEVHHQK_LVFFAEDVGSNK_GAIIGLMVGGVIA	SEQ ID NO: 5

De este modo, los métodos proporcionan la capacidad de medir concentraciones de fragmentos de diferentes isoformas de A β , tales como fragmentos producidos después de la digestión con una endoproteasa (por ejemplo, tripsina o proteasa V8). Fragmentos ejemplares de isoformas de A β incluyen, pero no se limitan a fragmentos peptídicos N-terminales (por ejemplo, A β 1-5, A β 1-16), fragmentos de dominios medios (por ejemplo, A β 17-28) y fragmentos peptídicos C-terminales (por ejemplo, péptidos 29-x, como A β 29-37, A β 29-38, A β 29-39, A β 29-40 y A β 29-42).

Tal y como se emplea en esta memoria, la expresión "ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, de cadena sencilla, de cadena doble o de cadena triple y a cualquier modificación química de los mismos. Se contempla prácticamente

cualquier modificación del ácido nucleico. Una "molécula de ácido nucleico" puede tener casi cualquier longitud, desde 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000, 75000, 100000, 150000, 200000, 500000, 1000000, 1500000, 2000000, 5000000 o incluso más bases de longitud, hasta una molécula de ADN cromosómico de longitud completa.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a dos o varios residuos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o varios residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural, los que contienen residuos modificados, y polímeros de aminoácidos de origen no natural. "Polipéptido" se refiere tanto a cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Del mismo modo, "proteína" se refiere a al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. Una proteína puede estar compuesta de aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos, o de estructuras peptidomiméticas sintéticas. Por lo tanto, "aminoácido" o "residuo peptídico", tal y como se usa en esta memoria significa tanto aminoácidos de origen natural como sintéticos. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. "Aminoácido" incluye también residuos de iminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. Las cadenas laterales pueden tener la configuración (R) o (S).

Se pueden utilizar varios restos diferentes para marcar la biomolécula de interés. En términos generales, los dos tipos de restos de marcadores utilizados en el método de la invención son isótopos radiactivos e isótopos no radiactivos (estables). En una realización, los isótopos no radiactivos se pueden utilizar y medir por espectrometría de masas. Isótopos estables preferidos incluyen deuterio (^2H), ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O o ^{18}O y ^{33}S , ^{34}S o ^{36}S , pero se admite que una cantidad de otros isótopos estables que cambian la masa de un átomo por más o menos neutrones que los que se observan en la forma natural prevalente, también serían eficaces. Un marcador adecuado generalmente cambiará la masa de la biomolécula en estudio de modo que se pueda detectar en un espectrómetro de masas. En una realización, la biomolécula que se va a medir puede ser un péptido o una proteína, y el resto marcado puede ser un aminoácido que comprende un isótopo no radiactivo (por ejemplo, ^{13}C). En otra realización, la biomolécula que se va a medir puede ser un ácido nucleico, y el resto marcado puede ser un nucleósido trifosfato que comprende un isótopo no radiactivo (por ejemplo, ^{15}N). Alternativamente, se puede utilizar un isótopo radioactivo y las biomoléculas marcadas se pueden medir con un contador de centelleo (o a través de gammagrafía nuclear), así como con un espectrómetro de masas. Uno o varios restos marcados se pueden utilizar simultáneamente o en secuencia.

Por lo tanto, en una realización, cuando se emplea el método para medir la concentración de proteínas, el resto marcado será típicamente un aminoácido. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden utilizar varios aminoácidos para proporcionar el marcado de biomoléculas. Generalmente, la elección del aminoácido se basa en una variedad de factores tales como: (1) El aminoácido generalmente está presente en al menos un residuo de la proteína o el péptido de interés. (2) El aminoácido generalmente es capaz de alcanzar rápidamente el sitio de producción de la proteína y equilibrarse rápidamente a través de la barrera hematoencefálica u otras barreras tisulares o celulares. (3) El marcador de los aminoácidos generalmente no influye en el metabolismo de la proteína de interés (por ejemplo, dosis muy elevadas de leucina pueden afectar al metabolismo muscular). Y (5) la disponibilidad del aminoácido deseado (es decir, algunos aminoácidos son mucho más caros o más difíciles de preparar que otros).

En una realización, el aminoácido es un aminoácido esencial (no producido por el organismo), de modo que se puede lograr un mayor porcentaje de marcado. En otra realización, el aminoácido es un aminoácido no esencial. Los aminoácidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, leucina, isoleucina y fenilalanina. Como tal, en una realización, el aminoácido marcado es uno o varios de un aminoácido marcado en ^{15}N , una fenilalanina marcada en $^{13}\text{C}_x$, en donde $x = 1$ a 9, una isoleucina marcada en $^{13}\text{C}_x$, en donde $x = 1$ a 6. Por ejemplo, una fenilalanina $^{13}\text{C}_6$, que contiene seis átomos de ^{13}C se puede utilizar para marcar una biomolécula de interés (por ejemplo, una proteína obtenida a partir del SNC). En otra realización, una leucina $^{13}\text{C}_6$ se puede utilizar para marcar una biomolécula de interés (por ejemplo, una proteína obtenida a partir del SNC). En aún otra realización, una leucina $^{13}\text{C}_6$ se usa para marcar A β .

Existen numerosas fuentes comerciales de aminoácidos marcados, tanto isótopos no radiactivos como isótopos radiactivos. Generalmente, los aminoácidos marcados se pueden producir de forma biológica o sintética. Los aminoácidos producidos biológicamente se pueden obtener a partir de un organismo (por ejemplo, alga parda/alga marina) que crece en una mezcla enriquecida de ^{13}C , ^{15}N , u otro isótopo que se incorpora en los aminoácidos cuando el organismo produce proteínas. Los aminoácidos se separan a continuación y se purifican. Alternativamente, los aminoácidos se pueden preparar por procedimientos químicos sintéticos conocidos.

El resto marcado (por ejemplo, el aminoácido marcado) se puede administrar a un sujeto mediante varios métodos. Las vías de administración adecuadas incluyen la vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular u oral. En una realización, el resto marcado se puede administrar por infusión intravenosa. En otra realización, el resto marcado se puede ingerir oralmente.

El resto marcado se puede administrar lentamente durante un período de tiempo, como una dosis única grande dependiendo del tipo de análisis seleccionado (por ejemplo, estado estacionario o bolo/Chase), o lentamente durante un período de tiempo después de una dosis inicial en bolo. Para lograr niveles de estado estacionario de la biomolécula marcada, el tiempo de marcado debe tener generalmente una duración suficiente para que la biomolécula marcada se pueda cuantificar de forma fiable. El resto marcado se puede administrar como una dosis oral única. El resto marcado se puede administrar durante un período de tiempo que varía desde aproximadamente una hora a aproximadamente 36 horas. El resto marcado se puede administrar durante un período de tiempo que varía desde aproximadamente 6 horas a aproximadamente 12 horas. El resto marcado se puede administrar durante un período de tiempo que varía desde aproximadamente 9 horas a aproximadamente 12 horas. El resto marcado se puede administrar durante un período de tiempo que varía desde aproximadamente 9 horas a aproximadamente 24 horas.

La tasa de administración del resto marcado puede variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg/h a aproximadamente 5 mg/kg/h. La tasa de administración de leucina marcada puede ser de aproximadamente 1 mg/kg/h a aproximadamente 3 mg/kg/h. La tasa de administración de leucina marcada puede ser de 1,8 mg/kg/h a aproximadamente 2,5 mg/kg/h. La leucina marcada se puede administrar como un bolo de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal del sujeto, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal del sujeto. La leucina marcada se puede administrar como un bolo de aproximadamente 200 mg/kg de peso corporal del sujeto. La leucina marcada se puede administrar por vía intravenosa como se ha detallado anteriormente después de un bolo inicial de entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 4 mg/kg, o aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal del sujeto.

Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad (o dosis) del resto marcado puede variar y variará. Generalmente, la cantidad depende (y se estima a partir) de los siguientes factores: (1) El tipo de análisis deseado. Por ejemplo, para alcanzar un estado estacionario de aproximadamente 15% de leucina marcada en plasma se requiere aproximadamente 2 mg/kg/h durante aproximadamente 9 horas después de un bolo inicial de 2 mg/kg durante 10 min. En contraste, si no se requiere un estado estacionario, se puede administrar inicialmente un gran bolo de resto marcado (por ejemplo, 1 o 5 gramos de leucina marcada). (2) La proteína que se analiza. Por ejemplo, si la proteína se está produciendo rápidamente, entonces puede ser necesario menos tiempo de marcado y menos marcador - quizás tan solo 0,5 mg/kg durante 1 hora. Sin embargo, la mayoría de las proteínas tienen semividas de horas a días, por lo que es más probable, que se emplee una infusión continua durante 4, 9 o 12 horas, desde 0,5 mg/kg a 4 mg/kg. Y (3) la sensibilidad de la detección del marcador. Por ejemplo, cuando se incrementa la sensibilidad de la detección del marcador, la cantidad de marcador que se necesita puede disminuir.

Se debe entender que se puede utilizar más de un resto marcado en un solo sujeto. Esto permitiría un marcado múltiple de la misma biomolécula y puede proporcionar información sobre la producción o el aclaramiento de esa biomolécula en diferentes momentos. Por ejemplo, se puede proporcionar al sujeto un primer marcador durante un período de tiempo inicial, seguido de un agente farmacológico (fármaco), y luego se puede administrar un segundo marcador. En general, el análisis de las muestras obtenidas a partir del sujeto proporcionará una medición de las concentraciones de biomoléculas de interés antes Y después de la administración del fármaco, midiendo directamente el efecto farmacodinámico del fármaco en el mismo sujeto. Alternativamente, se pueden utilizar múltiples marcadores al mismo tiempo para aumentar el marcado de la biomolécula.

Por lo tanto, una vez establecida la enfermedad e iniciado un protocolo de tratamiento, los métodos de la invención se pueden repetir sobre una base regular para vigilar la(s) concentración(es) de biomolécula(s) de interés en el sujeto. Los resultados obtenidos a partir de ensayos sucesivos se pueden utilizar para mostrar la eficacia del tratamiento durante un período de tiempo que oscila entre varios días a meses. Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a métodos para el seguimiento de un régimen terapéutico para el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno neurológico o neurodegenerativo. Una comparación de la(s) concentración(es) de biomolécula(s) de interés antes y durante la terapia será indicativa de la eficacia de la terapia. Por lo tanto, un experto en la técnica será capaz de reconocer y ajustar la metodología terapéutica según sea necesario.

Se describe que una muestra se obtiene a partir del sujeto de modo que se puede determinar la concentración *in vivo* de una o varias biomoléculas de interés. En una realización, la muestra es un fluido corporal. Los fluidos corporales adecuados incluyen, pero no se limitan a, líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, saliva, sudor y lágrimas. Se debe entender que los fluidos biológicos contienen normalmente una multitud de biomoléculas cuantificables. Por ejemplo, cuando la muestra es LCR, las biomoléculas ejemplares que se pueden cuantificar incluyen, pero no se limitan a, proteína beta-amiloide, variantes de la proteína beta-amiloide (A β), productos de la digestión de la proteína beta-amiloide, proteína precursora amiloide (APP), apolipoproteína E, apolipoproteína J, Tau, alfa-sinucleína o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido, tal como una muestra de tejido procedente del sistema nervioso central (SNC). La muestra generalmente será recogida usando procedimientos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización, la muestra es una muestra del SNC, que incluye, pero no se limita a, tejido procedente del sistema nervioso central, que comprende tejido cerebral y tejido de la médula espinal. En una realización de la invención, la muestra del SNC se puede tomar a partir de tejido cerebral, incluyendo, pero no limitado a, tejido del

cerebro anterior (por ejemplo, corteza cerebral, ganglios basales, hipocampo), el diencefalo (por ejemplo, tálamo, hipotálamo, subtálamo), el cerebro medio (por ejemplo, tectum, tegmento) o el cerebro posterior (por ejemplo, puente, cerebelo, bulbo raquídeo). En otra realización, la muestra del SNC se puede recoger a partir de tejido de la médula espinal. En todavía otras realizaciones, se pueden tomar muestras del SNC a partir de más de una región del SNC. En consecuencia, la concentración de una biomolécula de interés se puede medir en diferentes muestras del SNC, por ejemplo, en la corteza y el hipocampo, de forma simultánea.

Las muestras del SNC se pueden obtener a través de técnicas conocidas. Por ejemplo, el tejido cerebral o el tejido de la médula espinal se pueden obtener a través de una disección o resección. Alternativamente, las muestras del SNC se pueden obtener usando microdisección por láser. El sujeto se puede sacrificar o no para obtener la muestra, dependiendo de la muestra de SNC deseada y del sujeto utilizado.

En general, cuando la biomolécula bajo estudio es un péptido o una proteína, la invención proporciona una primera muestra de un sujeto, antes de la administración del resto marcado para proporcionar un punto de referencia. Después de la administración del resto marcado (por ejemplo, un aminoácido marcado), se proporcionan una o varias muestras. Como será apreciado por los expertos en la técnica, el número de muestras y cuándo se toman las muestras generalmente dependerá de una variedad de factores tales como: el tipo de análisis, el tipo de administración, la proteína de interés, la tasa metabólica, el tipo de detección y el tipo de sujeto.

En una realización, la muestra que se proporciona es del sujeto en un solo momento predeterminado, por ejemplo, al cabo de una hora del marcado. En general, para proteínas con metabolismo rápido, las muestras obtenidas durante las primeras 12-18 horas después del inicio de la administración del resto marcado, se pueden utilizar para determinar la tasa de producción de la biomolécula de interés, y las muestras tomadas durante 24-36 h después del inicio de la administración del resto marcado, se pueden utilizar para determinar la tasa de aclaramiento de la biomolécula de interés. En otra realización, la muestra se obtiene a partir del sujeto cada hora desde 0 a 12 horas, de 0 a 24 horas o de 0 a 36 horas. En aún otra realización, las muestras se pueden tomar desde una hora a días o incluso semanas, dependiendo de las tasas de producción y aclaramiento de la biomolécula de interés.

Se debe entender que si se desean muestras en diferentes puntos de tiempo, se debe utilizar más de un sujeto. Por ejemplo, se puede utilizar un sujeto para una muestra de referencia, otro sujeto para un punto de tiempo una hora después de la administración del resto marcado, otro sujeto para un punto de tiempo seis horas después de la administración del resto marcado.

Por consiguiente, la presente invención proporciona que la detección de la cantidad de biomolécula marcada y de la cantidad de biomolécula sin marcar en la muestra se puede utilizar para determinar la proporción entre biomoléculas marcadas y biomoléculas sin marcar, que a su vez, se puede utilizar para calcular la concentración de la biomolécula de interés en el sujeto. En una realización, la proporción se determina por medio de la detección de cambios en la masa de la biomolécula marcada (por ejemplo, péptido o proteína) con respecto a la biomolécula sin marcar. Los medios ejemplares para detectar diferencias en la masa entre las biomoléculas marcadas y la biomolécula sin marcar incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas para cromatografía líquida, espectrometría de masas para cromatografía de gases, espectrometría de masas MALDI-TOF y espectrometría de masas en tándem.

Sin embargo, antes de detectar la proporción entre biomolécula marcada y biomolécula sin marcar, puede ser deseable aislar y/o separar la biomolécula de interés de otras biomoléculas en la muestra. Por lo tanto, en una realización, la inmunoprecipitación se puede utilizar para aislar y purificar la biomolécula (por ejemplo, péptido o proteína) de interés antes de que se analice. En otra realización, la biomolécula de interés se puede aislar o purificar por cromatografía de afinidad o cromatografía de inunoafinidad. Alternativamente, espectrómetros de masas que tienen configuraciones de cromatografía se pueden utilizar para separar biomoléculas sin inmunoprecipitación, y luego la biomolécula de interés se puede medir directamente. En una realización ejemplar, la proteína de interés se puede inmunoprecipitar y luego analizar mediante un sistema de cromatografía líquida de interfaz con una unidad MS en tándem equipada con una fuente de ionización por electrospray (LC-ESI-MS en tándem).

Las biomoléculas múltiples en la misma muestra se pueden medir simultáneamente. Es decir, tanto la cantidad de biomolécula sin marcar como la marcada se puede detectar y medir por separado o al mismo tiempo, para múltiples biomoléculas. Como tal, en esta memoria se describe un método útil para detectar cambios en la producción y el aclaramiento de una o varias biomoléculas a gran escala (es decir, proteómica/metabolómica) y proporciona un medio sensible para detectar y medir biomoléculas implicadas en la fisiopatología subyacente. También se describe un medio para medir varios tipos de biomoléculas. En este contexto, por ejemplo, una proteína y un lípido se pueden medir de forma simultánea o secuencial.

Una vez que la cantidad de biomolécula marcada y sin marcar se ha detectado en una muestra, se puede determinar la proporción o el porcentaje de biomolécula marcada frente a biomolécula sin marcar. A partir de ahí, se puede determinar la concentración de la biomolécula sin marcar en la muestra. En otras palabras, puesto que se añade una cantidad conocida de biomolécula marcada a una cantidad desconocida de biomoléculas y se mide la proporción entre marcada y sin marcar, la concentración de biomoléculas sin marcar se puede calcular a partir de la proporción de la siguiente manera:

(i) Concentración de sin marcar = (proporción de sin marcar a marcada) x (concentración de marcada).

La ecuación se puede simplificar como:

(ii) Concentración de sin marcar = (proporción de sin marcar: Patrón de Cuantificación) x (concentración de Patrón de Cuantificación).

5 A la inversa, si se añade una cantidad conocida de sin marcar a una cantidad desconocida marcada, la concentración de marcada se puede calcular del modo siguiente:

(iii) Concentración de marcada = (proporción de marcada a sin marcar) x (concentración de sin marcar).

Además, si una cantidad conocida de biomolécula 1, marcada con marcador 1, se añade a una cantidad desconocida de biomolécula 2, marcada con marcador 2, la concentración de la biomolécula 2 se puede calcular del modo siguiente:

(iv) Concentración de marcador 2 = (proporción de marcador 2 a marcador 1) x (concentración de marcador 1).

Del mismo modo, si una cantidad conocida de biomolécula 1, marcada con marcador 1, se añade a una cantidad desconocida de biomolécula 2, marcada con marcador 2, y de biomolécula 3, marcada con marcador 3, la concentración de la biomolécula 2 y la biomolécula 3 se puede calcular del modo siguiente:

15 (v) Concentración de marcador 2 = (proporción de marcador 2 a marcador 1) x (concentración de marcador 1)

(vi) Concentración de marcador 3 = (proporción de marcador 3 a marcador 1) x (concentración de marcador 1).

Finalmente, si una cantidad conocida de biomolécula 1, marcada con marcador 1, se añade a una cantidad desconocida de biomolécula 2, marcada con marcador 2, y una cantidad desconocida de biomolécula 3 sin marcar, la concentración de la biomolécula 2 y la biomolécula sin marcar se puede calcular del modo siguiente:

20 (vii) Concentración de marcador 2 = (proporción de marcador 2 a marcador 1) x (concentración de marcador 1)

(viii) Concentración de sin marcar = (proporción de sin marcar a marcador 1) x (concentración de marcador 1).

En otra realización, los métodos incluyen además la etapa de normalizar la concentración calculada frente a una curva de calibración basada en la ecuación de ajuste de curva generada por la curva de calibración. La curva de calibración utilizada en esta memoria se genera mediante la determinación de dos o más proporciones de biomoléculas sin marcar frente a sus respectivos Patrones de Cuantificación, en donde se conoce la concentración de la biomolécula sin marcar de interés.

En otro aspecto, la invención permite la medición al mismo tiempo de la proteína marcada y sin marcar, de modo que se puede calcular la proporción entre proteína marcada sin marcar, así como otros cálculos. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los modelos cinéticos de marcado de primer orden que se pueden utilizar con el método de la invención. Por ejemplo, se puede calcular la tasa de síntesis fraccional (TSF). La TSF es igual a la tasa inicial de incremento de proteína marcada frente a sin marcar dividida por el enriquecimiento de precursores. Del mismo modo, se puede calcular la tasa de aclaramiento fraccional (TAF). Además, otros parámetros, tales como el tiempo de retardo y el estado estacionario del marcador isotópico, se pueden determinar y utilizar como mediciones del metabolismo y la fisiología de la proteína. Además, el modelo se puede realizar sobre los datos para adaptar múltiples modelos de compartimentos para estimar una transferencia entre compartimentos. Por supuesto, el tipo de modelo matemático seleccionado dependerá de los parámetros sintéticos de proteínas y de aclaramiento individuales (por ejemplo, de un solo grupo, varios grupos, en estado estacionario, en estado no estacionario, modelo compartimental, etc.). Tal y como se emplea en esta memoria, "estado estacionario" se refiere a un estado durante el cual existe un cambio insignificante en el parámetro medido durante un período de tiempo especificado.

40 Con la metodología de marcado cinético con isótopos estables (SILK, del inglés "stable isotope kinetic labeling") se ha mostrado la detección de una incorporación metabólica de isótopos estables (no radiactivos) en proteínas recién sintetizadas en el líquido cefalorraquídeo de un sujeto vivo. Para obtener una información detallada sobre SILK, véanse los documento de publicación US n° 2008/0145941 y 2009/0142766, y la publicación Internacional PCT n° WO 2006/107814, en donde el contenido completo de cada una se incorpora en esta memoria como referencia).

45 SILK permite medir las tasas de producción y de aclaramiento de proteínas en el sistema nervioso central. Hasta el momento, esta metodología se ha aplicado a la medición de la producción y el aclaramiento de la proteína beta amiloide (A β) implicada en la enfermedad de Alzheimer (EA).

Sin embargo, hasta la fecha, la versión actual del ensayo SILK solo mide el metabolismo de A β total ya que el ensayo mide la incorporación de un "marcador" (es decir, un aminoácido o una biomolécula que contiene átomos con una composición isotópica diferente a la que se encuentra en la naturaleza) dentro del péptido 17-28 de A β . Un ensayo de este tipo permite la medición de la actividad biológica de inhibidores de la producción de A β , pero no de cualquier tipo de fármacos u otros compuestos que modulan la producción de la isoforma A β incluyendo, por ejemplo, moduladores de la gamma-secretasa (GSMs). Por tanto, mientras que A β se proporciona como un ejemplo

en esta realización, se debe entender que los métodos proporcionados en este documento se pueden aplicar a cualquier proteína que incluye isoformas (por ejemplo, Tau).

Por consiguiente, en un aspecto, A β se aísla de las muestras biológicas mediante inmunoprecipitación, usando un anticuerpo que reconoce o bien el dominio central o el dominio N-terminal de A β . En esta realización, los péptidos aislados se eluyen a partir del anticuerpo, por ejemplo, mediante el uso de ácido fórmico y después se digieren con tripsina u otra proteasa. Contrariamente a la versión original del ensayo SILK-A β [®], que se basa en la cuantificación del fragmento triptico 17-28 de A β , véase la Tabla 1, la invención amplía el ensayo para medir el metabolismo específico de las diferentes isoformas de A β midiendo proporciones marcadas en los péptidos 29-x. Por lo tanto, mediante el uso de un anticuerpo que no es específico de una isoforma, es posible aislar todas las isoformas C-terminales de A β a partir de una muestra biológica. Los péptidos 29-x de A β contienen una leucina y se puedan cuantificar por el ensayo SILK utilizando leucina marcada en ¹³C₆, tal y como se describe en este documento.

El término "anticuerpo", tal y como se usa en esta invención se entiende que incluye moléculas intactas de anticuerpos policlonales o monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como Fab y F(ab')₂, Fv y fragmentos SCA que son capaces de unirse a un determinante epitópico. La expresión "se une específicamente" o "interacciona específicamente" cuando se usa en referencia a un anticuerpo, significa que una interacción entre el anticuerpo y un epítipo particular tiene una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} , generalmente al menos aproximadamente 1×10^{-7} , por lo general al menos aproximadamente 1×10^{-8} y particularmente al menos aproximadamente 1×10^{-9} o 1×10^{-10} o menos.

En consecuencia, la producción de proteína se basa típicamente en la tasa de incremento de la proporción entre proteína marcada/sin marcar a lo largo del tiempo (es decir, la pendiente, la curva de ajuste exponencial o un ajuste del modelo compartimental define la tasa de producción de proteína). Para estos cálculos, se requiere típicamente un mínimo de una muestra (se podría estimar el marcador de referencia), se prefieren dos y múltiples muestras son más preferidas para calcular una curva exacta de la captación de marcador en la proteína (es decir, la tasa de producción). Si se usan o se prefieren múltiples muestras, las muestras no se tienen que tomar del mismo sujeto. Por ejemplo, las proteínas se pueden marcar en cinco sujetos diferentes en el momento cero, y luego se toma una sola muestra de cada sujeto en un momento diferente, posterior al marcado.

Por el contrario, después de terminar la administración del aminoácido marcado, la tasa de disminución de la proporción entre proteína marcada y sin marcar refleja típicamente la tasa de aclaramiento de esa proteína. Para estos cálculos, se requiere típicamente un mínimo de una muestra (se podría estimar el marcador de referencia), dos es más preferido y muestras múltiples se prefieren más para calcular una curva exacta de la disminución del marcador en la proteína a lo largo del tiempo (es decir, la tasa de aclaramiento). Si se usan o se prefieren múltiples muestras, las muestras no se tienen que tomar del mismo sujeto. Por ejemplo, las proteínas se pueden marcar en cinco sujetos diferentes en el momento cero, y luego se toma una sola muestra de cada sujeto en un momento diferente posterior al marcado. La cantidad de proteína marcada en una muestra de SNC en un momento dado, refleja la tasa de producción o la tasa de aclaramiento (es decir, la eliminación o la destrucción) y se expresa generalmente como porcentaje por hora o la proporción masa/tiempo (por ejemplo, mg/h) de la proteína en el sujeto.

Combinado con cinéticas de marcado con isótopos estables (SILK) para medir la proporción de biomoléculas marcadas en diferentes momentos después de la infusión con un resto marcado, la metodología presentada en el presente documento permite el cálculo de la concentración absoluta de biomoléculas recién sintetizadas (por ejemplo, péptidos o proteínas) y/o la concentración absoluta de cada una de las isoformas de esa biomolécula.

El método de la invención se puede usar para diagnosticar o controlar la progresión de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa mediante la medición de la concentración *in vivo* de una o varias biomoléculas de interés en un sujeto. Además, los métodos de la invención se pueden utilizar para controlar el tratamiento de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa mediante la medición de la concentración *in vivo* de una biomolécula de interés en un sujeto. La concentración de la biomolécula se puede relacionar con una enfermedad neurológica o neurodegenerativa de modo que cualquier aumento o disminución pueda ser indicativa de la presencia o de la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la concentración calculada de una o varias biomoléculas de interés se puede comparar con la concentración de las mismas biomoléculas en una muestra normal correspondiente, con la concentración de las mismas biomoléculas en un sujeto con un estado de enfermedad neurológica o neurodegenerativa conocida, con la concentración de las mismas biomoléculas procedentes del mismo sujeto determinada en un momento anterior, o cualquier combinación de las mismas.

Además, tales métodos pueden ayudar a identificar a un individuo que tenga una predisposición para el desarrollo de la enfermedad, o pueden proporcionar un medio para detectar la enfermedad antes de la aparición de los síntomas clínicos reales. Un diagnóstico más definitivo de este tipo puede permitir a los profesionales sanitarios emplear medidas preventivas o un tratamiento agresivo anterior impidiendo de este modo el desarrollo o una progresión adicional de la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento una "muestra normal correspondiente" se refiere a una muestra procedente del mismo órgano y/o del mismo tipo que la muestra que está siendo examinada. En un aspecto, la muestra normal correspondiente comprende una muestra de células obtenidas a partir de un individuo sano. Una

muestra normal correspondiente de este tipo puede, pero no necesita ser, de un individuo que tiene la misma edad y/o el mismo sexo que el individuo que proporciona la muestra que se está examinando. En otro aspecto, la muestra normal correspondiente comprende una muestra de células obtenidas a partir de una porción de tejido por lo demás sano del sujeto, a partir del cual se obtiene la muestra que se está sometiendo a ensayo.

La referencia a la concentración de biomoléculas en un sujeto con un estado de enfermedad neurológica o neurodegenerativa conocida incluye una concentración predeterminada de una biomolécula ligada a una enfermedad neurológica o neurodegenerativa. Por lo tanto, la concentración se puede comparar con una concentración conocida de biomoléculas obtenidas a partir de una muestra de un solo individuo o puede ser de una línea celular establecida del mismo tipo que la del sujeto. En un aspecto, la línea celular establecida puede ser una de un panel de tales líneas celulares, en donde el panel puede incluir diferentes líneas celulares del mismo tipo de enfermedad y/o líneas celulares distintas de diferentes enfermedades asociadas con la misma biomolécula. Un panel de líneas celulares de este tipo puede ser útil, por ejemplo, para poner en práctica el presente método cuando solo se puede obtener una pequeña cantidad de células a partir del sujeto que se va a tratar, proporcionando de este modo una muestra sustituta de las células del sujeto, y también puede ser útil para incluir muestras control en la puesta en práctica de los presentes métodos.

Enfermedades neurológicas o neurodegenerativas ejemplares que se pueden relacionar con los intervalos de concentración de las biomoléculas de interés incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, demencias frontales temporales (DTTs), enfermedad de Huntington, parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), trastornos y demencias relacionados con el envejecimiento, esclerosis múltiple, enfermedades priónicas (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiforme bovina o de las vacas locas y tembladera), enfermedad por cuerpos de Lewy, esquizofrenia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig) u otras enfermedades de neuronas motoras, síndrome de piernas inquietas, epilepsia u otros trastornos con convulsiones, temblores, depresión, manía, trastornos de ansiedad, trauma o lesión cerebral, narcolepsia, insomnio u otros trastornos del sueño, autismo, hidrocefalia a presión normal, trastornos o síndromes dolorosos, migrañas, cefalea en racimos u otras formas de dolor de cabeza, trastornos espinocerebelosos, distrofias musculares, miastenia gravis, retinitis pigmentosa u otras formas de degeneración de la retina. También se prevé que el método de la invención se pueda utilizar para estudiar la fisiología normal, el metabolismo y la función del SNC.

En esta memoria se describe un método para evaluar si un agente terapéutico utilizado para tratar una enfermedad neurológica o neurodegenerativa afecta a la concentración de una biomolécula de interés en el sujeto. Por ejemplo, la concentración de la biomolécula se puede medir para determinar si un agente terapéutico dado produce como resultado un aumento o una disminución de la concentración de la biomolécula. En una realización, el método se realiza *in vivo*, tal y se describe en esta memoria. En otra realización, el método se realiza *in vitro* utilizando un cultivo de células, en donde el cultivo de células es el "sujeto" en los métodos descritos en el presente documento. Por consiguiente, el uso de los métodos proporcionados en este documento permitirá a los expertos en la técnica determinar con precisión el grado de cambio en la concentración de la biomolécula de interés, y correlacionar estas mediciones con el resultado clínico del tratamiento modificador de la enfermedad. Los resultados de este aspecto de la invención, por lo tanto, pueden ayudar a determinar las dosis óptimas y la frecuencia de las dosis de un agente terapéutico, pueden ayudar en la toma de decisiones sobre el diseño de ensayos clínicos y, en última instancia, pueden acelerar la validación de agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de enfermedades neurológicas o neurodegenerativas.

Por lo tanto, el método de la invención se puede utilizar para predecir qué sujetos responderán a un agente terapéutico particular. Por ejemplo, sujetos con un incremento de las concentraciones de una biomolécula particular, pueden responder a un agente terapéutico particular de forma diferente que sujetos con concentraciones reducidas de la biomolécula. En particular, los resultados del método se pueden usar para seleccionar el tratamiento apropiado (por ejemplo, un agente que bloquea la producción de la biomolécula o un agente que incrementa el aclaramiento de la biomolécula) para un sujeto particular. Del mismo modo, los resultados del método se pueden usar para seleccionar el tratamiento apropiado para un sujeto que tiene un genotipo particular.

El método para predecir qué sujetos responderán a un agente terapéutico particular incluye la administración de un agente terapéutico y un resto marcado al sujeto, en donde el resto marcado se incorpora en la biomolécula cuando se produce en el sujeto. El agente terapéutico se puede administrar al sujeto antes de la administración del resto marcado. El resto marcado se puede administrar al sujeto antes de la administración del agente terapéutico. El período de tiempo entre la administración de cada uno puede ser de varios minutos, una hora, varias horas o muchas horas. El agente terapéutico y el resto marcado se pueden administrar simultáneamente. El método incluye además la recogida de al menos una muestra biológica que incluye biomoléculas marcadas y sin marcar, determinar una proporción entre la biomolécula marcada y la biomolécula sin marcar en la muestra, y calcular la concentración de la biomolécula sin marcar en el sujeto. A partir de ahí, una comparación de la concentración calculada con un valor de control determinará si el agente terapéutico altera la concentración (por ejemplo, mediante la alteración de la tasa de producción o la tasa de aclaramiento) de la biomolécula en el sujeto.

Los expertos en la técnica apreciarán que el agente terapéutico puede variar y variará dependiendo de la enfermedad o el trastorno neurológico o neurodegenerativo que se va a tratar y/o la biomolécula cuyo metabolismo

se está analizando. En realizaciones en las que la biomolécula es A β , ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos adecuados incluyen inhibidores de la gamma secretasa, inhibidores de la beta-secretasa, activadores de la alfa-secretasa, inhibidores de RAGE, inhibidores de molécula pequeña de APP o de la producción de A β , anticuerpos humanizados contra A β , activadores del aclaramiento de A β en el SNC, inhibidores de molécula pequeña de la polimerización de A β , inhibidores basados en platino de la producción de A β , inhibidores basados en platino de la polimerización, agentes que interfieren con interacciones de metalproteína, proteínas (tales como, por ejemplo, la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (PRL) o PRL soluble) que se une a A β soluble y anticuerpos que aclaran A β soluble y/o descomponen A β depositada. Otros agentes terapéuticos adecuados contra la EA incluyen inhibidores de la proteína de transferencia de colesteroléster (PTCE), inhibidores de metaloproteasas, inhibidores de la colinesterasa, antagonistas del receptor de NMDA, hormonas, agentes neuroprotectores e inhibidores de la muerte celular. Muchos de los agentes terapéuticos mencionados anteriormente también pueden afectar al metabolismo *in vivo* de otras proteínas implicadas en trastornos neurodegenerativos. Agentes terapéuticos adicionales que pueden afectar al metabolismo de tau, por ejemplo, incluyen inhibidores de la cinasa de tau, inhibidores de la agregación de tau, inhibidores de la cathepsina D, etc. Además, los agentes terapéuticos que pueden afectar al metabolismo *in vivo* de la sinucleína incluyen los inhibidores de la sirtuina 2, inhibidores de la agregación de sinucleína, inhibidores de proteosomas, etc.

El agente terapéutico se puede administrar al sujeto de acuerdo con métodos conocidos. Típicamente, el agente terapéutico se administrará por vía oral, pero también se pueden utilizar otras vías de administración, tales como la parenteral o tópica. La cantidad de agente terapéutico que se administra al sujeto puede variar y variará dependiendo del tipo de agente, del sujeto y del modo particular de administración. Los expertos en la técnica apreciarán que las dosificaciones se pueden determinar con la orientación de Goodman & Goldman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, décima edición (2001), apéndice II, págs. 475-493, y "Physicians' Desk Reference".

Se debe entender que los métodos de la invención descritos en el presente documento se pueden adaptar a un formato de alto rendimiento, permitiendo así el examen de una pluralidad (es decir, 2, 3, 4 o más) de muestras y/o de biomoléculas, que pueden ser independientemente las mismas o diferentes, en paralelo. Un formato de alto rendimiento ofrece numerosas ventajas. Por ejemplo, un formato de alto rendimiento permite el examen/cuantificación de dos, tres, cuatro, etc., biomoléculas diferentes de un sujeto, solas o en combinación. Finalmente, un formato de alto rendimiento permite que se ejecute paralelamente, por ejemplo, muestras de control (controles positivos y controles negativos) con muestras del ensayo. Además, un método de alto rendimiento puede permitir que la inmunoprecipitación de múltiples proteínas al mismo tiempo empleando múltiples anticuerpos.

En esta memoria se describe un kit para realizar los métodos de la invención. En una realización, se proporciona un kit para el diagnóstico y/o el control de la progresión o el tratamiento de una enfermedad neurológica o neurodegenerativa en un sujeto. El kit incluye uno o varios restos marcados (por ejemplo, aminoácidos marcados) y un medio para la administración de uno o varios aminoácidos al sujeto. El kit puede incluir además un medio para obtener del sujeto una muestra biológica a intervalos de tiempo regulares. En ciertas realizaciones, el kit también incluirá instrucciones para detectar y determinar la proporción entre biomoléculas de interés, marcadas y sin marcar a lo largo del tiempo y para calcular la concentración de la biomolécula sin marcar. En una realización, las instrucciones describirán métodos para comparar la concentración calculada con ciertos patrones y/o controles, tal y como se describe en esta memoria.

En otra realización, el kit de la invención proporciona un vehículo compartimentado que incluye uno o varios recipientes que contienen el resto marcado y los diversos medios para realizar los métodos de la invención.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las ventajas y las características de la presente invención, pero no pretenden limitar el alcance de la invención. Aunque hay algunos que podrían utilizarse, se pueden utilizar otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

EJEMPLO 1

Marcado cinético con isótopos estables

Este ejemplo ilustra las mejoras desarrolladas sobre la metodología SILK. Se generó un medio de cultivo celular con una proporción conocida entre A β marcada y sin marcar. Este medio de curva de calibración se empleó a continuación para someter a ensayo la detección y la cuantificación de los péptidos 29-x de A β . Empleando este medio, se realizaron una serie de pruebas para mejorar la solubilidad de los péptidos 29-x, así como para establecer mejores condiciones cromatográficas con el fin de aumentar la detección de los péptidos.

Aumento de la solubilidad de los péptidos 29-x - La metodología original de SILK-A β [®] se modificó mediante el uso de detergente al 0,025%, por ejemplo, Tween-20, Triton o CHAPS, en lugar de utilizar guanidina 0,5 M para las etapas de IP y lavado. Los péptidos se mantienen en la solución de detergente al 0,025% durante la digestión y también hasta que se inyectan en el espectrómetro de masas. A β es un péptido muy hidrófobo y la adición de Tween-20 mejora en gran medida la solubilidad y la señal del espectrómetro de masas de los péptidos 29-x, hasta el punto en el que las intensidades iónicas de 29-40 son tan altas como las que se pueden alcanzar con el péptido 17-28. Esto

es significativo porque A β 40 es la especie más abundante de A β y por lo tanto la mayor parte del péptido 17-28 surge a partir del péptido A β 40. Por ello, el tener las intensidades iónicas de los dos péptidos similares, sugiere que toda la A β 29-40 está en solución para la detección mediante el espectrómetro de masas.

Mantenimiento de los péptidos 29-x en estado reducido – Además, se desarrollaron métodos para mantener los péptidos 29-x en estado reducido. Por ejemplo, estos péptidos contienen un residuo de metionina que se puede oxidar. En una caracterización a modo de ejemplo, se encontró que aproximadamente el 10% de la metionina se oxida en el LCR y los medios, por lo que mediante la adición de un agente reductor era posible eliminar la forma oxidada y aumentar la señal en un 10% o más, dependiendo del estado de oxidación que estaba presente originalmente en la muestra biológica. Este estado de oxidación podía variar - específicamente con estados de enfermedad tales como la enfermedad de Alzheimer que se sabe que viene acompañada por un daño oxidativo. Agentes reductores, tales como beta-mercaptoetanol y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), se utilizan para eliminar la oxidación de metionina.

Modificación de la columna - Por último, para evitar que los péptidos A β se adhieran a las columnas, la columna C18 se cambió por una columna C1. Una columna que tiene un contenido en carbono mucho menor que la de C18, tal como una columna C1, C4 o C8, es mucho menos hidrófoba, lo que permite una mayor recuperación de los péptidos A β , una mejora de la forma de los picos de los péptidos, así como una reducción potencial de los residuos entre las migraciones de las muestras.

Como se muestra en la Figura 1, los métodos proporcionados en este documento son capaces de detectar todos los péptidos 29-x, así como el péptido 17-28 en medios de cultivos celulares. Además para la observación de los picos, se han realizado estudios para determinar si los picos de estos péptidos se pueden cuantificar de forma fiable, generando de este modo las curvas de calibración para las isoformas C-terminales. El uso de medios de curvas de calibración proporciona la capacidad de cuantificar las isoformas (véase la Figura 2).

EJEMPLO 2

Patrón de Cuantificación

Este ejemplo muestra que la adición de un patrón de cuantificación se puede utilizar para calcular la proporción entre péptidos endógenos y péptidos adicionados. Por lo tanto, añadir cantidades conocidas de A β 37, A β 38, A β 39, A β 40 y A β 42 marcadas permite una cuantificación específica de esas isoformas además de la cuantificación de la concentración total de A β en la muestra.

Debido al tiempo de demora en la producción de los péptidos marcados, originalmente utilizamos péptidos sin marcar como adición y utilizamos medios procedentes de células cultivadas en 100% de leucina $^{13}\text{C}_6$ como la sustancia desconocida. Añadimos A β 38 y A β 42 sin marcar en medios con 100% de leucina $^{13}\text{C}_6$ y medimos las proporciones. A medida que se añadía más péptido sin marcar en los medios, la proporción entre marcador y sustrato natural que se marca (TTR, en este experimento se define como la proporción entre péptido sin marcar y marcado) tanto del péptido 17-28 como del péptido 29-38 aumentaba linealmente. (Véanse las Figuras 3 y 4).

Esto ilustra la viabilidad de la medición de la concentración de estos péptidos basándose en añadir un patrón en una solución que contiene cantidades desconocidas de péptido que contiene un marcado isotópico característico distinto.

EJEMPLO 3

Patrón de Cuantificación para calcular la concentración absoluta

Este ejemplo muestra el uso del Patrón de Cuantificación para calcular las tasas de producción o de aclaramiento de las biomoléculas de interés, que se utiliza para calcular la concentración absoluta de esas biomoléculas.

Una muestra que contiene A β u otras isoformas de péptidos (incluyendo, pero no limitadas a A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, A β 1-42) tanto en la forma sin marcar como marcada con leucinas $^{13}\text{C}_6$ (la leucina marcada se incorpora en la muestra por procesos biológicos naturales del sujeto) se enriquece con Patrón de Cuantificación. La proporción entre péptido marcado y sin marcar a lo largo del tiempo se utiliza para calcular las tasas cinéticas de producción y de aclaramiento (metabolismo) del péptido en el sujeto. Las proporciones entre péptido marcado o sin marcar y el Patrón de Cuantificación se utilizan para calcular las concentraciones de las respectivas versiones del péptido.

La biomolécula (por ejemplo, proteína o péptido) se inmunoprecipita utilizando un anticuerpo específico de la proteína. Para A β , la inmunoprecipitación se lleva a cabo en bicarbonato de amonio 25 mM, pH 7,6, con 0,025% de Tween-20 añadido durante cada etapa del aislamiento y la preparación de A β . Para A β , la muestra se incuba con el anticuerpo durante 2-3 horas a temperatura ambiente, se lava tres veces y se eluye del anticuerpo mediante la adición de 50 μl de ácido fórmico y se concentra en un aparato Speedvac hasta sequedad. La muestra se reconstituye en 20 μl de bicarbonato de amonio 25 mM, 10% de acetonitrilo, pH 7,6, se añade 0,025% de Tween-20 y se digiere con 20 μl de tripsina u otra endoproteasa durante una noche. Después de la digestión, se añade 1 μl de 1% de beta-mercaptoetanol para reducir la oxidación del residuo de metionina.

Para el análisis, se inyectan 5 µl de la muestra en una columna C18 de BioBasic u otra columna de fase inversa o de separación de proteínas, para la separación de los péptidos antes de la inyección en el espectrómetro de masas. La proporción m/z de cada péptido triptico C-terminal que se corresponde a, pero no limitado a, las isoformas 17-28 y 29-37, 29-38, 29-39, 29-40 y 29-42 se analiza entonces en busca de y seleccionada por CID (realizado para todas las leucinas sin marcar, marcadas +6D y marcadas +12D (Patrón de Cuantificación)). Esto da lugar a los datos ms² utilizados para realizar la cuantificación. El programa informático de procesamiento XCalibur se utiliza a continuación para calcular las áreas de picos totales de todos los datos ms² para leucinas sin marcar, marcadas +6D y marcadas +12D.

La cuantificación de las tasas de producción y de aclaramiento y la concentración absoluta se calculan después utilizando dos conjuntos de curvas de calibración que se ejecutan simultáneamente con las muestras biológicas. La primera curva de calibración contiene péptidos Aβ marcados con proporciones conocidas de leucina +6D a leucina sin marcar (de 0-25%). Esta curva de calibración se analiza mediante regresión lineal y la proporción de las áreas de los picos para los péptidos sin marcar y marcados +6D procedentes de la fuente biológica se normaliza basándose en la regresión lineal de la curva de calibración.

La segunda curva de calibración consiste en cantidades conocidas de patrón sintético o generado biológicamente. Cada especie que se va a cuantificar debe estar presente en la curva - por ejemplo, si se desea medir la concentración de Aβ 17-28 sin marcar y marcada con ¹³C₆, tanto Aβ marcada con ¹³C₆ como sin marcar debe estar presente en la curva de calibración. Además esta curva de calibración contiene el Patrón de Cuantificación - para Aβ 1-40, se utilizó un péptido que contenía dos fenilalaninas ¹³C₆ en las posiciones 19 y 20 (parte del péptido 17-28) y dos isoleucinas ¹³C₆ en las posiciones 31 y 32 (parte del péptido 29-x); además un péptido ¹⁵N se podría utilizar o una combinación de otros aminoácidos que proporcionarían una m/z característica que es distinta de la de los péptidos sin marcar y los marcados metabólicamente. Todos estos péptidos se añaden en una matriz que es semejante a la matriz endógena y se procesan como si provinieran de un sujeto (inmunoprecipitación, digestión, análisis de espectrometría de masas). Las áreas de los picos de los péptidos sin marcar y marcados con +6 y +12D se calculan de nuevo con el programa informático de procesamiento XCalibur, se trazan las curvas de calibración y se determina la regresión lineal. Las áreas para los péptidos endógenos se calculan como se ha realizado previamente. Las áreas para los péptidos sin marcar y marcados de forma endógena con +6D se añaden juntas y se comparan con la curva de calibración de los patrones sintéticos +12D y las áreas calculadas a partir de la regresión lineal. De esta manera la cantidad total de péptido endógeno se compara directamente con una cantidad conocida de patrones sintéticos internos, determinando así de forma inequívoca la concentración absoluta de Aβ presente en cada muestra biológica. Además, la concentración de cada uno de los péptidos sin marcar o marcados con ¹³C₆ se puede calcular individualmente.

EJEMPLO 4

Migraciones múltiples de muestras con curva de calibración

Este Ejemplo muestra una variación de la metodología expuesta en el Ejemplo 3. Se añadieron 20 ng de patrón cuantificación de Aβ a muestras de medios que ya contenían tanto Aβ sin marcar como marcada metabólicamente (leucina ¹³C₆).

El patrón de cuantificación utilizado fue Aβ 1-40 que contenía fenilalanina ¹³C₆ en la posición 19 y 20 (F* en la tabla a continuación, parte del péptido 17-28) y 2 isoleucinas ¹³C₆ en la posición 31 y 32 (I* en la tabla a continuación, parte del péptido 29-x).

Tabla 2 - Que muestra la ubicación de los aminoácidos marcados en el péptido Aβ 40. Péptidos similares se pueden crear para Aβ 1-37, 1-38, 1-39, 1-40, 1-42.

Aβ 40	DAEFR_HDSGYEVHHQK_LVF*F*AEDVGSNK_GAI*I*GLMVGGVV	SEQ ID NO: 4
-------	---	--------------

Las muestras se digirieron con tripsina para producir el péptido 17-28, así como los péptidos 29-x.

Las muestras de los medios proceden de experimentos de cultivos celulares individuales y por lo tanto tienen diferentes cantidades de Aβ en ellas debido a una variación biológica.

Para cada migración, se ejecutó una curva de cuantificación que contenía Aβ sin marcar en el intervalo desde 0,4 ng/ml a 100 ng/mL. El patrón de cuantificación se añadió en la cuantificación antes de realizar la IP en las muestras.

La proporción entre iones sin marcar y iones procedentes del patrón de cuantificación se utilizó junto con la curva de calibración de cuantificación, para calcular la cantidad de Aβ 17-28 sin marcar, así como Aβ 29-40 en cada muestra. Los datos mostrados en la Tabla 2 es la media de 3 migraciones de las muestras (véase la Figura 5).

	Abeta 17-28	DesEst	CV	Abeta 29-40	DesEst	CV
0% de medio	45,28868	6,574515	15%	41,66965	5,56925	13%

	Abeta 17-28	DesEst	CV	Abeta 29-40	DesEst	CV
1,25% de medio	40,49848	2,621899	6%	33,13193	3,268642	10%
2,5% de medio	42,88804	1,208532	3%	30,63681	3,207314	10%
5% de medio	53,13186	4,508435	8%	44,93799	3,229995	7%
10% de medio	44,13336	2,942345	7%	36,77698	4,169602	11%
20% de medio	34,50198	3,176109	9%	31,86353	0,88997	3%

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> C2N DIAGNOSTICS WEST, Tim PAOLETTI, Andrew C.

<120> MÉTODOS PARA MEDIR CONCENTRACIONES DE BIOMOLÉCULAS

5 <130> C2N1100-2WO

<150> US 61/120,329

< 151> 2008-12-05

<150> US 61/120,326

< 151> 2008-12-05

10 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 37

< 212> PRT

15 < 213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly
35

<210> 2

< 211> 38

< 212> PRT

20 < 213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly
35

ES 2 536 436 T3

<210> 3
 < 211> 39
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val
 35

10 <210> 4
 < 211> 40
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 4
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

15 <210> 5
 < 211> 42
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 5
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

REIVINDICACIONES

1. Un método para calcular la concentración de una proteína o un péptido marcado sintetizado en el SNC y una proteína o un péptido sin marcar sintetizado en el SNC en un sujeto que comprende:

- 5 (a) proporcionar una muestra obtenida previamente a partir de un sujeto al que se ha administrado previamente uno o varios aminoácidos marcados, en donde los aminoácidos marcados se han incorporado en una proteína o un péptido sintetizado en el SNC de modo que la muestra comprende una fracción marcada de una proteína o un péptido sintetizado en el SNC y una fracción sin marcar de una proteína o un péptido sintetizado en el SNC;
- 10 (b) poner en contacto la muestra procedente de un sujeto con un Patrón de Cuantificación en donde el Patrón de Cuantificación incluye una concentración conocida de una proteína o un péptido sintetizado en el SNC que está marcado con un resto que tiene un peso molecular que difiere del uno o varios aminoácidos marcados administrados previamente al sujeto;
- (c) aislar las proteínas o los péptidos marcados o sin marcar a partir de la muestra;
- 15 (d) determinar una proporción entre la proteína o el péptido sin marcar en la muestra y el Patrón de Cuantificación y determinar una proporción entre la proteína o el péptido marcado en la muestra y el Patrón de Cuantificación; y
- (e) calcular la concentración de la proteína o el péptido sin marcar y la proteína o el péptido marcado en la muestra,
- 20 en donde el sujeto es un paciente o un cultivo de células.

2. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra se pone en contacto con dos o más Patrones de Cuantificación y se calculan las concentraciones de dos o más proteínas o péptidos sin marcar sintetizados en el SNC.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína o el péptido sintetizado en el SNC se selecciona a partir del grupo que consiste en A β 1-16, A β 1-17, A β 1-37, A β 1-38, A β 1-39, A β 1-40, A β 1-41, A β 1-42 y A β 1-43.

4. El método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente comparar la concentración de la proteína o el péptido sin marcar sintetizado en el SNC con la concentración de la misma proteína o péptido sintetizado en el SNC en una muestra normal correspondiente, con la concentración de la misma proteína o péptido sintetizado en el SNC de un sujeto con un estado de enfermedad neurológica o neurodegenerativa conocido, con la concentración de la misma proteína o péptido sintetizado en el SNC procedente del mismo sujeto determinada en un momento anterior, o cualquier combinación de las mismas.

5. El método según la reivindicación 1, en el que la proteína o el péptido sintetizado en el SNC es una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste en beta-amiloide (A β), alfa-sinucleína, Tau, apolipoproteína E, apolipoproteína J, proteína precursora amiloide (APP), alfa-2-macroglobulina, S100B, proteína básica de mielina, TDP-43, superóxido dismutasa-1, huntingtina, una interleucina y TNF.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el patrón de cuantificación es un péptido 29-x de A β , en donde el péptido 29-x de A β se selecciona a partir del grupo que consiste en A β 29-37, A β 29-38, A β 29-39, A β 29-40 y A β 29-42.

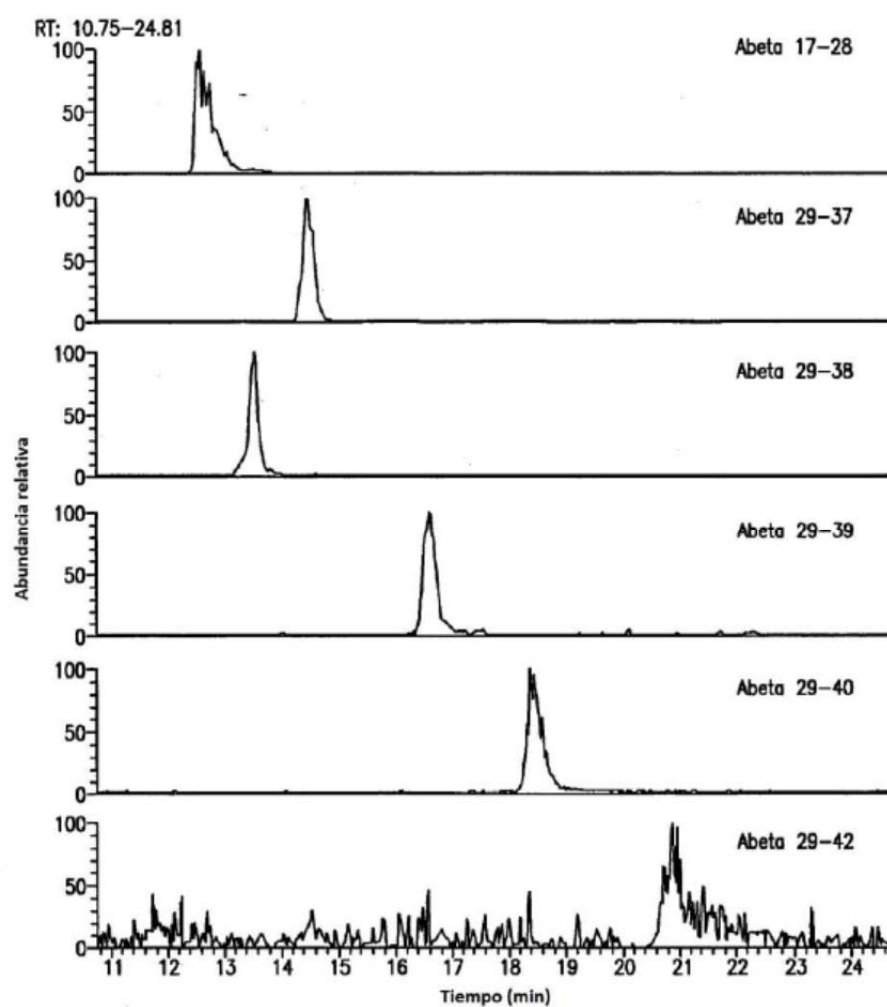


FIG. 1

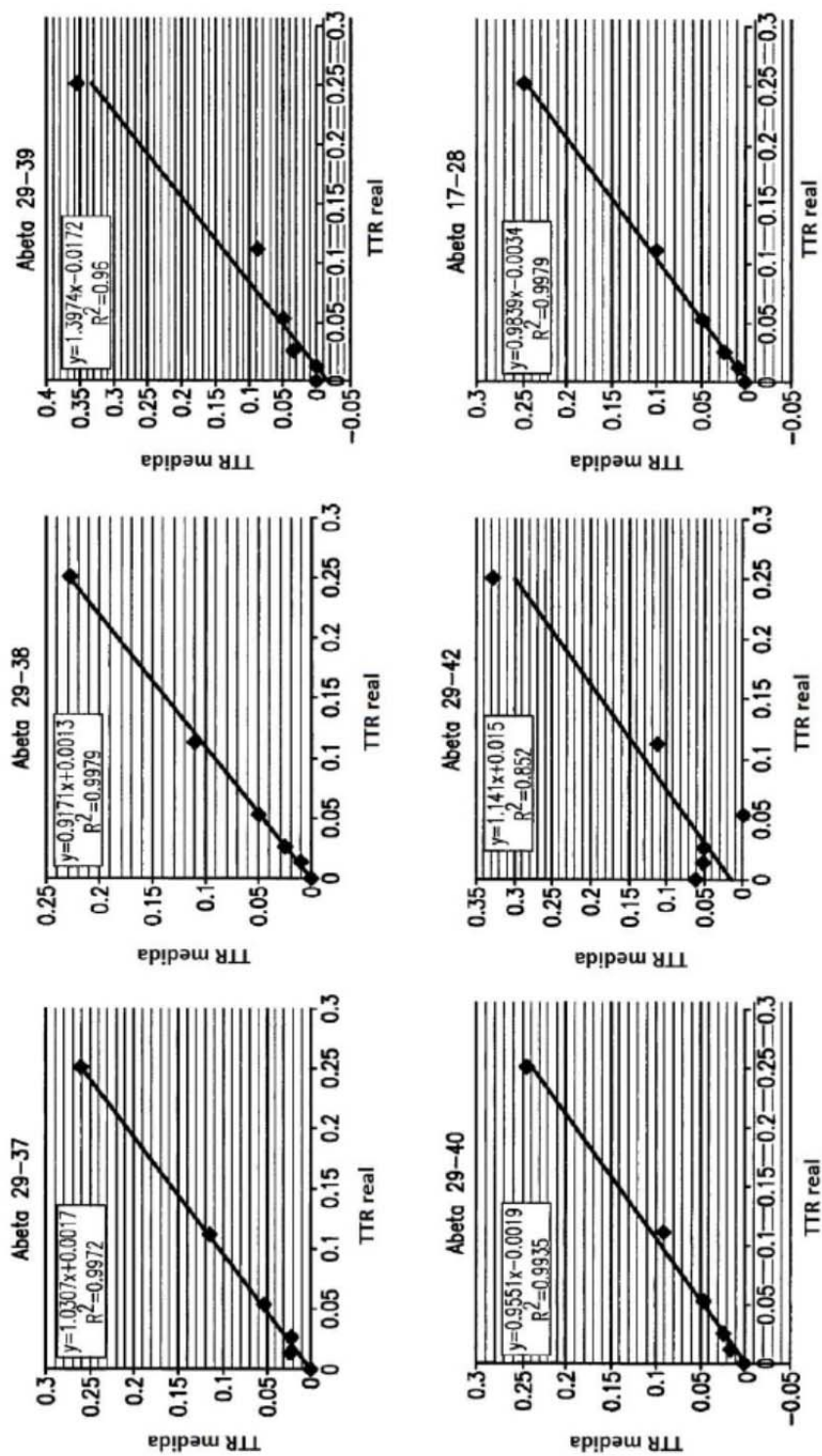


FIG. 2

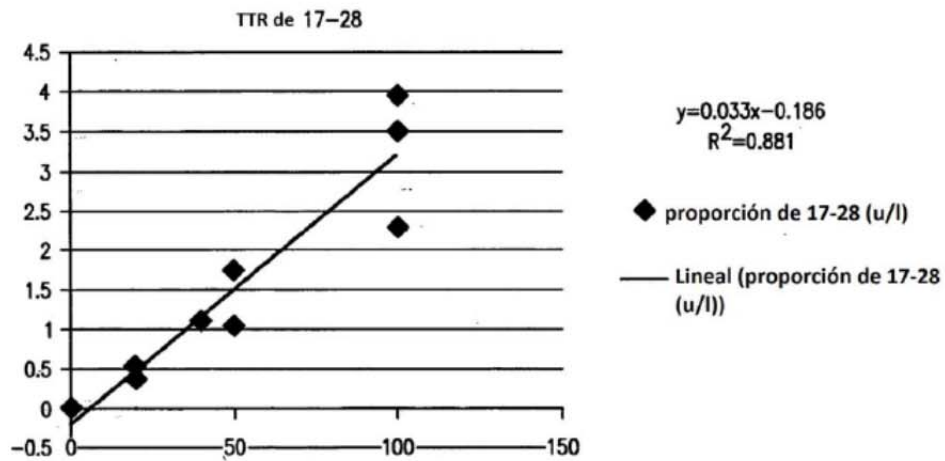


FIG. 3

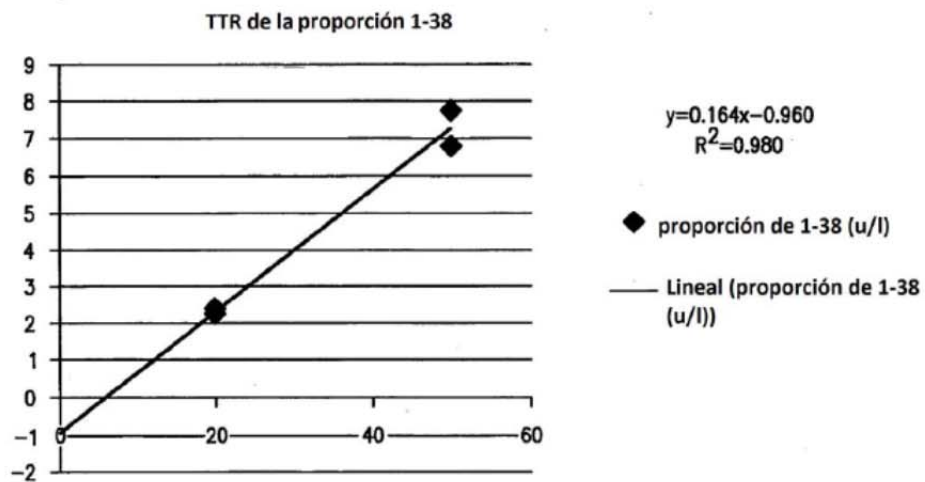


FIG. 4

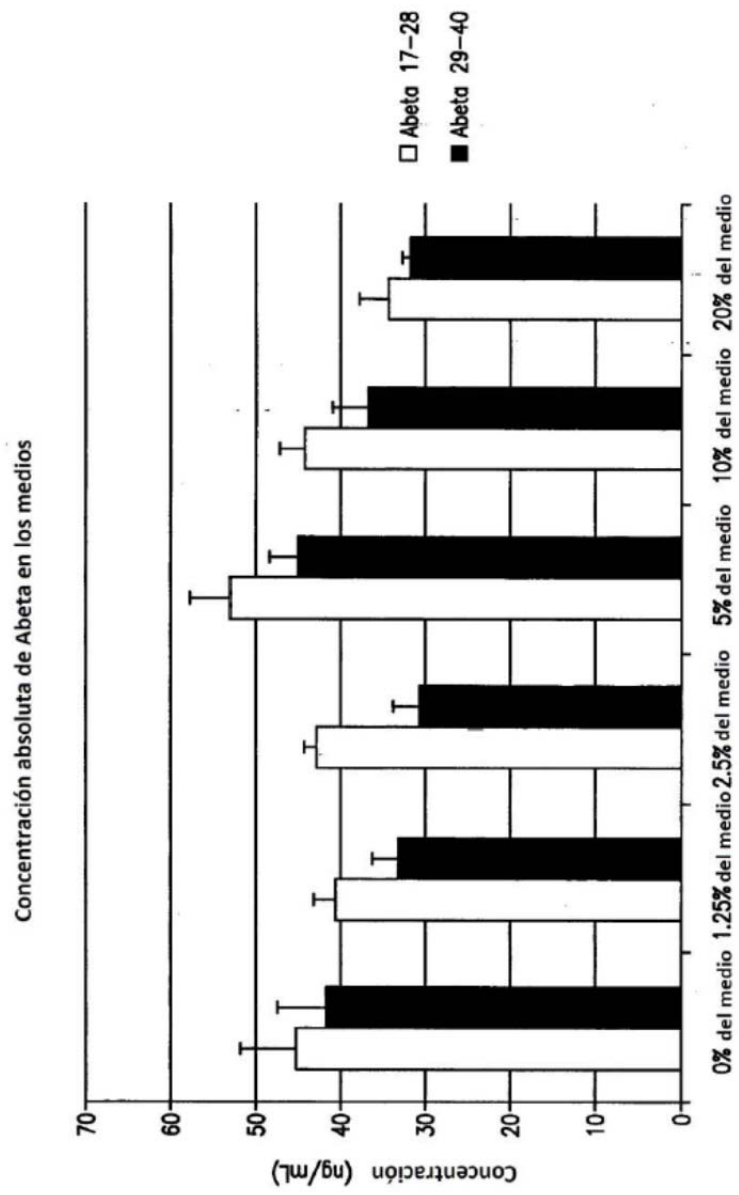


FIG. 5