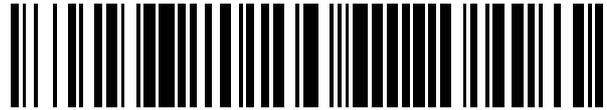


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 627**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2010 E 10787797 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2510359**

54 Título: **Métodos y reactivos para la detección mejorada de péptidos beta amiloides**

30 Prioridad:

11.12.2009 EP 09382279

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

01.12.2015

73 Titular/es:

ARACLÓN BIOTECH, S.L. (100.0%)

**Vía Hispanidad 21
50009 Zaragoza, ES**

72 Inventor/es:

SARASA BARRIO, JOSÉ MANUEL

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 552 627 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 y reactivos para la detección mejorada de péptidos beta amiloides

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere al campo de los inmunoensayos y, más específicamente, a métodos para aumentar la sensibilidad de los inmunoensayos para la determinación de péptidos beta amiloides en fluidos biológicos.

10 **TÉCNICA ANTERIOR**

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva y degenerativa del sistema nervioso central caracterizada por la pérdida progresiva y cada vez mayor de la memoria, seguida de la pérdida de control de las extremidades y las funciones corporales y finalmente la muerte. Es de lejos la causa más común de demencia, afectando a entre el 1 y el 6% de las personas mayores de 65 años y entre el 10 y el 20% de las mayores de 80.

La EA se distingue de otros tipos de demencia por varios rasgos patológicos, entre los que se incluyen la aparición progresiva en el cerebro de los pacientes de placas seniles en el espacio extracelular entre las neuronas. Las placas tienen núcleos centrales de depósitos amiloides formados principalmente por fibrillas de un péptido con 40-42 aminoácidos referido como péptido β amiloide ($A\beta$) rodeado por neuritis degenerada y células gliales. Este péptido es el resultado de la transformación proteolítica de una proteína precursora llamada proteína precursora de β amiloide (β APP).

La EA se puede clasificar de acuerdo a la edad de aparición, como de aparición temprana (edad inferior a 60 años) y de aparición tardía (edad superior a 60 años), de acuerdo con la existencia de una herencia autosómica dominante, como EA familiar o EA esporádica. Las formas de EA familiares de aparición temprana pueden estar asociadas a una mutación conocida en los genes que codifican la β APP, la presenilina 1 y presenilina 2 (que se encuentran, respectivamente, en los cromosomas 21, 14 y 1). Estas clasificaciones no son mutuamente excluyentes. Las formas más frecuentes son las formas esporádicas de aparición tardía.

En la práctica clínica, el diagnóstico de la EA se lleva a cabo mediante criterios clínicos basados en la presencia de las típicas características clínicas y la exclusión de otros tipos de demencia mediante técnicas de neuroimagen y el análisis de sangre. Utilizando estos criterios, la fiabilidad del diagnóstico es aceptable, aunque, de acuerdo a estudios realizados utilizando la autopsia del cerebro, entre el 10-20% de los pacientes diagnosticados con EA padeció una enfermedad diferente. Por otra parte, los métodos de diagnóstico actuales sólo pueden llevarse a cabo cuando el proceso neurodegenerativo es tan avanzado que el paciente sufre de demencia severa y los daños cerebrales son tan extensos que el número de medidas terapéuticas son limitadas. El diagnóstico definitivo requiere del examen patológico del tejido cerebral post mortem.

En vista del hecho de que $A\beta$ se acumula en el cerebro de pacientes con EA y es un elemento central en la patogénesis de la EA, esta proteína ha sido considerada como el candidato más adecuado como biomarcador de EA. Sin embargo, la utilización de $A\beta$ como biomarcador de plasma para I se enfrenta al problema de que las concentraciones de los péptidos $A\beta A\beta(1-40)$ y $A\beta(1-42)$ en el suero son extremadamente bajas, por lo que no hay ensayos que sean lo suficientemente sensibles para permitir una detección fiable de dichas especies peptídicas.

Se han utilizado muchos ensayos diferentes para determinar los niveles de péptidos beta amiloides en muestras biológicas (véase, por ejemplo los métodos descritos por Scheuner y otros (Nature Med., 1996, 2:864-870), Tamaoka A y otros (J. Neurol Sci., 1996, 141, 65-68); Suzuki, N. y otros (Science, 1994, 264:1336-1340). documento WO200722015, Vanderstichele H y otros (Amyloid, 2000, 7, 245-258), Fukomoto y colaboradores (Arch. Neurol 2003, 60, 958-964.), Mehta y otros (Arch. Neurol 57, 2000, 100-105.), Mayeux, R. y otros (Ann Neurol 1999, 46, 412-416), Lanz, T. A. y Schachter, J. B. (J. Neuroscience Methods, 2006, 157:71-81), documento WO200750359, documento WO0162801, documento WO0315617, documento WO0246237, documento WO0413172. Sin embargo, todos los ensayos basados en ELISA conocidos hasta la fecha tienen un límite de detección menor que no está en el intervalo de pg/ml de un solo dígito como máximo, que es suficiente para detectar $A\beta 40$ y $A\beta 42$ en CSF, así como para la detección de dichas especies en el plasma en pacientes que sufren de EA familiar, pero no son adecuados para la detección de $A\beta 42$ en el plasma de pacientes que sufren de EA esporádica, en los que la concentración plasmática $A\beta 42$ es mucho menor.

Hasta la fecha, los únicos ensayos de péptido $A\beta$ que muestran un límite inferior de detección inferior a los pg/ml de un solo dígito corresponden a los ensayos descritos en el documento WO200646644 y en el documento WO2009015696.

El documento WO200646644 describe un ensayo sándwich de electroquimioluminiscencia (ECL) en el que el Acm 21F12 (que reconoce los aminoácidos 33-42 de $A\beta 42$) está acoplado a microesferas magnéticas, que se utilizan a continuación para capturar el péptido $A\beta 42$ en la muestra que contiene $A\beta 42$ y posteriormente se ponen en contacto

con el Acm 3D6 acoplado a un complejo de rutenio. La cantidad de anticuerpo 3D6 unido se detecta mediante la luminiscencia emitida por el complejo de rutenio cuando se aplica energía eléctrica. Utilizando este ensayo, los inventores son capaces de detectar hasta un valor tan bajo como 0,5 pg/ml de una A β 42 estándar. Sin embargo, cuando el mismo ensayo se utiliza para comparar A β 42 en muestras de plasma de pacientes con EA y controles sanos, no se pudo observar diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes, lo que llevó a los inventores a la conclusión de que la cantidad de A β 42 intacta en el suero es muy baja debido a la degradación y se volvió a un ensayo de ELISA competitivo utilizando Acm 21F12 que proporciona niveles de sensibilidad bajos en el intervalo de los ng/ml.

10 El documento WO2009015696 describe un ensayo de ELISA sándwich de alta sensibilidad en el que el anticuerpo de detección se pone en contacto con un reactivo marcado con biotina que muestra especificidad para dicho anticuerpo. El reactivo se pone en contacto con estreptavidina que está acoplada a peroxidasa. Posteriormente, se detecta la actividad de la peroxidasa mediante colorimetría utilizando TMB o fluorescencia utilizando QuantaBlue.

15 El documento WO2006053251 describe un método para la determinación de especies de péptidos beta amiloides en una muestra que comprende poner en contacto una muestra con un agente desnaturalizante, la extracción de la mezcla de péptidos de a partir de la mezcla muestra-agente desnaturalizante, separar las especies beta amiloide de la mezcla y determinar la cantidad de especies de péptidos beta amiloides. Este método requiere una etapa de separación de los péptidos antes de la determinación, lo que da como resultado tiempos de procesamiento y costes elevados.

20 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de ensayos inmunológicos y kits mejorados para detectar péptidos derivados de A β que superen los problemas de los métodos y kits conocidos en la técnica, en particular, que sean lo suficientemente sensibles para detectar péptidos A β de una manera fiable en el plasma de pacientes que sufren de EA esporádica.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

30 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico en un sujeto de una enfermedad neurodegenerativa, para la detección de una etapa anterior de una enfermedad neurodegenerativa o para la distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa, que comprende las etapas de

(i) determinar uno o más parámetros seleccionados del grupo de

35 (a) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto, (b) los niveles agregados de uno o más péptidos beta amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto y de dichos uno o más péptidos beta amiloides asociados a los componentes macromoleculares presentes en dicha muestra biológica, en el que dichos niveles agregados se determinan mediante la cuantificación de la cantidad de dichos uno o más péptidos beta amiloides en la fracción libre de células de dicha muestra después de poner en contacto dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de los componentes presentes en la muestra biológica, (c) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides asociados a las células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que dicho nivel se determina mediante el aislamiento de la fracción de células de dicha muestra biológica, el contacto de dicha fracción celular de dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de las células presentes en la muestra.

50 (ii) comparar el valor de, como mínimo, uno de los parámetros (b) o (c) o el valor de un parámetro calculado resultante de combinar aritméticamente, como mínimo, dos de los parámetros (a) a (c) con un valor de referencia correspondiente al valor de dichos parámetros (b) o (c), o dicho parámetro calculado en una muestra de referencia y

55 (iii) diagnosticar la enfermedad neurodegenerativa, detectar una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa o distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa cuando hay una alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia.

60 en el que la muestra biológica es plasma o sangre, y en el que los parámetros determinados en la etapa (i) son un o varios de los parámetros seleccionados entre el grupo de

65 (a) 1ab40, que corresponde al nivel de péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto, (b) 1ab42, que corresponde al nivel de péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto, (c) 2ab40, correspondiente a los niveles agregados del péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de

dicho sujeto y del péptido ABETA40 asociado a componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab40 es determinado al cuantificar la cantidad de péptido ABETA40 en dicha muestra después de contactar dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación del péptido ABETA40, a partir de los componentes presentes en la muestra biológica,

(d) 2ab42, correspondiente al nivel agregado del péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y de péptido ABETA42 asociado a componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab42 es determinado al cuantificar la cantidad de péptido ABETA42 en dicha muestra después de contactar dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación del péptido ABETA42 a partir de de los componentes presentes en la muestra biológica,

(e) 3ab40, correspondiente al nivel del péptido ABETA40 asociado a células de una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab40 es determinado cuantificando la cantidad de péptido ABETA40 después de contactar la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación de los péptidos amiloide beta de las células presentes en la muestra y

(f) 3ab42, correspondiente al nivel del péptido ABETA42 asociado a células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab42 es determinado cuantificando la cantidad de péptido ABETA42 después de contactar la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación de los péptidos amiloide beta de las células presentes en la muestra.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la determinación de péptidos beta amiloides en una muestra biológica que comprende

(i) un agente solubilizante de proteínas y

(ii) como mínimo, un anticuerpo contra un péptido beta amiloide.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1: Gráfico de puntos A-F de las mediciones para (A) UP A β 1-40, (B) DP A β 1-40, (C) CB A β 1-40, (D) UP A β 1-42, (E) DP A β 1-42 y (F) CB A β 1-42 obtenidos en los dos laboratorios externos (Lab1 y Lab2). La mayoría de los puntos están cerca de la línea de concordancia de lo que indica un grado sustancial casi perfecto de acuerdo en las mediciones. El inserto de la parte baja derecha indica el coeficiente de correlación de concordancia (CCC) y los intervalos de confianza del 95%.

Figura 2: Marcadores directos de A β 1-40 (A), de A β 1-42 (B) y marcadores calculados de A β 1-40 y A β 1-42 (C). A. Concentraciones en pg/ml de A β 1-40 libre en el suero (FP), niveles agregados de A β 1-40 en el plasma (incluyendo A β 1-40 libre y A β 1-40 unido a los componentes del plasma) (TP) y A β 1-40 unido a las células (CB) en los controles sanos (CS), pacientes que sufren deterioro cognitivo leve (DCL), y pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer (EA). B. Concentraciones en pg/ml de A β 1-42 libre en el suero (FP), el niveles agregados de A β 1-42 en plasma (incluyendo A β 1-42 libre y A β 1-42 unido a los componentes del plasma) (TP) y A β 1-42 unido a las células (CB) en controles sanos (CS), pacientes que sufren deterioro cognitivo leve (DCL), y pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer (EA). C. Valores agregados en pg/ml de plasma total de A β 1-40 (obtenido a través de una muestra de plasma con un agente solubilizante de proteínas), más A β 1-40 unido a la célula (TP + CB A β 1-40), del total de A β 1-42 en plasma (obtenidos poniendo en contacto una muestra de plasma con un agente solubilizante de proteínas) más A β 1-42 unido a la célula (TP + CB A β 1-42), o los valores agregados de TP + CB A β 1-40 y A β 1-42 (TP + CB-42 A β 1). H, M y A son significativas ($p < 0,05$) con respecto a CS, DCL y AD, respectivamente. * Significa $p < 0,01$.

Figura 3: Gráfico de puntos A-F para valores de (A) DP A β 1-40, (B) CB A β 1-40, (C) UP A β 1-42, (D) DP A β 1-42, (E) T40 y (F) valores T- β APB en participantes CS, DCL y EA. Números junto al * indica el valor de los valores atípicos en el DCL y grupos de EA que, por la claridad de la representación, no están representados en la misma escala del eje de ordenadas. La línea horizontal representa el valor de corte entre DCL y CS.

Figura 4: curva ROC para el marcador lab40 en pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva ROC = 0,510.

Figura 5: curva ROC para el marcador 2ab40 en pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva ROC = 0,778.

Figura 6: curva ROC para el marcador 3ab40 para los pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva ROC = 0,458.

Figura 7: curva ROC para el marcador 1ab42 para los pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva ROC = 0,576.

Figura 8: curva ROC para el marcador 2ab42 para pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva ROC = 0,667.

Figura 9: curva ROC para el marcador 3ab42 para pacientes con EA/CS. El área bajo la curva ROC = 0,744.

Figura 10: curva ROC para el marcador 3ab42 para pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva ROC = 0,508.

Figura 11: curva ROC para los marcadores 2ab40 + 3ab40 para pacientes con deterioro cognitivo leve/CS. El área bajo la curva es 0,830.

5 **Figura 12:** curva ROC para los marcadores 2ab42 + 3ab42 para pacientes con TDA/CS. El área bajo la curva es 0,713.

Figura 13: curva ROC para los marcadores 2ab42 + 3ab42 para pacientes con DCL/CS. El área bajo la curva es 0,777.

10 **Figura 14:** curva ROC para los marcadores 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42 con DCL/CS. El área bajo la curva es 0,848.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Los autores de la presente invención han descubierto que, sorprendentemente, la dilución del plasma con una muestra tampón da como resultado un aumento de los niveles detectables de A β 1-40 y A β 1-42. Sin querer unirse a ninguna teoría, se cree que la dilución del plasma da como resultado un cambio en la fuerza iónica y en las interacciones moleculares dentro de la muestra lo que conduce a la liberación de A β 1-40 y A β 1-42 unidos a las proteínas plasmáticas y otros componentes.

20 De este modo, el incremento en las mediciones después de la dilución del plasma puede ser debido a la detección de péptidos A β liberados de las proteínas y otros componentes del plasma y podría interpretarse como una estimación del nivel total de A β en el plasma.

25 En cualquier caso, estos resultados muestran que los niveles de péptido A β en sangre son mucho mayores de lo que podría estimarse a partir de analizar simplemente sus niveles en el plasma no diluido. Una determinación completa de los niveles agregados de β APB en sangre de debe incluir la cuantificación de los péptidos libres en el plasma, los que se unen a las proteínas plasmáticas y los que se unen a las células sanguíneas. Esta cuantificación global de los diferentes componentes de la β APB podría dar una medición más precisa de los niveles de A β y podría ayudar a entender la compleja regulación de los péptidos A β en la salud y en la enfermedad. Además, los niveles de dichas colecciones de péptidos beta amiloides, así como el valor de ciertos parámetros calculados resultantes de la combinación aritmética de las concentraciones de las diferentes colecciones con las concentraciones de péptidos beta amiloides libres, se puede utilizar para determinar si un paciente sufre una enfermedad neurodegenerativa, si un paciente sufre un estado anterior a una enfermedad neurodegenerativa y para distinguir una enfermedad neurodegenerativa de un estado previo a una enfermedad neurodegenerativa.

Método de diagnóstico de la invención

40 De este modo, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico en un sujeto de una enfermedad neurodegenerativa, para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa o para la distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa que comprende las etapas de

45 (i) determinar uno o más parámetros seleccionados del grupo de

- (a) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (b) los niveles agregados de uno o más péptidos amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto y de dichos uno o más péptidos beta amiloides asociados a los componentes macromoleculares presentes en dicha muestra biológica, en el que dichos niveles agregados se determinan mediante la cuantificación de la cantidad de dichos uno o más péptidos beta amiloides en la fracción libre de células de dicha muestra después de poner en contacto dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (c) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides asociados a las células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que dicho nivel se determina mediante el aislamiento de la fracción de células de dicha muestra biológica, el contacto de dicha fracción celular de dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de las células presentes en la muestra.

60 (ii) comparar el valor de, como mínimo, uno de los parámetros (b) o (c) o el valor de un parámetro calculado resultante de combinar aritméticamente, como mínimo, dos de los parámetros (a) a (c) con un valor de referencia correspondiente al valor de dichos parámetros (b) o (c), o dicho parámetro calculado en una muestra de referencia y

65

(iii) diagnosticar la enfermedad neurodegenerativa, detectar una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa o distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa cuando hay una alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia.

5 en el que la muestra biológica es plasma o sangre, y en el que los parámetros determinados en la etapa (i) son un o varios de los parámetros seleccionados entre el grupo de

- 10 (a) 1ab40, que corresponde al nivel de péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto,
 (b) 1ab42, que corresponde al nivel de péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto,
 (c) 2ab40, correspondiente a los niveles agregados del péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y del péptido ABETA40 asociado a componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab40 es determinado al cuantificar la cantidad de péptido ABETA40 en dicha muestra después de contactar dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación del péptido ABETA40, a partir de los componentes presentes en la muestra biológica,
 15 (d) 2ab42, correspondiente al nivel agregado del péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y de péptido ABETA42 asociado a componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab42 es determinado al cuantificar la cantidad de péptido ABETA42 en dicha muestra después de contactar dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación del péptido ABETA42 a partir de de los componentes presentes en la muestra biológica,
 20 (e) 3ab40, correspondiente al nivel del péptido ABETA42 asociado a células de una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab40 es determinado cuantificando la cantidad de péptido ABETA40 después de contactar la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación de los péptidos amiloide beta de las células presentes en la muestra y
 25 (f) 3ab42, correspondiente al nivel del péptido ABETA42 asociado a células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab42 es determinado cuantificando la cantidad de péptido ABETA42 después de contactar la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación de los péptidos amiloide beta de las células presentes en la muestra.
 30

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "diagnóstico", incluye la evaluación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad, la determinación de si un sujeto tiene actualmente la enfermedad, y también el pronóstico de un sujeto afectado por la enfermedad. Tal como se comprenderá por las personas técnicas en la materia, esta evaluación normalmente no puede ser correcta para el 100% de los sujetos que van a ser diagnosticados, aunque preferentemente es correcta. El término, sin embargo, requiere que pueda identificarse en una parte estadísticamente significativa de los sujetos que sufren la enfermedad o tienen una predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa, se puede determinar de forma sencilla por la persona técnica en la materia utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación de los valores de p, prueba de la t de Student, de Mann-Whitney, etc. Los detalles se proporcionan en Dowdy y Wearden "Estadísticas para la Investigación", John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son, como mínimo, del 50%, como mínimo, del 60%, como mínimo, del 70%, como mínimo, del 80%, como mínimo, del 90%, como mínimo, del 95%. Los valores de p son preferentemente de 0,2, 0,1 ó 0,05.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "sujeto" se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, los animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferentemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "enfermedad neurodegenerativa", se refiere a un estado o trastorno en el que las células neuronales se pierden debido a la muerte celular provocando un deterioro de las funciones cognitivas o provocan daños, disfunciones o complicaciones que pueden ser caracterizados por aberraciones neurológicas, neurodegenerativas, fisiológicas, psicológicas o de comportamiento. Entre las enfermedades neurodegenerativas adecuadas que pueden diagnosticarse con los métodos de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, degeneración macular relacionada con la edad, a enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, demencia inducida por radioterapia, lesión axonal, depresión cortical propagada aguda, alfa-sinucleinopatías, isquemia cerebral, enfermedad de Huntington, isquemia cerebral focal permanente, la regeneración del nervio periférico, modelo post estado epiléptico, lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica esporádica y la encefalopatía espongiiforme transmisible.

60 En una realización preferente, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer. El término "enfermedad de Alzheimer" (o "demencia senil") se refiere a un deterioro mental asociado con la enfermedad específica cerebral degenerativa que se caracteriza por placas seniles, ovillos neuríticos, y la pérdida neuronal progresiva que se manifiesta clínicamente en el déficit progresivo de la memoria, confusión, problemas de conducta,

incapacidad para cuidar de uno mismo, deterioro físico gradual y, en última instancia, la muerte. Los pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer se identifican mediante el criterio NINCDS-ADRDA (CDR = 1, MMSE entre 16 y 24 puntos y atrofia temporal medial (determinada por resonancia magnética) de más de 3 puntos en la escala Scheltens.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa", se refiere a una situación de transición que se produce entre los individuos normales y las personas que sufren de enfermedades neurodegenerativas y que se caracteriza por la aparición de algunos de los signos y síntomas de las enfermedades neurodegenerativas o por la aparición de un subconjunto de los signos y síntomas observados en los pacientes que sufren la enfermedad neurodegenerativa. En una realización preferente, la etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa es el deterioro cognitivo leve (a continuación, DCL), que se refiere a una etapa de transición de deterioro cognitivo entre el envejecimiento normal y la enfermedad de Alzheimer temprana. Generalmente, los pacientes se identifican con DCL, si cumplen los criterios de la Clínica Mayo (CDR = 0,5, que muestran una atrofia temporal medial (determinada por resonancia magnética) que es superior a 3 puntos en la escala Scheltens, muestran un patrón de hipometabolismo parietal y/o temporal en la tomografía por emisión de positrones con 18-fluorodeoxiglucosa (PET-FDG) (sugestivo de EA).

El término "distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa" se refiere a la capacidad de discriminar entre un paciente que se encuentra en la etapa anterior o prodrómica de una enfermedad neurodegenerativa de pacientes que ya sufren la enfermedad. En el caso particular de que la enfermedad neurodegenerativa sea la enfermedad de Alzheimer, el método de la presente invención permite la distinción entre la enfermedad de Alzheimer y la fase prodrómica de dicha enfermedad conocida como deterioro cognitivo leve (DCL):

En una primera etapa, el método de la presente invención comprende la determinación de, como mínimo, un parámetro seleccionado del grupo de

- (a) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (b) los niveles agregados de o más péptidos amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto y de dichos uno o más péptidos beta amiloides asociados a los componentes macromoleculares presentes en dicha muestra biológica, en el que dichos niveles agregados se determinan mediante la cuantificación de la cantidad de dichos uno o más péptidos beta amiloides en la fracción libre de células de dicha muestra después de poner en contacto dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (c) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides asociados a las células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que dicho nivel se determina mediante el aislamiento de la fracción de células de dicha muestra biológica, el contacto de dicha fracción celular de dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de las células presentes en la muestra

en el que la muestra biológica es plasma o sangre, y en el que los parámetros son uno o varios de los parámetros seleccionados del grupo de

- (a) 1ab40, que corresponde al nivel de péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (b) 1ab42, que corresponde al nivel de péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (c) 2ab40, correspondiente a los niveles agregados del péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y del péptido ABETA40 asociado a componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab40 es determinado al cuantificar la cantidad de péptido ABETA40 en dicha muestra después de contactar dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación del péptido ABETA40, a partir de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (d) 2ab42, correspondiente al nivel agregado del péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y de péptido ABETA42 asociado a componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab42 es determinado al cuantificar la cantidad de péptido ABETA42 en dicha muestra después de contactar dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación del péptido ABETA42 a partir de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (e) 3ab40, correspondiente al nivel del péptido ABETA40 asociado a células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab40 es determinado cuantificando la cantidad de péptido ABETA40 después de contactar la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación de los péptidos amiloide beta de las células presentes en la muestra y
- (f) 3ab42, correspondiente al nivel del péptido ABETA42 asociado a células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab42 es determinado cuantificando la cantidad de péptido ABETA42 después de contactar la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para producir la disociación de los péptidos amiloide beta de las células presentes en la muestra.

En la presente memoria descriptiva, el término "péptido beta amiloide" se utiliza de manera intercambiable con "Abeta", "Abeta", "beta AP", "A beta péptido", o "péptido A β " se refiere a una familia de péptidos que son el componente químico principal de la placas seniles y los depósitos amiloides vasculares (angiopatía amiloide) que se encuentran en el cerebro en pacientes de la enfermedad de Alzheimer (EA), Síndrome de Down, y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D). Los péptidos beta amiloides son fragmentos de proteína precursora de beta-amiloide (APP) que comprende un número variable de aminoácidos, típicamente 38-43 aminoácidos.

Los péptidos beta amiloides se expresan comúnmente como "A β x-y)" en el que x representa el número de aminoácidos del extremo amino del péptido beta amiloide e y representa el número de aminoácidos del extremo carboxílico. Por ejemplo, A β 1-40) es un péptido beta amiloide cuyo amino terminal comenzará en el aminoácido número 1 y el extremo carboxílico terminal en el aminoácido número 40, cuya secuencia está dada por la Sec. No. Id. 1. Los péptidos beta amiloides que se detectan de acuerdo con el método de la presente invención son A β (1-40) y A β (1-42) (Sec. No. Id. 5)

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "A β (1-42)" se refiere a un péptido de 42 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 672 a 713 (Sec. No. Id. 5) de APP y que se produce por la escisión proteolítica secuencial de la proteína precursora amiloide (Sec. No. Id. 15) por las β - y γ -secretasas.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "A β (1-40)" se refiere a un péptido de 40 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 672 a 711 (Sec. No. Id. 1) y que se produce por la escisión proteolítica secuencial de la proteína precursora amiloide (Sec. No. Id. 15) por las β - y γ -secretasas.

Tal como se entiende en la presente invención, el término "muestra biológica", incluye (1) fluidos biológicos tales como sangre completa, suero y plasma; y (2) componentes de la sangre, tales como plasma, suero, células sanguíneas, y plaquetas. Los métodos de la presente invención son particularmente adecuados para la medición de A β en una muestra de sangre de un animal humano o no humano, tal como sangre completa, plasma, o una muestra que contiene cualquiera de los componentes sanguíneos en cualquier cantidad.

El término "sangre completa" significa la sangre a partir de un humano o animal que contiene tanto componentes celulares como el componente líquido. La sangre completa puede estar en estado coagulado o en un estado no coagulado. "La sangre completa" incluye también una porción en la que la sangre o la totalidad de los componentes celulares, tales como las células blancas de la sangre o células rojas de la sangre, han sido lisados.

El término "plasma" se refiere al componente líquido de la sangre completa. Dependiendo del método de separación utilizado, el plasma puede estar completamente libre de componentes celulares, o pueden contener diversas cantidades de plaquetas y/o pequeñas cantidades de otros componentes celulares.

El término "suero" se refiere al plasma sin la proteína fibrinógena de coagulación y otros factores de coagulación.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "péptido beta amiloide libre", se refiere a péptidos beta amiloides que no están asociados a ningún componente de la muestra biológica y que están disponibles fácilmente para su unión a un anticuerpo específico. Este péptido puede determinarse por técnicas inmunológicas convencionales poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo específico para dicho péptido. En una realización preferente, el nivel de péptido amiloide libre se determina en el plasma.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "péptido beta amiloide asociado a componentes macromoleculares", se refiere al péptido beta amiloide que está unido no-covalentemente o enlazado a moléculas que se encuentran en la muestra biológica en estudio. Por lo general, este péptido no es fácilmente accesible para detección inmunológica y, por tanto, requiere de un tratamiento previo de la muestra biológica a fin de lograr la separación del péptido de los componentes. En estas condiciones, el péptido beta amiloide unido a los componentes macromoleculares será liberado de dichos componentes y estará disponible para la detección inmunológica utilizando anticuerpos específicos. Dado que la muestra biológica ya contiene una cierta cantidad de péptido beta amiloide libre, la cantidad total de péptido amiloide libre después de poner en contacto con la muestra el agente de solubilización de proteínas, será el nivel agregado de péptido beta amiloide libre presente originalmente y el nivel de péptido beta amiloide que se ha liberado mediante el tratamiento con el agente solubilizante de proteínas. En caso de que el nivel de péptido beta amiloide asociado a los componentes macromoleculares presentes en la muestra biológica necesite ser determinado, esto se puede hacer típicamente determinando el nivel de péptido beta amiloide libre antes del tratamiento con el agente solubilizante de proteínas y el nivel de péptido beta amiloide libre después del tratamiento con el agente solubilizante de proteínas y restando el primer valor del segundo valor. Para el propósito de la presente invención, es generalmente adecuado determinar el nivel agregado de péptidos beta amiloides libres que incluye los péptidos beta amiloides libres originalmente, así como el nivel de péptidos beta amiloides que han sido liberados a partir de los componentes macromoleculares después del tratamiento con el agente solubilizante de proteínas. Por lo tanto, el parámetro que normalmente se determina cuando la muestra se

trata para disociar el péptido amiloide de los componentes macromoleculares corresponde a la adición del péptido libre presente en la muestra y el péptido asociado a los componentes macromoleculares.

5 Los componentes macromoleculares de la muestra que pueden unirse a péptidos beta amiloides y que contribuyen a la mezcla de péptidos beta amiloides asociados a los componentes macromoleculares incluyen tanto proteínas como lípidos. En el caso particular de que el método se lleve a cabo en muestras de sangre o plasma, los componentes macromoleculares incluyen, sin que constituyan limitación, proteínas y lípidos de la sangre. Entre los ejemplos de proteínas de la sangre se incluyen albúmina G, inmunoglobulinas, inmunoglobulina E, inmunoglobulina M, inmunoglobulina A, fibrinógeno (fibrina y productos de degradación del mismo), alfa-1-antitripsina, prealbúmina, antitripsina alfa 1, glicoproteína ácida alfa 1, fetoproteína alfa-1, haptoglobina alfa 2, macroglobulina, ceruloplasmina, transferrina, C3/C4 Beta 2 microglobulina, lipoproteína beta, alfa, beta y gamma-globulinas, proteína C-reactiva (CRP), protrombina, proteína fijadora de tiroxina, transtiretina y similares. Entre los ejemplos de los lípidos de la sangre se incluyen ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos y similares. La cantidad de péptido beta amiloide asociado a los componentes macromoleculares puede determinarse poniendo en contacto una muestra libre de células de la muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para inducir la liberación de dichos péptidos beta amiloides de los componentes macromoleculares.

20 En la presente memoria descriptiva, por poner en contacto se entiende la adición a la muestra de una cantidad suficiente de una solución que comprende el agente solubilizante de proteínas de modo que la concentración del agente solubilizante de proteínas en la mezcla es suficiente para solubilizar eficazmente el péptido beta amiloide que está unido a las proteínas y células en la muestra. Preferentemente, el agente solubilizante de proteínas se encuentra en solución en una solución tampón de modo que la adición del agente de solubilización de proteínas no da lugar a una modificación sustancial en el pH de la muestra.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "agente solubilizante de proteínas", se refiere a cualquier compuesto de la composición capaz de alterar la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria de polipéptidos, dejando intacta la estructura primaria. En virtud de estas propiedades, los agentes solubilizantes de proteínas son capaces de aumentar la solubilidad de proteínas en una muestra, así como de prevenir la agregación inter e intramolecular de las proteínas. Entre los agentes solubilizantes de proteínas adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, detergentes, agentes caotrópicos, agentes reductores o sus mezclas.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "detergente", es un sinónimo utilizado para surfactantes en general, y se refiere a agentes anfipáticos surfactantes que, cuando se añaden a un líquido, reducen la tensión superficial del líquido en comparación con el mismo líquido en ausencia del detergente. Los detergentes son capaces además de prevenir la agregación de las proteínas y de prevenir la interacción o la unión no específica de contaminantes a una proteína de interés. Entre los detergentes adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, detergentes no iónicos (neutros), aniónicos, catiónicos, o zwitteriónicos.

40 Entre los ejemplos de detergentes no iónicos o neutros se incluyen, sin que constituyan limitación, los detergentes de la serie Tween, tales como Tween[®] 20, Tween[®] 21, Tween[®] 40, Tween[®] 60, Tween[®] 61, Tween[®] 65, Tween[®] 80, Tween[®] 81, Tween[®] 85, detergentes de la serie Span[®], tales como Span[®] 20; detergentes de la serie Tergitol, tales como Tergitol tipo 15-S-12; detergentes de la serie Brij[®], tales como Brij[®] 35, Brij[®] 56, Brij[®] 72, Brij[®] 76, Brij[®] 92V, Brij[®] 97, Brij[®] 58P; detergentes de la serie Tween, tales como Tween[®] 20, Tween[®] 21, Tween[®] 40, Tween[®] 60, Tween[®] 61, Tween[®] 65, Tween[®] 80, Tween[®] 81, Tween[®] 85; detergentes de la serie Triton[®], tales como Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Triton[®] CF-21, Triton[®] CF-32, Triton[®] DF-12, Triton[®] DF-16, Triton[®] GR-5M, Triton[®] X-102, Triton[®] X-15, Triton[®] X-151, Triton[®] X-207, Triton[®] X-165, Triton[®] X-305, Triton[®] X-405, Triton[®] X-45, Triton[®] X-705-70, o una variante conservante no iónico de, como mínimo, uno de dichos detergentes.

50 Entre los ejemplos de detergentes aniónicos se incluyen, sin que constituyan limitación, ácido cólico y derivados del mismo, ácido taurocólico, Triton X-200, Triton W-30, Triton-30, Triton-770, sulfosuccinato de dioctilo, N-óxido de N₅N-dimetildodecilamina, 1-alkilsulfonatos sódicos, N-lauroilsarcosina o sales de ácidos grasos.

55 Entre los ejemplos de detergentes catiónicos se incluyen, sin que constituyan limitación, mono y di-metil aminas grasas, sales de alquil trimetil amonio, sales de dialquil dimetil amonio, acetatos de aminoalquilo, acetatos trialquilamonio, sales alquildimetilbencil amonio, sales de dialquimetilbencil amonio, sales de haluro de alquilpiridinio y sales de alquilo (alquilo sustituido) piridinio, sales de alquiltiometilpiridinio sales de alquilamidometilpiridinio, sales de alquilquinolinio sales de alquilisoquinolinio, sales de N,N-alquilmetilpirolidonio, sales de 1,1-dialquilpiperidinio, sales de 4,4-dialquiltiamorfolinio, sales de 4,4-dialquiltiamorfolinio-1-óxido, metilsulfato de metil bis(alquiletil)-2-alquilimidazolinio (y otras sales), metilsulfato de metil bis(alquilamidoetil)-2-hidroxiethylamonio (y otras sales), sales de alquilamidopropil dimetilbencilamonio, sales de carboxialquil-alquildimetilamonio, óxidos de alquilamina, óxidos de alquildimetil amina, sales de poli(vinilmetilpiridinio), sales de poli(vinilpiridina), polietileniminas, bicarbonatos de trialquifosfonio (y otras sales), sales de trialquilmetilfosfonio, sales de alquiletilmetilsulfonio y sales de alquildimetilsulfoxonio.

Entre los ejemplos de detergentes zwitteriónicos se incluyen, sin que constituyan limitación, 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-L-propanosulfonato (CHAPSO), N-(alquil C10-C16)-N,N-dimetilglicino betaina (EMPIGEN BB); caprilil sulfobetaina (SB3-10); 3-[N,N-dimetil (3-miristoilaminopropil)amonio] propanosulfonato (Amidosulfobetaina-14; ASB-14), N-tetradecil-N, N-dimetil-3-amonio-L-propoanesulfonato (detergente 3-14; ZWITTERGENT), N-dodecil-N,N'-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, N-octadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, N-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato; Mirataine CB; Mirataine BB; Mirataine CBR; Mirataine ACS; MiraCare 2MHT y MiraCare 2MCA.

En una realización preferente, el reactivo solubilizante de proteína es un detergente. En una realización aún más preferente, el detergente es Tween 20. En una realización aún más preferente, se utiliza Tween 20 a una concentración del 0,5%.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, un "agente caotrópico", se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que alteran los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrófobas entre las proteínas y dentro de las mismas. Cuando se utilizan a altas concentraciones, los agentes caotrópicos perturban la estructura secundaria de las proteínas y disuelven proteínas que no serían solubles de otro modo. Entre los agentes caotrópicos se incluyen, sin que constituyan limitación, urea, isotiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio (NaSCN), clorhidrato de guanidina, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, tetracloroacetato de litio, perclorato sódico, tetracloroacetato de rubidio, yoduro de potasio o trifluoroacetato de cesio.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "agente reductor", se refiere a cualquier compuesto o material que mantiene los grupos sulfidrilos en estado reducido y reduce los enlaces disulfuro intra o intermoleculares. A modo de ejemplo, entre los agentes reductores adecuados para el método de la presente invención incluyen agentes reductores de sulfidrilos o fosfina. Entre los ejemplos de agentes reductores de sulfidrilos incluyen ditiotreitolo (DTT), ditioeritritolo (DTE), y β -mercaptoetanol. Entre los ejemplos de agentes reductores de fosfina se incluyen tributilfosfina (PDD) y tris-carboxietilfosfina (TCEP).

Típicamente, en primer lugar la muestra biológica se procesa para eliminar la fracción celular. La muestra libre de células se pone en contacto con el agente solubilizante de proteínas. En una realización preferente, la muestra se diluye con un tampón que comprende el agente solubilizante de proteínas. Típicamente, la muestra se diluye 5 veces en una solución tampón que comprende Tween 20.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, una "solución tampón" es cualquier sustancia o mezcla de compuestos en solución que es capaz de neutralizar los ácidos y las bases sin modificar de forma apreciable la acidez o alcalinidad original de la solución. Entre las soluciones tampón adecuadas para ser utilizadas en el método de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, solución tampón de Tris, solución tampón de fosfato, solución tampón de borato, solución tampón de carbonato, solución tampón glicina-hidróxido sódico, o similares. Preferentemente, la solución tampón es una solución tampón de fosfato tal como tampón fosfato salino o PBS.

La cantidad de solución que comprende el agente solubilizante de proteínas que se añade a la muestra biológica no es esencial siempre que se logre la disociación suficiente del péptido beta amiloide. A modo de ejemplo, el fluido biológico puede diluirse en la solución que comprende el agente solubilizante proteína a una dilución de, como mínimo, 1/2 (v/v), 1/3 (v/v), 1/4 (v/v), 1/5 (v/v), 1/6 (v/v), 1/7 (v/v), 1/8 (v/v), 1/9 (v/v), 1/10 (v/v), 1/20 (v/v), 1/50 (v/v), 1/60 (v/v), 1/80 (v/v), 1/90 (v/v), 1/100 (v/v) o mayor. El técnico en la materia apreciará que se puede utilizar cualquier combinación de dichas proporciones de dilución y dichas concentraciones de agente solubilizante de proteína siempre que la concentración final de agente solubilizante de proteínas sea la adecuada para lograr el efecto deseado. Por ejemplo, la solución que contiene el agente solubilizante de proteínas puede comprender dicho o dichos agentes solubilizantes de proteínas seleccionados a una concentración que va desde el 0,001% al 0,5% (p/v). Después de haberse diluido en dicha solución que contiene el agente solubilizante de proteínas, dicho fluido biológico contiene típicamente dicho o dichos surfactantes a menos del 0,1% (p/v), preferentemente menos del 0,6% (p/v), más preferentemente no más del 0,5% (p/v), más preferentemente no más del 0,45% (p/v) y aún más preferentemente el 0,5%.

Sistemas tampón adecuados para utilización en la presente invención incluyen tampones de Tris-HCl entre los que se incluyen una sal tal como NaCl o KCl y, opcionalmente, BSA. Sistemas tampón particulares incluyen, sin que constituyan limitación,

50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20, GuHCl 1 M;
 50 mM Tris-HCl, pH 8, KCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
 50 mM Tris-HCl, pH 8, KCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20, GuHCl 1 M;
 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-80;
 50 mM Tris-HCl, pH 8, KCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-80;
 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Triton X-100
 50 mM Tris-HCl, pH 8, KCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Triton X-100;

- 50 mM Tris-HCl, pH 8; 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,1%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; BSA, 0,1% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,1%; BSA, 0,1% de Tween-20;
- 5 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 1 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 1,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 2 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 2,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 3 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 10 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20, 10% de DMSO;
- 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20, GuHCl 0,5 M;
- 50 mM Tris-HCl, pH 6, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 7, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 50 mM Tris-HCl, pH 9, NaCl 0,5 M, 0,05%; de BSA, 0,05% de Tween-20;
- 15 50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M, 0,05%; BSA

Por ejemplo, cuando se utiliza Tween 20 como un agente solubilizante de proteínas, la concentración preferente es del 0,004-0.02%, más preferentemente del 0,005-0,01% (p/v).

- 20 La etapa de contacto se lleva a cabo preferentemente a una temperatura baja a efectos de inhibir las actividades proteolíticas presentes en la muestra. Las temperaturas adecuadas son de, aproximadamente, de 0-10 grados C, preferentemente de aproximadamente 3-5 grados C, por ejemplo de, aproximadamente, 4 grados C.

- 25 Una vez que el fluido biológico se ha puesto en contacto con la solución que comprende el agente solubilizante de proteínas, ambos fluidos se pueden mezclar. La mezcla puede llevarse a cabo por removimiento, preferentemente por agitación, más preferentemente por agitación a alta velocidad, lo más preferente por agitación con vórtice) durante, como mínimo, 5 segundos, preferentemente durante, como mínimo, 10 segundos, más preferentemente, como mínimo, 15 segundos (por ejemplo, durante 15-50 segundos). Velocidades ventajosas para dicha mezcla, agitación, sacudidas, agitación de alta velocidad o agitación con vórtice comprenden una velocidad de, como mínimo, 250 rpm, preferentemente de, como mínimo, 500 rpm, más preferentemente de, como mínimo, 1.000 rpm, lo más preferente de, aproximadamente, 2.000-2.500 rpm.

- 35 La etapa de contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para lograr la disociación parcial o, preferentemente, completa del péptido beta amiloide de las proteínas y lípidos presentes en la muestra biológica. Las condiciones pueden ser determinadas adecuadamente por una persona con habilidades normales en la técnica mediante el control de la cantidad de péptido beta amiloide que es detectable antes de la etapa de contacto y progresivamente a diferentes puntos temporales después de que ha tenido lugar la etapa de contacto. El curso temporal del experimento puede determinarse tal como se describe en el ejemplo de la parte experimental.

- 40 El técnico en la materia apreciará que cuando el nivel de péptido beta amiloide se determina mediante la dilución de una muestra biológica con un tampón que contiene el reactivo solubilizante de proteína, el nivel de péptido beta amiloide libre obtenido por determinación inmunológica tendrá que ser corregido a efectos de tener en consideración el factor de dilución anteriormente aplicado a la muestra biológica.

- 45 De este modo, en una realización preferente, el parámetro que se determina en la etapa (i) del método de la presente invención es uno o más de los parámetros seleccionados del grupo de nivel de péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto (denominado a continuación como 1ab40 o UP Aβ(1-40)), los niveles agregados de péptido ABETA40 libre en la muestra biológica y de péptido ABETA40 asociado a los componentes de dicha muestra biológica obtenido tal como se ha descrito anteriormente (referido a continuación como 2ab40 o DP Aβ(1-40)), el nivel de péptido ABETA42 libre en la muestra biológica (denominado a continuación 1ab42 o UP Aβ1-42)) y los niveles agregados de péptido ABETA42 libre en la muestra biológica y de péptido ABETA42 asociado a los componentes de dicha muestra biológica obtenido tal como se ha descrito anteriormente (referido a continuación como 2ab42 o DP Aβ1-42)).

- 55 Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "péptido beta amiloide asociado a células", se refiere al péptido beta amiloide que está asociado no-covalentemente a la superficie de las células presentes en la muestra biológica y que no está disponible para su unión a anticuerpos añadidos a la muestra y, por lo tanto, es indetectable inmunológicamente. Normalmente, si la muestra biológica es sangre, el péptido beta amiloide se asocia a glóbulos rojos, glóbulos blancos, entre los que se incluyen neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos y plaquetas.

- 65 La cantidad de péptido beta amiloide asociado a células en una muestra dada puede determinarse y este valor se puede utilizar sólo o en combinación con otros parámetros relacionados con péptidos beta amiloide en los métodos de la presente invención. Para este propósito, en primer lugar se requiere aislar la fracción celular de la muestra biológica. Esto puede llevarse a cabo utilizando cualquier técnica conocida para por el técnico en la materia, tal como centrifugación, sedimentación, filtración y similares. Una vez que la fracción de células de una muestra

biológica se ha aislado, las células se ponen en contacto con un agente solubilizante de proteínas.

Entre los agentes solubilizantes de proteínas adecuados se incluyen detergentes, agentes caotrópicos y agentes reductores tal como los definidos anteriormente y se proporcionan generalmente en una solución tampón a una concentración adecuada. Se han descrito anteriormente los agentes, las soluciones tampón y las concentraciones de agentes en la solución tampón adecuados. La etapa de contacto se lleva a cabo esencialmente tal como se ha explicado anteriormente en el método para liberar el péptido amiloide que está unido a los componentes (proteínas y lípidos) de la muestra biológica. En una realización preferente, el agente solubilizante de proteínas es un detergente. En una realización aún más preferente, el detergente es Tween 20. Las concentraciones adecuadas de Tween 20 para su utilización como agente solubilizante de proteínas son las que se han definido anteriormente, es decir, entre el 0,004-0,02%, más preferentemente del 0,005-0,01% (p/v).

La etapa de contacto se lleva a cabo preferentemente a una temperatura baja a efectos de inhibir las actividades proteolíticas presentes en la muestra. Las temperaturas adecuadas son de, aproximadamente, 0-10 grados C, preferentemente de, aproximadamente, 3-5 grados C, por ejemplo de, aproximadamente, 4 grados C.

Típicamente, la etapa de contacto se lleva a cabo por resuspensión de la fracción celular en la muestra biológica con la solución que comprende el agente solubilizante de proteínas. Dicha resuspensión puede llevarse a cabo por pipeteo suave arriba y abajo, removiendo, preferentemente por agitación, más preferentemente por agitación a alta velocidad, lo más preferente mediante vórtice) durante, como mínimo, 5 segundos, preferentemente durante, como mínimo, 10 segundos, más preferentemente, como mínimo, 15 segundos (por ejemplo, durante 15-50 segundos). Velocidades ventajosas para dicha mezcla, removimiento, agitación, agitación de alta velocidad o mediante vórtice comprenden una velocidad de, como mínimo, 250 rpm, preferentemente de, como mínimo, 500 rpm, más preferentemente de, como mínimo, 1.000 rpm, lo más preferente de, aproximadamente, 2.000-2.500 rpm.

La etapa de contacto se lleva a cabo en condiciones suficientes para la conseguir la disociación parcial o, preferentemente, completa del péptido beta amiloide de las células presentes en la muestra biológica. Las condiciones pueden ser determinadas adecuadamente por una persona con habilidades normales en la técnica mediante el control de la cantidad de péptido beta amiloide que es detectable antes de la etapa de contacto y progresivamente a diferentes puntos temporales después de que ha tenido lugar la etapa de contacto. El curso temporal del experimento puede determinarse tal como se describe en el ejemplo de la parte experimental.

De este modo, en una realización preferente, el parámetro que se determina en la etapa (i) del método de la presente invención es uno o más de los parámetros seleccionados del grupo del nivel de ABETA40 asociado a las células presentes en la muestra biológica (referidas a continuación como 3ab40 o CB Aβ(1-40)) y el nivel de ABETA42 asociado a las células presentes en la muestra biológica (denominado a continuación como 3ab42 o CB Aβ(1-42)).

La etapa siguiente del método de la presente invención comprende la comparación del valor de, como mínimo, uno de los parámetros (b) o (c) o el valor de un parámetro calculado resultante de combinar aritméticamente uno o más de los parámetros (a) a (c) con un valor de referencia correspondiente al valor de dichos parámetros (b) o (c), o dicho parámetro calculado en una muestra de referencia en donde (a), (b) y (c) se han definido en detalle anteriormente y corresponden, respectivamente, al nivel de un péptido beta amiloide libre en una muestra biológica de dicho sujeto (a), los niveles agregados de un péptido amiloide libre en una muestra biológica de dicho sujeto y de dicho péptido beta amiloide asociado a los componentes macromoleculares presentes en dicha muestra biológica (b) y el nivel de un péptido beta amiloide asociado a las células en una muestra biológica de dicho sujeto (c).

Los parámetros que se utilizan en la etapa (ii) del método de la presente invención son cualquiera de los parámetros directos, es decir, los parámetros que se pueden determinar directamente tal como se ha definido anteriormente y que corresponden a los definidos anteriormente como 2ab40, 3ab40, 2ab42 y 3ab42. Alternativamente, también es posible combinar aritméticamente uno o más de los parámetros directos a efectos de obtener un parámetro calculado. En la práctica, cualquier combinación aritmética de los dos parámetros o más puede dar parámetros calculados con valor de diagnóstico, entre los que se incluyen adiciones, restas, multiplicaciones, divisiones y combinaciones de las mismas. Entre los marcadores calculados particulares para su utilización en el método de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, $2ab40/2ab42$, $3ab40/3ab42$, $2ab40/3ab40$, $2ab42/3ab42$, $1ab40 + 2ab40$, $1ab40 + 3ab40$, $2ab40 + 3ab40$, $1ab40 + 2ab40 + 3ab40$, $1ab42 + 2ab42$, $1ab42 + 3ab42$, $2ab42 + 3ab42$, $1ab42 + 2ab42 + 3ab42$, $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$, $1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42$, $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$, $1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42$, $(1ab40 + 2ab40)/(1ab42 + 3ab42)$, $(2ab40 + 3ab40)/(2ab42 + 3ab42)$, $(1ab40 + 2ab40 + 3ab40)/(1ab42 + 2ab42 + 3ab42)$, $(1ab42 + 2ab42)/(1ab40 + 2ab40)$, $(1ab42 + 3ab42)/(1ab40 + 3ab40)$, $(2ab42 + 3ab42)/(2ab40 + 3ab40)$, $(1ab42 + 2ab42 + 3ab42)/(1ab40 + 2ab40 + 3ab40)$, $2ab40 - 1ab40$, $2ab42 - 1ab42$ y $(2ab40 - 1ab40)/(2ab42 - 1ab42)$. En una realización preferente, el parámetro calculado es el resultado de la adición de los parámetros 2ab40 y 3ab40 (referido a continuación como T40). En otra realización preferente, el parámetro calculado es el resultado de la adición de los parámetros 2ab42 y 3ab42 (a continuación, T42). En otra realización preferente, el parámetro calculado es el resultado de la adición de los parámetros 2ab40, 3ab40, 2ab42 y 3ab42 (referido a continuación como T-βAPB).

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "valor de referencia", se refiere a un valor del parámetro que se está utilizando para comparación y que se ha determinado en un sujeto que no sufre de una enfermedad neurodegenerativa o sin historia de enfermedad neurodegenerativa. Preferentemente, los sujetos a partir de los que se obtienen los valores de referencia para los diferentes parámetros y los parámetros calculados son pacientes que muestran una ausencia de fallos de memoria, rendimiento normal en las pruebas neuropsicológicas y ausencia de alteraciones estructurales en la imagen de resonancia magnética MRI.

En particular, se seleccionan valores de referencia que permiten una sensibilidad mayor del 85% y una especificidad superior al 75%. En otra realización preferente, se seleccionan valores de referencia de manera que se obtenga una sensibilidad mayor del 70% y una especificidad superior al 70%. Preferentemente, los valores de referencia permiten obtener una predicción con una exactitud y precisión de, como mínimo, el 80%.

En la etapa (iii) del método de la presente invención, el diagnóstico de la enfermedad neurodegenerativa, la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa o la distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo utilizando un determinado conjunto de marcadores o marcadores calculados que proporcionan niveles de especificidad y de sensibilidad particularmente adecuados. De este modo, en un ejemplo particular, el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo comparando el valor de un parámetro seleccionado del grupo 3ab40 y 2ab42 o el valor de un parámetro calculado seleccionado del grupo 2ab40 + 3ab40 y 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42.

En otra realización particular, la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo comparando el valor de un parámetro seleccionado del grupo 2ab40, 3ab40 y 2ab42 o el valor de un parámetro calculado seleccionado del grupo 2ab40 + 3ab40, 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42, 1ab40 + 2ab40 + + 3ab40 1ab42 + 2ab42 + 3ab42, 1ab40 + 2ab40 + 3ab40, 1ab42 + 2ab42 + 3ab42, 1ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42, 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 y 1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42.

En aún otra realización, la distinción entre una enfermedad neurodegenerativa y una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo comparando el valor de un parámetro seleccionado del grupo 3ab40 y 2ab42 o comparando el valor de un parámetro calculado seleccionado del grupo 2ab40 + 3ab40, 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42 y 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42.

Los valores de referencia adecuados para los diferentes métodos de diagnóstico de la presente invención se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de los métodos preferentes de la presente invención de acuerdo con el parámetro y el valor de corte.

| Método | Parámetro | Valor de corte (pg/ml) |
|---|---|------------------------|
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 /DP (Aβ1-40) | 63,8 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 3ab40/CB (Aβ1-40) | 71,9 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 3ab40/CB (Aβ1-40) | 71,1 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | 3ab40/CB (Aβ1- 40) | 211,3 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 2ab42/DP (Aβ1-42) | 47,4 |
| Detección de una etapa anterior a una 2ab42/DP enfermedad neurodegenerativa | 2ab42/DP (Aβ1-42) | 50,3 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | 2ab42/DP (Aβ1-42) | 151,7 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 3ab42/CB (Aβ1-42) | 76,9 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 3ab42/CB (Aβ1-42) | 58,8 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 + 3ab40/T40 | 132,7 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 + 3ab40/T40 | 132,7 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 + 3ab40/T40 | 550,8 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 2ab42 + 3ab42/T42 | 115,8 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 2ab42 + 3ab42/T42 | 103,3 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42/T-βAPB | 235,5 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42/T-βAPB | 235,5 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42/T-βAPB | 778,1 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42 | 272,1 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 1ab40 + 2ab40 + 3ab40 | 155,8 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 1ab42 + 2ab42 + 3ab42 | 124,3 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 | 158,3 |

| Método | Parámetro | Valor de corte (pg/ml) |
|---|-------------------------------|------------------------|
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 | 142,4 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 | 161,2 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | 1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42 | 154,7 |

Una vez que se determina el valor del parámetro o del parámetro calculado, el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa, la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa o la distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo cuando hay una alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia.

El término "alteración" se refiere a un aumento o disminución estadísticamente significativo en el valor del parámetro en cuestión con respecto al valor de referencia.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, por "estadísticamente significativa", se refiere a un análisis estadístico de la probabilidad de que exista una asociación no aleatoria entre dos o más resultados, criterios, o valoraciones, es decir, que existe un cierto grado de fiabilidad matemática de que el valor del parámetro está asociado con una población de pacientes determinada con respecto al valor de referencia.

La significación estadística de la alteración en los valores se pueden determinar utilizando valor de p, por ejemplo, cuando se utiliza valor de p, un parámetro que se identifica como que muestra una alteración significativa cuando el valor p es menor que 0,1, preferentemente menor que 0,05, más preferentemente menor que 0,01, aún más preferentemente menor que 0,005, lo más preferente menor que 0,001.

Típicamente, el valor del parámetro en cuestión pueden ser asignados como que ha "aumentado" cuando el valor por encima del valor de referencia es, como mínimo, 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso mayor, en comparación con el valor de referencia. Por otro lado, un valor del parámetro se puede considerar como que ha "disminuido" cuando es, como mínimo, 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menor en comparación con el valor de referencia. En una realización particular, la alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia es un aumento.

Se puede utilizar en la presente invención cualquier método adecuado para la determinación de péptidos. A modo de ejemplo, la concentración de péptido beta amiloide se puede determinar utilizando una o más técnicas elegidas de transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), resonancia de plasmones superficiales, reacción de precipitación, un ensayo de inmunodifusión por difusión en gel, radioinmunoensayo (RIA), citometrías de flujo de activación fluorescente (FACS), la electroforesis de gel bidimensional, electroforesis capilar, espectroscopia de masas (MS), EM de desorción/ionización de matriz asistida por láser - tiempo de vuelo (MALDI-TOF), ionización desorción de superficie aumentada por láser - tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC), seguida de espectrometría de masas en tándem (EM/EM), cromatografía en capa fina, análisis de expresión de proteína en chip y densitometría láser.

En una realización preferente, la determinación de, como mínimo, una o más de 1ab40, 1ab42, 2ab40, 2ab42 3ab40, y 3ab42 se lleva a cabo por un método inmunológico. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, "método inmunológico", cuando se aplica a una determinación, se refiere a cualquier método que implica la utilización de uno o más anticuerpos específicos para una sustancia diana a fin de determinar la cantidad/concentración de dicha sustancia diana excluyendo otras sustancias encontradas en la muestra. Entre los métodos inmunológicos adecuados se incluyen, sin que constituyan limitación, transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), resonancia de plasmones superficiales, radioinmunoensayo (RIA).

El técnico en la materia apreciará que cualquier tipo de anticuerpo es adecuado para realizar los métodos de detección inmunológicos de acuerdo con la presente invención, siempre que el anticuerpo sea suficientemente específico para discriminar eficazmente las especies beta amiloide en la muestra de otras sustancias. Entre las moléculas de anticuerpo adecuadas para utilización en los métodos inmunológicos de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación:

- (i) anticuerpos "intactos" que comprenden una región variable de unión a antígeno, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3,
- (ii) fragmentos "Fab" resultantes de la digestión con papaína de un anticuerpo intacto y que comprenden un único sitio de unión del antígeno y una región CL y una CH1,
- (iii) fragmentos "F(ab')₂" resultantes de la digestión con pepsina de un anticuerpo intacto y que contienen dos sitios de unión al antígeno,

(iv) fragmentos "Fab' " que contienen el dominio constante de cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada y tienen un único sitio de unión de antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio de la cadena pesada CH 1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpos.

(v) "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión al antígeno. Esta región se compone de un dímero de una cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación fuerte, no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDRs) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completa.

(vi) fragmentos de anticuerpos FV o "scFv" de cadena única comprenden los dominios VL y VH de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Preferentemente, las regiones VL y VH están conectadas por un polipéptido espaciador que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno.

(vii) "diacuerpos" comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectado por un espaciador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto obliga a la unión con dominios complementarios de otra cadena y favorece la unión de una molécula dimerica con dos sitios funcionales de unión a antígeno.

(viii) "anticuerpos biespecíficos" (BAB) son anticuerpos individuales, divalentes (o fragmentos inmunoterapéuticamente eficaces de los mismos) que tienen dos sitios de unión de antígeno de forma diferentemente específica. Los dos sitios antigénicos pueden estar acoplados químicamente o por métodos de ingeniería genética conocidos en la técnica.

Todos estos fragmentos de anticuerpos pueden modificarse adicionalmente mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante supresión o supresiones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones y/o recombinación y/o cualquier otra modificación o modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, modificaciones postraduccionales y químicas, tales como glicosilación y fosforilación) conocidos en la técnica ya sea bien solos o en combinación. Los métodos para la introducción de tales modificaciones en la secuencia de ADN que subyacen a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para el experto en la técnica, véase, por ejemplo, Sambrook y otros; Clonado Molecular: Manual de Laboratorio ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual"); Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición 1989 y tercera edición, 2001.

Los anticuerpos comprenden tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diferentes anfitriones, entre los que se incluyen cabras, conejos, ratas, ratones, camellos, dromedarios, llamas, seres humanos, aves y otros mediante inyección con un péptido que corresponde a un fragmento de la A β 40 o A β 42 que tiene propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Entre estos adyuvantes se incluyen, sin que constituyan limitación, coadyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias surfactantes tales como lisolecitina, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, KLH, y dinitrofenol. Entre los adyuvantes utilizados en los seres humanos, son especialmente preferentes BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Si el antígeno es un péptido, puede ser útil conjugarlo a una proteína que es inmunogénica en las especies que se van a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa de california (KLH), Portador Azul (hemocianina aislada de *Concholepas concholepas*), tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico o SOCl₂.

Para la producción de anticuerpos monoclonales, pueden utilizarse técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales utilizando el método de hibridoma, descrito por primera vez por Kohler y otros, Nature, 256:495 (1975) utilizando el procedimiento descrito en detalle en las unidades de 11.4 a 11.11 de Ausubel, F.M. y otros (Protocolos actuales en Biología Molecular, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, edición "ring-bound", 2003). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales se pueden aislar mediante procedimientos de ADN recombinante a partir de librerías de anticuerpos de fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty y otros, Nature, 348:552-554 (1990). Clacksoii y otros, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y otros, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murina y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de alta afinidad (rango nM) de anticuerpos humanos por intercambio o "shuffling" de cadenas (Marks y otros, Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para la construcción de bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y otros, Nucl. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales se puede utilizar directamente como un antisuero obtenido a partir de huéspedes inmunizados después del sangrado y la eliminación del coágulo de fibrina. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse directamente tal como sobrenadante del cultivo de hibridoma o como fluido de ascitis después de la implantación del hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped adecuado. Alternativamente, las moléculas de inmunoglobulina, ya sean policlonales o monoclonales, pueden purificarse antes de su utilización por medios convencionales tales como la purificación por afinidad utilizando péptidos derivados de péptidos beta amiloides, purificación en gel no desnaturante, HPLC o RP-HPLC, por exclusión por tamaño, purificación sobre columna de proteína A, o cualquier combinación de estas técnicas.

Entre los anticuerpos adecuados para llevar a cabo los métodos inmunológicos de la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación:

- (i) Anticuerpos que reconocen una región de la región N-terminal de péptidos beta amiloides, tales como anticuerpos específicos para los epítomos situados dentro de los aminoácidos 1 a 16, de 1 a 17, 13 a 28, 15 a 24, 1 a 5 y 1 a 11 de A β 40 o A β 42. Anticuerpos preparados contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A β 42 que se une específicamente a A β 42 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con A β 40 o A β 43,
- (ii) Anticuerpos preparados contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A β 40 que se unen específicamente a A β 40 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con A β 42, A β 39, A β 38, A β 41 o A β 43,
- (iii) Anticuerpos que reconocen al mismo tiempo la región C-terminal tanto de A β 40 como A β 42 y
- (iv) Anticuerpos específicos para la región de unión de los péptidos beta amiloides, que son adecuados para distinguir péptidos beta amiloides de otros fragmentos de APP y que se encuentra dentro de los aminoácidos 16 y 17, abarca típicamente los residuos de aminoácidos 13 a 28.
- (v) una combinación de dos o más de los anticuerpos mencionados en (i) a (iv).

En una realización preferente, la determinación de la cantidad de péptido beta amiloide se lleva a cabo mediante ELISA.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "ELISA", significa ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima y se refiere a un ensayo mediante el que se fija una cantidad desconocida de la sustancia objetivo (el péptido beta amiloide) a una superficie, y a continuación se lava un anticuerpo específico sobre la superficie de modo que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo está ligado a una enzima, y en la etapa final se añade una sustancia para que la enzima pueda convertirla a una señal detectable. Se conocen diferentes tipos de ensayos de ELISA y se pueden aplicar al método de la presente invención, entre los que se incluyen ELISA directo, ELISA sándwich, ELISA competitivo y método y dispositivo de ELISA inverso (ELISA-R m&d).

El ELISA directo se lleva a cabo poniendo en contacto la muestra de ensayo que comprende el péptido beta amiloide con un soporte sólido que ha sido anteriormente recubierto con una solución concentrada de una proteína o reactivo que no interactúan (albúmina de suero bovino, caseína). Una vez que el péptido beta amiloide presente en la muestra de ensayo se absorbe sobre el soporte, se añade un anticuerpo específico para el péptido beta amiloide en condiciones adecuadas para su unión al péptido beta amiloide. A continuación, el anticuerpo que se une se detecta con un anticuerpo secundario que está acoplado a un marcador detectable o a un enzima modificador de sustrato. A continuación, la señal resultante del marcador detectable o del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido al soporte que, a su vez, se correlaciona directamente con la cantidad de péptido beta amiloide en la muestra.

El ensayo ELISA competitivo incluye una primera etapa en la que la muestra de ensayo que comprende una cantidad desconocida de péptido beta amiloide se pone en contacto con un primer anticuerpo tal como se ha definido anteriormente. Los complejos antígeno-anticuerpo se añaden a un antígeno bien recubierto. Una vez que el soporte se lava para eliminar cualquier complejo no específicamente unido, la cantidad de primer anticuerpo se detecta con un segundo anticuerpo que está acoplado a un marcador detectable. En este tipo de ensayos, cuanto mayor es la concentración de antígeno original, más débil es la señal final. Un ensayo ELISA competitivo alternativo es el que incluye un antígeno unido a enzima en lugar del anticuerpo unido a enzima. El antígeno marcado compete por los sitios de unión primarios del anticuerpo con el antígeno de la muestra (sin marcador). Utilizando este tipo de ensayos, la concentración de antígeno en la muestra se correlaciona inversamente con la cantidad de antígeno marcado retenido en el pocillo y, en consecuencia, con una señal más débil.

El método y dispositivo de ELISA inverso (ELISA-R M&D) utiliza una fase sólida innovadora constituida por un tubo de poliestireno de inmunoensayo con 4-12 ojivas que sobresalen, todo el dispositivo es adecuado para introducirse en un tubo de ensayo que contiene la muestra recogida y las etapas siguientes (lavado, incubación en conjugado e incubación en cromógeno) se llevan a cabo fácilmente sumergiendo las ojivas en micropocillos de microplacas estándar rellenas anteriormente con los reactivos, selladas y almacenadas hasta su utilización.

En una realización preferente, el ensayo ELISA es un ensayo ELISA sándwich. El ensayo ELISA sándwich implica

recubrir un soporte con un primer anticuerpo específico para el péptido beta amiloide, aplicar la muestra que contiene el péptido beta amiloide que dará como resultado la unión del péptido beta amiloide para el primer anticuerpo y la aplicación de un segundo anticuerpo específico también para el péptido beta amiloide, en el que dicho segundo anticuerpo está normalmente acoplado a un marcador detectable o a una enzima modificadora de sustrato. La señal generada por el marcador o por el sustrato convertido es el proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

En el contexto de la presente invención, el primer anticuerpo se denomina "anticuerpo de captura", lo que significa que este anticuerpo se utiliza para recuperar de una muestra todas las especies moleculares a las que el anticuerpo se une específicamente. Prácticamente no hay limitación con respecto al tipo de anticuerpo que puede utilizarse como anticuerpo de captura, siempre que contenga, como mínimo, un sitio de unión de antígeno específico para A β 40 y/o A β 42. De este modo, cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente puede utilizarse como anticuerpo de captura.

En el contexto de la presente invención, el segundo anticuerpo se denomina "anticuerpo de detección", ya que este anticuerpo se utiliza para detectar la cantidad de antígeno que ha sido retenido por el anticuerpo de captura. Al igual que con el anticuerpo de captura, prácticamente no hay limitación con respecto al tipo de anticuerpo que puede utilizarse como anticuerpo de detección. Sin embargo, se entiende también por la persona técnica en la materia que el anticuerpo de detección (i) debe unirse a una región del antígeno que no está cubierta por el anticuerpo de captura y (ii) debe contener no sólo el sitio de unión al antígeno sino además bien un marcador detectable, bien una enzima modificadora de sustrato o bien una región o regiones adicionales que pueden ser detectadas específicamente por un reactivo que muestra una afinidad elevada de unión para dicho anticuerpo, así como para permitir la detección del anticuerpo que se une al antígeno capturado por el anticuerpo de captura. Preferentemente, dichas regiones adicionales que pueden unirse específicamente por dicho reactivo corresponden a la región constante de la molécula de inmunoglobulina.

En una realización preferente, el anticuerpo de captura es un anticuerpo específico contra la región N-terminal de los péptidos beta amiloides. En una realización aún más preferente, dicho anticuerpo de captura es un anticuerpo específico contra un epítipo situado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de Abeta40 o Abeta42. Un anticuerpo de captura particularmente preferente es el anticuerpo monoclonal 6E10, tal como el que se ha descrito por Kim, K. S. (Neuroscience. Res. Comm. 1988, 2:121-130).

En otra realización preferente, el anticuerpo de detección es un anticuerpo específico contra un epítipo localizado en la región C-terminal del péptido beta amiloide. Tal como se ha explicado anteriormente, la madurez de los anticuerpos de detección se puede elegir adecuadamente por cualquiera con habilidades normales en la técnica, dependiendo del número de especies beta amiloides que se van a detectar.

A efectos de detectar o determinar específicamente A β 40, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de A β 40 (y también de A β 42, ya que ambos péptidos tienen idénticas regiones N-terminales) y el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A β 40 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 42. Alternativamente, se puede detectar específicamente A β 40 utilizando un anticuerpo de captura, que reconoce la región C-terminal de A β 40 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 42 y un anticuerpo de detección, que reconoce una región de A β 40 que es común a ambos A β 40 y A β 42, preferentemente la región N-terminal de A β 42/A β 40.

A efectos de detectar o determinar específicamente A β 42, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal de A β 42 (y también de A β 40, ya que ambos péptidos tienen idénticas regiones N-terminales) y el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A β 42 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 40. Alternativamente, se puede detectar específicamente A β 42 utilizando un anticuerpo de captura, que reconoce la región C-terminal de A β 42 y un anticuerpo de detección, que reconoce una región de A β 42 que es común a ambos A β 42 y A β 40.

A efectos de detectar o determinar simultáneamente A β 42 y A β 40, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal común a A β 42 y A β 40 y el anticuerpo de detección puede ser una combinación de, como mínimo, dos anticuerpos, en el que el primer anticuerpo reconoce específicamente la región C-terminal de A β 42 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 40 y el segundo anticuerpo reconoce específicamente la región C-terminal de A β 40 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 42. Alternativamente, el anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo que reconoce la región N-terminal común a A β 42 y A β 40 y el anticuerpo de detección puede ser un anticuerpo que reconoce la región C-terminal tanto de A β 40 y A β 42. Alternativamente, se pueden detectar simultáneamente A β 42 y A β 40 utilizando como anticuerpo de captura una mezcla de, como mínimo, dos anticuerpos que comprende un primer anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A β 42 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 40 y un segundo anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de A β 40 sin dar ninguna reacción cruzada con A β 42 y un anticuerpo de detección, que reconoce la región N-terminal común a ambos A β 42 y A β 40. Alternativamente, se pueden detectar simultáneamente A β 42 y A β 40 utilizando como

anticuerpo de captura un anticuerpo que reconoce la región C-terminal tanto de Aβ40 y Aβ42 y un anticuerpo de detección, que reconoce la región N-terminal común a ambos Aβ42 y Aβ40.

5 Se han descrito en detalle anticuerpos específicos para Aβ40 y Aβ42 y métodos para su preparación en el documento WO2004024770 y el documento WO2004098631, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia.

10 Los anticuerpos detectados y/o capturados pueden haber sido purificados por afinidad utilizando un polipéptido que comprende la secuencia del polipéptido utilizado para su preparación.

15 Tal como se ha mencionado anteriormente, el anticuerpo de detección puede acoplarse directamente a un marcador detectable o a una enzima modificadora de sustrato. Preferentemente, puede utilizarse un reactivo que muestra una afinidad para la detección de anticuerpos, en cuyo caso se dice que el reactivo está marcado con un marcador detectable o con una enzima modificadora de sustrato en lugar del anticuerpo de detección. Además, el reactivo de unión al anticuerpo puede estar acoplado a un primer miembro de un par de unión, en cuyo caso, es el segundo miembro de un par de unión el que puede acoplarse a un marcador detectable o a una enzima modificador de sustrato.

20 El reactivo de unión a anticuerpo puede unirse de forma no covalente a uno o más tipos particulares, una o más clases particulares y/o una o más subclases particulares de un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, el reactivo de unión a anticuerpo puede unirse de forma no covalente a un anticuerpo específico para un antígeno particular. En ciertas realizaciones, el reactivo de unión a anticuerpo se une de forma no covalente a la región Fc o a la región F(ab) del anticuerpo de detección. Entre los reactivos preferentes de unión de anticuerpo se incluyen proteína A, proteína G, proteína V, proteína L, un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo anti-Fc y un receptor de Fc (FcR) o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo. Entre los ejemplos de anticuerpos, que no constituyen limitación, que pueden unirse de forma no covalente al anticuerpo de detección se incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de dominio único, FVs de cadena única (scFv) anticuerpos de una sola cadena, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs enlazados por disulfuro (sdFv), intracuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-ID) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Entre los ejemplos no limitantes de los receptores Fc se incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIAα, FcγRIIIB, FcεRIα, FcεRIξ y FcγRIIIAξ.

35 Entre los pares de unión adecuados para su utilización en la detección se incluyen:

- hapteno o antígeno/anticuerpo, por ejemplo anticuerpos digoxina y anti-digoxina
- biotina o análogos de la biotina (por ejemplo aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina)/avidina o estreptavidina,
- azúcar/lectina,
- 40 • enzima y cofactor
- ácido fólico/folato
- oligonucleótidos de doble cadena que se unen selectivamente a proteínas/factores de transcripción.
- ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/complementario de ácido nucleico,
- receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroide/hormona esteroide.

45 Se comprenderá que el término "primer" y "segundo" miembro de un par de unión es relativo y que cada uno de los miembros anteriores puede verse como el primer o segundo miembro del par de unión. En una realización preferente, el primer miembro de un par de unión es la biotina o una de sus variantes funcionalmente equivalentes y el segundo miembro de la pareja de enlace es avidina, estreptavidina o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

50 En una realización preferente, el segundo miembro de la pareja de enlace es estreptavidina.

55 Entre los marcadores detectables adecuados se incluyen, sin que constituyan limitación, fragmentos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, cumarina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), fragmentos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot[®] suministradas por la Corporación Quantum Dot, Palo Alto, CA).

60 Los enzimas modificadores de sustrato adecuados son aquellos capaces de generar una señal detectable, por ejemplo, tras la adición de un activador, sustrato, agente de amplificación y similares. Entre los enzimas que son adecuados como marcadores detectables para la presente invención y los correspondientes sustratos se incluyen:

- Fosfatasa alcalina:
 - 65 ○ Sustratos cromogénicos: Sustratos basado en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-

- 4-cloro-3-indolilo/nitroazul tetrazolio (BCIP/TNP), fosfato de Fast-Red/naftol-AS-TS
- Sustratos fluorogénicos: fosfato de 4-metilumbeliferil (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), 3,6-difosfato de fluoresceína (3,6-FDP), Azul Fast BB, Rojo Fast TR, o sales de diazonio Rojo Violeta Fast LB

- 5
- Peroxidasas:
 - Sustratos cromogénicos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (TPO), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), O-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinohidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (CEA)-y 3,3'-diaminobencidina (DAB).
 - Sustratos fluorogénicos: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas, entre las que se incluyen reactivo Rojo Amplex[®], Amplex Ultrared y dihidroxantenos reducidos.
 - Glicosidasas:
 - Sustratos cromogénicos: o-nitrofenil-β-D-galactósido (O-NPG), p-nitrofenil-β-D-galactósido y 4-metilumbeliferil-β-D-galactósido (MUG) para β-D-galactosidasa.
 - Sustratos fluorógenos: β-D-galactopiranosido resorufina, fluoresceína digalactósido (FDG), fluoresceína diglucurónido, 4-metilumbeliferil β-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil β-D-galactopiranosido y cumarina beta-D-galactopiranosido fluorada.
 - Oxidorreductasas (luciferasa):
 - Sustratos luminiscentes: luciferina.

KITS DE LA INVENCION

30 La presente invención da a conocer además kits que son adecuados para la práctica del método de la presente invención. De este modo, en otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para la determinación de péptidos beta amiloides en una muestra biológica que comprende

- 35
- (i) un agente solubilizante de proteínas y
 - (ii) como mínimo, un anticuerpo contra un péptido beta amiloide.

Los componentes (i) y (ii) del kit son esencialmente tal como se describen en relación al método de la presente invención. En una realización preferente, el reactivo agente solubilizante de proteínas es un detergente. En una realización aún más preferente, el detergente es Tween20.

40 En otra realización preferente el, como mínimo, un anticuerpo contra el péptido beta amiloide se selecciona de entre el grupo de

- 45
- (i) un anticuerpo contra la región N-terminal del péptido beta amiloide,
 - (ii) un anticuerpo contra la región C-terminal del péptido beta amiloide y
 - (iii) una combinación de un anticuerpo contra la región N-terminal del péptido beta amiloide y un anticuerpo contra la región C-terminal del péptido beta amiloide.

50 En una realización aún más preferente, el kit de la presente invención comprende un anticuerpo contra la región N-terminal del péptido beta amiloide que está dirigido contra un epítipo situado dentro de los aminoácidos 1 a 16 de ABETA40 y ABETA42. En otra realización preferente, el kit de la presente invención comprende un anticuerpo contra la región C-terminal del péptido beta amiloide que está dirigido contra un péptido se selecciona de entre el grupo de:

- 55
- (i) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido ABETA42 que se une específicamente a ABETA42 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con ABETA40
 - (ii) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido ABETA40 que se une específicamente a ABETA40 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con ABETA42 y
 - 60 (iii) un anticuerpo que reconoce al mismo tiempo la región C-terminal tanto de ABETA40 como de ABETA42 y
 - (iv) una combinación de los anticuerpos de (i) y (ii).

65 En una realización preferente, el kit de la presente invención comprende además un soporte sólido. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "soporte" o "superficie" se refiere a una fase sólida que es un material insoluble en agua poroso o no poroso que puede tener cualquiera de múltiples de formas, tales como tira,

varilla, partículas, incluidas partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas, perlas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. En principio, cualquier material es adecuado como soporte sólido, siempre que sea capaz de unirse a cantidades suficientes del anticuerpo de captura. De este modo, la elección del material de fase sólida se determina en base a las características de rendimiento deseadas del formato de ensayo. Entre los materiales adecuados para el soporte sólido se incluyen materiales poliméricos, especialmente materiales celulósicos y materiales derivados de celulosa, tales como papeles que contienen fibra, por ejemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, papel de fibra de vidrio, etc., polímeros sintéticos o naturales modificados, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poliacrilamida, dextrano reticulado, agarosa, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, butirato de vinilo, etc.; bien utilizados por sí mismos o en combinación con otros materiales; vidrio, tal como, por ejemplo, vidrio disponible como "bioglass", materiales cerámicos, metales, y similares. Son preferentes polímeros no reticulados de estireno y estireno carboxilado o estireno funcionalizado con otros grupos activos tales como, amino, hidroxilo, haluro, y similares. En algunos casos, se utilizan copolímeros de estirenos sustituidos con dienos tales como butadieno.

El soporte sólido y el anticuerpo se pueden proporcionar de forma separada en el kit o, alternativamente, el soporte puede suministrarse anteriormente ya recubierto con el anticuerpo de captura. En este caso, el soporte puede haberse tratado con una solución de bloqueo después de la unión del anticuerpo de captura.

Otros componentes del kit pueden incluir:

- Medios para retirar del paciente la muestra a analizar.
- Tampones y soluciones necesarios para la preparación de las curvas patrón de los péptidos beta-amiloides.
- Tampones y soluciones para el lavado y el bloqueo del soporte sólido durante el ensayo.
- Tampones y soluciones para recubrir el soporte sólido con el anticuerpo de recubrimiento.
- Reactivos para el desarrollo de la señal de color o fluorogénica a partir del marcador detectable.
- Reactivos para detener la formación del producto coloreado o fluorogénico del marcador detectable (por ejemplo H₂SO₄ 1N)
- Una muestra que contiene una solución de reserva de los péptidos Aβ40 o Aβ42 o una combinación de los mismos.

En una realización preferente, el kit de la presente invención comprende dos anticuerpos que pueden utilizarse en un ensayo ELISA sándwich. En este caso, uno de los anticuerpos, el anticuerpo de captura, se inmoviliza sobre un soporte sólido. La inmovilización puede llevarse a cabo antes de la unión del polipéptido diana que va a ser detectado o una vez que el péptido/proteína se une al anticuerpo de captura. En cualquier caso, si se utiliza un soporte sólido, es conveniente bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas en el portador antes de la adición de la muestra que contiene el polipéptido diana que se va a determinar. Preferentemente, el bloqueo o desactivación de los sitios de unión del péptido sobre el soporte se lleva a cabo utilizando el mismo tampón que se utiliza para lavar los complejos después de cada reacción de unión (por ejemplo, 50 mM Tris-HCl, pH 8, PBS o TBS que comprende opcionalmente Tween 20) complementado con un compuesto macromolecular (por ejemplo, albúmina de suero bovino, leche en polvo desnatada, reactivo de bloqueo western, caseína, lactoalbúmina, ovoalbúmina) en concentraciones de, aproximadamente, el 0,05% al 10%, preferentemente del 1 al 5%, más preferentemente, aproximadamente, del 3%.

La presente invención se describe a continuación mediante los siguientes ejemplos, que se han de interpretar como meramente ilustrativos y no limitantes del alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Población de estudio

El estudio incluyó a 40 participantes, 16 controles sanos (CS), 8 pacientes amnésicos con deterioro cognitivo leve (DCL) y 16 pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA). Todos los mayores con más de 65 años y el 50% de cada sexo en cada grupo. Las características demográficas de los participantes se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características demográficas

| Característica | EA | DCL | CS | P ¹ |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------|
| Hombre/Mujer | 8/8 | 4/4 | 8/8 | - |
| Edad (años, media ± SD) | 78,8 ± 4,7 ^H | 77,3 ± 3,6 ^H | 70,3 ± 4,1 ^{M,A} | 0,0002 |
| Frecuencia ApoE ε4 (%) | 34,4 ^H | 37,5 ^H | 3,1 ^{M,A} | 0,002 |
| Nivel de educación* | 1,9±0,9 | 1,6±0,9 | 2,4±0,6 | 0,072 |

* El nivel de educación se expresa como 0: no hay estudios. 1: Educación Primaria. 2: Educación Secundaria. 3: Educación universitaria. ¹ U-Test de Kruskal-Wallis, contrasta con el U-test de Mann-Whitney. H, M, y A siendo significativos con respecto a CS, DCL y EA, respectivamente.

5 Los controles sanos fueron cuidadosamente seleccionados entre voluntarios residentes en la comunidad, activos socialmente con la ausencia de quejas de memoria, rendimiento normal en pruebas neuropsicológicas y ausencia de alteraciones estructurales en técnicas cuantitativas de imagen por resonancia magnética (IRM).

10 Los participantes con deterioro cognitivo leve cumplieron con los criterios de la Clínica Mayo. Además para la selección de los participantes DCL se requirió un CDR de 0,5 puntos, más de 3 puntos en la escala de Scheltens (J. Neurol Neurosurg Psychiatry 1992, 55:967-972) para la atrofia temporal medial y un patrón de parietal y/o hipometabolismo temporal en la tomografía por emisión de positrones con 18-fluorodeoxiglucosa (PET-FDG), sugerente de la conversión a EA. Se excluyeron pacientes con cualquier patología psiquiátrica o sistémica, diferente de las enfermedades neurodegenerativas posibles, que podría provocar el DCL.

15 Los criterios específicos de inclusión para el grupo de EA fueron un diagnóstico de EA probable (NINCDS-ADRD), un CDR de 1 punto, un MMSE entre 16 y 24 puntos y más de 3 puntos en la escala Scheltens para la atrofia temporal medial.

20 Las pruebas cognitivas para el diagnóstico de DCL y EA se realizaron de acuerdo a las rutinas de la Clínica de la Memoria ECA tal como se describen en cualquier lugar.

25 Se obtuvo de cada participante por escrito el consentimiento informado (o en el caso de varios pacientes con EA de su pariente más cercano). Los protocolos de los estudios fueron revisados y aprobados por el Comité Ético del Hospital Clínic i Provincial (Barcelona, España).

EJEMPLO 2

Preparación de la muestra

30 La sangre se recoge a partir de un sujeto y se añade un gránulo de Roche CompleteMini (inhibidores de la proteasa) por cada 10 ml. La sangre bien se centrifuga directamente o se conserva a 4°C y se centrifuga en el mismo día del ensayo.

35 El plasma se separa de la fracción celular y el plasma se recoge y se divide en alícuotas de 0,5 ml en tubos Eppendorf. Las alícuotas se pueden mantener a -80°C.

40 Se determina el amiloide libre en el plasma (1ab40 y 1ab42) directamente en plasma sin diluir clarificado obtenido tal como se explica a continuación. Estos parámetros se denominarán a continuación tal como 1ab40 o UP (plasma sin diluir) Aβ1-40) para Aβ1-40) y como 1ab42 o UP Aβ(1-42) para Aβ1-42).

45 El amiloide plasmático total, correspondiente al amiloide libre en el plasma más el amiloide asociado a los componentes del plasma, se determina en muestras obtenidas por dilución de 150 μl de plasma en 300 μl de tampón de dilución (PBS que contiene 0,5% de Tween-20). Estos parámetros se denominarán a continuación como 2ab40 o DP (plasma diluido) Aβ1-40) para Aβ1-40) y como 2ab42 o DP Aβ(1-42) para Aβ1-42).

50 El beta amiloide enlazado a células se determina mediante la dilución de la fracción de células plasmáticas 1/5 v/v en la muestra de dilución (PBS que contiene 0,5% de Tween-20). Estos parámetros se denominarán a continuación como 3ab40 o CB (unidos a células) Aβ1-40) para Aβ1-40) y como 3ab42 o CB Aβ(1-42) para Aβ1-42).

EJEMPLO 3

Condiciones para el tratamiento de la muestra

55 *Dilución de la muestra*

A efectos de identificar la dilución de la muestra que proporcione la máxima absorbancia en el ensayo de ELISA, se ensayaron diferentes diluciones y soluciones tampón.

Las muestras se diluyeron 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 y 1/10. Se observó que la absorbancia de la muestra disminuyó cuando se diluye 1/4 y más de esta dilución. Las mejores son diluciones 1/2 y 1/3.

5 *Centrifugación de la muestra*

Las muestras pueden clarificarse por centrifugación durante 1' a 13.000 rpm a efectos de eliminar los componentes particulados que pueden interferir con la detección inmunológica. El sobrenadante se puede recoger y analizar directamente o diluir tal como se ha descrito anteriormente.

10 *Ejemplo de sonicación*

Las muestras se pueden sonicar durante 5'-10'. Las muestras sonicadas se puede utilizar directamente en los ensayos de ELISA o pueden centrifugarse durante 1' a 13000 rpm y el sobrenadante se puede utilizar directamente en ensayos ELISA. Las muestras sonicadas también puede diluirse con los tampones adecuados tal como se define en los ejemplos anteriores.

Preaclarado de la muestra

20 Las muestras se hacen pasar a través de una columna de Sepharosa 4B-IgGK a efectos de eliminar los posibles contaminantes esencialmente tal como se describe por Fukumoto y otros, (Arch. Neurol, 2003, 60: 958-964). Se preparó la columna de Sefarosa 4B-IgGK por reacción de Sefarosa activada con CNBr con IgG1k mediante el siguiente procedimiento:

- 25 - Se disolvió IgG1k (PM = 150.000) en tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 y NaCl 0,5 M (1,5 ml por 300 mg de agarosa) utilizando 500 µl de IgG1k I (0,6 mg) y 1,5 ml de tampón de acoplamiento.
- La resina se lavó con HCl 1 mM (60 ml por cada 300 mg de resina)
- El ligando se mezcló con la resina lavada con ácido y se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación constante (alternativamente, la incubación puede llevarse a cabo durante 2 horas a temperatura ambiente).
- 30 - El exceso de ligando se lavó a continuación utilizando 5 volúmenes de tampón de acoplamiento.
- Los grupos activos que no han reaccionado en la resina se bloquean con Tris-HCl 0,1 M, pH 8 durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación.
- La resina se lavó con tres ciclos utilizando alternativamente Tris-HCl 0,1 M, pH 8 + NaCl 0,5 M/acetato de sodio 0,1 M pH 4 + NaCl 0,5 M.

35 Una vez que se ha obtenido la Sepharosa 4B-IgGK, el tratamiento de la muestra comprende las etapas de:

- Poner en contacto 300 µl de plasma con 525 µl tampón de muestra y 75 µl de agarosa-IgG1k e incubar durante 2 horas a 4°C con agitación constante.
- 40 - La agarosa se elimina por centrifugación (5' a 1000 rpm)
- Se añade 100 µl de la muestra tratada a los pocillos en placas de microtitulación sobre las que se ha adsorbido un anticuerpo de captura específico para el extremo N-terminal de los péptidos beta amiloides y se incuban durante toda la noche a 4°C.
- La cantidad de péptido beta amiloide en la muestra clarificada se determina por ensayo ELISA añadiendo a los pocillos el antisuero específico anti Aβ40 o anti-Aβ42 (1/4000) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.
- 45 - Las muestras se incuban a continuación con una dilución 1/5000 de un anti-conejo biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante.
- Las muestras se incuban a continuación con 1/4000 de estreptavidina acoplada a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación.
- 50 - A continuación, la reacción se desarrolló con TMB durante 30' en oscuridad.
- La reacción de desarrollo se detuvo con solución de detención y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Eliminación de albúmina y de IgG

55 Las muestras se hicieron pasar a través de columnas que enlazan albúmina e IgG. Se ensayó el flujo a través de la misma a efectos de identificar la fracción en la que se encuentran los péptidos amiloides. La albúmina se elimina mediante el "kit de eliminación de albúmina ProteoExtract" (CALBIOCHEM) según las instrucciones del fabricante. La IgG se elimina utilizando una columna de proteína A (Protein A Sepharose Fast Flow 4, Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Concentración de la muestra

65 Las muestras se concentraron con un microcon que tiene un paso de corte de 10000. Los péptidos amiloides se recuperan en el flujo que pasa a través, mientras que las proteínas de peso molecular elevado se recuperan en el producto retenido.

Los efectos de los diferentes protocolos de tratamiento se pueden resumir tal como sigue:

- 5 - Detergentes: Tween-20 es el detergente que proporciona un mayor incremento en los valores de absorbancia. No se observó efecto cuando la concentración de Tween-20 se aumentó desde el 0,05% al 0,1%.
- pH: Los valores de pH que proporcionan mejores resultados fueron 7 y 8. Cuando se determinó A β 40, también se observaron valores adecuados de absorbancia a pH=9. Cuando se determinó A β 42, los valores adecuados de absorbancia se obtuvieron a pH 9 y 5.
- 10 - Condiciones de desnaturalización: La adición de GuHCl 0,5 M o 1 M ó DMSO al 10% no dio lugar a una mejora de los valores de absorbancia.
- Sales: Los valores de absorbancia más elevados se obtuvieron cuando se utilizó NaCl en comparación con KCl.
- 15 - BSA: No se observaron diferencias en los niveles de absorbancia cuando la concentración de BSA se aumentó del 0,05% al 0,5%.
- Sonicación: No se observaron diferencias cuando las muestras se sometieron a ultrasonidos antes de la determinación de absorbancia.
- Preaclarado: No se observó ningún efecto cuando las muestras fueron pretratadas con Sepharosa 4B-IgGk.
- 20 - Eliminación de albúmina y la IgG: Los péptidos amiloides parecen asociarse a la IgG, pero no a la albúmina.
- Concentración: Los péptidos amiloides se presentan principalmente en el producto retenido.

EJEMPLO 4

25 ELISA sándwich colorimétrico con amplificación de biotina-estreptavidina

A efectos de aumentar la sensibilidad, la señal puede ser amplificada utilizando biotina-estreptavidina. La placa se recubrió utilizando 6E10 Acm de anticuerpo de captura que reconoce los aminoácidos 1-17, tanto en el péptido amiloide A β 40 y como en el amiloide A β 42. El recubrimiento se lleva a cabo a una concentración de 5 μ g/ml en solución tampón de carbonato/bicarbonato 100 mM, pH = 9,6, durante toda la noche a 4°C. A continuación, la placa se bloqueó con 300 μ l de una solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM, pH 8, 0,2% de Tween-20, 0,5% de BSA) durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación o durante 2 horas a 37°C. Cuando es necesario, las placas pueden ser tratadas, después del bloqueo, con 100 μ l de una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 8 que contiene 20 mg/ml de trehalosa. Las placas se dejan evaporar hasta que aparece un característico halo blanco de trehalosa. Las placas tratadas de esta manera puede mantenerse a 4°C cubiertas con papel de aluminio y son estables durante dos años.

Las muestras de la curva patrón se prepararon a partir de una solución madre de 200 pg/ml de los péptidos A β 40 Y A β 42 en placas recubiertas 6E10 con el Acm y se trataron con trehalosa. A partir de estas soluciones, se hicieron diluciones seriadas 1:2 en SDB para proporcionar concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 pg/ml. Se añaden diluidos o sin diluir 100 μ l de cada muestra diluida o sin diluir, a SDB (1/1.000.000) y se incuban durante toda la noche a 4°C (o durante 2 horas a 37°C). Las muestras para la determinación de amiloide libre en plasma, amiloide total en plasma y amiloide enlazado células en las muestras de ensayo se preparan tal como se describe en el ejemplo 1 y se añaden a los pocillos de las placas de ELISA utilizando las mismas condiciones que para las muestras de la muestra patrón. Se añadió el anticuerpo de detección (un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A β 42 o un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido A β 40, dependiendo de si va a ser detectado A β 42 o A β 40) diluido en TRS. Se añaden 100 μ l a cada pocillo y a continuación se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente.

50 A continuación, se añadieron 100 μ l de una dilución 1/5000 en SDB de un anticuerpo IgG anti-conejo marcado con biotina (Sigma) a continuación y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de una dilución 1/4000 en SDB de estreptavidina acoplada a HRP (de Sigma) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

55 La placa se desarrolló utilizando 100 μ l del sustrato cromogénico TMB (ZEU Inmunotec). Se añadió TMB y se incubó en oscuridad durante 15-30 minutos. Como solución de detención, se añadieron por pocillo 50 μ l de H₂SO₄ 1N. La absorbancia a 450 nm se leyó en un lector de placas de Synergy HT (BioTek Instruments).

60 Los valores de concentración (pg/ml) obtenidos a partir de las muestras utilizadas para la determinación de amiloide total en plasma (amiloide plasmático libre junto con amiloide enlazado a los componentes del plasma) se corrigió a efectos de compensar la dilución llevada a cabo durante la etapa de preparación. Dado que la dilución era típicamente una dilución 1:3 (véase el ejemplo 1), los pg/ml obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia tuvieron que multiplicarse por tres a efectos de determinar la concentración agregada real de amiloide libre en plasma y amiloide unido a los componentes del plasma. Asimismo, los pg/ml obtenidos a partir de los valores de absorbancia obtenidos de las muestras utilizadas para la determinación del amiloide unido a las células se

corrigen también a efectos de compensar la dilución llevada a cabo durante la etapa de preparación. Dado que la dilución era típicamente 1:5 (véase ejemplo 1), los pg/ml obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia tuvieron que multiplicarse por cinco a efectos de determinar la concentración real de amiloide unido a las células.

- 5 Entre cada una de las etapas, se lavó la placa con un lavador de placas automático (Elx50 Bio Tek Instruments) programado para la realización de 5 lavados cada vez. La solución de lavado contenía 50 mM de Tris-HCl pH 8, 0,05% de Tween-20 y 150 mM de NaCl (filtrada antes de su utilización).

EJEMPLO 5

10 Ensayo ELISA sándwich fluorescente

La placa se recubrió con 6E10 en tampón de bicarbonato (5 µg/ml) durante toda la noche a 4°C. La placa se bloqueó a continuación 3 h a temperatura ambiente con agitación (300 µl/pocillo). A continuación se añadieron las muestras de ensayo y de la curva patrón a las placas y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se añadió a cada pocillo una dilución 1/4000 del anticuerpo de detección (suero anti-Aβ40 o anti-Aβ42) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron diluciones seriadas del anti-anticuerpo acoplado FITC (diluciones 1/1000, 1/5000, 1/10000) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. La fluorescencia utilizó una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528.

20 Alternativamente, el ensayo se lleva a cabo utilizando el sustrato fluorescente *Quanta Blu* (PIERCE), lo que aumenta la sensibilidad del ensayo ELISA. La excitación máxima es de 325 nm y emisión máxima es de 420 nm. Puede ser detectado en el intervalo de excitación de 315-340 nm y en el rango de emisión 370-470 nm. La Solución de Trabajo QuantaBlu se prepara mezclando 9 partes de Solución de Sustrato QuantaBlu con 1 parte de Solución Estable de Peroxidasa QuantaBlu (solución estable durante 24 horas a temperatura ambiente). Pueden incubarse de 1,5 minutos a 90 minutos a temperatura ambiente y se pueden leer deteniendo la reacción o sin detenerla (se produce una coloración azul).

30 La placa se recubre con 6E10 Acm en tampón bicarbonato (5 µg/ml) durante una noche a 4°C y a continuación se bloquea durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación (300 µl/pocillo). A continuación, se prepararon diferentes curvas patrón con las siguientes concentraciones de péptidos Aβ42 y Aβ40:

- 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31, 25 y 15,65 pg/ml
- 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 pg/ml
- 35 • 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78 y 0,39 pg/ml
- 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 y 0,156 pg/ml
- 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,156 y 0,078 pg/ml
- 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 y 0,0156 pg/ml

40 Se añade anticuerpo de detección (suero anti-Aβ40 o anti-Aβ42) (diluido a 1/4000) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se añade a continuación IgG anti-conejo acoplada a HRP 1/1000 y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Para el desarrollo de la reacción, se añaden 100 µl de Solución de Trabajo de Quanta-Blue y se incubaron a continuación durante 30', 60' y 90' a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación se lee la fluorescencia (excitación: 360/40 nm, emisión: 460/40 nm) a 30', 60' y 90' sin detener la reacción o deteniendo la reacción con una solución de Detención.

EJEMPLO 6

50 Preparación de curvas patrón de Aβ40 y Aβ42

Para la preparación de la curva patrón de Aβ40, se reconstituyó una muestra liofilizada de Aβ40 humano a 10 µg/ml. A partir de la solución madre, se prepararon las muestras que contienen las siguientes concentraciones (en pg/ml): 25.000 pg/ml, 2.500 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,125 pg/ml, 1,56 pg/ml, 0,78 pg/ml. Las muestras se prepararon en presencia de 1 mM de inhibidor de proteasa AEBSF. Las muestras se procesaron de acuerdo con el método definido en los ejemplos anteriores.

60 Para la preparación de la curva patrón de Aβ42, se reconstituyó una muestra liofilizada de Aβ42 humano a 10 mcg/ml. A partir de la solución madre, se prepararon las muestras que contienen las siguientes concentraciones (en pg/ml): 25.000 pg/ml, 2.500 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml, 3,125 pg/ml, 1,56 pg/ml, 0,78 pg/ml. Las muestras se prepararon en presencia de 1 mM de inhibidor de proteasa AEBSF. Las muestras se procesaron de acuerdo con el método definido en los ejemplos anteriores.

EJEMPLO 7

Análisis estadístico

5 La reproducibilidad de las mediciones entre laboratorios a partir de 16 muestras elegidas al azar se evaluó mediante el coeficiente de correlación de concordancia (CCC), que evalúa el acuerdo entre tres lecturas, la de los presentes inventores y la determinada por dos laboratorios externos, de la misma muestra mediante la medición de la variación de la línea de 45 grados a través del origen (la línea de concordancia)²⁷. El grado en que las muestras de un mismo individuo obtenidas en días diferentes se parecen entre sí (la reproducibilidad intra-sujeto) se evaluó mediante el coeficiente de correlación intraclase (CCI). El grado de acuerdo estimado por estos coeficientes de correlación fue descrito como insatisfactorio (0,21 a 0,40), moderado (0,41 a 0,60), sustancial (0,61 a 0,80) y casi perfecto (0,81 a 1,00). Los niveles de Aβ en los diferentes grupos diagnósticos se compararon mediante el examen U de Mann-Whitney. Se utilizó el análisis de Spearman para evaluar las correlaciones entre las variables continuas. Para rechazar la hipótesis nula fue necesaria una p <0,05. Todos los análisis estadísticos, incluidas las mediciones de la precisión diagnóstica, se realizaron con el software SAS 9.1. Los gráficos en las figura 1 a 3 se han generado con el software estadístico SPSS.

20 Se estimaron los siguientes indicadores de la validez y fiabilidad de los marcadores de péptido beta-amiloide como una prueba de detección entre los pacientes con EA, DCL y CS.

Para cada uno de los marcadores indicados y determinados, se llevó a cabo el análisis que se especifica a continuación, clasificando a los participantes entre los controles sanos-EA, los controles sanos-DCL y DCL-EA:

| | | Clasificación real de los participantes | |
|--|----|---|----|
| | | EA | CS |
| Clasificación de los participantes de acuerdo con marcador | EA | PV | PF |
| | CS | NF | NV |

25 Tabla 3: Clasificación de los pacientes con EA en comparación con los controles sanos (PV: positivo verdadero; PF: Positivo falso, NV: Negativo verdadero; NF: negativo falso)

| | | Clasificación real de los participantes | |
|--|-----|---|----|
| | | DCL | CS |
| Clasificación de los participantes de acuerdo con marcador | DCL | PV | PF |
| | CS | NF | NV |

Tabla 4: Clasificación de los pacientes con DCL en comparación con los controles sanos (PV: positivo verdadero; PF: Positivo falso, NV: Negativo verdadero; NF: negativo falso)

| | | Clasificación real de los participantes | |
|--|-----|---|-----|
| | | EA | DCL |
| Clasificación de los participantes de acuerdo con marcador | EA | PV | PF |
| | DCL | NF | NV |

30 Tabla 5: Clasificación de los pacientes con EA en comparación con los pacientes DCL (PV: positivo verdadero; PF: Positivo falso, NV: Negativo verdadero; NF: negativo falso)

Propiedades de validez:

35 **Sensibilidad:** Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de obtener en la prueba un resultado positivo para un sujeto enfermo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad.

40
$$Sensibilidad = \frac{PV}{PV + NF}$$

Especificidad: Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de obtener un resultado negativo en un sujeto sano. En otras palabras, la especificidad puede ser diseñada como la capacidad para detectar a las personas sanas.

45
$$Especificidad = \frac{NV}{NV + PF}$$

Propiedades de fiabilidad:

Valor Predictivo Positivo: Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtienen resultados positivos en la prueba. Por lo tanto, el valor predictivo positivo, puede estimarse a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente estaban enfermos:

$$VPP = \frac{NV}{NV + PF}$$

Valor Predictivo Negativo: Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se calcula dividiendo el número de negativos verdaderos entre el total de los pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{NV}{NV + NF}$$

Además de los conceptos de sensibilidad, especificidad y los valores predictivos, se consideran además el concepto de proporción de verosimilitud, proporción de probabilidad, o proporción de probabilidades. Cuanto más tardía es una medición más probable es un resultado específico (positivo o negativo) de acuerdo a la presencia o ausencia de enfermedad.

Proporción de verosimilitud positiva o proporción de probabilidad positiva: se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado positivo en los pacientes enfermos por la probabilidad de un resultado positivo entre los sanos. Es, en resumen, la relación entre la fracción de verdaderos positivos (sensibilidad) y la fracción de falsos positivos (1-especificidad):

$$PVP = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{especificidad}}$$

Proporción de verosimilitud negativa o proporción de probabilidad negativa: se calcula dividiendo la probabilidad de un resultado negativo en presencia de la enfermedad por la probabilidad de un resultado negativo en ausencia de la misma. Por consiguiente, se calcula como la relación entre la fracción de falsos negativos (1-sensibilidad) y la fracción de verdaderos negativos (especificidad):

$$PVN = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{especificidad}}$$

La curva ROC se presenta por medio de una gráfica, y el área bajo la curva ROC con IC del 95%, la clasificación real de acuerdo con el parámetro de los pacientes (enfermedad/salud), y el valor de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo con el IC del 95% se presentan por medio de tablas. Todas las pruebas estadísticas se han realizado con un nivel de significación de 0,05.

EJEMPLO 8

Reproducibilidad de las medidas de Aβ entre laboratorios.

Dieciséis muestras elegidas al azar de cualquiera de los participantes y extracción fueron enviadas a dos laboratorios externos para la evaluación de la reproducibilidad de las mediciones entre laboratorios. Todos los marcadores se comportaron de manera similar con la CCC, que osciló desde 0,84 hasta 0,99 (IC del 95% global de 0,73 a 0,99), lo que corresponde a un grado de acuerdo entre sustancial a casi perfecto en todos los casos (figura 1).

La reproducibilidad intraensayo, expresada como el coeficiente de variación de los pocillos por triplicado, para los seis marcadores en cada laboratorio fue de 4,31, 5,83 y 8,34 (tabla 6). El límite de las detecciones de los ensayos en los tres laboratorios, fue de 5,31, 3,63 y 1,91 pg/ml para Aβ1-40 y 2,37, 2,04 y 2,45 pg/ml para Aβ1-42.

Tabla 6. Reproducibilidad intra-ensayo.

| Marcador | LAB1 | | | LAB2 | | | LAB3 | | |
|--------------|------|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|
| | N | CV | SD | N | CV | SD | N | CV | SD |
| UP Aβ1-40 | 15 | 5,86 | 4,25 | 15 | 5,51 | 4,19 | 16 | 9,87 | 7,21 |
| DP Aβ1-40 | 15 | 2,89 | 1,63 | 15 | 6,97 | 11,58 | 15 | 4,55 | 3,99 |
| CB Aβ1-40 | 15 | 3,10 | 1,44 | 14 | 4,85 | 3,32 | 16 | 8,97 | 4,35 |
| UP Aβ1-42 | 15 | 5,42 | 5,13 | 13 | 5,23 | 4,08 | 16 | 6,33 | 5,75 |
| DP Aβ1-42 | 15 | 3,46 | 2,00 | 15 | 6,61 | 6,90 | 15 | 8,72 | 6,82 |
| CB Aβ1-42 | 15 | 5,11 | 3,60 | 13 | 5,83 | 4,72 | 16 | 11,60 | 14,22 |
| Promedio LAB | | 4,31 | 3,01 | | 5,83 | 5,80 | | 8,34 | 7,06 |

CV: Coeficiente de variación de los tres pozos para cada marcador.

EJEMPLO 9

5

Reproducibilidad intraindividual de las mediciones de Aβ.

La reproducibilidad de las mediciones de Aβ lo largo de cuatro recogidas de sangre semanales (BS1-BS4), tal como se ha medido por el ICC varió entre sustancial hasta casi perfecta para todos los marcadores directos en los tres grupos (tabla 7). En promedio para los tres grupos de diagnóstico la ICC más elevada se corresponde con las mediciones de Aβ1-40 y Aβ1-42 en DP (0,93, IC 95% = 0,98 a 0,80 y 0,93, IC 95% = 0,98 a 0,78, respectivamente).

10

Tabla 7. Reproducibilidad intraindividual

| | EA | | | DCL | | | CS | | | Valor promedio | | |
|----------------|----------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------------|------|------|
| | Promedio | Max. | Min. | Promedio | Max. | Min. | Promedio | Max. | Min. | Promedio | Max. | Min. |
| UP Aβ1-40 | 0,97 | 0,99 | 0,91 | 0,93 | 0,99 | 0,69 | 0,77 | 0,91 | 0,47 | 0,89 | 0,96 | 0,69 |
| DP Aβ1-40 | 0,97 | 0,99 | 0,92 | 0,95 | 0,99 | 0,77 | 0,88 | 0,96 | 0,71 | 0,93 | 0,98 | 0,80 |
| CB Aβ1-40 | 0,79 | 0,92 | 0,50 | 0,87 | 0,97 | 0,47 | 0,75 | 0,90 | 0,43 | 0,80 | 0,93 | 0,47 |
| UP Aβ1-42 | 0,97 | 0,99 | 0,90 | 0,91 | 0,98 | 0,63 | 0,84 | 0,94 | 0,62 | 0,91 | 0,97 | 0,72 |
| DP Aβ1-42 | 0,98 | 1,00 | 0,96 | 0,91 | 0,98 | 0,61 | 0,91 | 0,97 | 0,77 | 0,93 | 0,98 | 0,78 |
| CB Aβ1-42 | 0,84 | 0,94 | 0,61 | 0,84 | 0,97 | 0,42 | 0,79 | 0,92 | 0,52 | 0,82 | 0,95 | 0,52 |
| Promedio grupo | 0,92 | 0,97 | 0,80 | 0,90 | 0,98 | 0,60 | 0,82 | 0,93 | 0,59 | 0,88 | 0,96 | 0,66 |

Los valores medios de la ICC después de comparar las cuatro extracciones una con la otra. Todas las correlaciones fueron estadísticamente significativas. Max y Min se refiere a los intervalos de confianza del 95%.

15

EJEMPLO 10

Comparación entre los grupos de diagnóstico.

En concordancia con la alta reproducibilidad intrasujeto de las mediciones, la comparación entre grupos de participantes siguió el mismo patrón en muestras de sangre recogidas en cuatro días diferentes (BS1 a BS4), aunque algunos valores de p variaron ligeramente de una BS a otra. La siguiente descripción se basa en las mediciones de BS4.

El primer resultado sorprendente fue que la concentración de Aβ1-40 y Aβ1-42 medida en UP representó sólo, aproximadamente, 1/3 y 1/4, respectivamente, de los niveles de DP para los grupos de diagnóstico (Tabla 8).

Tabla 8. Niveles de marcadores directos y calculados en cada grupo de participantes.

| MARCADOR | EA | | | | DCL | | | | CS | | | | |
|------------------|---------|----|--------------------|-------|-------------|---|---------------------|-------|-------------|----|---------------------|------|-------------|
| | DIRECTO | n | Promedio | CV | Int. | n | Promedio | CV | Int. | n | Promedio | CV | Int. |
| UP Aβ1-40 | | 15 | 32,2 | 152,5 | 7,2; 203,2 | 7 | 44,7 ^H | 102,7 | 14,4;133,6 | 16 | 15,4 ^M | 47,4 | 2,2;33,3 |
| DP Aβ1-40 | | 15 | 115,4 | 137,3 | 12,0; 645,7 | 7 | 124,6 ^H | 86,9 | 54,5;339,6 | 16 | 56,4 ^M | 36,2 | 21,4;104,3 |
| CB Aβ1-40 | | 15 | 103,3 | 88,2 | 15,3; 328,6 | 7 | 107,4 ^{H*} | 54,7 | 63,7;211,2 | 16 | 59,3 ^{M*} | 28,8 | 14,5;89,2 |
| UP Aβ1-42 | | 15 | 23,3 | 206,0 | 4,5; 195,3 | 7 | 24,8 ^{H*} | 96,8 | 8,6;67,4 | 16 | 8,0 ^{M*} | 38,7 | 3,7;16,9 |
| DP Aβ1-42 | | 15 | 96,5 | 183,3 | 22,3; 728,5 | 7 | 75,2 ^H | 66,5 | 34,9;151,5 | 16 | 40,1 ^M | 32,2 | 20,5;78,6 |
| CB Aβ1-42 | | 15 | 89,8 ^H | 59,0 | 52,6; 262,6 | 7 | 79,8 | 35,5 | 62,9;141,9 | 16 | 58,7 ^A | 23,2 | 28,4;76,8 |
| CALCULADO | | | | | | | | | | | | | |
| UP Aβ42/Aβ40 | | 15 | 0,6 | 50,0 | 0,3;1,2 | 7 | 0,6 | 16,7 | 0,5;0,7 | 16 | 0,7 | 85,7 | 0,1;2,9 |
| DP Aβ42/Aβ40 | | 15 | 0,9 | 55,5 | 0,4;2,6 | 7 | 0,7 | 14,3 | 0,4;0,9 | 16 | 0,8 | 25,0 | 0,3;1,5 |
| CB Aβ42/Aβ40 | | 15 | 1,2 | 66,7 | 0,4;3,8 | 7 | 0,8 | 25,0 | 0,4;1,1 | 16 | 1,1 | 63,6 | 0,4;3,7 |
| T40 | | 15 | 218,8 | 109,8 | 27,3;946,5 | 7 | 232,0 ^H | 71,7 | 118,2;550,8 | 16 | 115,7 ^M | 29,2 | 35,9;175,4 |
| T42 | | 15 | 186,3 ^H | 122,0 | 74,9;991,0 | 7 | 155,0 ^H | 48,3 | 103,9;293,4 | 16 | 98,8 ^{A,M} | 24,7 | 59,7;155,5 |
| T-βAPB | | 15 | 405,1 | 113,1 | 116,6;1937 | 7 | 387,0 ^H | 60,1 | 222,8;778 | 16 | 214,5 ^M | 22,1 | 121,8;307,2 |

Todos los valores se expresan en pg/ml. H, M, y A son significativos (p <0,05) con respecto a CS, DCL y AD, respectivamente.

* significa p <0,01.

- 5 En segundo lugar, los niveles de péptidos CB, medidos directamente de la fracción celular de la muestra de sangre, fueron similares a los niveles medidos en la DP. Por otra parte, los niveles de Aβ1-40 y de Aβ1-42 se correlacionan fuertemente cuando se mide en cualquiera de UP, DP o CB (r = 0,58, 0,71 y 0,71, respectivamente, p <0,001). Se encontraron correlaciones significativas también entre cualquier par de los seis marcadores directamente en las muestras analizadas (Aβ1-40 y Aβ1-42 en la UP, DP, CB, Tabla 9).

10

Tabla 9. La correlación entre las variables.

| | UP Aβ1-40 | DP Aβ1-40 | CB Aβ1-40 | UP Aβ1-42 | DP Aβ1-42 | CB Aβ1-42 | MMSE | ATM derecha |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| DP Aβ1-40 | 0,935 ^{***} | - | - | - | - | - | - | - |
| CB Aβ1-40 | 0,685 ^{***} | 0,776 ^{***} | - | - | - | - | - | - |
| UP Aβ1-42 | 0,583 ^{***} | 0,556 ^{***} | 0,510 ^{**} | - | - | - | - | - |
| DP Aβ1-42 | 0,652 ^{***} | 0,717 ^{***} | 0,656 ^{***} | 0,806 ^{***} | - | - | - | - |
| CB Aβ1-42 | 0,379 [*] | 0,465 ^{**} | 0,712 ^{***} | 0,578 ^{***} | 0,693 ^{***} | - | - | - |
| MMSE | -0,417 ^{**} | -0,395 [*] | -0,214 | -0,485 ^{**} | -0,450 ^{**} | -0,274 | - | - |
| ATM derecha | 0,321 [*] | 0,280 | 0,257 | 0,530 ^{**} | 0,510 ^{**} | 0,353 [*] | -0,756 ^{***} | - |
| ATM izquierda | 0,198 | 0,187 | 0,192 | 0,442 ^{**} | 0,426 ^{**} | 0,310 | -0,868 ^{***} | 0,894 ^{***} |

Coefficiente de Spearman para cada par de variables. ***, ** y * significan p <0,001, 0,01 y 0,05, respectivamente.

- 15 Además, se encontró que los niveles de cada marcador aumentaron en pacientes con DCL y con EA con respecto al grupo control sano (Fig. 2, tabla 8). Estos incrementos alcanzaron significación estadística entre los grupos DCL y de CS para los tres marcadores Aβ1-40 (UP, DP y CB, que aumentaron 2,9, 2,2 y 1,8 veces, respectivamente) y para los dos marcadores Aβ1-42 en plasma (UP y DP, que aumentaron 3,1 y 1,8 veces, respectivamente). El nivel promedio de cada marcador en el grupo de EA fue muy similar a su nivel promedio en el grupo de deterioro cognitivo leve y no se produjeron diferencias significativas entre estos dos grupos de pacientes. De forma similar, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos de EA y de CS con la excepción de los niveles de CB Aβ1-42 (figura 2). Esta falta de significación fue debida muy probablemente a la amplia gama de mediciones individuales dentro del grupo de EA (n = 16) que mostraron un CV de 1,5 a 2,7 veces mayor que en el grupo de DCL (n = 8) y de 2,5 a 5,7 veces mayor que el grupo de CS (n = 16) para cada marcador (tabla 8).

- 25 Los marcadores plasmáticos Aβ1-40 y Aβ1-42 (UP y DP), pero no CB, se correlacionaron significativamente con el MMSE (tabla 9) a pesar de que podría ser, en parte, sobrestimado, dado que de la agrupación de los CS en las

puntuaciones más altas. De hecho, excluyendo a los participantes con MMSE ≥ 26 , los niveles de A β 1-40 y A β 1 42 fueron menores en los pacientes gravemente afectados (MMSE ≤ 21 , n = 5) que en los moderadamente afectados (MMSE 22-25, n = 12), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (datos no mostrados). Además, los tres marcadores A β 1-42, pero no los A β 1-40, se encontró que se correlacionan significativamente con el grado de atrofia temporal medial, tanto en el hemisferio derecho como en el izquierdo (tabla 9).

Se consideró además varios marcadores calculados a partir de los directamente ensayados en las muestras. Aparte de las habituales relaciones de A β 1-42/A β 1-40, lo más interesante fue la suma de A β 1-40 DP más CB y la suma de A β 1-42 DP más CB, a la que los presentes inventores llamaron A β 1-40 total (T40) y el de A β 1 -42 total (T42), respectivamente, y la suma de estas dos, que los presentes inventores han denominado β APB total (T- β APB). Las proporciones A β 1-42/A β 1-40 bien medidos en UP, DP o CB no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, el T40, T42 y T- β APB aumentaron 2,0, 1,5 y 1,8 veces, respectivamente en el grupo DCL con respecto al grupo control sano ($p \leq 0,03$) (tabla 4). Se encontraron incrementos promedio similares entre CS y los pacientes con EA, pero en este caso sólo la T42 alcanzó significación estadística (Figura 2).

EJEMPLO 11

Características de diagnóstico de los marcadores directos y calculados

Los parámetros y directos calculados mencionados en la tabla 10 se determinaron utilizando los métodos definidos en los ejemplos anteriores.

| Parámetros directos | |
|--|--|
| <i>Aβ40</i> | <i>Aβ42</i> |
| 1ab40 (UP) | 1ab42 (UP) |
| 2ab40 (DP) | 2ab42 (DP) |
| 3ab40 (CB) | 3ab42 (CB) |
| Parámetros calculados | |
| <i>Sumas entre Aβ40</i> | <i>Sumas entre Aβ42</i> |
| 1ab40 + 2ab40 | 1ab42 + 2ab42 |
| 1ab40 + 3ab40 | 1ab42 + 3ab42 |
| 2ab40 + 3ab40/T40 | 2ab42 + 3ab42/T42 |
| 1ab40 + 2ab40 + 3ab40 | 1ab42 + 2ab42 + 3ab42 |
| <i>Sumas entre Aβ40 y Aβ42</i> | |
| 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 | |
| 1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42 | |
| 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42/T- β APB | |
| 1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42 | |

Tabla 10: Lista de parámetros directos y calculados que se analizaron durante el estudio.

El valor predictivo de los parámetros anteriores se ha probado para

- (i) el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (mediante la comparación de muestras de pacientes sanos, con muestras de pacientes con enfermedad de Alzheimer, EA/CS),
- (ii) el diagnóstico de deterioro cognitivo leve y el escenario previo a la enfermedad de Alzheimer (mediante la comparación de muestras de pacientes sanos, con muestras de pacientes que sufren deterioro cognitivo leve, DCL/CS) y
- (iii) distinción del deterioro cognitivo leve de la enfermedad de Alzheimer (mediante la comparación de muestras de pacientes que sufren deterioro cognitivo leve con muestras de muestras de pacientes con enfermedad de Alzheimer, DCL/EA).

Las características de diagnóstico de los ensayos se evaluaron por el análisis logístico de las mediciones de A β y el diagnóstico clínico considerado como el estándar de referencia. Los resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), precisión y el área bajo la Característica de Funcionamiento del Receptor (ROC, de Receiver Operating Characteristic) se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Características de diagnóstico de los marcadores β APB directos y calculados.

| Marcador | Límite de corte (pg/ml) | de | Sensibilidad (> 85%) | Especificidad (> 75%) | VPP | VPN | Precisión (> 80 %) | ROC (> 0,8) |
|--|-------------------------|--------|----------------------|-----------------------|-------|-------|--------------------|-------------|
| UP A β 1-40 (1ab40) | 23,2 EA | EA/CS | 40,0 | 93,8 | 85,7 | 62,5 | 67,7 | 0,6 |
| | 17,0 DCL | DCL/CS | 85,7 | 68,8 | 54,5 | 91,7 | 73,9 | 0,8 |
| | 22,5 EA | EA/DCL | 40,0 | 71,4 | 75,0 | 35,7 | 50,0 | 0,4 |
| DP A β 1-40 (2ab40) | 63,8 EA | EA/CS | 46,7 | 81,3 | 70,0 | 61,9 | 64,5 | 0,6 |
| | 63,8 DCL | DCL/CS | 85,7 | 81,3 | 66,7 | 92,9 | 82,6 | 0,8 |
| | 72,2 EA | EA/DCL | 40,0 | 71,4 | 75,0 | 35,7 | 50,0 | 0,4 |
| CB A β 1-40 (3ab40) | 71,9 EA | EA/CS | 53,3 | 87,5 | 80,0 | 66,7 | 70,9 | 0,7 |
| | 71,1 DCL | DCL/CS | 85,7 | 81,3 | 66,7 | 92,9 | 82,6 | 0,9 |
| | 211,3 EA | EA/DCL | 13,3 | 100,0 | 100,0 | 35,0 | 40,9 | 0,4 |
| UP A β 1-42 (1ab42) | 10,28 EA | EA/CS | 46,7 | 87,5 | 77,8 | 63,6 | 67,7 | 0,7 |
| | 9,2 DCL | DCL/CS | 85,7 | 81,3 | 66,7 | 92,9 | 82,6 | 0,9 |
| | 67,4 EA | EA/DCL | 6,7 | 100,0 | 100,0 | 33,3 | 36,3 | 0,3 |
| DP A β 1-42 (2ab42) | 47,4 EA | EA/CS | 46,7 | 87,5 | 77,8 | 63,6 | 67,7 | 0,6 |
| | 50,3 DCL | DCL/CS | 57,1 | 93,8 | 80,0 | 83,3 | 82,6 | 0,8 |
| | 151,7 EA | EA/DCL | 6,7 | 100,0 | 100,0 | 33,3 | 36,3 | 0,4 |
| CB A β 1-42 (3ab42) | 76,9 EA | EA/CS | 40,0 | 100,0 | 100,0 | 64,0 | 70,9 | 0,7 |
| | 59,8 DCL | DCL/CS | 100,0 | 50,0 | 46,7 | 100,0 | 65,2 | 0,7 |
| | 71,3 EA | EA/DCL | 53,3 | 71,4 | 80,0 | 41,7 | 59,0 | 0,5 |
| T40 (DP + CB) (2ab40 + 3ab40) | 132,7 EA | EA/CS | 53,3 | 81,3 | 72,7 | 65 | 67,7 | 0,6 |
| | 132,7 DCL | DCL/CS | 85,7 | 85,3 | 66,7 | 92,9 | 86,3 | 0,8 |
| | 550,8 EA | EA/DCL | 13,3 | 100 | 100 | 35 | 40 | 0,4 |
| T42 (DP + CB) (2ab42 + 3ab42) | 115,8 EA | EA/CS | 53,3 | 87,5 | 80 | 66,7 | 70,9 | 0,7 |
| | 103,3 DCL | DCL/CS | 100 | 50 | 46,7 | 100 | 68 | 0,8 |
| | 113,7 EA | EA/DCL | 53,3 | 57,1 | 72,7 | 36,4 | 54 | 0,4 |
| T- β APB (T40 + T42) (2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42) | 235,5 EA | EA/CS | 53,3 | 81,3 | 72,7 | 65 | 38 | 0,7 |
| | 235,5 DCL | DCL/CS | 85,7 | 81,3 | 66,7 | 92,9 | 86,3 | 0,8 |
| | 778,1 EA | EA/DCL | 13,3 | 100 | 100 | 35 | 40 | 0,4 |

Resaltados en gris están los resultados que cumplieron con el criterio considerado adecuado como figura en el encabezamiento. VPP: valor predictivo positivo.VPN: valor predictivo negativo. ROC: área bajo la curva característica de funcionamiento del receptor.

5 La mayoría de los marcadores directos y dos marcadores calculados (T40 y T- β APB) cumplieron con los criterios que se consideren idóneos para distinguir entre los pacientes DCL y CS, que es de sumo interés, porque desde cualquier punto de vista práctico, es aquí donde el diagnóstico debe ser mejorado. Por lo tanto, todos los marcadores directos, con excepción de CB A β 1-42, presentaron un ROC \geq 0,8 y entre ellos cuatro (DP A β 1-40, CB A β 1-40, UP A β 1-42 y DP A β 1-42) tienen una precisión mayor del 80%, lo que significa que el 80% de las prueba fueron correctas cuando se comparan con el estándar de referencia clínico (figura 3). Los T40 y T- β APB calculados fueron igual de precisos para distinguir entre DCL y CS que los marcadores directos, mientras que la T42 parecen ser menos fiable (Figura 3). Debido a la gran variabilidad de las mediciones de A β de un individuo a otro dentro del grupo de EA, no se pudo encontrar un punto de corte en la que estos marcadores discriminaran a los pacientes con EA de los otros dos grupos de participantes con una sensibilidad y especificidad aceptables (Figura 3).

EJEMPLO 12

20 Otros parámetro que muestran la mayor sensibilidad y precisión adecuadas para su utilización en la presente invención incluyen los que se muestran en la Tabla 12.

| Método | parámetro |
|---|---|
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40)/2ab40 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | CB (Aβ1-40)/3ab40 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | CB (Aβ1-40)/3ab40 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | CB (Aβ1-40)/3ab40 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-42)/2ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-42)/2ab42 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-42)/2ab42 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | CB (Aβ1-42)/3ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | CB (Aβ1-42)/3ab42 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40)/2ab40 + 3ab40 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40)/2ab40 + 3ab40 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40)/2ab40 + 3ab40 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/2ab42 + 3ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/2ab42 + 3ab42 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40) + DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/2ab40 + 3ab40 + 2ab42 3ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40) + DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40) + DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | FP (Aβ1-40) + DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40) + FP (Aβ1-42) + DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | PF (Aβ1-40) + DP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40)/1ab40 + 2ab40 + 3ab40 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | FP (Aβ1-42) + DP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/1ab42 + 2ab42 + 3ab42 |
| Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa | PF (Aβ1-40) + DP (Aβ1-40) PF (Aβ1-42) + DP (Aβ1-42)/1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | FP (Aβ1-40) + DP (Aβ1-40) FP (Aβ1-42) + DP (Aβ1-42)/1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 |
| Distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa | FP (Aβ1-40) + DP (Aβ1-40) FP (Aβ1-42) + DP (Aβ1-42)/1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42 |
| Detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa | FP (Aβ1-40) + CB (Aβ1-40) FP (Aβ1-42) + CB (Aβ1-42)/1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42 |

Tabla 12: Resumen de los métodos que muestran mejor sensibilidad, especificidad y niveles de precisión. Los métodos más preferentes se dan en caracteres blancos sobre un fondo negro. Los segundos mejores métodos se muestran con un fondo gris claro.

- 5 Los métodos dados a conocer particularmente útiles para la detección de deterioro cognitivo leve de pacientes sanos, utilizan el marcador 1ab40 (figura 4), el marcador 2ab40 (figura 5), el marcador 3ab40 (figura 6), el marcador 1ab42 (figura 7), el marcador 2ab42 (figura 8), el marcador 3ab42 (figuras 9 y 10), el marcador 2ab40 + 3ab40 (figura 11), el marcador 2ab42 + 3ab42 (figura 12), el 2ab42 + 3ab42 (figura 13) y el 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42 (figura 14).

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ARACLON BIOTECH S.L.

15 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN MEJORADA DE PÉPTIDOS BETA AMILOIDE

<130> P4599PC00

<150> EP09382279

20 <151> 2009-12-11

<160> 15

<170> Patent In version 3.5

25

ES 2 552 627 T3

<210> 1
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<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 Gly Val Val
          35           40
    
```

10 <210> 2
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <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
    
```

20 <210> 3
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <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
    
```

30 <210> 4
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 552 627 T3

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
 35 40

5 <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

10 <210> 6
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

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 Thr
 35 40

20 <210> 7
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

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

Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 20 25 30

30 <210> 8
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 552 627 T3

<400> 8

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

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

Met Val Gly Gly Val Val
 35

5 <210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

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

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

Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

15 <210> 10
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 10

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

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

Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35

25 <210> 11
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 552 627 T3

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

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

Gly Val Val Ile Ala
 35

<210> 12
 <211> 36
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

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

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

Val Val Ile Ala
 35

10
 <210> 13
 <211> 35
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 13

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

Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val
 20 25 30

Val Ile Ala
 35

20
 <210> 14
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 14

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

Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 20 25 30

Ile Ala

ES 2 552 627 T3

<210> 15
 <211> 770
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

```

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1          5          10          15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
          20          25          30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
          35          40          45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50          55          60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65          70          75          80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
          85          90          95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
          100          105          110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
          115          120          125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
          130          135          140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
          145          150          155          160
    
```

10

ES 2 552 627 T3

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365

Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp
 370 375 380

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile

ES 2 552 627 T3

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755 760 765

Gln Asn
770

REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico en un sujeto de una enfermedad neurodegenerativa, para la detección de una etapa anterior de una enfermedad neurodegenerativa o para la distinción una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa, que comprende las etapas de

(i) determinar uno o más parámetros seleccionados del grupo de

- (a) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (b) los niveles agregados de uno o más péptidos amiloides libres en una muestra biológica de dicho sujeto y de dichos uno o más péptidos beta amiloides asociados a los componentes macromoleculares presentes en dicha muestra biológica, en el que dichos niveles agregados se determinan mediante la cuantificación de la cantidad de dichos uno o más péptidos beta amiloides en la fracción libre de células de dicha muestra después de poner en contacto dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (c) el nivel de uno o más péptidos beta amiloides asociados a las células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que dicho nivel se determina mediante el aislamiento de la fracción de células de dicha muestra biológica, el contacto de dicha fracción celular de dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido o péptidos beta amiloides de las células presentes en la muestra y

(ii) comparar el valor de, como mínimo, uno de los parámetros (b) o (c) o el valor de un parámetro calculado resultante de combinar aritméticamente, como mínimo, dos de los parámetros (a) a (c) con un valor de referencia correspondiente al valor de dichos parámetros (b) o (c), o dicho parámetro calculado en una muestra de referencia y

(iii) diagnosticar la enfermedad neurodegenerativa, detectar una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa o distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa cuando hay una alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia,

en el que la muestra biológica es plasma o sangre y en el que los parámetros determinados en la etapa (i) son uno o más de los parámetros seleccionados del grupo

- (a) 1ab40, correspondiente al nivel de péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (b) 1ab42, correspondiente al nivel de péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto,
- (c) 2ab40, correspondientes a los niveles agregados de péptido ABETA40 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y de péptido ABETA40 asociado a los componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab40 se determina mediante la cuantificación de la cantidad de péptido ABETA40 en dicha muestra después de poner en contacto dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido ABETA40 de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (d) 2ab42, correspondiente al nivel agregado de péptido ABETA42 libre en una muestra biológica de dicho sujeto y de péptido ABETA42 asociado a los componentes de dicha muestra biológica, en el que 2ab42 se determina mediante la cuantificación de la cantidad de péptido ABETA42 en dicha muestra después de poner en contacto dicha muestra con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación del péptido ABETA42 de los componentes presentes en la muestra biológica,
- (e) 3ab40, correspondiente al nivel del péptido ABETA40 asociado a las células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab40 se determina mediante la cuantificación de la cantidad de péptido ABETA40 después de poner en contacto la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación de los péptidos beta amiloides de las células presentes en la muestra y
- (f) 3ab42, correspondiente al nivel del péptido ABETA42 asociado a las células en una muestra biológica de dicho sujeto, en el que 3ab42 se determina mediante la cuantificación de la cantidad de péptido ABETA42 después de poner en contacto la fracción celular de dicha muestra biológica con un agente solubilizante de proteínas en condiciones adecuadas para promover la disociación de los péptidos beta amiloides de las células presentes en la muestra.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que el parámetro calculado obtenido en la etapa (ii) se selecciona del grupo de 2ab40/2ab42, 3ab40/3ab42, 2ab40/3ab40, 2ab42/3ab42, 1ab40 + 2ab40, 1ab40 + 3ab40, 2ab40 + 3ab40, 1ab40 + 2ab40 + 3ab40, 1ab42 + 2ab42, 1ab42 + 3ab42, 2ab42 + 3ab42, 1ab42 + 2ab42 + 3ab42, 1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42, 1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42, 2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42, 1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42, (1ab40 + 2ab40)/(1ab42 + 2ab42), (1ab40 + 3ab40)/(1ab42 + 3ab42), (2ab40 + 3ab40)/(2ab42 + 3ab42), (1ab40 + 2ab40 3ab40)/(1ab42 + 2ab42 + 3ab42), (1ab42 + 2ab42)/(1ab40 + 2ab40), (1ab42 + 3ab42)/(1ab40 + 3ab40), (2ab42 + 3ab42)/(2ab40 + 3ab40), (1ab42 + 2ab42 + 3ab42)/(1ab40 + 2ab40 +

3ab40), 2ab40 - 1ab40, 2ab42 - 1ab42 y $(2ab40-1ab40)/(2ab42 - 1ab42)$.

3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que

- 5 (i) el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo comparando el valor de un parámetro seleccionado del grupo de 3ab40, 2ab42 y 3ab42 o el valor de un parámetro calculado seleccionado del grupo de $2ab40 + 3ab40$, $2ab42 + 3ab42$, $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$ y $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$,
- 10 (ii) la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo comparando el valor de un parámetro seleccionado del grupo de 2ab40, 3ab40, 2ab42 y 3ab42 o el valor de un parámetro calculado seleccionado del grupo de $2ab40 + 3ab40$, $2ab42 + 3ab42$, $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$, $1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42$, $1ab40 + 2ab40 + 3ab40$, $1ab42 + 2ab42 + 3ab42$, $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$ y $1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42$ o
- 15 (iii) la distinción de una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa se lleva a cabo comparando el valor de un parámetro seleccionado del grupo de 3ab40 y 2ab42 o comparando el valor de un parámetro calculado seleccionado del grupo de $2ab40 + 3ab40$, $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$ y $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$.

4. Método, según la reivindicación 3, en el que el valor de referencia utilizado en la etapa (ii) para comparar el valor del parámetro o el valor del parámetro calculado se selecciona del grupo de

- (i) 63,8 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 2ab40 para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 25 (ii) 71,9 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 3ab40 para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (iii) 71,1 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 3ab40 para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- (iv) 211,3 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 3ab40 para distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa,
- 30 (v) 47,4 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 2ab42 para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (vi) 50,3 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 2ab42 para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 35 (vii) 151,7 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 2ab42 para distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa,
- (viii) 76,9 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 3ab42 para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (ix) 58,8 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro 3ab42 para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 40 (x) 132,7 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab40 + 3ab40$ para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (xi) 132,7 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab40 + 3ab40$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 45 (xii) 550,8 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab40 + 3ab40$ para distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa,
- (xiii) 115,8 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab42 + 3ab42$ para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (xiv) 103,3 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab42 + 3ab42$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 50 (xv) 235,5 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$ para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (xvi) 235,5 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 55 (xvii) 778,1 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $2ab40 + 3ab40 + 2ab42 + 3ab42$ para distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa,
- (xviii) 272,1 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab40 + 2ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 2ab42 + 3ab42$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- (xix) 155,8 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab40 + 2ab40 + 3ab40$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 60 (xx) 124,3 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab42 + 2ab42 + 3ab42$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- (xxi) 158,3 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$ para el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa,
- (xxii) 142,4 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa,
- 65 (xxiii) 161,2 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab40 + 2ab40 + 1ab42 + 2ab42$ para

distinguir una enfermedad neurodegenerativa de una etapa anterior a dicha enfermedad neurodegenerativa y

(xxiv) 154,7 pg/ml en los casos en los que se utiliza el parámetro $1ab40 + 3ab40 + 1ab42 + 3ab42$ para la detección de una etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa.

- 5
6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia es un aumento.
- 10
7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente solubilizante de proteínas es un detergente, preferiblemente de Tween 20.
- 15
8. Método, según la reivindicación 7, en el que dicho método inmunológico es un ensayo ELISA.
9. Método, según la reivindicación 8, en el que el ensayo ELISA es un ensayo ELISA sándwich.
- 20
10. Método, según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo de captura en el ensayo ELISA sándwich es un anticuerpo contra la región N-terminal del péptido beta amiloide.
11. Método, según la reivindicación 10, en el que el anticuerpo contra la región N-terminal del péptido beta amiloide se dirige contra un epítipo situado dentro de los aminoácidos 1 a 7 de ABETA40 y ABETA42.
- 25
12. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que el anticuerpo de detección en el ensayo ELISA sándwich es un anticuerpo específico contra un epítipo localizado en la región C-terminal del péptido beta amiloide.
- 30
13. Método, según la reivindicación 12, en el que el anticuerpo específico contra la región C-terminal del péptido beta amiloide se selecciona del grupo de
- (i) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido ABETA42 que se une específicamente a ABETA42 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con ABETA40,
- 35
- (ii) un anticuerpo policlonal preparado contra un péptido correspondiente a la región C-terminal del péptido ABETA40 que se une específicamente a ABETA40 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con ABETA42 y
- (iii) un anticuerpo que reconoce al mismo tiempo la región C-terminal tanto de ABETA40 como de ABETA42 y
- 40
- (iv) una combinación de los anticuerpos de (i) y (ii).
14. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el anticuerpo de detección se detecta posteriormente utilizando un reactivo que muestra afinidad por dicho anticuerpo que está acoplado a un primer miembro de un par de unión.
- 45
15. Método, según la reivindicación 14, en el que la detección se lleva a cabo utilizando un segundo miembro de un par de unión acoplado a un marcador detectable.
- 50
16. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer y/o la etapa anterior a una enfermedad neurodegenerativa es deterioro cognitivo leve.

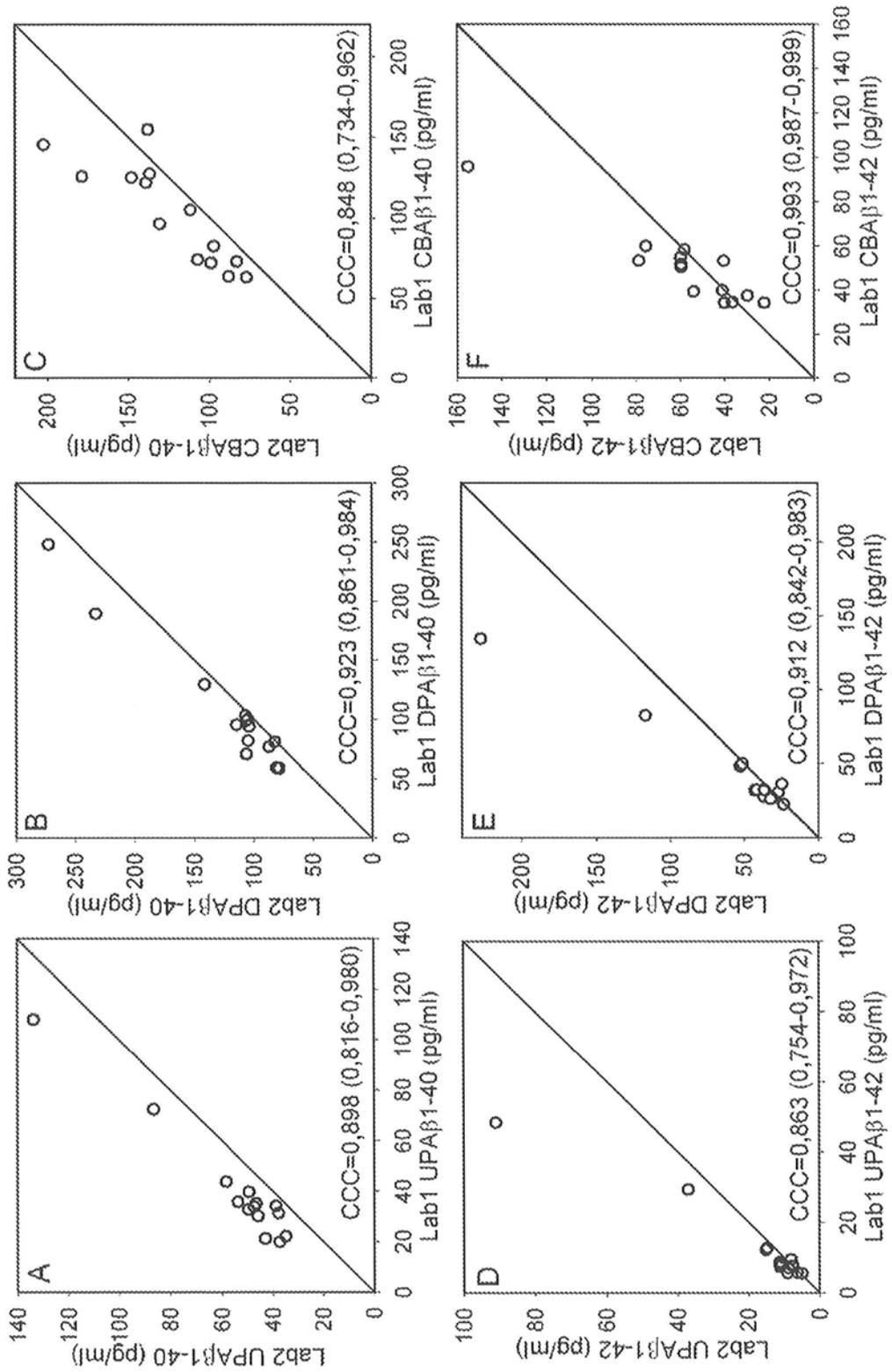


FIGURA 1

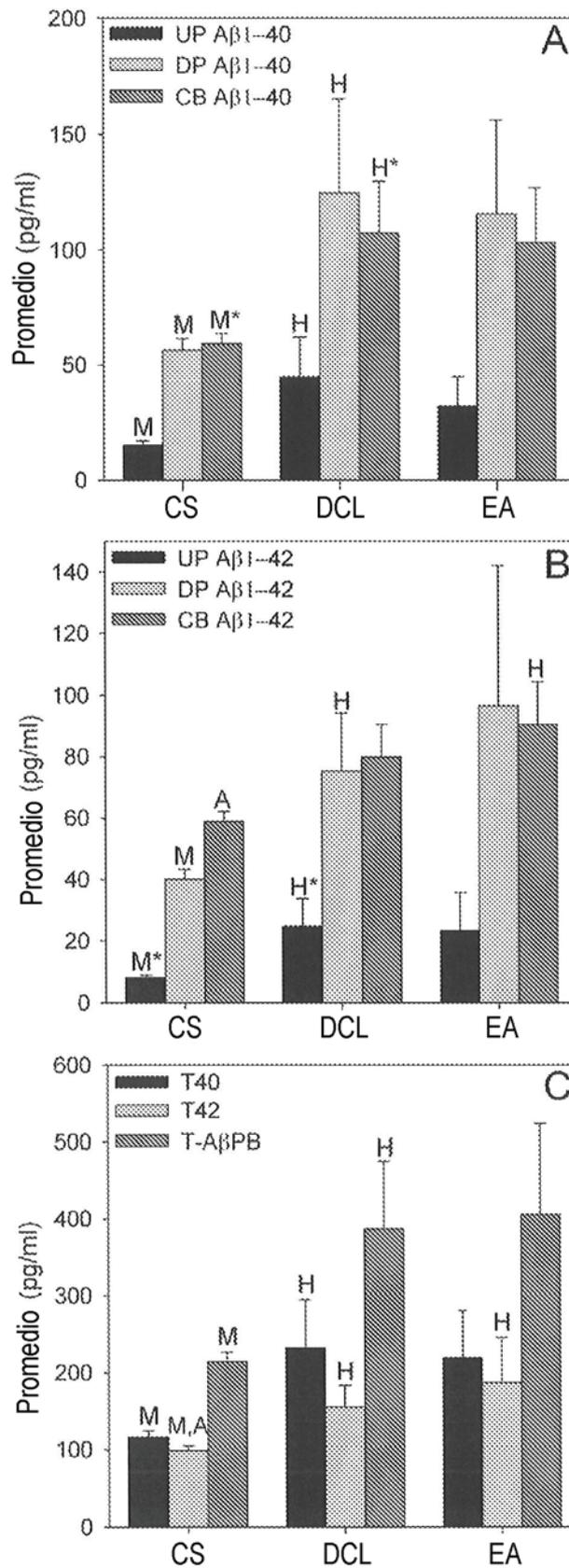


FIGURA 2

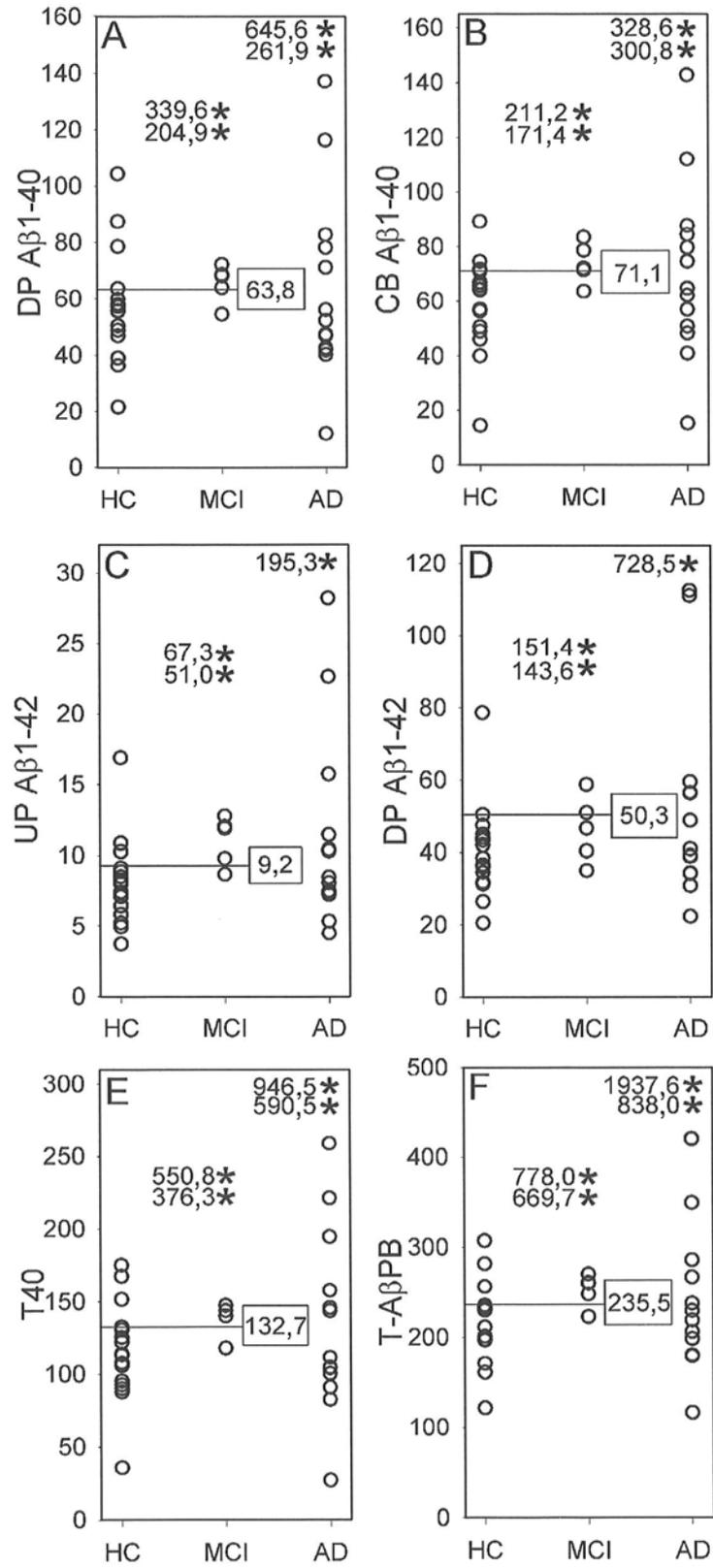


FIGURA 3

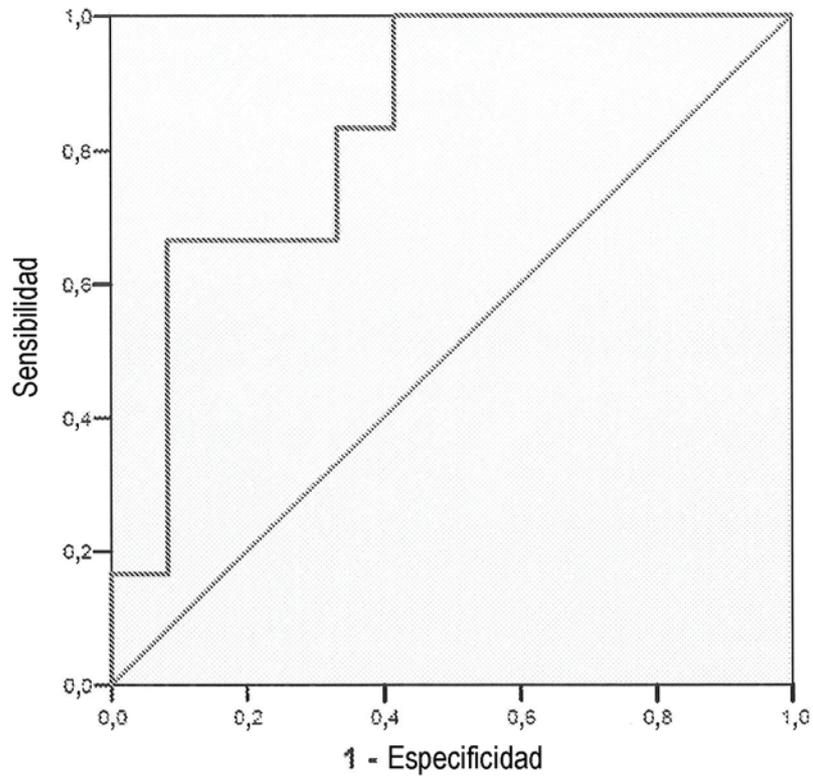


FIGURA 4

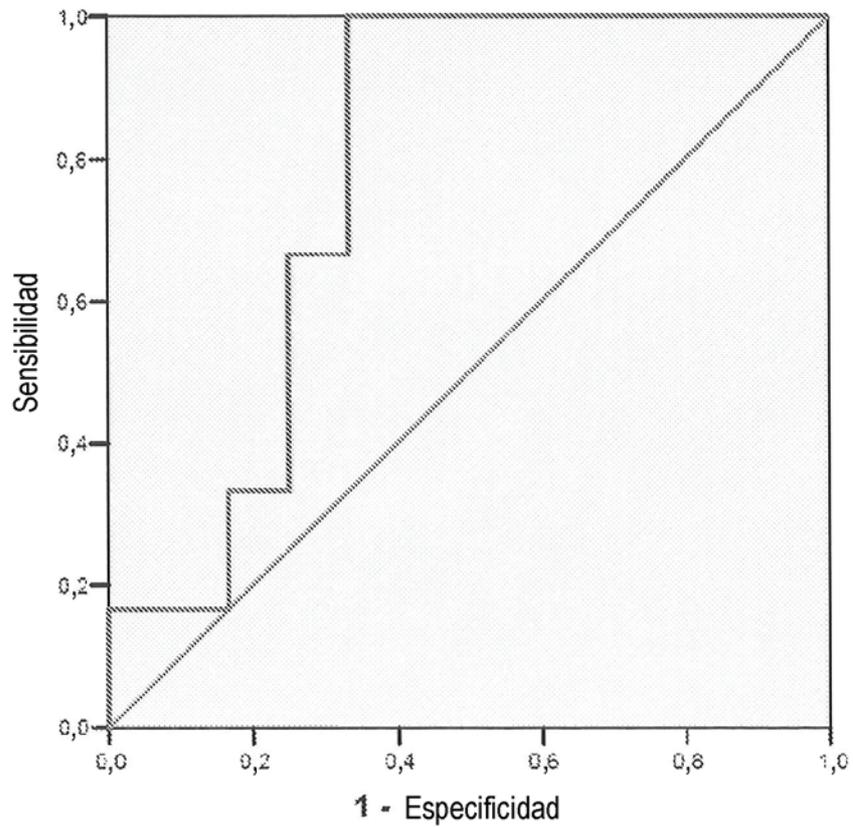


FIGURA 5

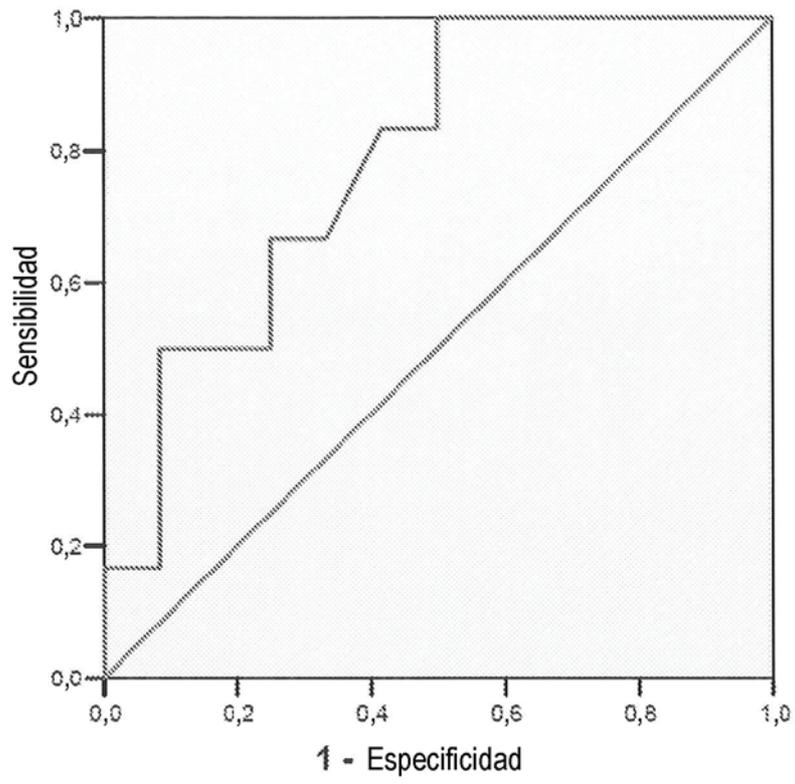


FIGURA 6

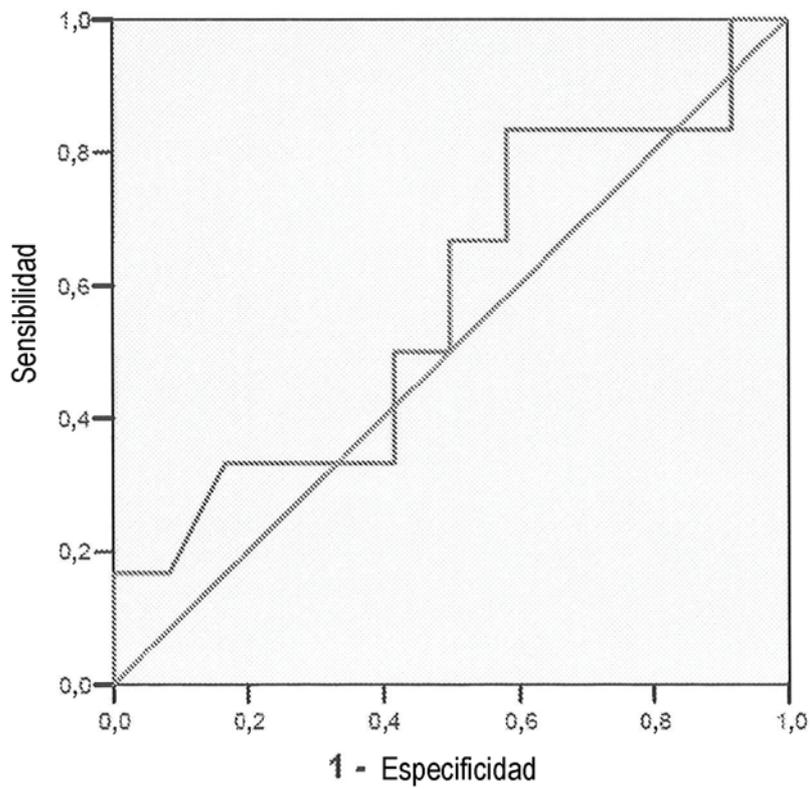


FIGURA 7

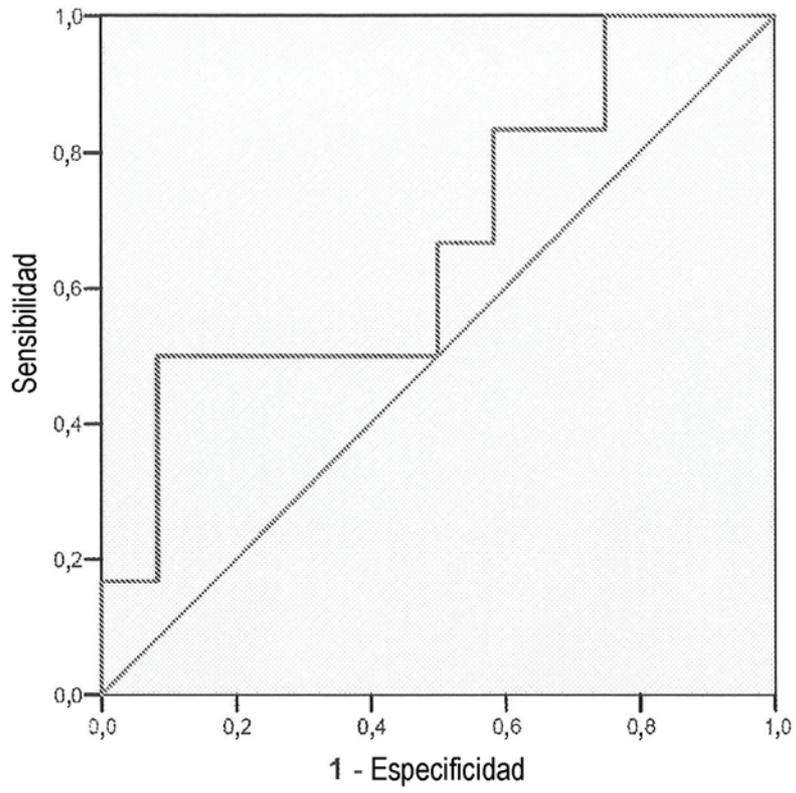


FIGURA 8

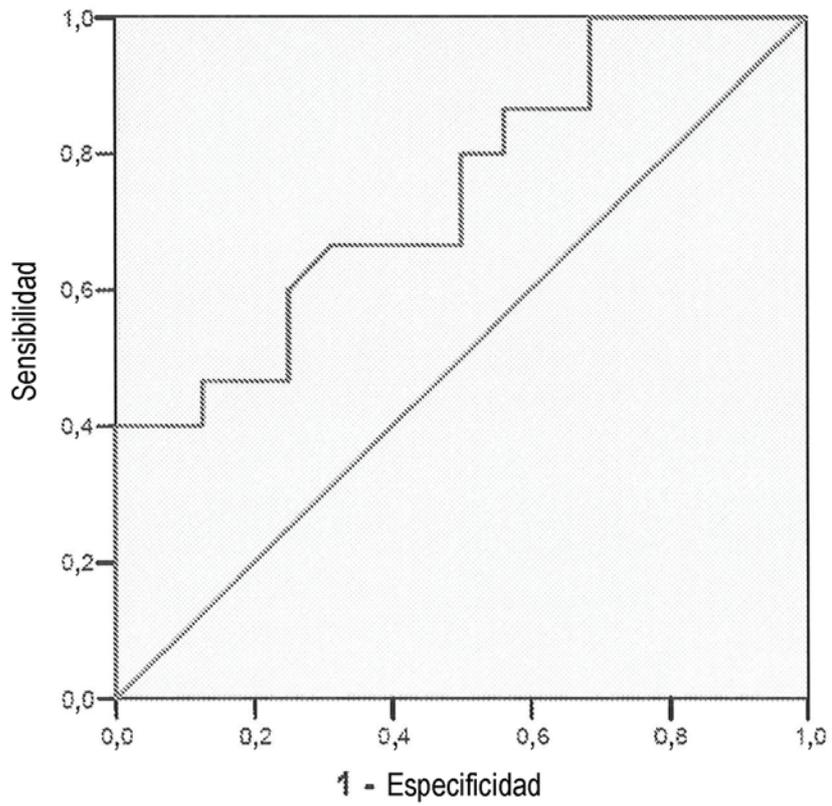


FIGURA 9

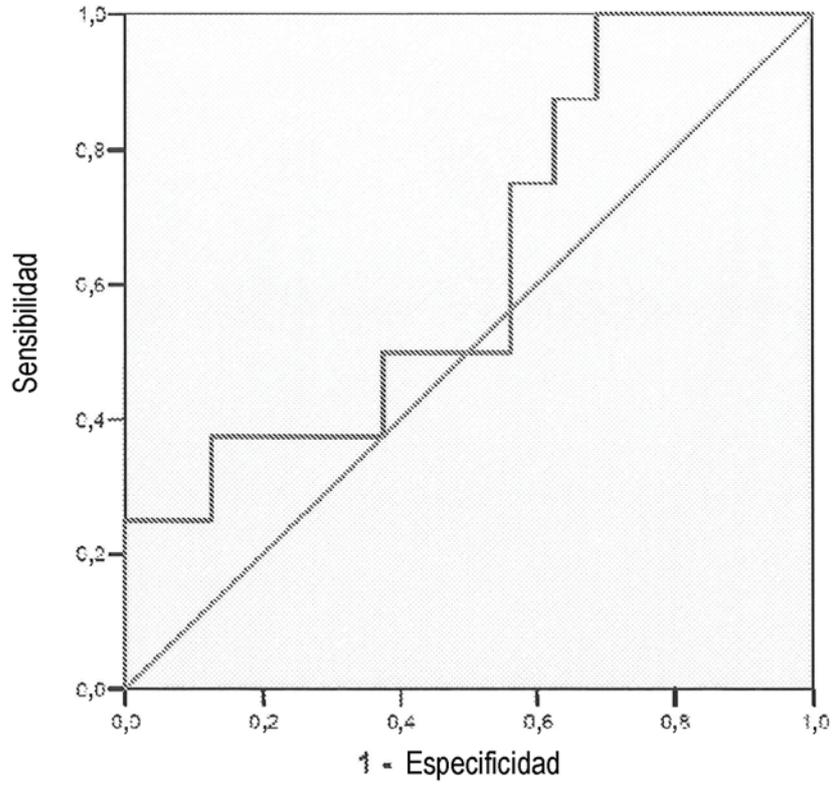


FIGURA 10

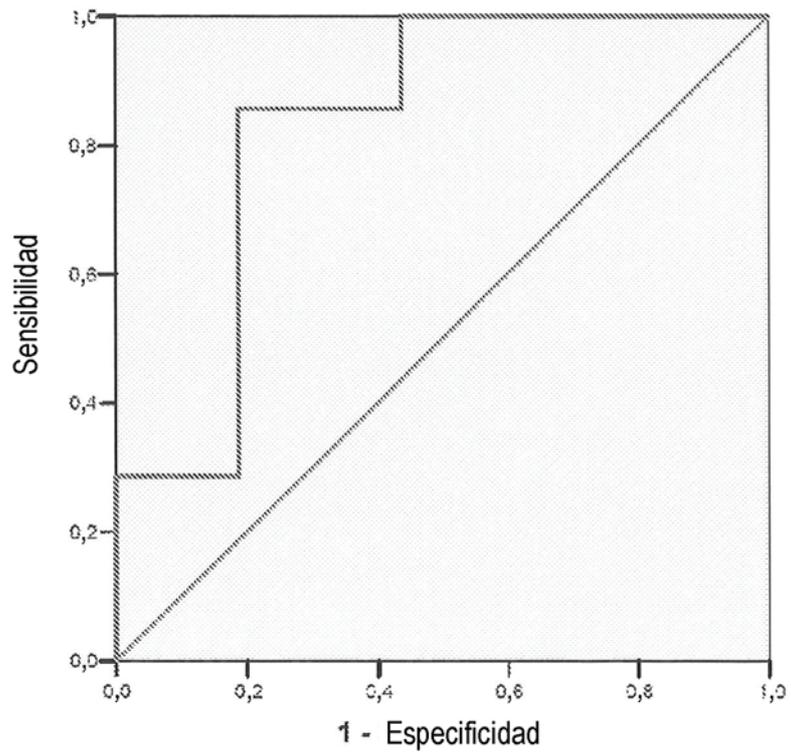


FIGURA 11

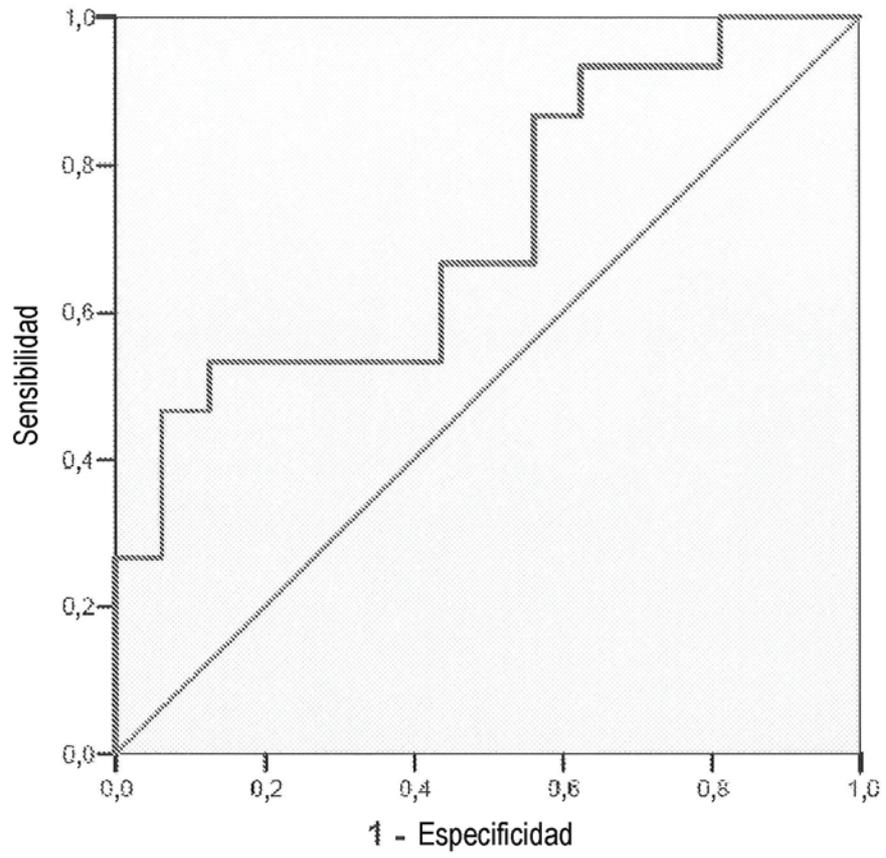


FIGURA 12

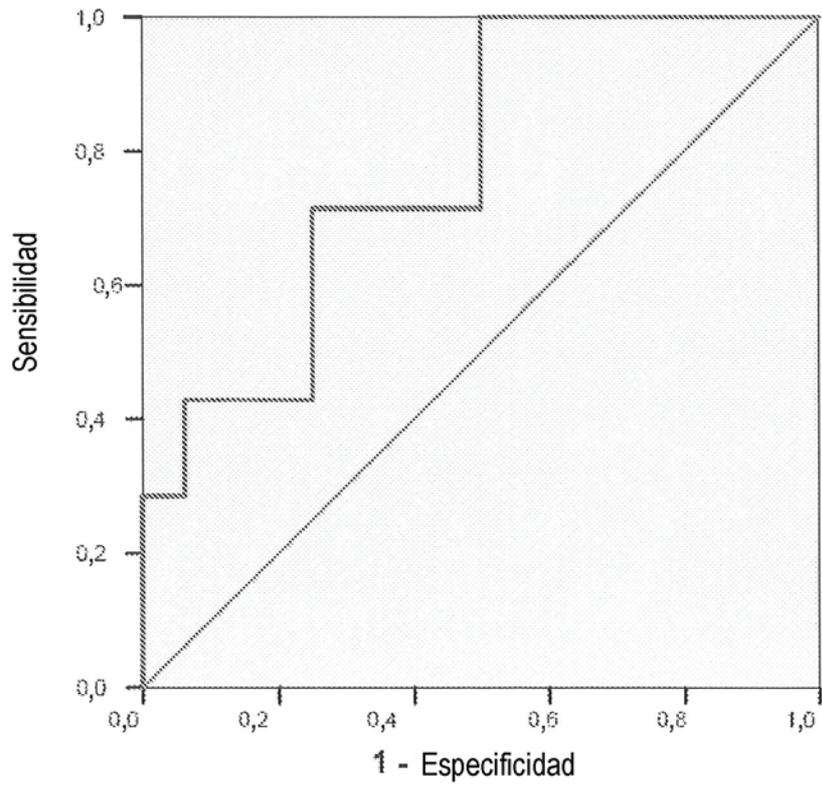


FIGURA 13

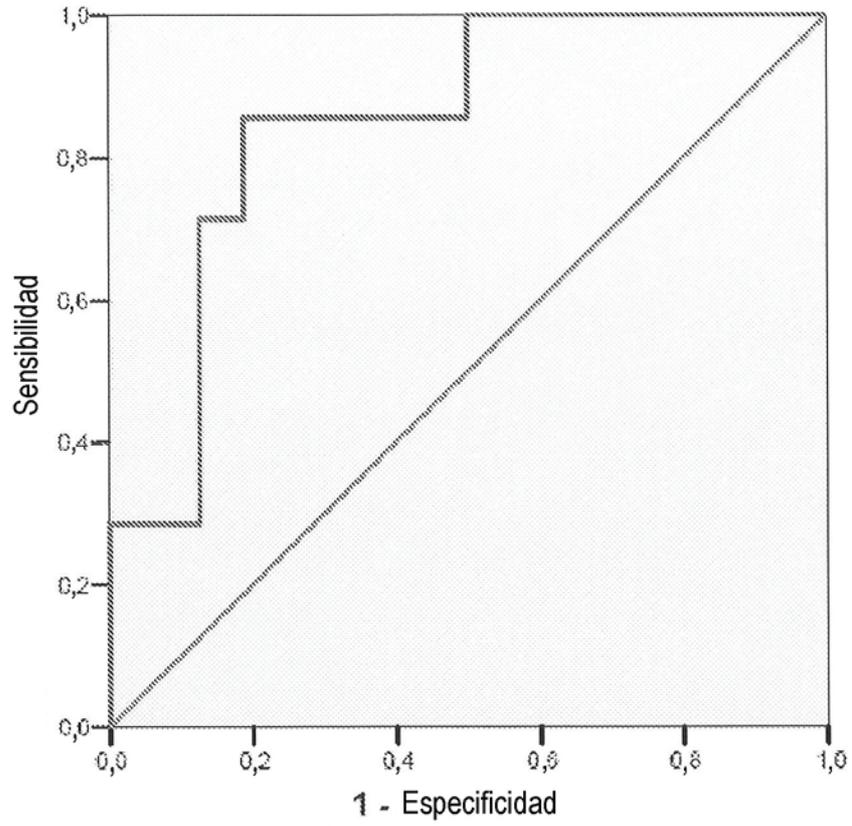


FIGURA 14