

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 480**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014** **E 14158225 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015** **EP 2816353**

54 Título: **Un método para detectar riesgo de enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

18.06.2013 TW 102211361

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2016

73 Titular/es:

MAGQU CO. LTD. (100.0%)
3F., No. 12, Ln. 538, Zhongzheng Rd., Xindian
Dist.
New Taipei City 231, TW

72 Inventor/es:

YANG, SHIEH-YUEH

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 564 480 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

Un método para detectar riesgo de enfermedad de Alzheimer

5 Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad respecto a TW 102211361, presentada el 18 de junio de 2013.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar riesgo de enfermedad de Alzheimer usando ensayos de reducción inmunomagnética (RIM) del producto de las concentraciones de proteína tau y proteína A β -42, dos biomarcadores para la enfermedad de Alzheimer.

Descripción del estado de la técnica

Debido al rápido envejecimiento de la población global, las enfermedades neurodegenerativas se han vuelto problemas serios actualmente. La demencia es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente entre todas ellas. En la mayoría de las regiones del mundo el índice de prevalencia de demencia entre los ancianos por encima de una edad de 60 es del 5-7%. Se proyectó que cerca de 35,6 millones de personas en el mundo padecerían demencia en 2010. La Organización Mundial de la Salud ha instado que todos los gobiernos, responsables políticos y otros participantes deben ver el impacto de la demencia como una amenaza creciente y deben asignar todos los recursos necesarios para tener los sistemas médicos y de asistencia social listos para la amenaza inminente de la demencia.

Los pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) comprenden el 50%-70% de la población anciana que padece demencia. La neuroimagenología y pruebas neurocognitivas son dos piedras angulares de la práctica médica actual usadas para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. Aunque las pruebas neurocognitivas son más fáciles de implementar comparadas con la neuroimagenología, los resultados dependen no solo del grado de neurodegeneración sino también de otros factores tal como educación, antecedentes culturales, estado socioeconómico, etc. Por tanto, se debe tener cuidado cuando se evalúan pacientes mediante pruebas neurocognitivas y los resultados de las pruebas no deben ser la única información para alcanzar un diagnóstico final de enfermedad de Alzheimer. Respecto a la neuroimagenología, se pueden obtener datos estructurales o funcionales para diagnosticar enfermedad de Alzheimer en un motivo objetivo. Por ejemplo, se puede identificar atrofia del hipocampo cualitativa (evaluación visual) o cuantitativamente (volumetría) usando imagenología de resonancia magnética; y la tomografía de emisión de positrones (TEP) de amiloide o tau puede mostrar placas amiloides y ovillos neurofibrilares típicamente encontrados en los cerebros de pacientes de enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la neuroimagenología es cara y generalmente no accesible, especialmente en clínicas privadas u hospitales pequeños. Por tanto, se motiva a la gente a desarrollar otras tecnologías para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer.

El diagnóstico molecular es la nueva tendencia del diagnóstico *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer. Los potenciales biomarcadores incluyen amiloides, proteína tau, y sus derivados. La mayoría de estos biomarcadores se encuentran en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La punción lumbar es necesaria para recoger muestras de LCR. Puesto que el proceso de muestreo de LCR es relativamente peligroso y molesto, las muestras de LCR no son adecuadas para cribar la enfermedad de Alzheimer a gran escala, ni son adecuadas para seguir el pronóstico de la enfermedad o efecto terapéutico a largo plazo que requiere muestreos repetitivos. Por tanto, se han buscado biomarcadores en líquidos corporales diferentes del LCR. Uno de los líquidos corporales más prometedores es la sangre que es la muestra clínica más fiable, conveniente y familiar. Sin embargo, las concentraciones de biomarcadores en sangre son muy bajas, tan bajas que se pueden expresar a nivel de pg/ml. Se necesitan tecnologías de ensayo de sensibilidad ultra alta para la detección de estos biomarcadores de concentración ultra baja.

Se ha desarrollado una tecnología de sensibilidad ultra alta para inmunoensayo en 2008. Esta tecnología se denomina ahora ensayos de reducción inmunomagnética (RIM) con dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID). Se encontró que los límites de detección baja de la RIM basada en SQUID para amiloides y proteína tau eran 1-10 pg/ml, lo que hace posible la medida de biomarcadores en plasma para diagnosticar enfermedad de Alzheimer. Por tanto, la presente invención divulga las caracterizaciones de RIM con SQUID para ensayar biomarcadores en plasma humano.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para detectar riesgo de enfermedad de Alzheimer, que comprende: (a) detectar señales de reducción inmunomagnética (RIM) *in vitro* de dos biomarcadores de enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica de un sujeto, en donde las señales de RIM se producen por la unión de los dos

biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer con nanopartículas magnéticas que contienen un anticuerpo anti-biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, en donde los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer son proteína tau y proteína A β -42, respectivamente; (b) las señales de RIM de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer detectados en el paso (a) se ajustan a una función logística (I) para calcular la concentración de cada biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en la muestra biológica:

$$RIM (\%) = \frac{A - B}{1 + \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right)^y} + B \quad (I)$$

en donde RIM (%) es las señales de RIM de un biomarcador, Φ es la concentración del biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, el parámetro de ajuste A es un valor de fondo, B es un valor máximo, Φ_0 es la concentración del biomarcador cuando la señal de RIM equivale a $((A+B)/2)$, y es una pendiente en el punto de los datos Φ_0 de una curva donde Φ es el eje x y RIM (%) es el eje y; y (c) comparar un producto de la concentración de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer obtenidos en el paso (b) con un valor estándar calculado multiplicando las concentraciones de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, cuando el producto de la concentración de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer es mayor que el valor estándar eso es indicativo de riesgo creciente de enfermedad de Alzheimer del sujeto.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra el sistema de detección de la presente invención.

La figura 2 (a) ilustra el reactivo de detección de la presente invención. (b) muestra el reactivo de detección unido al biomarcador.

La figura 3 muestra la curva de señal de RIM dependiente de la concentración con barras de error. (●) indica A β -40, (X) indica A β -42 y (■) indica proteína tau.

La figura 4 muestra las concentraciones de proteína A β -40 en plasma detectadas por ensayos de RIM ayudados por reactivo de A β -40 en varios grupos clínicos.

La figura 5 (a) muestra las concentraciones de proteína A β -42 en plasma detectadas por ensayos de RIM ayudados por reactivo de A β -42 en varios grupos clínicos. (b) muestra una curva ROC que es capaz de diferenciar un grupo de sujetos sanos de un grupo de pacientes (incluyendo deterioro cognitivo leve debido a enfermedad de Alzheimer (DCL debido a EA), enfermedad de Alzheimer leve (EA) y demencia por enfermedad de Alzheimer de moderada a grave (DEA). (c) muestra una curva ROC que es capaz de diferenciar un grupo de pacientes que padecen DCL debido a EA de un grupo de pacientes que padece DEA.

La figura 6 (a) muestra la concentración de proteína tau en plasma detectada usando ensayos de RIM en varios grupos clínicos. (b) muestra una curva ROC que es capaz de diferenciar un grupo de sujetos sanos de un grupo de pacientes (incluyendo DCL debido a EA, EA leve y DEA de moderada a grave. (c) muestra una curva ROC que es capaz de diferenciar un grupo de pacientes que padecen DCL debido a EA de un grupo de pacientes que padece DEA.

La figura 7 (a) muestra el producto de la concentración de proteína A β -42 en plasma y la concentración de proteína tau en plasma detectadas en varios grupos clínicos usando ensayos de RIM. (b) muestra una curva ROC que es capaz de diferenciar un grupo de sujetos sanos de un grupo de pacientes (incluyendo DCL debido a EA, EA leve y DEA de moderada a grave. (c) muestra una curva ROC que es capaz de diferenciar un grupo de pacientes que padecen DCL debido a EA de un grupo de pacientes que padece DEA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un sistema para detectar riesgo de enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende:

un dispositivo detector 11, que se usa para detectar señales de reducción inmunomagnética (RIM) que se producen cuando dos biomarcadores en una muestra biológica de un sujeto se unen a nanopartículas magnéticas que contienen un anticuerpo anti-biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, en donde los dos biomarcadores son proteína tau y proteína A β -42, respectivamente;

un dispositivo informático 12, que está conectado al dispositivo 11 para recibir las señales de RIM de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer y para calcular la concentración de cada uno de los dos biomarcadores en la muestra biológica ajustando a la función logística (I)

$$RIM (\%) = \frac{A - B}{1 + \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right)^y} + B \quad (I)$$

en donde, RIM (reducción inmunomagnética) es la señal de RIM de un biomarcador, Φ es la concentración individual del biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, el parámetro de ajuste A es un valor de fondo, B es un valor máximo, Φ_0 es la concentración del biomarcador cuando la señal de RIM equivale a $((A+B)/2)$, y y es la pendiente de una curva en el punto de datos Φ_0 donde Φ es el eje x y RIM (%) es el eje y; y

un dispositivo de identificación 13, que está conectado con el dispositivo informático 12 para calcular un producto de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer calculadas por el dispositivo informático 12 y para determinar el riesgo de enfermedad de Alzheimer basado en el producto de las concentraciones de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.

En una forma de realización, la enfermedad de Alzheimer es demencia por enfermedad de Alzheimer (DEA). En una forma de realización preferida, la demencia por enfermedad de Alzheimer incluye deterioros cognitivos debido a la enfermedad de Alzheimer. En otra forma de realización preferida, el deterioro cognitivo debido a la enfermedad de Alzheimer es deterioro cognitivo leve (DCL) debido a la enfermedad de Alzheimer.

En una forma de realización, el dispositivo de identificación 13 determina el riesgo de enfermedad de Alzheimer comparando el producto de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica de un sujeto con un umbral predeterminado (o valor de corte) que es un producto de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer calculado usando una curva característica operativa del receptor (ROC, del inglés "*receiver operating characteristic*"); el riesgo de que el sujeto padezca enfermedad de Alzheimer aumenta cuando el producto es mayor que el umbral predeterminado. En una forma de realización preferida, el umbral predeterminado de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer se determina por un punto de datos de la mayor especificidad a la mayor sensibilidad en la curva ROC, en donde la curva ROC se traza según los productos calculados multiplicando las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer de sujetos tanto del grupo control sano como del grupo de pacientes de la enfermedad de Alzheimer.

En una forma de realización, la mayor sensibilidad varía de 0,7 a 1. En otra forma de realización, la mayor especificidad varía de 0,7 a 1.

En una forma de realización, el dispositivo informático y el dispositivo de identificación están integrados en un circuito integrado.

En otra forma de realización, la muestra biológica es una muestra de sangre. En una forma de realización preferida, la muestra de sangre es plasma.

La presente invención proporciona además un reactivo para detectar enfermedad de Alzheimer, que comprende una pluralidad de nanopartículas magnéticas dispersadas en solución, en donde la estructura de una nanopartícula magnética comprende (Fig. 2 (a)):

un núcleo magnético; y

un material soluble en agua que recubre el núcleo magnético; y

un anticuerpo, que se une al material soluble en agua fuera del núcleo magnético, que se usa para identificar biomarcadores en una muestra biológica.

En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de un anti-biomarcador de enfermedad de Alzheimer. En una forma de realización preferida, el anticuerpo del anti-biomarcador de la enfermedad de Alzheimer es un anticuerpo de anti-proteína tau o un anticuerpo de anti-proteína A β -42.

En una forma de realización, el material del núcleo magnético se selecciona del grupo que consiste en Fe₃O₄, Fe₂O₃, MnFe₂O₄, CoFe₂O₄, NiFe₂O₄. En una forma de realización preferida, el material del núcleo magnético es Fe₃O₄.

En otra forma de realización, el biomarcador en la muestra biológica es proteína tau o proteína A β -42 que es capaz de unirse con el anticuerpo conjugado con las nanopartículas magnéticas (Fig. 2 (b)).

La presente invención proporciona además un método para diagnosticar enfermedad de Alzheimer, que comprende: proporcionar el reactivo anterior para detectar la enfermedad de Alzheimer;

proporcionar una muestra biológica;

detectar señal de RIM de un biomarcador después de mezclar la muestra biológica con el reactivo; y

- 5 comparar la señal de RIM detectada en la muestra biológica con una curva estándar se señal de RIM del biomarcador.

En una forma de realización, la curva estándar de señal de RIM del biomarcador es una curva dependiente de la concentración de la proteína Aβ-42 o proteína tau, incluyendo un punto de datos de la señal de RIM pico. En una forma de realización preferida, la curva estándar de señal de RIM del biomarcador es una curva RIM (%) – Φ o una curva característica.

En otra forma de realización, los puntos de datos de las señales de RIM del biomarcador se ajustan usando una función logística (I):

$$RIM (\%) = \frac{A - B}{1 + \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right)^y} + B \quad (I)$$

en donde, A, B, Φ₀ y γ son parámetros de ajuste, A es un valor de fondo, B es un valor máximo, Φ₀ es la concentración del biomarcador cuando la señal de RIM equivale a ((A+B)/2), y γ es una pendiente de una curva donde Φ es el eje x y RIM (%) es el eje y, la curva de ajuste del biomarcador se traza según la función logística, y los datos se pueden analizar adicionalmente por la curva ROC.

La presente invención proporciona además un método para detectar el riesgo de enfermedad de Alzheimer, que comprende: (a) detectar señales de reducción inmunomagnética (RIM) *in vitro* de dos biomarcadores de enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica de un sujeto, en donde las señales de RIM se producen por la unión de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer con nanopartículas magnéticas que contienen un anticuerpo anti-biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, en donde los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer son proteína tau y proteína Aβ-42, respectivamente; (b) las señales de RIM de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer detectados en el paso (a) se ajustan a una función logística (I) para calcular la concentración de cada biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en la muestra biológica:

$$RIM (\%) = \frac{A - B}{1 + \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right)^y} + B \quad (I)$$

en donde RIM (%) es las señales de RIM de un biomarcador, Φ es la concentración del biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, el parámetro de ajuste A es un valor de fondo, B es un valor máximo, Φ₀ es la concentración del biomarcador cuando la señal de RIM equivale a ((A+B)/2), γ es una pendiente en el punto de datos Φ₀ de una curva donde Φ es el eje x y RIM (%) es el eje y; y (c) comparar un producto de la concentración de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer obtenidos en el paso (b) con un valor estándar calculado multiplicando las concentraciones de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, cuando el producto de la concentración de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer es mayor que el valor estándar eso es indicativo de riesgo creciente de enfermedad de Alzheimer del sujeto.

Como se usa en el presente documento, la función logística (I) mencionada en la presente invención se refiere a la fórmula usada para convertir señales de RIM a concentraciones y divulgada en el estado de la técnica (C. C. Yang et al., Effect of molecule-particle binding on the reduction in the mixed-frequency alternating current magnetic susceptibility of magnetic bio-reagents, Journal of Applied Physics, Volumen 112, Número 2, 2012). Cuando se usa la función logística (I), se traza un gráfico donde la concentración del biomarcador estándar es el eje x y la correspondiente señal de RIM es el eje y; el valor de fondo (A) se determina después detectando la señal de RIM de un reactivo libre de dicho biomarcador; el valor máximo (B) se determina detectando la señal de RIM del reactivo que está saturado con el dicho biomarcador; se dibuja una curva entre los puntos A y B en los gráficos, la concentración del biomarcador (Φ₀) es un punto en la curva donde la señal de RIM equivale a ((A+B)/2); calcular la pendiente γ a Φ₀; y la concentración del biomarcador que se va a detectar (Φ) se puede calcular.

Como se usa en el presente documento, el término “ROC” significa “características operativas del receptor” y se refiere a un método de análisis de la concentración. Un análisis ROC se usa para evaluar la eficacia diagnóstica de una prueba. Un gráfico ROC es un gráfico de sensibilidad (%) y especificidad (%) de una prueba a varios umbrales o valores de corte. Una curva ROC se puede usar para diferenciar entre dos grupos de muestras, tal como una muestra control o normal que tiene características especificadas, y una muestra de prueba o experimental. Habitualmente las distribuciones vistas en las dos muestras solapan, haciendo un ejercicio no trivial determinar si hay una diferencia real entre ellas. Si el umbral de discriminación o especificidad de un análisis ROC se ajusta alto,

entonces es menos probable que la prueba genere falsos positivos, es decir, menos probable identificar incorrectamente una diferencia entre dos muestras. Sin embargo, en estas circunstancias será más probable que la prueba falle casos donde hay una diferencia real entre las muestras y consecuentemente es más probable que algunos casos de enfermedad no se identifiquen. Si la sensibilidad de la prueba se aumenta, hay una caída correspondiente en la especificidad. Por tanto, si la prueba se hace más sensible entonces es más probable que la prueba identifique la mayoría o todos los sujetos con la enfermedad, pero también diagnosticará la enfermedad en más sujetos que no tienen la enfermedad.

Cada punto en una curva ROC representa la sensibilidad y su respectiva especificidad. Se puede seleccionar una concentración umbral basada en una curva ROC para identificar un punto donde tanto sensibilidad como especificidad tienen valores aceptables, y este punto se puede usar al aplicar la prueba para fines diagnósticos. Mientras que un usuario es capaz de modificar los parámetros en modos que entenderán fácilmente los expertos en la materia, para los ejemplos descritos en esta divulgación cada concentración umbral o de corte se elige para obtener tanto sensibilidad como especificidad razonables. En casos particulares, ambas se mantuvieron a aproximadamente del 60% al 95%, aunque son posibles valores menores y mayores.

Otra característica útil de la curva ROC es un valor de área bajo la curva (AUC), que cuantifica la capacidad global de la prueba para distinguir entre propiedades de diferentes muestras, en este caso para distinguir entre esos sujetos con enfermedad de Alzheimer y esos sin enfermedad de Alzheimer. Una prueba que no es mejor en identificar verdaderos positivos que la probabilidad aleatoria generará una curva ROC con un área de 0,5. Una prueba que tiene especificidad y sensibilidad perfectas, que no genera falsos positivos ni falsos negativos, tendrá un área de 1,00. En realidad, cualquier prueba tendrá un área en algún lugar entre estos dos valores.

En una forma de realización de la presente invención, se representa una curva ROC según los productos de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (proteína tau y proteína A β -42) detectados en muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Alzheimer e individuos sanos. Por tanto, se genera un gráfico, que se puede usar para determinar la sensibilidad (%) y especificidad (%) de los productos correspondientes de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer a varias concentraciones umbral o de corte. El uso de análisis ROC lo entienden fácilmente y lo pueden implementar fácilmente los expertos en la materia.

En otra forma de realización, la curva ROC se dibuja usando 1 – especificidad como el eje x y sensibilidad como el eje y.

Como se usa en el presente documento, el término “sensibilidad” se refiere al porcentaje de identificación correcta como sujetos que padecen enfermedad de Alzheimer usando los productos de concentración de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (proteína tau y proteína A β -42). En otras palabras, la sensibilidad es igual a (resultado de verdaderos positivos) / [(resultado de verdaderos positivos) + (resultado de falsos negativos)].

Como se usa en el presente documento, el término “especificidad” se refiere al porcentaje de identificación correcta como sujetos sanos de un grupo control. En otras palabras, la especificidad es igual a (resultado de verdaderos negativos) / [(resultado de verdaderos negativos) + (resultado de falsos positivos)].

En una forma de realización, el valor estándar calculado multiplicando la concentración de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer es un umbral o valor de corte determinado por la curva ROC. En una forma de realización preferida, el umbral se determina por un punto de la mayor especificidad al mayor punto de sensibilidad.

En una forma de realización, el intervalo de la mayor sensibilidad es desde 0,7 a 1. En otra forma de realización, el intervalo de mayor especificidad es desde 0,7 a 1.

En una forma de realización, el umbral se determina además por el área máxima bajo la curva ROC (AUC). En una forma de realización preferida, el área máxima varía de 0,7 a 1.

Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no están limitados a, seres humanos, primates, ganado, roedores y mascotas.

Como se usa en el presente documento, el término “paciente” se refiere a una persona que está bajo o en necesidad de cuidado o tratamiento médico. La persona puede estar esperando para el cuidado o tratamiento médico, puede estar bajo cuidado o tratamiento médico, o puede haber recibido el cuidado o tratamiento médico.

Como se usa en el presente documento, el término “grupo control sano”, “grupo normal” o una muestra de un individuo “sano” significa una persona que está diagnosticada por un médico como que no padece enfermedad de Alzheimer basado en resultados de pruebas cualitativas o cuantitativas. Un individuo “normal” habitualmente tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que se va a evaluar, incluyendo, pero no limitado a, individuos de la misma edad. El error de edad está en el intervalo de 5 a 10 años.

En una forma de realización, la curva ROC se representa según los productos de las concentraciones de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer de sujetos tanto de un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer como un grupo control sano.

5 En una forma de realización, la enfermedad de Alzheimer es demencia por enfermedad de Alzheimer. En una forma de realización preferida, la demencia por enfermedad de Alzheimer incluye deterioros cognitivos debido a la enfermedad de Alzheimer. En otra forma de realización preferida, el deterioro cognitivo debido a la enfermedad de Alzheimer es deterioro cognitivo leve debido a la enfermedad de Alzheimer.

10 En una forma de realización, el material de las nanopartículas magnéticas se selecciona de un grupo que consiste en Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , y NiFe_2O_4 . En una forma de realización preferida, el material de las nanopartículas magnéticas es Fe_3O_4 .

15 Como se usa en el presente documento, el término "muestra de sangre" se refiere a una muestra biológica derivada de sangre, preferiblemente sangre periférica (o circulante). La muestra de sangre puede ser sangre completa, plasma o suero. En otra forma de realización, la muestra biológica es una muestra de sangre. En una forma de realización preferida, la muestra de sangre es plasma.

20 Comparada con otras técnicas, el método para determinar el riesgo de enfermedad de Alzheimer proporcionado por la presente invención tiene las siguientes ventajas:

- (1) Los ensayos de RIM permiten al presente inventor usar una muestra de sangre como la muestra biológica, que es relativamente más fácil y seguro de recoger comparado con líquido cefalorraquídeo. Usando ensayos de RIM, las concentraciones de los biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, proteína tau y proteína $\text{A}\beta$ -42, se pueden detectar sensiblemente al nivel de pg/ml, un nivel que otras tecnologías de inmunoensayo no pueden proporcionar.
- (2) La sensibilidad y especificidad de la proteína $\text{A}\beta$ -42 es mala cuando se usa individualmente como un biomarcador para identificar la enfermedad de Alzheimer. La concentración de la proteína tau sube siempre que hay un daño cerebral, lo que hace la proteína tau un mal biomarcador para identificar la enfermedad de Alzheimer debido a su baja especificidad. La presente invención proporciona un nuevo parámetro identificador de la enfermedad de Alzheimer, el producto de las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, que es capaz de diferenciar deterioros cognitivos leves debido a la enfermedad de Alzheimer de demencia por enfermedad de Alzheimer con alta sensibilidad y especificidad. La presente invención puede diagnosticar deterioro cognitivo débil en el estadio preclínico de la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplos

La esencia de la presente invención es detectar el riesgo de enfermedad de Alzheimer usando el producto de las concentraciones de proteína tau y proteína $\text{A}\beta$ -42, que son dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (biomarcadores de EA). Los ejemplos posteriores son no limitantes y son solamente representativos de varios aspectos y características de la presente invención.

45 Según la escala de clasificación de demencia clínica (CDR), las muestras de plasma se recogieron de 66 individuos sanos y 61 pacientes que padecían demencia por EA de gravedad diferente, desde muy leve (CDR 0,5), leve (CDR 1) hasta grave (CDR 3), para ensayos de amiloides y proteína tau usando RIM con SQUID. Todos los pacientes que padecían demencia cumplían las directrices diagnósticas publicadas por los grupos de trabajo del US National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) en 2011. Los sujetos control se seleccionaron de un grupo de voluntarios sanos en un proyecto de cohorte de DCL.

50 En el estadio prodrómico de la EA, los pacientes habitualmente padecen deterioro cognitivo leve (DCL). El índice de conversión anual de DCL a EA es aproximadamente el 10% y en tres años aproximadamente del 30 al 50% de ellos contrae demencia. En un subgrupo de DCL positivo para amiloide cerebral, el índice de conversión acumulado de tres años puede subir hasta el 82%. Para implementar posible intervención preventiva para demencia por enfermedad de Alzheimer, el DCL debido a EA necesita ser diagnosticado por ensayos de biomarcadores tan pronto como sea posible. Por tanto, se analizaron muestras de plasma de 24 pacientes con DCL debido a EA para amiloides y proteína tau usando RMI con SQUID. El diagnóstico de DCL debido a EA también seguía las recomendaciones de la NIA-AA sobre las directrices diagnósticas. Para diagnosticar DCL debido a EA se usa la prueba cognitiva formal y se ajustó el umbral como el 4º percentil o por debajo (la desviación estándar es menor de 1,5) de una puntuación de escala derivada de sujetos de la misma edad y nivel de educación. Los experimentos de la presente invención se dirigían a explorar parámetros diagnósticos capaces de identificar sujetos de grupo de individuos sanos, DCL debido a EA o demencia por EA según los resultados de los ensayos de amiloide y proteína tau en plasma.

65 Todos los participantes o sus cuidadores primarios proporcionaron consentimiento anterior a participar en esta investigación.

Detalles experimentales

Se usaron tres tipos de reactivos (MF-AB0-0060, MF-AB2-0060, MF-TAU-0060, MagQu) para ensayar los biomarcadores A β -40, A β -42, y proteína tau, respectivamente. Cada tipo de reactivo consistía en nanopartículas dispersadas en una solución de tampón fosforilo (PBS) a pH 7,2. Estos reactivos se prepararon inmovilizando reactivos contra A β -40 (sc-53822, Santa Cruz Biotech), A β -42 (437900, Invitrogen), y proteína tau (Tau-441, Sigma) respectivamente en nanopartículas magnéticas. El diámetro medio de las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpo era 50-60 nm. La concentración magnética de cada tipo de reactivo era 12 mg de Fe/ml.

Los volúmenes de reactivos y muestras que se van a detectar usados para las medidas de señales de RIM se resumen en la tabla I. Cada mezcla se puso en un magnetosusceptómetro de corriente alterna (ca) basado en SQUID (XacPro-S, MagQu) para detectar la susceptibilidad magnética de ca dependiente del tiempo. Después de que las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpo se hubieran asociado con los biomarcadores diana, la susceptibilidad magnética de ca de la mezcla se redujo. La reducción en la susceptibilidad magnética se denominó la señal de RIM.

Tabla I. Volúmenes de reactivos y plasma usados para las detecciones de señales de RIM

Biomarcador	Volumen de reactivo	Volumen de plasma
A β -40	80 ml	40 ml
A β -42	60 ml	60 ml
Proteína tau	80 ml	40 ml

En este experimento se prepararon varias soluciones con varias concentraciones de A β -40/A β -42/proteína tau. Estas soluciones se usaron como muestras que se van a detectar para establecer las relaciones entre la señal de RIM y A β -40/A β -42/proteína tau. Estas relaciones se denominaron curvas características. A continuación, se detectaron las señales de RIM de plasma humano para A β -40, A β -42, y proteína tau y se convirtieron a las concentraciones de A β -40, A β -42, y proteína tau mediante las curvas características. Las características demográficas de los 66 individuos sanos (controles sanos), 24 pacientes con DCL debido a EA (deterioro cognitivo leve debido a enfermedad de Alzheimer, DCL), y 31 pacientes con demencia de EA muy leve y 30 pacientes con demencia por EA de leve a moderada (DEA) se enumeran en la tabla II.

Tabla II. Características demográficas de los sujetos.

Grupo	CS	DCL	DEA
Números	66	24	61
Mujer/hombre	32/34	12/12	28/33
Edad (años)	23-81	55-95	53-89

CS: controles sanos; DCL: deterioro cognitivo leve debido a la enfermedad de Alzheimer; DEA: demencia por enfermedad de Alzheimer incluyendo esos con demencia muy leve hasta grave (CDR = 0,5 a 3).

Resultados y discusión

Las señales de RIM dependientes de la concentración, es decir las curvas RMI (%) - Φ o curvas características, para A β -40, A β -42, y proteína tau añadidas en PBS se muestran con puntos de datos en la figura 3. Para un biomarcador determinado, los puntos de los datos se ajustaron bien con la función logística (I):

$$RIM (\%) = \frac{A - B}{1 + \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right)^y} + B \quad (I)$$

en donde, A, B, Φ_0 y y son parámetros de ajuste, el parámetro de ajuste A era el valor de fondo, B era el valor máximo, Φ_0 era la concentración del biomarcador cuando la señal de RIM equivale a $((A+B)/2)$, y y era la pendiente en el punto de datos Φ_0 de una curva donde Φ era el eje x y RIM (%) era el eje y de la curva. Los parámetros correspondientes para A β -40, A β -42, y proteína tau, enumerados en la tabla III, se calcularon ajustando los puntos de los datos a la función logística (I). Las curvas de ajuste en la figura 3 se representaron con líneas continuas. Los límites de detección inferiores para los ensayos de A β -40, A β -42, y proteína tau se bajaron a un nivel de pg/ml.

Tabla III. Parámetros de ajuste en la función logística (I) para A β -40, A β -42, y proteína

Biomarcador	Parámetros de ajuste			
	A	B	Φ_0	y
A β -40	1,89	7,39	567,3	0,65
A β -42	1,91	8,09	14157,7	0,49
Proteína tau	2,28	7,34	39,03	0,33

Se midieron las concentraciones de A β -40 $\Phi_{A\beta-40}$ de plasma humano usando RIM con SQUID. Los resultados se muestran en la figura 4. Se encontró que no había diferencia significativa en $\Phi_{A\beta-40}$ entre los grupos de controles sanos, DCL debido a EA, demencia por EA muy leve y demencia por EA de leve a grave. Este resultado implicaba que A β -40 en plasma no era un biomarcador útil para diagnosticar DCL o EA. Esto también era cierto para las

Respecto a A β -42, las concentraciones detectadas $\Phi_{A\beta-42}$ en plasma se mostraron en la figura 5 (a). Las concentraciones de A β -42 para los controles sanos eran relativamente bajas comparadas con las de pacientes con DCL debido a EA y grupos de demencia por EA. Esta observación era contraria a los resultados para la reducción en la concentración de A β -42 descrita en muestras de LCR habitualmente medida usando enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Las razones para el contraste podrían ser varias veces tal como cambios en la permeabilidad de barrera hematoencefálica a amiloides en pacientes con enfermedad de Alzheimer y fuentes extracerebrales de amiloides en plasma. Respecto a los diferentes resultados, las concentraciones de A β -42 en plasma disminuidas o sin cambios, descritas en algunos de los estudios previos, estaba causada probablemente por el efecto quelante del hierro de las nanopartículas de Fe₃O₄ magnéticas en el reactivo, que prevenía la oligomerización del péptido A β -42 en plasma. Comparadas con otros estudios, las concentraciones de A β -42 detectadas usando RIM en este experimento eran relativamente mayores en los grupos de DCL y EA.

Para caracterizar adicionalmente las propiedades diagnósticas, los grupos de DCL debido a EA, EA muy leve, y EA leve-grave se combinaron en un grupo, el grupo de pacientes. El análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) se mostró en la figura 5 (b), el umbral en términos de la concentración de A β -42 entre el grupo control sano y el grupo de pacientes era 16,33 pg/ml, que se presentó en línea discontinua en la figura 5 (a). Como se muestra en la figura 5 (b), cuando se usó la concentración de A β -42 en plasma para diferenciar los controles sanos de pacientes que padecen DCL y demencia debido a la EA, la sensibilidad y especificidad eran 0,91 y 0,88, respectivamente. La especificidad y sensibilidad para diferenciar DCL de demencia debido a EA en el grupo de pacientes se examinaron adicionalmente. La curva ROC mostrada en la figura 5 (c) reveló que la sensibilidad y especificidad eran 0,69 y 0,68, respectivamente, el umbral era 17,65 pg/ml, que se presentó como una línea de puntos en la figura 5 (a). Todos los resultados de umbral, sensibilidad y especificidad se enumeran en la tabla IV.

Tabla IV. Umbrales, sensibilidad y especificidad para diferenciar controles sanos, DCL debido a EA y demencia por EA de varios parámetros.

Parámetro	Grupos	Umbral	Sensibilidad	Especificidad
$\Phi_{A\beta-42}$	CS frente a pacientes	16,33 pg/ml	0,91	0,88
	DCL frente a DEA	17,65 pg/ml	0,69	0,68
Φ_{Tau}	CS frente a pacientes	23,89 pg/ml	0,97	0,91
	DCL frente a DEA	37,93 pg/ml	0,74	0,79
$\Phi_{A\beta-42} \times \Phi_{\text{Tau}}$	CS frente a pacientes	455,49 (pg/ml) ²	0,96	0,97
	DCL frente a DEA	642,58 (pg/ml) ²	0,77	0,83

CS: controles sanos; DCL: deterioro cognitivo leve debido a la enfermedad de Alzheimer; DEA: demencia por enfermedad de Alzheimer incluyendo esos con demencia muy leve hasta grave (CDR = 0,5 a 3); combinar DEA y DCL para formar pacientes.

La figura 6 (a) muestra las concentraciones de tau Φ_{Tau} de proteína tau de plasma de diferentes grupos clínicos. Se observó un umbral de corte claro de 23,89 pg/ml entre los controles sanos y el grupo de pacientes. La especificidad y sensibilidad fueron 0,97 y 0,91, respectivamente como se muestra en la figura 6 (b). El umbral de 23,89 pg/ml para la concentración de proteína tau se mostró como línea discontinua en la figura 6 (a). El aumento en las concentraciones de proteína tau en plasma de los grupos DCL y EA era consistente con el aumento en la concentración de proteína tau en LCR descrito en muchos de los artículos previos. En el grupo de pacientes, las curvas ROC del grupo de DCL debido a EA y el grupo de demencia por EA se analizaron adicionalmente. La curva ROC se mostró en la figura 6 (c), la sensibilidad era 0,74, la especificidad era 0,79 y el umbral era 37,93 pg/ml. El umbral de 37,93 pg/ml para la concentración de proteína tau entre el grupo de DCL y el grupo de EA se mostró como la línea de puntos en la figura 6 (a).

Los resultados mostrados en las figuras 5 (a) y 6 (a) sugería que A β -42 y proteína tau en plasma mostraban alta sensibilidad y especificidad para identificar pacientes con DCL o EA. Estudios e investigaciones recientes describieron que la proteína A β -42 era en efecto un biomarcador de la enfermedad de Alzheimer con alta especificidad. Sin embargo, la proteína tau era un marcador con baja especificidad porque su concentración aumentaba siempre que había daño cerebral. Por tanto, la concentración de la proteína tau no era adecuada para determinar la gravedad de la enfermedad de Alzheimer.

Para diferenciar DCL debido a EA de demencia por EA se debe buscar un parámetro mejor. Puesto que las concentraciones tanto de A β -42 como proteína tau eran mayores en el grupo de pacientes comparadas con las de los controles sanos, era razonable proponer el producto de las concentraciones de A β -42 y proteína tau como un potencial parámetro diagnóstico para diferenciar demencia por EA de DCL debido a EA. El producto de las concentraciones de A β -42 y proteína tau para el grupo de DCL debido a EA, el grupo de demencia por EA

(incluyendo EA muy leve y EA de leve a grave), y los controles sanos se mostraron en la figura 7 (a). El análisis ROC identificó un umbral de $642,58 \text{ (pg/ml)}^2$ que se podría usar para diferenciar DCL debido a EA de demencia por EA, la sensibilidad era 0,77, la especificidad era 0,83. El producto de la concentración de A β -42 y la concentración de la proteína tau se comportó mejor en diferenciar DCL debido a EA de demencia por EA que usar la concentración de A β -42 o la concentración de la proteína tau solas. El producto de las concentraciones dio una precisión y se podría aplicar para mejorar el diagnóstico del grupo de pacientes. Como se muestra en la figura 7 (c), basado en el análisis de curvas ROC la sensibilidad era 0,96, la especificidad era 0,9 y el umbral era $455,49 \text{ (pg/ml)}^2$. Los resultados mostrados en las figuras 7 (a)-(c) revelaron que el producto de las concentraciones de A β -42 y proteína tau en plasma era un parámetro diagnóstico mejor comparado con el biomarcador individual de o bien A β -42 o proteína tau.

En lugar de biomarcadores individuales tales como A β -42 o proteína tau, el producto de las concentraciones de A β -42 en plasma y proteína tau en plasma mejoró la sensibilidad y especificidad de diagnóstico de EA y era capaz de diferenciar DCL debido a EA de demencia por EA con sensibilidad de 0,77 y especificidad de 0,83. Además de su precisión, otra ventaja del método diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer divulgado por la presente invención era que usaba muestras de plasma más que muestras de LCR. La seguridad y accesibilidad del ensayo estaba significativamente aumentada utilizando RIM por SQUID. Por tanto, el experimento demostró que el ensayo de RIM por SQUID en biomarcadores de plasma era una ayuda diagnóstica prometedora no solo para detectar demencia por EA sino también para identificar DCL en el estadio preclínico de la EA.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar el riesgo de enfermedad de Alzheimer, que comprende:

- (a) detectar señales de reducción inmunomagnética (RIM) *in vitro* de dos biomarcadores de enfermedad de Alzheimer en una muestra biológica de un sujeto, en donde las señales de RIM se producen por la unión de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer con nanopartículas magnéticas que contienen un anticuerpo anti-biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, en donde los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer son proteína tau y proteína Aβ-42, respectivamente;
- (b) las señales de RIM de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer detectados en el paso (a) se ajustan a una función logística (I) para calcular la concentración de cada biomarcador de la enfermedad de Alzheimer en la muestra biológica:

$$RIM (\%) = \frac{A - B}{1 + \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right)^y} + B \quad (I)$$

en donde RIM (%) es las señales de RIM del biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, Φ es la concentración del biomarcador de la enfermedad de Alzheimer, el parámetro de ajuste A es un valor de fondo, B es un valor máximo, Φ_0 es la concentración del biomarcador cuando la señal de RIM equivale a $((A+B)/2)$, y es una pendiente en el punto de datos Φ_0 de una curva donde Φ es el eje x y RIM (%) es el eje y; y

- (c) comparar un producto de la concentración de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer obtenidos en el paso (b) con un valor estándar calculado multiplicando las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, cuando el producto de la concentración de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer es mayor que el valor estándar eso es indicativo de riesgo creciente de enfermedad de Alzheimer del sujeto.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el valor estándar calculado multiplicando las concentraciones de dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer es un umbral determinado por una curva característica operativa del receptor (ROC).
3. El método de la reivindicación 2, en donde el umbral se determina por un punto de los datos de la mayor especificidad a la mayor sensibilidad en la curva ROC.
4. El método de la reivindicación 2, en donde el umbral se determina por el área máxima debajo de la curva ROC.
5. El método de la reivindicación 2, en donde la curva ROC se representa según los productos de las concentraciones de los dos biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer de sujetos tanto de un grupo de pacientes de enfermedad de Alzheimer como un grupo control sano.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la enfermedad de Alzheimer es demencia por enfermedad de Alzheimer.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la demencia por enfermedad de Alzheimer incluye deterioros cognitivos debidos a enfermedad de Alzheimer.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el material de las nanopartículas magnéticas se selecciona de un grupo que consiste en Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , $MnFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$ y $NiFe_2O_4$.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el material de las nanopartículas magnéticas es Fe_3O_4 .
10. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es una muestra de sangre.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la muestra de sangre es plasma.

Figura 1

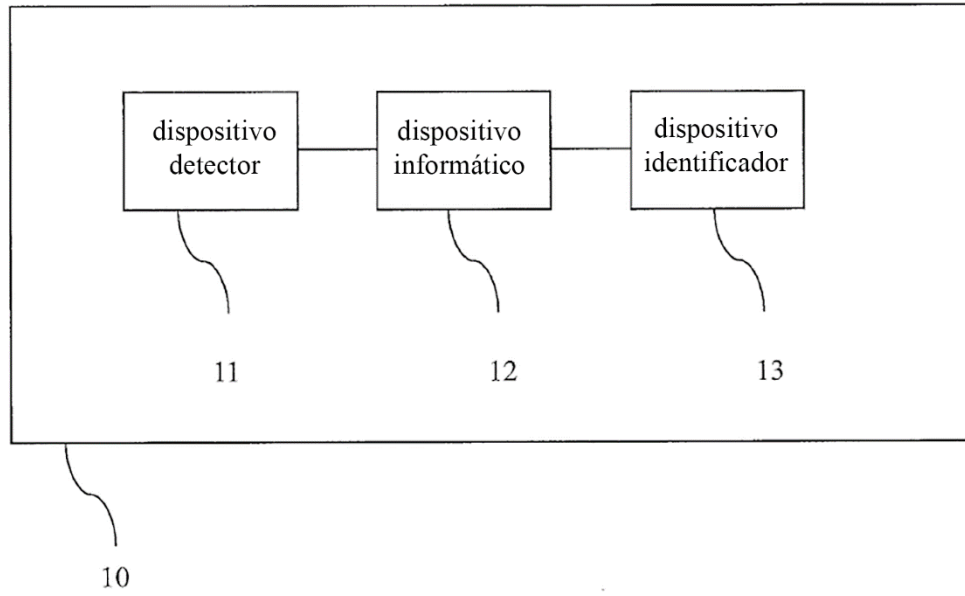
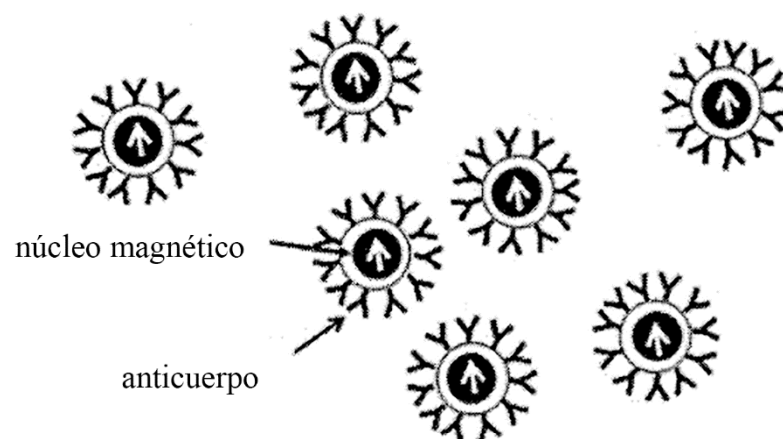


Figura 2

(a)



(b)

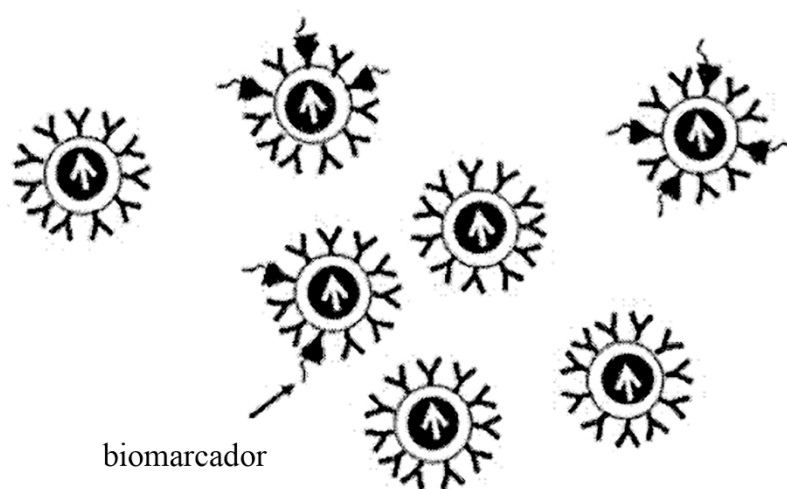


Figura 3

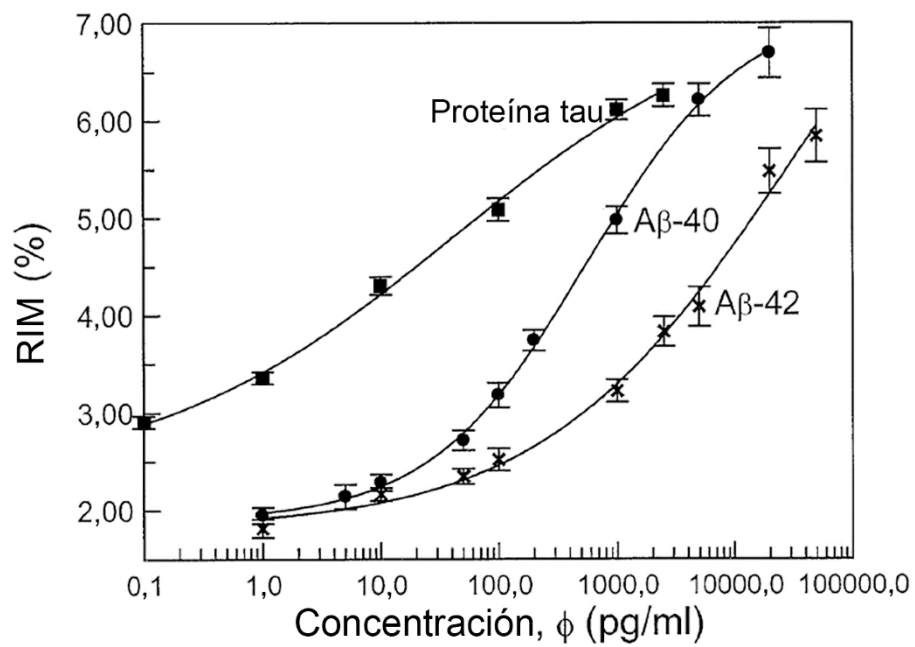


Figura 4

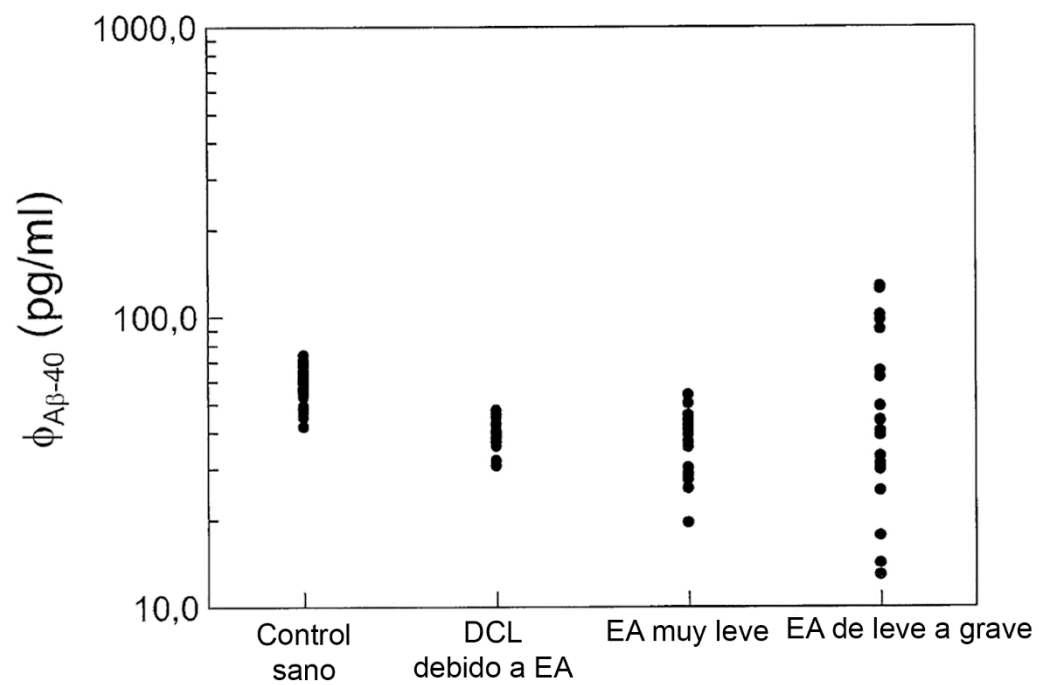


Figura 5

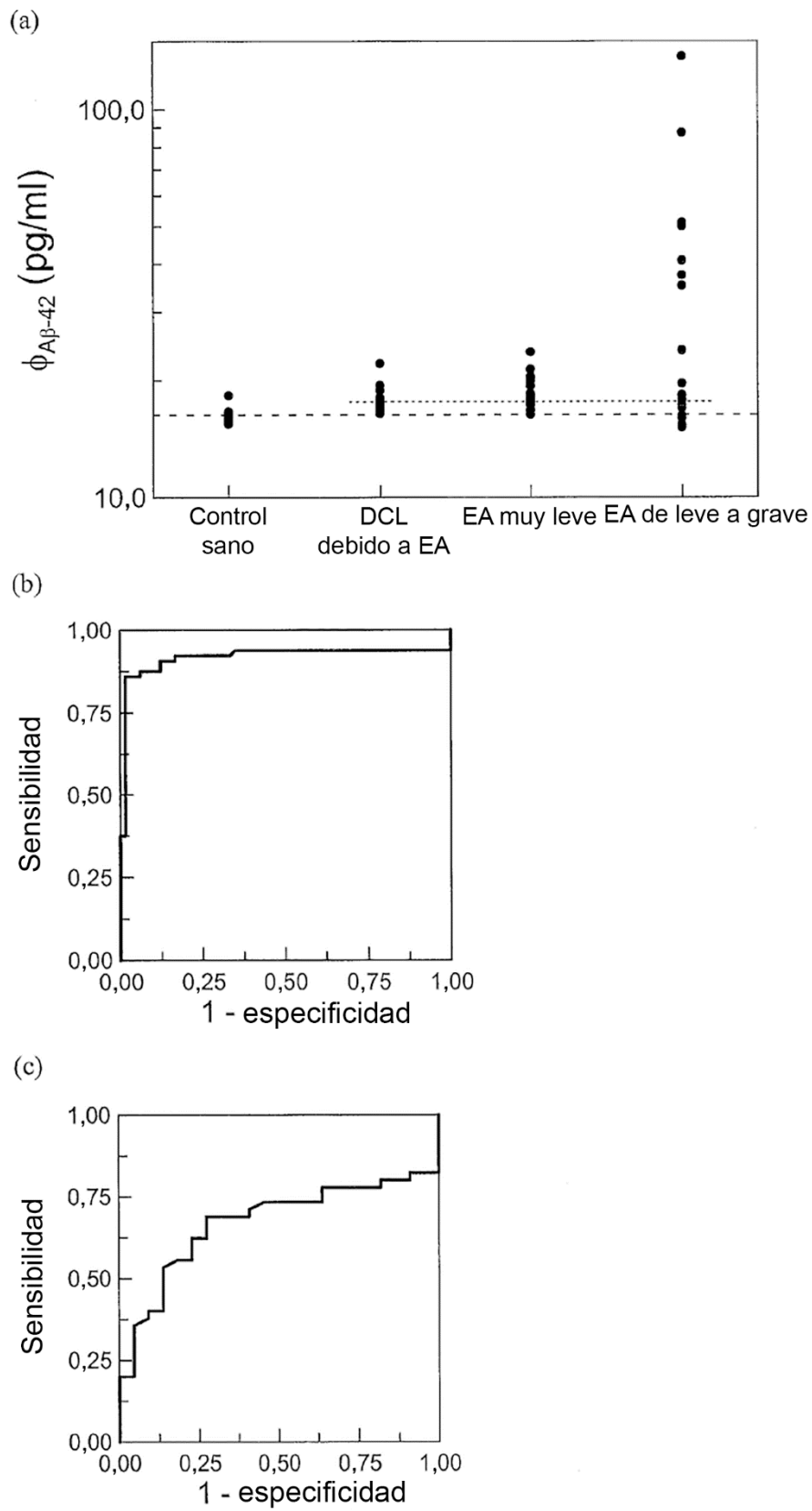
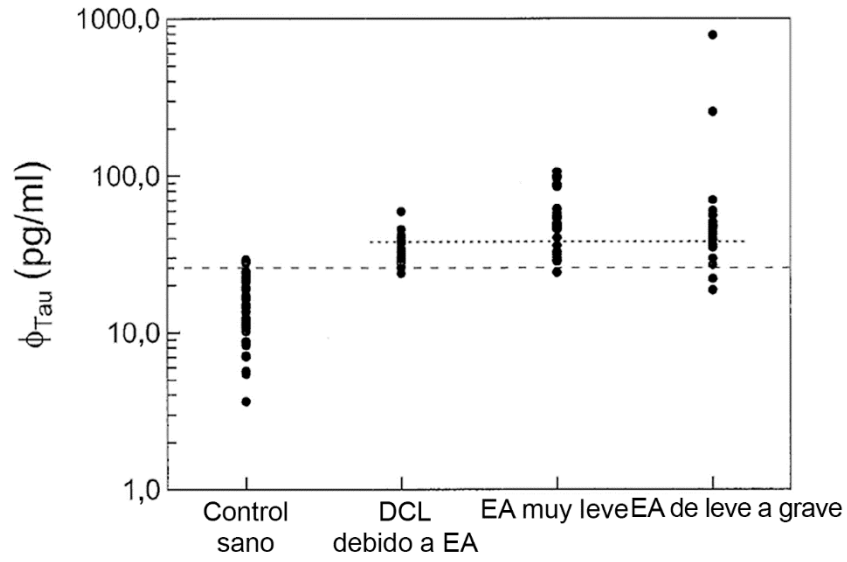
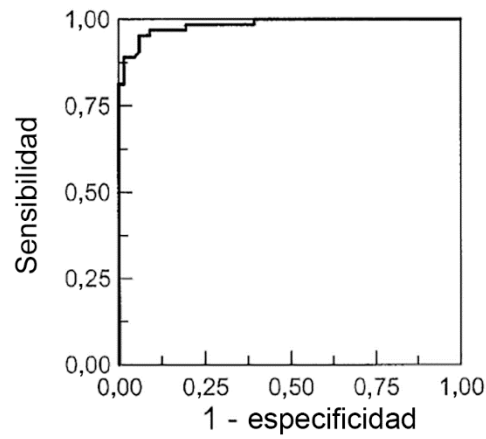


Figura 6

(a)



(b)



(c)

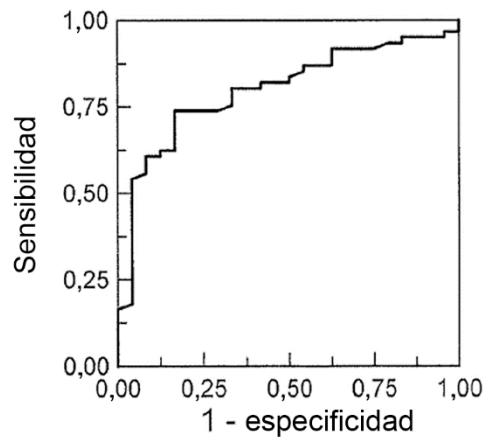


Figura 7

