

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 025**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2010 E 10714063 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2419738**

54 Título: **Enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

15.04.2009 GB 0906458

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

20.07.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CORSI, MASSIMILIANO;
FITZGERALD, STEPHEN P.;
LAMONT, JOHN V. y
INNOCENZI, PAUL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 578 025 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

Enfermedad de Alzheimer.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un biomarcador para la enfermedad de Alzheimer y, en particular, a los métodos de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante el uso de tal biomarcador y el uso de un kit para tal diagnóstico.

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica caracterizada por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas y la pérdida de memoria. Los ovillos neurofibrilares, las placas β -amiloides, la pérdida de sinapsis y la pérdida de neuronas son los principales distintivos patológicos del cerebro en los individuos con EA. Se ha sugerido que la inflamación crónica es importante para la degeneración del cerebro de los pacientes con EA, ya que los procesos neurodegenerativos están acompañados de astrogliosis reactiva y activación de los microglíocitos (Dickson et al.; Rogers et al.). Los estudios inmunopatológicos han demostrado que las placas amiloides están relacionadas con agrupamientos de microglíocitos activados que expresan citocinas proinflamatorias, tales como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y otras moléculas reguladoras relacionadas con la inflamación. El sistema inmunitario y el sistema nervioso central (SNC) son tejidos complejos, y se han dedicado pocos estudios a conocer su interacción. El SNC se ha etiquetado como un sitio inmunológicamente privilegiado y la presencia de la barrera hematoencefálica reforzó el punto de vista de que no hay inmunovigilancia dentro del SNC. Sin embargo, investigaciones recientes del SNC apuntan a la producción localizada de moléculas con una función inmunitaria y su accesibilidad a un número pequeño de linfocitos y monocitos (Akiyama et al.; Rebenko-Moll et al.). No se han establecido los mecanismos que atraen los microglíocitos al cerebro normal en las condiciones fisiológicas. En los modelos animales, solo un pequeño número de fagocitos mononucleares se ven atraídos continuamente hacia el cerebro sano, donde se diferencian en microglíocitos o bien permanecen como una población diferente; los estudios del cerebro enfermo sugieren un mecanismo parecido, pero el proceso está acelerado. En un modelo de ratón con EA, un receptor específico de quimiocinas facilitaba la atracción de los microglíocitos desde dentro del cerebro y los monocitos desde la sangre que rodean los depósitos β -amiloides. La alteración de este proceso aceleró la enfermedad y los ratones murieron rápidamente. Estos resultados sugieren que la acumulación de microglíocitos da lugar a un incremento de los depósitos β -amiloides, en particular en los vasos sanguíneos y alrededor de ellos. Los estudios anteriores sobre la asociación de polimorfismos génicos con la EA reforzaron el punto de vista de que la alteración de las respuestas inmunitarias podía desempeñar una función importante en la patogenia de la EA (Chiapelli et al.). Además, varias citocinas, tales como la IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-8, interferón- γ (INF- γ) y el factor de la necrosis tumoral α (TNF- α) se ha encontrado que están relacionadas con las placas seniles, que se secretan desde los microglíocitos activados, y que están implicadas en el desarrollo de las placas neuríticas. Otras moléculas, tales como la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor del crecimiento epidérmico (EGF), la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), la selectina E, la selectina P y la selectina L, están implicadas en el tránsito de moléculas a través de la barrera hematoencefálica.

El diagnóstico clínico de la EA se produce a menudo mucho después de que comience la enfermedad. Lo normal es que la noten primero los miembros más cercanos de la familia, que detectan problemas con la memoria a corto plazo y un comportamiento inusual. La confirmación se obtiene después de la autopsia, al detectar la presencia de los distintivos patológicos de la enfermedad, como son las placas β -amiloides y los ovillos neurofibrilares.

La metodología actual para diagnosticar la EA utiliza el diagnóstico diferencial que puede implicar la anamnesis y la exploración del paciente, detalles de los antecedentes familiares y sociales del paciente, análisis de sangre para descartar otras formas de demencia, test psicológicos y neuroimágenes. Además, se ha demostrado en muchos estudios que la presencia de una gran cantidad de β -amiloides y proteínas τ es indicativa de EA, pero a pesar de que en el mercado ya existen pruebas comerciales para estas proteínas, no han recibido el reconocimiento clínico para ser usadas en el diagnóstico del alzhéimer. Las pruebas neuropsicológicas principales incorporan una test de memoria para diagnosticar la EA, p. ej., el Miniexamen Cognoscitivo (MEC). Por desgracia, el deterioro leve de la memoria está asociado de forma habitual al envejecimiento (así como el estrés y la depresión), y a menudo no implica necesariamente una EA (Small et al.). Así pues, hay un gran interés por biomarcadores tanto clínicos como preclínicos.

Los biomarcadores proteicos de diagnóstico son una ayuda para el diagnóstico de las enfermedades. Los marcadores proteicos de diagnóstico de alta especificidad para la EA proporcionarían una medida objetiva de la progresión de la enfermedad y reduciría los costes. Tales biomarcadores son especialmente importantes para detección precoz de la enfermedad (y distinguir la EA del deterioro leve de la memoria relacionado con la edad), que es cuando los compuestos terapéuticos tienen más capacidad de producir beneficios, pero, lo más importante, para que el paciente y la familia puedan planear la gestión de la enfermedad. Adicionalmente, la identificación de los biomarcadores de la EA puede proporcionar otros importantes conocimientos sobre la patogenia de la EA. Con este fin, hay varios informes y solicitudes de patente que describen los biomarcadores de la EA (p. ej., las solicitudes de

patente internacional WO 2005/052592, WO 2007/136614). Sin embargo, la mayoría de estos biomarcadores todavía se tienen que someter a la validación completa o no han sido aceptados/captados por la comunidad clínica. Incluso aunque se validaran estos biomarcadores y se utilizaran en la práctica clínica, siempre existe la necesidad de más biomarcadores de la EA con mayor capacidad de diagnóstico y de pronóstico.

- 5 Es clínicamente deseable una prueba pronóstica para calibrar la velocidad de avance de la EA en los pacientes con la enfermedad.

Una vez que se diagnostica la EA, la esperanza de vida media es de 8 a 12 años, aunque puede oscilar de 3 a 20 años. La probable velocidad de progresión de la EA es muchísimo más un factor de interés para el paciente y la familia del paciente, y facilita una serie de decisiones, tales como la provisión de la asistencia a corto y largo plazo, y la participación en los ensayos clínicos de fármacos. La pérdida cognitiva progresiva que experimentan las personas con EA a menudo se documenta con el MEC. Esta medición proporciona información sobre la velocidad de cambio con el tiempo y ayuda a calibrar la eficacia de las intervenciones terapéuticas, la medición del deterioro cognitivo y la planificación de la asistencia sanitaria. Sin embargo, el método tiene sus inconvenientes: requiere que se realicen varias mediciones con el tiempo, y el procedimiento se vuelve más difícil de aplicar a medida que empeora el estado del paciente.

Doody et al. (2001) describieron un método para estimar la velocidad de progresión en la EA mediante el MEC. El método requiere tres conjuntos de datos: el valor esperado del MEC para un paciente, el valor inicial del MEC del paciente, y una estimación del médico sobre la duración de la EA en el paciente. El problema de tal método reside en que consume muchos recursos al requerir la realización de una prueba de MEC e información en profundidad para valorar la duración de la EA antes de que el paciente se presente en la consulta. Otros métodos utilizados para predecir la velocidad de declive de los pacientes con EA hacen uso de un equipamiento especialista caro, tal como imágenes por resonancia magnética y morfometría basada en vóxeles. Así pues, también se necesita con urgencia un método rápido de confirmación que prediga si los pacientes con EA padecen DCA o DCL.

Se ha investigado mucho durante última década para detectar biomarcadores proteicos de la EA, principalmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR). La proteína β -amiloide y la proteína τ han sido objeto de mucha investigación, y una elevada concentración de estas proteínas en el LCR representan los biomarcadores proteicos más prometedores de la EA. No obstante, estos biomarcadores todavía no han recibido una aceptación clínica total y el método tiene la desventaja añadida de que cualquier muestra de LCR para este análisis necesita que el procedimiento de punción lumbar doloroso sea ejecutado por un médico con experiencia. Más recientemente, se ha prestado mucha atención al descubrimiento de biomarcadores proteicos de la EA procedentes de la sangre (p. ej., Hye et al., Zhang et al., solicitud de patente internacional WO 2005/052592).

El biomarcador ideal sería cualquiera que sea muy específico de un estado patológico. La complejidad del cuerpo humano y sus vías bioquímicas, en las que muchas proteínas son multifuncionales e interdependientes, sugiere que tales biomarcadores, si existen, probablemente son raros. Además, se estima que el proteoma humano está formado por un millón de proteínas, por lo que sería difícil aislar e identificar tales proteínas raras, por lo que para la identificación de la enfermedad son más probables las combinaciones de varios biomarcadores. Sin embargo, se prefieren los biomarcadores con una mayor especificidad de enfermedad, tanto si se utilizan solos como en combinación con otros biomarcadores. Independientemente de la especificidad aparente de una proteína individual para un estado patológico específico, en la práctica su uso diagnóstico o pronóstico es probablemente complementario, es decir, como un soporte o ayuda para otras proteínas y métodos para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad.

Compendio de la invención

Los inventores de la presente invención han encontrado un nuevo biomarcador inventivo para ser usado en el diagnóstico y en el pronóstico de la EA. Específicamente, la presente invención se basa en el hallazgo de que una determinada proteína, que no se ha descrito antes como biomarcador de la EA, se expresa diferencialmente en los líquidos biológicos periféricos de los pacientes que padecen la EA y de los pacientes sin la enfermedad. La proteína es la selectina L. La comparación y el análisis de la concentración de esta proteína en una muestra tomada de un paciente para un control proporciona un método que ayuda al diagnóstico de la EA.

En un primer aspecto, la presente invención da a conocer un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) que comprende:

medir la concentración de la selectina L en una muestra *in vitro* de un líquido biológico periférico de una persona que se sospecha que tiene EA, y

comparar la concentración de la selectina L en la muestra *in vitro* con la muestra control, en donde una disminución en la concentración de la selectina L en comparación con el control es indicativa de EA.

En un segundo aspecto, la presente invención da a conocer el uso de la selectina L como biomarcador para el diagnóstico de la EA.

En un tercer aspecto, la presente invención da a conocer el uso de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, en donde el kit comprende al menos una sonda específica de analito para la selectina L junto con al menos una sonda para uno o varios biomarcadores conocidos de la EA, en donde los marcadores conocidos son MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ y VEGF.

5 Definiciones

Biomarcador

Una característica del cuerpo humano, que en el caso de la invención actual es un compuesto bioquímico, cuya medición y evaluación objetivas sirve de indicador de los procesos normales y patológicos, o de respuestas farmacológicas para la intervención terapéutica.

10 Biomarcador complementario

Un biomarcador que se utiliza junto a otro biomarcador, otros biomarcadores, u otros métodos, para incrementar la sensibilidad y/o especificidad de una prueba utilizada, por ejemplo, para el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad y para el análisis de la eficacia del fármaco.

Biomarcadores conocidos o propuestos de la EA

- 15 Tal y como se proponen los estudios descritos dentro del apartado de métodos, IFN- γ , IL-8, MCP-1 y VEGF se han descrito como posibles biomarcadores en la técnica anterior. Otros biomarcadores conocidos son la proteína τ y las proteínas β -amiloides. Los biomarcadores conocidos y propuestos que se describen en la presente memoria no son una lista exhaustiva.

Control

- 20 Los controles a utilizar para valorar si se ha producido un cambio en la cantidad del biomarcador diagnóstico o pronóstico puede ser la cantidad del biomarcador diagnóstico o pronóstico:
- en el paciente antes del comienzo de la EA,
 - en los pacientes sanos idóneos,
 - de un conjunto idóneo de datos procedentes de valores de la bibliografía.

25 Deterioro cognitivo acelerado (DCA)

Para el propósito de la invención que se describe, el DCA en la EA se define por un paciente con EA cuya puntuación en el MEC disminuye del orden de cinco o más puntos al año.

Deterioro cognitivo lento (DCL)

- 30 Para el propósito de la invención que se describe, el DCL en la EA se define por un paciente con EA cuya puntuación en el MEC disminuye del orden de menos de 5 puntos al año.

Líquidos biológicos periféricos

Se trata de los líquidos de mamífero que son relativamente fáciles de conseguir en comparación con el líquido cefalorraquídeo. Los ejemplos son la saliva, las lágrimas, el sudor, la orina, el plasma y el suero.

Sonda

- 35 Cualquier molécula capaz de fijarse a otra molécula (la molécula diana) durante un intervalo de tiempo suficiente para permitir la detección de la molécula fijada. Muchas sondas juntas permiten la cuantificación de la molécula diana. En la invención actual, la sonda es preferiblemente un anticuerpo monoclonal o policlonal, y las sondas «individuales» implican sondas que son específicas de un analito determinado.

La invención se describirá ahora por medio de ejemplos con referencia a las figuras y tablas siguientes, en donde:

- 40 La figura 1 y la tabla 1 muestran la concentración media de la selectina P y de la selectina L, y de otras moléculas de adhesión y diferentes citocinas en el plasma de los pacientes con EA en comparación con los controles emparejados por edades;

- 45 La figura 2 y la tabla 2 muestran la mediana de la concentración (margen entre paréntesis) de la selectina P, de la selectina L y de otras moléculas de adhesión y diferentes citocinas en el plasma de los pacientes con EA con un deterioro cognitivo acelerado (DCA) o un deterioro cognitivo lento (DCL) en comparación con los controles emparejados por edades. La concentración de los analitos es en pg/ml, excepto para las selectinas, ICAM-1 y VCAM-1, que son en ng/ml. Para un analito específico, los valores con diferentes letras son significativamente

diferentes en el nivel del 5%; y

La figura 3 muestra la mediana de la concentración de la selectina P en el plasma de los pacientes con EA en comparación con los controles emparejados por edades.

Descripción detallada de la invención

- 5 Se puede detectar o cuantificar únicamente el biomarcador útil en la presente invención. La selectina L se puede detectar o cuantificar junto con otros biomarcadores de la EA, tales como (pero sin limitarse a ellos) MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ , MCP-1 y VEGF. Otros biomarcadores de la EA con los cuales el biomarcador de la presente invención se puede combinar para ayudar al diagnóstico de la EA incluyen la proteína β -amiloide y la proteína τ . El líquido biológico periférico es preferiblemente plasma o suero. Los controles idóneos son, por ejemplo, la
- 10 concentración de los biomarcadores medida en el paciente antes del comienzo de la EA, un grupo de pacientes sin enfermedad de un perfil parecido, o un conjunto idóneo de datos procedente de los valores de la bibliografía. Las diferencias significativas de la cantidad relativa de una o varias de las proteínas antes mencionadas entre el paciente con EA y el control ayudan al pronóstico del DCA o del DCL. Los biomarcadores pronósticos reconocidos para la EA se pueden utilizar además de las proteínas de la invención antes mencionadas.
- 15 Un aspecto más de la invención es el uso de un kit para cuantificar la cantidad de la selectina L sola o en combinación con otros biomarcadores de la EA, tales como (pero sin limitarse a ellos) MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ , MCP-1 y VEGF presentes en una muestra de líquido biológico periférico tomada de una persona que se sospecha que tiene la EA. Preferiblemente, el kit comprende dos conjuntos de moléculas de sonda para cada analito diana. El primer conjunto de moléculas de sonda se inmoviliza preferiblemente en una superficie de soporte, mientras que el
- 20 segundo conjunto de moléculas de sonda son móviles en la muestra del paciente. Preferiblemente, las moléculas de sonda son anticuerpos. El kit se basa preferiblemente en el formato de ELISA de tipo sándwich, que comprende anticuerpos de captura y anticuerpos detectores para cada una de las proteínas. El líquido biológico periférico es preferiblemente plasma o suero. El kit puede incorporar estándares y controles. Uno o más biomarcadores de diagnóstico reconocidos de la EA se pueden utilizar junto con las proteínas de la invención antes mencionadas.
- 25 La invención se basa en el hallazgo de que la molécula de adhesión selectina L se expresa en menor cantidad en los pacientes diagnosticados con EA que en los controles. Este hecho permite utilizar la selectina L como una ayuda para el diagnóstico de la EA. El control podría ser una muestra biológica tomada de: un paciente sano, el paciente con Alzheimer antes del comienzo de la EA, un conjunto adecuado de datos procedente de los valores de la bibliografía, o un paciente que padece una enfermedad diferente a la EA para el cual el uno o varios biomarcadores
- 30 que se utilizan para diagnosticar la EA son específicos de la EA. El nivel de expresión de las proteínas se determina fuera del cuerpo de la persona que se sospecha que tiene la enfermedad, mediante un ensayo *in vitro*. La proteína de la invención se puede medir con la plataforma inmunodiagnóstica detectora de varios analitos a la vez, Evidence Investigator, pero se puede utilizar cualquier otra plataforma analítica adecuada, p. ej., inmunotransferencia Western, ELISA, citometría de flujo, electroforesis en gel 2D con espectrometría de masas (2DGE-MS o 2DGE-MS/MS).
- 35 Un aspecto único de la invención es el descubrimiento de que la selectina L se expresa diferencialmente en los pacientes diagnosticados con EA en comparación con los pacientes sin EA. A pesar de la intensidad con la que se está investigando en la detección de biomarcadores para la EA, ningún estudio ha descrito anteriormente la selectina L, p. ej., Abdi et al. (2006) identificaron más de 1500 proteínas en el LCR de los pacientes con Alzheimer y los pacientes sin la enfermedad; Hye et al. (2006) identificaron 211 proteínas del plasma de los pacientes con
- 40 Alzheimer; la solicitud de patente internacional WO 2005/052592 recoge 250 proteínas halladas en el plasma o en la orina; la solicitud de patente internacional WO 2007/1366614 describe 90 analitos en las muestras de pacientes con Alzheimer.

Las realizaciones preferidas de la invención utilizan la selectina L como una ayuda para el diagnóstico *in vitro* de la EA en un paciente y, como un biomarcador complementario, para ayudar al diagnóstico *in vitro* de la EA en un

45 paciente.

Un aspecto más de la invención es el uso de la selectina L y uno o más de IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ , MCP-1 y VEGF como ayuda para el diagnóstico *in vitro* de la EA en un paciente.

El líquido biológico periférico, tomado de un mamífero, puede ser saliva, sudor, orina, suero o plasma. El líquido biológico periférico preferido es suero o plasma.

50 Otro aspecto de la invención es el uso de un kit para ayudar al diagnóstico de la EA, que comprende una sonda para la selectina L. El kit incorpora adicionalmente uno o varios biomarcadores de diagnóstico conocidos para la EA, entre ellos MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , VEGF, IL-8 e IFN- γ . Las sondas son preferiblemente anticuerpos.

En un aspecto más de la invención, el kit comprende un dispositivo en estado sólido con las sondas pegadas a él. El dispositivo en estado sólido es preferiblemente un biochip.

55 El biomarcador de la invención puede igualmente utilizarse con otros biomarcadores conocidos de la EA, tales como la proteína τ o las proteínas β -amiloides, para detectar selectivamente la EA mediante la toma de líquidos corporales

de los pacientes sin diagnosticar o con un posible diagnóstico de EA, y la comparación de la concentración de los biomarcadores con un valor de control reconocido del biomarcador en, por ejemplo, un individuo sano. El valor de control puede ser una medida de la tendencia central, p. ej., la media o la mediana de una población de muestras descrita en un estudio de la bibliografía. Por ejemplo, Ponthieux et al. (2003) describen valores de referencia para la concentración de las moléculas de adhesión en el suero en los individuos sanos.

Resultará obvio para el experto en la técnica que el uso de la selectina L junto con uno o varios de MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ y VEGF y/o otros biomarcadores conocidos de la EA (p. ej., proteínas β -amiloides, proteína τ) en una prueba para la EA incrementaría el poder diagnóstico y pronóstico de la prueba mediante, por ejemplo, el incremento de su sensibilidad (porcentaje más elevado de positivos verdaderos, a saber, análisis positivo para los pacientes con EA) y/o especificidad (porcentaje alto de negativos verdaderos, a saber, análisis negativo para los pacientes sin EA). Es deseable conseguir la sensibilidad y especificidad deseadas con el mínimo número de biomarcadores.

Al identificar el biomarcador de la EA, resultará obvio para el experto en la técnica que al igual que se puede identificar la proteína completa, se puede identificar un fragmento (o varios fragmentos), siempre y cuando esto permita la identificación exacta de la proteína completa; por ejemplo, la digestión con proteasa de una proteína seguido de espectrometría de masas de un número pequeño de los péptidos resultantes se utiliza sistemáticamente para identificar una proteína. Este método se utiliza a menudo para identificar un punto de un gel de proteínas. Si la proteína es un oligómero, puede ser suficiente la identificación de una única cadena.

Sujetos

Los pacientes con un diagnóstico clínico de EA (28 varones y 44 mujeres; edad media de 75,6 \pm 7,2 años) y los sujetos de control (2 varones y 4 mujeres; edad media de 73,4 \pm 1,1 años) fueron captados por el Departamento de Neurociencias, Universidad de Castellanza, Milán.

El diagnóstico clínico de la probable EA se realizó de acuerdo con los procedimientos clínicos estándares y siguiendo los criterios establecidos por NINCDS/ADRDA (McKhann et al., 1984) y DSM-III-R (American Psychiatric Association, 1987). Brevemente, el diagnóstico de la probable EA se hizo mediante las evaluaciones independientes de dos médicos y tomografías computerizadas cerebrales. El comportamiento cognitivo se midió mediante el Miniexamen Cognoscitivo (MEC) y la escala de deterioro global (EDG). El comportamiento cognitivo longitudinal durante un seguimiento de dos años de pacientes con EA se valoró mediante las puntuaciones del Miniexamen Cognoscitivo (Doody et al., 2001). Los pacientes con EA se dividieron en dos grupos de acuerdo con las puntuaciones del MEC; los que tienen un deterioro cognitivo lento (EA que pierde <4,9 puntos/año) o los que tienen un deterioro cognitivo rápido (EA que pierde >5 puntos/año).

Los pacientes y los controles eran de raza blanca y se obtuvo un consentimiento informado de cada sujeto o paciente con EA. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica de la Fundación Don Gnocchi, Milán.

Medición de la concentración de los analitos en el plasma (estudio italiano)

Se utilizaron Evidence Investigator™ y Biochip Array Technology (Randox Laboratories, Crumlin, Irlanda del Norte, GB) para la detección simultánea de varios analitos de una muestra de plasma de un único paciente. Se utilizó el EDTA como anticoagulante para la recogida de sangre. La tecnología utiliza el Randox Biochip, un sustrato sólido de 9 mm² que soporta una matriz de regiones de prueba aisladas que contienen anticuerpos específicos del antígeno inmovilizados. Las matrices utilizadas fueron Cytokine Array I (analitos: EGF, IFN- γ , VEGF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TGF- α , IL-1 α , IL-1 β y MCP-1, número de catálogo EV3513) y Adhesion Molecules Array (analitos: selectina E, selectina L, selectina P, ICAM-1 y VCAM-1, número de catálogo EV3519). Después de la activación del anticuerpo con tampón de ensayo, se añadieron estándares y muestras, se incubaron a 37 °C durante 60 minutos, y luego se colocaron en un termoagitador a 370 rpm durante 60 minutos. Se añadieron los anticuerpos conjugados (HRP) y se incubaron en un termoagitador a 370 rpm durante 60 minutos. Las señales quimioluminiscentes formadas después de la adición de luminol (razón de 1:1 con el conjugado) se detectaron y midieron con la tecnología de toma de imágenes digitales y se compararon con las de una curva de calibración para calcular la concentración de los analitos en las muestras.

Medición de la concentración de los analitos en el plasma (estudio austriaco)

Un segundo estudio independiente, aprobado por el comité de ética local, se realizó en Austria con el biochip Adhesion Markers de Randox en el Evidence Investigator™. Se comparó la cantidad de proteínas de adhesión en el plasma de los pacientes con EA y en los controles sanos (los pacientes con EA se clasificaron inicialmente con el MEC y se verificó que tenían la EA con una autopsia; los pacientes sanos se clasificaron con el MEC). En este estudio no se aplicó una prueba para el DCA ni el DCL. Se halló que la cantidad de selectina P en los pacientes con EA se había reducido significativamente en comparación con los controles (prueba de *t* sin emparejar: *P* = 0,044, figura 3). La cantidad media de selectina P en los grupos de control y de EA fue de 81,9 ng/ml (N = 45; 12 varones, 33 mujeres; edad media de 79,30 años) y 94,9 ng/ml (N = 36; 8 varones, 28 mujeres; edad media de 81,30 años), respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos del estudio italiano, tanto sin transformar como transformados, no se distribuían con normalidad. Se utilizaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis (con la prueba de comparaciones emparejadas de Dunn) para las comparaciones de EA y control, y de DCA, DCL y control, respectivamente. Los datos del estudio austriaco se analizaron con una prueba de *t*. Se le supuso la significación estadística a un nivel de $P \leq 0,05$.

Resultados

La concentración plasmática de IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ , MCP-1 y VEGF eran significativamente mayores en los pacientes con EA con respecto a los controles (tabla 1). La concentración de las moléculas de adhesión selectina P y selectina L eran significativamente más bajas que en los controles. La concentración plasmática de varios analitos se halló que difería entre los pacientes con EA en DCL y los pacientes con EA en DCA (tabla 2). La concentración de las citocinas IL-1 α , IL-8, IFN- γ y MCP-1 era significativamente mayor en los pacientes con EA en DCL en comparación con los pacientes con EA en DCA o los controles. La concentración de la molécula de adhesión selectina L era significativamente más baja en los pacientes con EA en DCA en comparación con los pacientes con EA en DCL o los controles.

Bibliografía

1. Abdi et al (2006). J. AL Dis., 9: 293-348.
2. Akiyama et al. (2000). Neurobiol. Aging, 21: 382-421.
3. Chiapelli et al. (2006). Expert Rev. Neurother., 6: 1327-1336.
4. Dickson et al. (1988). Am. J. Pathol., 132: 86-101.
5. Doody R.S. et al. (2001). Arch. Neurol., 58: 449-454.
6. Hye et al. (2006). Brain, 129: 3042-3050.
7. Koutrobakis et al. (2004). Atherosclerosis, 176: 125-132.
8. Magro et al. (2004). 8. Dig. Dis. Sci., 49:1265-74.
9. Ponthieux et al. (2003). Clin. Chem., 49: 1544-1546.
10. Rebenko-Moll N.M. et al (2006). Curr. Opin. Immunol., 18: 683-689
11. Rogers et al. (1988). Neurobiol. Aging, 9: 939-349.
12. Small et al. (2000). Proc. Nat. Acad. Sci., 97(11): 6037-6042.
13. Zhang et al. (2004). Proteomics, 4: 244-256.

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende:
medir la concentración de la selectina L en una muestra *in vitro* de un líquido biológico periférico de una persona que se sospecha que tiene una EA, y
- 5 comparar la concentración de la selectina L en la muestra *in vitro* de una muestra de control, en donde una disminución en la concentración de la selectina L en comparación con el control es indicativa de la EA.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la determinación de la concentración de uno o varios biomarcadores conocidos de la EA en la muestra *in vitro*, en donde un incremento de la concentración de uno o varios biomarcadores conocidos en comparación con una muestra de control en
10 combinación con una disminución de la selectina L en comparación con una muestra de control es indicativa de la EA, en donde los biomarcadores conocidos de la EA son MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- γ y VEGF.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el líquido biológico periférico es suero o plasma.
4. Utilización de la selectina L como biomarcador para el diagnóstico de la EA.
- 15 5. Utilización de un kit para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, en donde el kit comprende al menos una sonda específica de analito para la selectina L junto con al menos una sonda para uno o más biomarcadores conocidos de la EA, en donde los marcadores conocidos son MCP-1, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IFN- α y VEGF.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde al menos una sonda específica de analito es un anticuerpo.

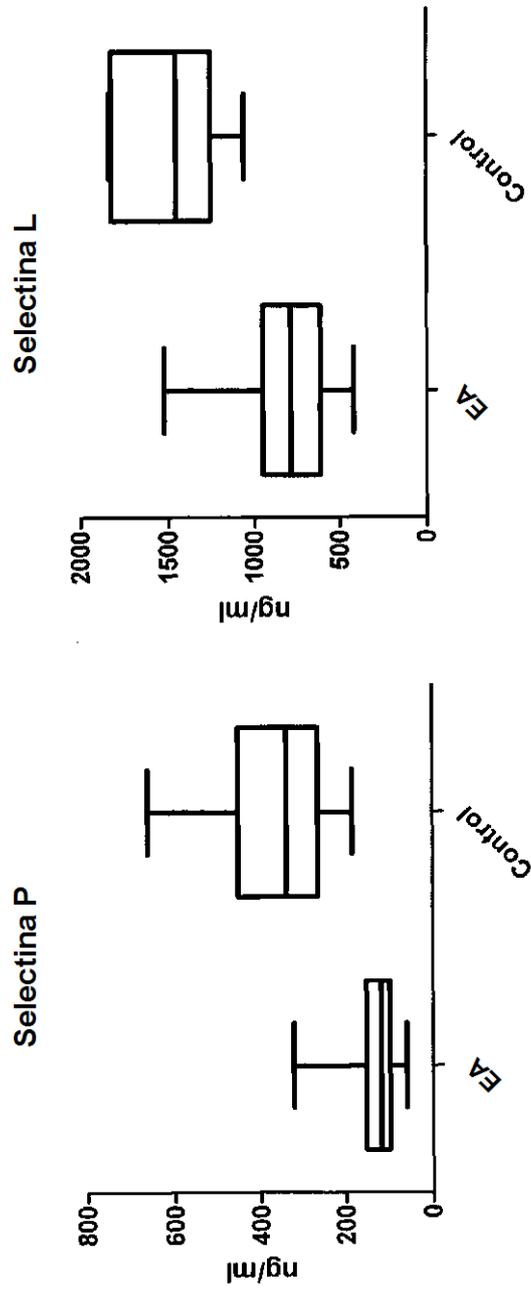


Figura 1

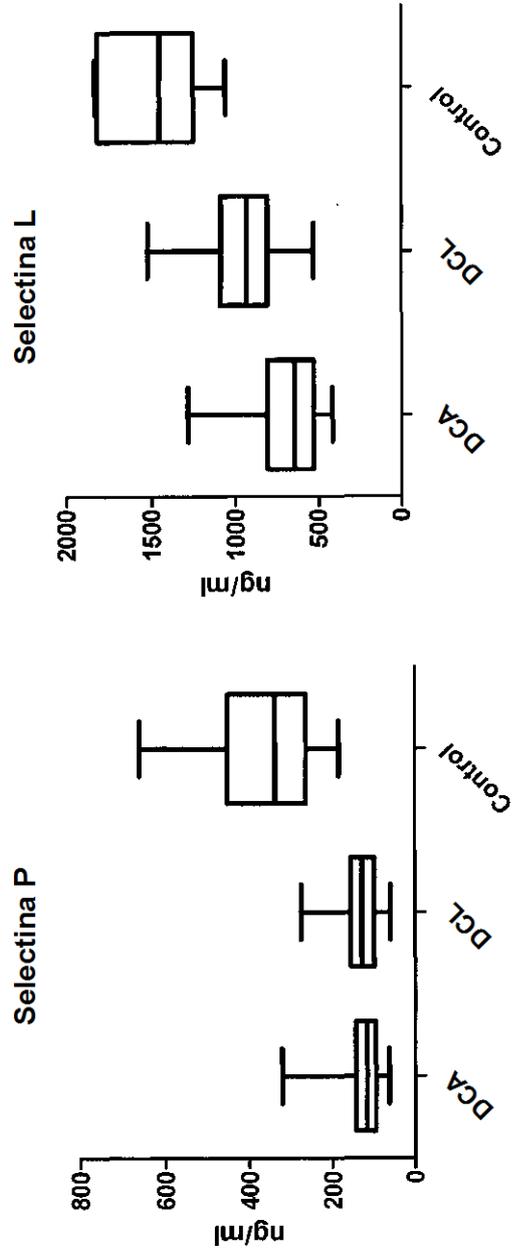


Figura 2

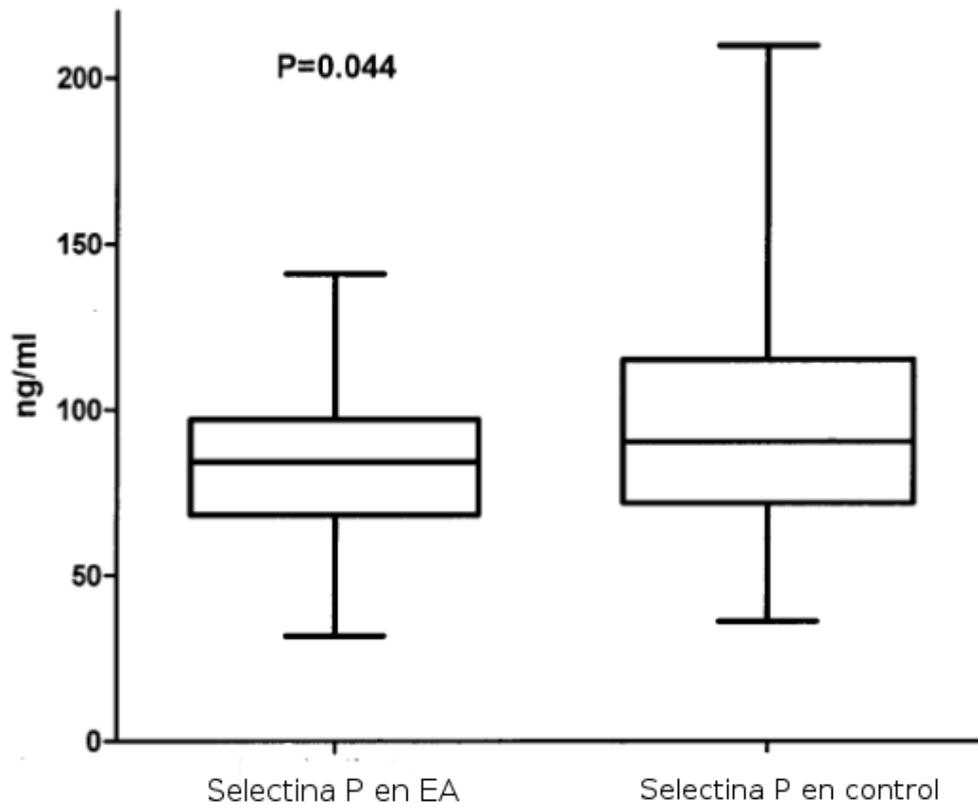


Figura 3