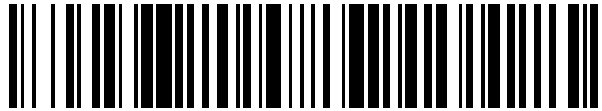


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 033**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2011 E 11787251 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2575596**

54 Título: **Métodos de determinación del recambio de amiloide beta en sangre**

30 Prioridad:

**24.05.2010 US 347554 P**

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

**16.09.2016**

73 Titular/es:

**THE WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)  
One Brookings Drive  
St. Louis, MO 63130, US**

72 Inventor/es:

**BATEMAN, RANDALL J.;  
HOLTZMAN, DAVID M. y  
MAWUENYEGA, KWASI G.**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 583 033 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 de determinación del recambio de amiloide beta en sangre

## 5 Referencia a la lista de secuencias

[0001] Se adjunta a continuación una copia en papel de la lista de secuencias y una forma legible por ordenador de la misma lista de secuencias y se incorporan en la presente memoria por referencia. La información registrada en la forma legible por ordenador es idéntica a la lista de secuencias por escrito, según 37 C.F.R. 1.821 (f).

10

## Campo de la invención

[0002] La invención se refiere a un método para determinar el metabolismo de A $\beta$  en la sangre.

## 15 Antecedentes de la invención

[0003] La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común de demencia y es un problema creciente de salud pública. Actualmente se estima que afecta a 5 millones de personas en los Estados Unidos, con un aumento esperado hasta 13 millones para el año 2050. AD conduce a pérdida de memoria, función cognitiva, y finalmente independencia. La AD conlleva una pesada carga personal y financiera en el paciente y la familia. A causa de la gravedad y prevalencia creciente de la enfermedad en la población, es urgente desarrollar mejores tratamientos y suministrarlos en la fase más temprana de la enfermedad.

20

## Referencia a figuras de color

25

[0004] El archivo de solicitud contiene al menos una fotografía ejecutada en color. Las copias de esta publicación de solicitud de patente con fotografías de color se proporcionarán por la oficina tras petición y pago de la tasa necesaria.

## 30 Breve descripción de las figuras

## [0005]

La FIG. 1 representa un gráfico que muestra el porcentaje de A $\beta$  total marcado en la sangre sobre 36 a 48 horas para 6 participantes (círculos azules) y el porcentaje de A $\beta$  total marcado en FCR en doce participantes (cuadrados rojos). Obsérvese la rápida elevación hasta la meseta en 9 horas con una rápida tasa de eliminación en la sangre, aunque FCR no se aproxima a la meseta hasta 18 horas o después. También obsérvese la eliminación mucho más rápida de A $\beta$  en la sangre en comparación con FCR A $\beta$ . También puede haber un segundo pico de A $\beta$  marcado en la sangre desde 20 hasta 30 horas (pico ~26 horas).

35

La FIG. 2 representa el porcentaje de A $\beta$  marcado en la sangre sobre 40 horas después (a) marcaje intravenoso y (b) marcaje oral.

40

La FIG. 3 representa la cuantificación absoluta de isoformas de A $\beta$  en la sangre sobre 40 horas. Se añadieron patrones internos de Amiloide-beta marcados con <sup>15</sup>N (ISTD) a la muestra antes del procesamiento. Las muestras se procesaron como se describe en los ejemplos, y se representaron las cantidades absolutas de isoformas de amiloide beta.

45

## Descripción detallada de la invención

[0006] La presente invención proporciona un método para determinar el metabolismo de A $\beta$  midiendo el recambio de A $\beta$  en una muestra de sangre. En más detalle, la invención proporciona la <reivindicación 1>. Como se usa en la presente memoria "recambio" se refiere en una realización a la tasa de producción de A $\beta$  marcado, la tasa de eliminación de A $\beta$  marcado, o una combinación de ambas, como se detalla a continuación. En cada caso, sin embargo, la determinación del metabolismo de A $\beta$  requiere una medición de A $\beta$  marcado en una muestra. En otra realización, "recambio" se refiere a la vida media de A $\beta$  en la sangre. Como se usa en ese documento, "A $\beta$ " se refiere a amiloide $\beta$  total, una isoforma de amiloide $\beta$  tal como A $\beta$ <sub>38</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub>, o A $\beta$ <sub>42</sub>, o una combinación de los mismos. De forma ventajosa, un método de la invención elimina la necesidad de una muestra, más difícil de obtener e invasiva del sistema nervioso central para determinar el metabolismo de A $\beta$ .

55

I. Método para determinar el metabolismo de A $\beta$  en la sangre

60

[0007] Un aspecto de la presente invención es un método para determinar el metabolismo de A $\beta$  en la sangre. De forma importante, el recambio de A $\beta$  en la sangre puede reflejar el metabolismo de A $\beta$  en el sistema nervioso central. (Esto es contrario a los niveles constantes de A $\beta$  en la sangre, que no se han correlacionado satisfactoriamente con A $\beta$  del sistema nervioso central.) Hablando en líneas generales la medición del recambio de A $\beta$  en la sangre comprende administrar un marcador a un sujeto, recoger una muestra de sangre del sujeto y

65

analizar la muestra para determinar el recambio de Aβ en la muestra. Cada etapa se describe en más detalle a continuación.

**(a) administración de un marcador**

5

**[0008]** El método de la invención requiere en parte, que se haya administrado un marcador a un sujeto. Los marcadores adecuados y métodos adecuados de administración se detallan a continuación.

i. marcadores

10

**[0009]** Los marcadores adecuados deben permitir la medición del recambio de Aβ en la sangre. A modo de ejemplo no limitante, un marcador adecuado puede incluir un aminoácido o un precursor de aminoácido marcado. En una realización, el marcador puede comprender al menos un aminoácido marcado. El aminoácido puede ser de origen natural, sintético, o un análogo de aminoácido. En cada caso, sin embargo, el aminoácido debe ser capaz de incorporarse en Aβ para permitir la detección y cuantificación del recambio de Aβ en la sangre. Ejemplos no limitantes de aminoácidos naturales pueden incluir alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, o valina. En una realización, el aminoácido puede ser un aminoácido esencial (por ejemplo, un aminoácido no producido por el organismo). En otra realización, el aminoácido puede ser un aminoácido no esencial.

15

20

En otra realización más, un marcador puede comprender al menos un aminoácido esencial y al menos un aminoácido no esencial. En líneas generales, la elección del aminoácido puede basarse en una diversidad de factores, incluyendo (1) si el aminoácido está presente en al menos un resto de la proteína o péptido de interés; (2) si el aminoácido puede alcanzar rápidamente el sitio de síntesis proteica; (3) si el aminoácido marcado afecta al metabolismo de la proteína de interés (por ejemplo, dosis muy grande de leucina pueden afectar al metabolismo del músculo); y (4) puede considerarse la disponibilidad del aminoácido deseado (es decir, algunos aminoácidos son mucho más caros o difíciles de fabricar que otros).

25

**[0010]** En algunas realizaciones, un marcador puede comprender al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce, al menos quince, al menos dieciséis, al menos diecisiete, al menos dieciocho, al menos diecinueve, al menos veinte, o más de los veinte diferentes tipos de aminoácidos marcados.

30

**[0011]** Los aminoácidos pueden marcarse usando cualquier método conocido en la técnica, siempre que el aminoácido pueda incorporarse en Aβ y permita la detección del recambio de Aβ en la sangre. En la presente invención los marcadores son isótopos no radiactivos estables. Ejemplos no limitantes pueden incluir <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>33</sup>S, <sup>34</sup>S, o <sup>36</sup>S. Adicionalmente, se reconoce que también serían eficaces otros varios isótopos estables que cambian la masa de un átomo en más o menos neutrones que lo observado en la forma nativa prevalente. En otra realización, un aminoácido puede marcarse con más de un marcador (por ejemplo, <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N).

35

40

**[0012]** En una realización, puede usarse <sup>13</sup>C<sub>6</sub> fenilalanina, que contiene seis átomos de <sup>13</sup>C, para marcar Aβ. En una realización ejemplar puede usarse <sup>13</sup>C<sub>6</sub> leucina para marcar Aβ. En otra realización más, puede usarse una combinación de un isótopo no radiactivo y un aminoácido numerado en la Tabla A para marcar Aβ.

45

**[0013]** Existen numerosas fuentes comerciales de aminoácidos marcador. En líneas generales, los aminoácidos marcados pueden producirse de forma biológica o sintética. Los aminoácidos producidos de forma biológica pueden obtenerse de un organismo (por ejemplo, kelp/alga marina) cultivado en una mezcla enriquecida de <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, u otro isótopo que se incorpora en los aminoácidos según el organismo produce las proteínas. Los aminoácidos después se separan y purifican. Alternativamente, los aminoácidos pueden fabricarse con procedimientos químicos sintéticos

50

Tabla A

<sup>2</sup> H	alanina
<sup>13</sup> C	alanina
<sup>15</sup> N	alanina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	alanina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	alanina
<sup>2</sup> H	arginina
<sup>13</sup> C	arginina

ES 2 583 033 T3

<sup>15</sup> N	arginina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	arginina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	arginina
<sup>2</sup> H	asparagina
<sup>13</sup> C	asparagina
<sup>15</sup> N	asparagina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	asparagina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	asparagina
<sup>2</sup> H	ácido aspártico
<sup>13</sup> C	ácido aspártico
<sup>15</sup> N	ácido aspártico
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	ácido aspártico
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	ácido aspártico
<sup>2</sup> H	cisteína
<sup>13</sup> C	cisteína
<sup>15</sup> N	cisteína
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	cisteína
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	cisteína
<sup>2</sup> H	ácido glutámico
<sup>13</sup> C	ácido glutámico
<sup>15</sup> N	ácido glutámico
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	ácido glutámico
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	ácido glutámico
<sup>2</sup> H	glutamina
<sup>13</sup> C	glutamina
<sup>15</sup> N	glutamina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	glutamina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	glutamina
<sup>2</sup> H	glicina
<sup>13</sup> C	glicina
<sup>15</sup> N	glicina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	glicina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	glicina
<sup>2</sup> H	histidina
<sup>13</sup> C	histidina
<sup>15</sup> N	histidina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	histidina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	histidina

ES 2 583 033 T3

$^2\text{H}$	isoleucina
$^{13}\text{C}$	isoleucina
$^{15}\text{N}$	isoleucina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	isoleucina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	isoleucina
$^2\text{H}$	leucina
$^{13}\text{C}$	leucina
$^{15}\text{N}$	leucina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	leucina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	leucina
$^2\text{H}$	lisina
$^{13}\text{C}$	lisina
$^{15}\text{N}$	lisina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	lisina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	lisina
$^2\text{H}$	metionina
$^{13}\text{C}$	metionina
$^{15}\text{N}$	metionina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	metionina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	metionina
$^2\text{H}$	fenilalanina
$^{13}\text{C}$	fenilalanina
$^{15}\text{N}$	fenilalanina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	fenilalanina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	fenilalanina
$^2\text{H}$	prolina
$^{13}\text{C}$	prolina
$^{15}\text{N}$	prolina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	prolina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	prolina
$^2\text{H}$	serina
$^{13}\text{C}$	serina
$^{15}\text{N}$	serina
$^{17}\text{O}$ y/o $^{18}\text{O}$	serina
$^{33}\text{S}$ y/o $^{34}\text{S}$ y/o $^{36}\text{S}$	serina
$^2\text{H}$	treonina
$^{13}\text{C}$	treonina
$^{15}\text{N}$	treonina

<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	treonina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	treonina
<sup>2</sup> H	triptófano
<sup>13</sup> C	triptófano
<sup>15</sup> N	triptófano
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	triptófano
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	triptófano
<sup>2</sup> H	tirosina
<sup>13</sup> C	tirosina
<sup>15</sup> N	tirosina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	tirosina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	tirosina
<sup>2</sup> H	valina
<sup>13</sup> C	valina
<sup>15</sup> N	valina
<sup>17</sup> O y/o <sup>18</sup> O	valina
<sup>33</sup> S y/o <sup>34</sup> S y/o <sup>36</sup> S	valina

*ii. métodos de administración*

**[0014]** Los métodos adecuados de administración de un marcador pueden incluir cualquier método que permita la medición del recambio de Aß en la sangre. En una realización, un marcador puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular. En otra realización más, un marcador puede administrarse por vía oral.

**[0015]** Un marcador puede administrarse de varios modos diferentes, dependiendo en parte del tipo de marcador. En una realización, un marcador puede administrarse como una infusión en el tiempo. Por ejemplo, un marcador puede administrarse mediante una infusión de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 minutos. Alternativamente, un marcador puede administrarse mediante una infusión durante aproximadamente 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9, 9,25, 9,5, 9,75, 10, 10,25, 10,5, 10,75, 11, 11,25, 11,5, 11,75, 12, 12,25, 12,5, o 12,75 horas. En otras realizaciones más, un marcador puede administrarse como una infusión durante más de 13 horas. En una realización ejemplar, el marcador puede administrarse como una infusión IV.

**[0016]** Un marcador también puede administrarse en uno o más bolos. Por ejemplo, un marcador puede administrarse en un bolo, dos bolos, tres bolos, cuatro bolos, cinco bolos, o más de cinco bolos. Hablando en líneas generales, un bolo es una administración concreta de una duración de no más de aproximadamente 1 hora. En una realización, un bolo se administra en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 segundos. En otra realización, un bolo se administra en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116,

117, 118, 119, o 120 s. Alternativamente, el tiempo entre los bolos puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 5 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 minutos. En otra alternativa, el tiempo entre los bolos puede ser de aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9, 9,25, 9,5, 9,75, 10, 10,25, 10,5, 10,75, 11, 11,25, 11,5, 11,75, 12, 12,25, 12,5, 12,75, 13, 13,25, 13,5, 13,75, 14, 14,25, 14,5, 14,75, 15, 15,25, 15,5, 15,75, 16, 16,25, 16,5, 16,75, 17, 17,25, 17,5, 17,75, 18, 18,25, 18,5, 18,75, 19, 19,25, 10 19,5, 19,75, 20, 20,25, 20,5, 20,75, 21, 21,25, 21,5, 21,75, 22, 22,25, 22,5, 22,75, 23, 23,25, 23,5, 23,75, 24, 24,25, 24,5, 24,75, 25, 25,25, 25,5, 25,75, 26, 26,25, 26,5, 26,75, 27, 27,25, 27,5, 27,75, 28, 28,25, 28,5, 28,75, 29, 29,25, 29,5, 29,75, 30, o más de 30 horas.

**[0017]** En una realización ejemplar, el marcador puede administrarse en al menos un bolo oral o IV. En ciertas realizaciones, un marcador puede administrarse mediante una combinación de un bolo y una infusión. Por ejemplo, puede administrarse a un sujeto un bolo de marcador, seguido por una infusión de marcador.

**[0018]** Los expertos en la materia apreciarán que la cantidad (o dosis) del marcador puede variar y variará, dependiendo en parte de la vía de administración y el marcador usado. Hablando en líneas generales, la cantidad debe ser suficiente para permitir la medición del recambio de A $\beta$  en la sangre. En algunas realizaciones, si el marcador se administra mediante infusión, la cantidad puede ser entre aproximadamente 0,01 mg/kg/h a aproximadamente 4,5 mg/kg/h. Por ejemplo, la cantidad puede ser de aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,15, 0,2, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, o 4,5 mg/kg/h. En otras realizaciones, si el marcador se administra mediante bolo, la cantidad puede ser entre aproximadamente 0,01 g a 25 aproximadamente 8 g. Por ejemplo, la cantidad puede ser de 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 7 u 8 g.

**30 (b) recogida de una muestra de sangre**

**[0019]** El método de la invención requiere, en parte, que se haya recogido al menos una muestra de sangre de un sujeto. La muestra de sangre típicamente contiene A $\beta$  marcado. La muestra también puede contener A $\beta$  no marcado. Como se usa en la presente memoria, "sangre" se refiere a sangre completa, plasma, o suero. Los métodos de recogida de una muestra de sangre son bien conocidos en la técnica. En una realización ejemplar, puede usarse venipunción, con o sin un catéter, para recoger una muestra de sangre. En otra realización ejemplar, puede usarse una punción en el dedo o equivalente, para recoger una muestra de sangre.

**[0020]** Hablando en líneas generales, una muestra de sangre se recoge después de la administración de un marcador, descrito en la sección I (a) anterior. Un experto en la materia apreciará que el momento en que se recoge una muestra de sangre (después de la administración de un marcador) puede variar y variará dependiendo del marcador y el método de administración del marcador. En una realización, se recoge una muestra de sangre entre aproximadamente 1 min y aproximadamente 48 horas después de la administración de un marcador. Por ejemplo, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 1 min y 48 horas, entre aproximadamente 1 min y 45 10 horas, o entre aproximadamente 1 min y 30 horas. En otra realización, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 10 min y aproximadamente 24 horas después de la administración de un marcador. En otra realización más, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 10 min y aproximadamente 10 horas después de la administración de un marcador. Por ejemplo, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 15 min y 8 horas, entre aproximadamente 15 min y 6 horas, entre aproximadamente 15 min y 4 50 horas, entre aproximadamente 30 min y 5 horas, entre aproximadamente 1 hora y 5 horas, entre aproximadamente 1 hora y 4 horas, entre aproximadamente 2 horas y 4 horas, o entre aproximadamente 2 horas y 6 horas. En otra realización más, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 20 horas después de la administración de un marcador. Por ejemplo, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 12 horas y 20 horas, entre aproximadamente 14 horas y 20 horas, entre aproximadamente 16 55 horas y 20 horas, o aproximadamente 18 horas y 20 horas. En otra realización más, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 20 horas y aproximadamente 30 horas después de la administración de un marcador. Por ejemplo, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 22 horas y 28 horas o entre aproximadamente 24 horas y 28 horas. En una realización alternativa, puede recogerse una muestra de sangre después de 30 horas después de la administración de un marcador. Por ejemplo, puede recogerse una 60 muestra de sangre después de 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o más de 48 horas después de la administración de un marcador.

**[0021]** En algunas realizaciones, puede recogerse una muestra de sangre después de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 65 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,

68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 s después de la administración de un marcador. En otras realizaciones, puede recogerse una muestra de sangre después de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 minutos después de la administración de un marcador. En ciertas realizaciones, puede recogerse una muestra de sangre después de aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9, 9,25, 9,5, 9,75, 10, 10,25, 10,5, 10,75, 11, 11,25, 11,5, 11,75, 12, 12,25, 12,5, 12,75, 13, 13,25, 13,5, 13,75, 14, 14,25, 14,5, 14,75, 15, 15,25, 15,5, 15,75, 16, 16,25, 16,5, 16,75, 17, 17,25, 17,5, 17,75, 18, 18,25, 18,5, 18,75, 19, 19,25, 19,5, 19,75, 20, 20,25, 20,5, 20,75, 21, 21,25, 21,5, 21,75, 22, 22,25, 22,5, 22,75, 23, 23,25, 23,5, 23,75, 24, 24,25, 24,5, 24,75, 25, 25,25, 25,5, 25,75, 26, 26,25, 26,5, 26,75, 27, 27,25, 27,5, 27,75, 28, 28,25, 28,5, 28,75, 29, 29,25, 29,5, 29,75, o 30 horas después de la administración de un marcador.

**[0022]** En realizaciones ejemplares, si el marcador se administra por vía intravenosa durante aproximadamente 9 horas, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente una hora y aproximadamente 15 horas, entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 13 horas, o entre aproximadamente 8 horas y aproximadamente 10 horas después de la administración del marcador. En una realización ejemplar, si el marcador se administra por vía intravenosa puede recogerse una muestra de sangre aproximadamente 9 horas después de la administración del marcador. En otras realizaciones ejemplares, si el marcador se administra por vía oral, puede recogerse una muestra de sangre entre aproximadamente 30 min y aproximadamente 5 horas o entre aproximadamente 1 hora y 4 horas después de la administración del marcador. En una cierta realización ejemplar, si el marcador se administra por vía oral, puede recogerse una muestra de sangre aproximadamente 3 horas después de la administración del marcador.

**[0023]** Puede recogerse más de una muestra de sangre de un sujeto. Por ejemplo, pueden recogerse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, o más de 40 muestras de sangre de un sujeto. El tiempo entre las muestras puede ser de segundos, minutos, horas, o días. Por ejemplo, el tiempo entre las muestras puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 s. Alternativamente, el tiempo entre las muestras puede ser de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, o 120 minutos. En otra alternativa, el tiempo entre las muestras puede ser de aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 3,25, 3,5, 3,75, 4, 4,25, 4,5, 4,75, 5, 5,25, 5,5, 5,75, 6, 6,25, 6,5, 6,75, 7, 7,25, 7,5, 7,75, 8, 8,25, 8,5, 8,75, 9, 9,25, 9,5, 9,75, 10, 10,25, 10,5, 10,75, 11, 11,25, 11,5, 11,75, 12, 12,25, 12,5, 12,75, 13, 13,25, 13,5, 13,75, 14, 14,25, 14,5, 14,75, 15, 15,25, 15,5, 15,75, 16, 16,25, 16,5, 16,75, 17, 17,25, 17,5, 17,75, 18, 18,25, 18,5, 18,75, 19, 19,25, 19,5, 19,75, 20, 20,25, 20,5, 20,75, 21, 21,25, 21,5, 21,75, 22, 22,25, 22,5, 22,75, 23, 23,25, 23,5, 23,75, 24, 24,25, 24,5, 24,75, 25, 25,25, 25,5, 25,75, 26, 26,25, 26,5, 26,75, 27, 27,25, 27,5, 27,75, 28, 28,25, 28,5, 28,75, 29, 29,25, 29,5, 29,75, 30 o más de 30 horas.

**[0024]** La muestra de sangre típicamente debe ser suficientemente grande para permitir la medición del recambio de A $\beta$ . Puede combinarse más de una muestra para un punto temporal particular. En una realización, una muestra de sangre puede ser de aproximadamente 50  $\mu$ l a aproximadamente 3000  $\mu$ l. Por ejemplo, una muestra de sangre puede ser de aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2650, 2700, 2750, 2800, 2850, 2900, 2950, o 3000  $\mu$ l. En otras realizaciones, una muestra de sangre puede ser de más de 3000  $\mu$ l.

**(c) análisis de la muestra para determinar el recambio de A $\beta$**

**[0025]** El método de la invención, comprende, en parte, analizar la muestra para determinar el recambio de A $\beta$  en la sangre. Hablando en líneas generales, el análisis de la muestra abarca (a) detección y cuantificación de A $\beta$  marcado y no marcado en una muestra de sangre y (b) deducción del recambio de A $\beta$  a partir de la cantidad de A $\beta$  marcado y no marcado en la muestra de sangre. Cada etapa se analiza en más detalle a continuación.



i. detección y cuantificación de A $\beta$  marcado y no marcado en una muestra de sangre

**[0026]** El método de detección y cuantificación de A $\beta$  marcado y no marcado en una muestra de sangre puede variar y variará. Por ejemplo, variarán los métodos de detección con el tipo de marcador usado (por ejemplo, radiactivo o no radiactivo). Como se usa un marcador no radiactivo en la presente invención, el método de detección debe ser suficientemente sensible para detectar cambios en la masa de la proteína marcada con respecto a la proteína no marcada. Por lo tanto, en la presente invención, se detecta A $\beta$  marcado y no marcado con espectrometría de masas. En una realización, se usa el protocolo de espectrometría de masas resumido en los Ejemplos.

**[0027]** Pueden usarse técnicas adicionales para separar A $\beta$  marcado y no marcado de otros componentes de la sangre, o para concentrar A $\beta$  marcado y no marcado en una muestra. Por ejemplo, A $\beta$  marcado y no marcado pueden inmunoprecipitarse de una muestra de sangre. Los protocolos para inmunoprecipitación son conocidos en la técnica. En una realización, el anticuerpo de inmunoprecipitación puede estar adherido a un soporte sólido, tal como una perla o resina. En otra realización, puede usarse el protocolo de inmunoprecipitación detallado en los Ejemplos. Otros métodos de separación y concentración de A $\beta$  pueden incluir cromatografía. En particular, pueden usarse técnicas que vinculan una etapa cromatográfica con una etapa de espectrometría de masas.

**[0028]** Para ayudar en la detección y cuantificación de A $\beta$  marcado y no marcado, el A $\beta$  puede dividirse en péptidos más pequeños. Por ejemplo, puede digerirse A $\beta$  con una proteasa para crear varios péptidos pequeños. En una realización, se usa tripsina para digerir A $\beta$ .

**[0029]** Hablando en líneas generales, el método de detección de A $\beta$  marcado y no marcado también puede usarse para cuantificar la cantidad de A $\beta$  marcado y no marcado. En algunas realizaciones, la cuantificación abarca determinar la relación entre A $\beta$  marcado y no marcado.

ii. deducción del recambio de A $\beta$ 

**[0030]** A partir de la etapa de detección y cuantificación resumida anteriormente, puede deducirse el recambio de A $\beta$ . Como se usa en la presente memoria, "recambio" se refiere en una realización a la tasa de producción de A $\beta$  marcado, la tasa de eliminación de A $\beta$  marcado, o una combinación de ambas. En otra realización, "recambio" se refiere a la vida media de A $\beta$  en la sangre. En otra realización más, el "recambio" se refiere al producto del porcentaje de A $\beta$  marcado y el valor de cuantificación absoluta de A $\beta$ . Por ejemplo, "recambio" puede referirse al producto del porcentaje de A $\beta_{42}$  marcado respecto al valor de cuantificación absoluto de A $\beta_{42}$ .

**[0031]** El recambio puede calcularse, en parte, a partir del cambio en el tiempo en A $\beta$  marcado, no marcado o la relación de A $\beta$  marcado a no marcado. En otras realizaciones, el recambio puede determinarse a partir del pico de A $\beta$  marcado. En otras realizaciones más, puede usarse la tasa de síntesis fraccionada, la tasa de eliminación fraccionada, la tasa de síntesis absoluta, la tasa de eliminación absoluta, la vida media, la tasa de descomposición, o modelado compartimental para determinar el recambio. En cada realización, el recambio puede calcularse usando A $\beta$  marcado *in vivo*, A $\beta$  no marcado *in vivo*, el patrón interno *ex vivo* (cuantificación absoluta), o una combinación de los mismos.

**[0032]** Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Los expertos en la materia deben, sin embargo, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y aún obtener un resultado parecido o similar a la invención, por lo tanto, toda la materia expuesta o mostrada en los dibujos adjuntos debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitante.

**Definiciones**

**[0033]** Como se usa en la presente memoria, "bolo" se refiere a una dosificación concreta de marcador. Puede usarse más de un bolo para administrar un marcador, pero cada bolo es una dosis concreta. Esto está en contraste con una infusión, que es una dosis continua administrada en el tiempo.

**[0034]** Como se usa en la presente memoria, "sistema nervioso central" se refiere al cerebro, fluido cefalorraquídeo, o cualquier otro tejido o fluido del sistema nervioso central donde pueda encontrarse A $\beta$ .

**[0035]** Como se usa en la presente memoria, "infusión" se refiere a una dosificación continua de marcador en el tiempo. En algunas realizaciones, la tasa de dosificación puede cambiar en el tiempo.

**[0036]** Como se usa en la presente memoria, "metabolismo" se refiere a cualquier combinación de la tasa de síntesis, transporte, descomposición, modificación, o eliminación de una biomolécula.

**[0037]** Como se usa en la presente memoria, "sujeto" se refiere a cualquier sujeto que tenga un sistema nervioso central. En realizaciones ejemplares, "sujeto" se refiere a cualquier sujeto que sea susceptible a una enfermedad o trastorno caracterizado por placas amiloides. En una realización ejemplar, "sujeto" se refiere a un individuo con AD o un individuo que está riesgo de AD. En otra realización ejemplar, "sujeto" se refiere a un individuo en edad  
5 avanzada.

### Ejemplos

**[0038]** Los siguientes ejemplos ilustran diversas iteraciones de la invención.  
10

**[0039]** Recientemente se desarrolló un enfoque pionero para medir directamente el metabolismo de A $\beta$  en el sistema nervioso central de seres humanos vivos (Bateman et. al 2006). Este método requiere que los participantes sean admitidos en una habitación de hospital para investigación, y tener dos catéteres IV y un catéter espinal en el área lumbar, colocados de modo pueden obtenerse, cada hora, muestras de sangre y fluido cefalorraquídeo.  
15 Usando este método, estudios recientes han demostrado que A $\beta$  tiene un rápido metabolismo (vida media de 8-10 horas) en el cerebro y fluido cefalorraquídeo (FCR) humano.

**[0040]** La dinámica de A $\beta$  en sangre, sin embargo, no está bien comprendida ya que previamente no había método para medir A $\beta$  marcado en la sangre. Si estuviera disponible dicho método, podría entenderse mejor la fisiología (y patofisiología) de A $\beta$  como medida cuantitativa de la producción de A $\beta$  en el cerebro, el transporte a la sangre y fluido cefalorraquídeo, y la eliminación desde la sangre. Un ensayo de A $\beta$  marcado en la sangre permitiría medir la fisiología y patofisiología de A $\beta$  sin catéteres espinales invasivos.  
20

**[0041]** Se desarrolló un enfoque de espectrometría de masas-inmunoprecipitación para la cinética de marcaje de isótopos estables para medir A $\beta$  marcado en sangre. Esto proporciona la capacidad de medir las tasas de producción, transporte entre compartimentos, y eliminación de A $\beta$  de la sangre en seres humanos.  
25

**[0042]** La vida media de A $\beta$  en sangre/plasma es marcadamente diferente que en el SNC/FCR, con un t $_{1/2}$  de 1 a 3 horas en la producción (FIG. 1). Esto contrasta con una vida media de 8 a 10 horas medida en FCR (Bateman et. al 2006). Para la FIG. 1, se administró a los sujetos un aminoácido marcado ( $^{13}\text{C}_6$  leucina; infundido en 9 horas con una infusión cebada de 10 minutos de 2 mg/kg, seguida por 2 mg/kg/hora durante 8 horas y 50 minutos) y después se tomaron muestras de sangre cada hora durante 0-15 horas, después cada hora impar hasta la hora 35, después a las 36 y 48 horas. Se tomaron 28 muestras en totas. Las muestras se almacenaron congeladas. Después, las muestras se descongelaron y se añadió un cóctel de inhibidor de proteasa. Las muestras se centrifugaron y después se combinaron a partir de dos muestras de plasma (2 ml en total) en cada punto temporal. A continuación, se inmunoprecipitó A $\beta$  de las muestras como se describe a continuación:  
30  
35

#### Día 1:

- 40 1. Se descongelan las muestras en hielo.
2. Se añaden 20  $\mu\text{l}$  de Complete Protease Inhibitors (Roche, 1 comprimido disuelto en 1 ml de agua)
3. Se centrifugan a 14.000 RPM a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para retirar los particulados.
4. Se combinan los sobrenadantes.
5. Se diluyen patrones de medio en PBS.
- 45 6. Se lavan perlas HJ5.1 (anticuerpo específico de A $\beta$ ) dos veces con PBS 1 x con azida al 0,02 %. Se hace una suspensión de perlas al 50 % al final.
7. Se añaden 220  $\mu\text{l}$  de solución de clorhidrato de guanidina 5 M.
8. Se añaden 20  $\mu\text{l}$  de Tween-20 (5 % en PBS para 0,05 % final).
9. Se añaden 5  $\mu\text{l}$  de ISTD ( $\text{N}^{15}$ - A $\beta$ ).
- 50 10. Se añaden 30  $\mu\text{l}$  de perlas de anticuerpo (suspensión al 50 % suficiente para  $\sim 20$  ng de A $\beta$ ).
11. Se incuban durante una noche a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

#### Día 2:

- 55 12. Se centrifugan las perlas a 4500 RPM durante 5 minutos.
13. Se retira el sobrenadante en un nuevo tubo y se guarda (plasma solamente).
14. Se añade 1 ml de solución de clorhidrato de guanidina 0,5 M.
15. Se añaden 10  $\mu\text{l}$  de Tween-20 al 5 % para 0,05 % final.
16. Una vez resuspendidas se transfieren las perlas a un tubo de 1,5 ml.
- 60 17. Se centrifugan las perlas a 4500 RPM durante 5 minutos.
18. Se descarta el sobrenadante.
19. Se lavan las perlas dos veces con enjuague AmBic 1 x. Se descarta el sobrenadante y se secan las perlas.
20. Se añaden 50  $\mu\text{l}$  (volumen de perlas) de ácido fórmico al 98 % (solución de elución) y se centrifugan las perlas. Se retira el sobrenadante y se coloca en tubo de 1,5 ml.  
65

21. Se seca la solución de elución en un speedvac durante 1 hora para retirar el ácido fórmico (37 °C).  
 23. Se descongelan 20 µl de tripsina. Se añade 1 ml de solución AmBic 25 mM para resuspender la tripsina hasta una concentración final de 20 ng/ul.  
 24. Se resuspenden las proteínas en 10 ul de solución de AmBic 25 mM.  
 5 25. Se añaden 10 µl de la solución de tripsina a 20 ng/ µl a las perlas para la digestión.  
 26. Se digiere O/N (16 horas) a 37 °C en la incubadora.

Día 3:

- 10 27. Se realiza un corto centrifugado de las muestras para dejar el condensado sedimentado en el fondo del tubo.  
 28. Se añaden 2 ul de ácido fórmico a la digestión (para precipitar las proteínas).  
 29. Se mezclan las muestras.  
 30. Se centrifuga la digestión trípica a 14.000 RPM a 4 °C durante 15 minutos.  
 15 31. Se transfieren a viales de tomamuestras automático y después se centrifugan las muestras usando el speedvac y se mantienen en el refrigerador a 4 °C.

**[0043]** Las muestras después se analizan por espectrometría de masas del siguiente modo:

- 20 **[0044]** La secuencia de aminoácidos de Aβ 1-42 es DAEFRHDSGYEVHH QKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 1) y de Aβ 1-40 es DAEFRHDSGYEVH HQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 2). Cuando se digiere con una proteasa tipo tripsina, se generan cuatro péptidos más pequeños como Aβ 1-5 1-5 DAEFR (SEQ ID NO: 3), Aβ 6-16 HDSGYEVHHQK (SEQ ID NO:4), Aβ 17-28 LVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5), y Aβ 29-42 GAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 6). Solamente  
 25 dos de estos péptidos son de relevancia para la cuantificación usando la tecnología SILK (Stable Isotope Labeling Kinetics - Bateman et. al 2009) con marcaje con leucina porque su secuencia incluye un resto de leucina que puede marcarse *in vivo*. Estos péptidos son Aβ 17-28 LVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5), y Aβ 29-42 GAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 6), pero usamos solamente el péptido Aβ 17-28 LVFFAEDVGSNK (SEQ ID NO: 5) porque representa las cantidades totales de Aβ en la sangre y produce una señal mayor. Por supuesto, puede ser útil cuantificar  
 30 también los fragmentos C-terminales (Aβ 29-42 GAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO: 6) o Aβ 29-40 GAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO: 7)) o N-terminales en la sangre también. En general, puede usarse cualquier aminoácido marcado, puede usarse cualquier endoproteasa (o ninguna en absoluto) para marcar Aβ y cuantificar el marcador en la sangre.

- 35 **[0045]** Los experimentos se realizaron en un espectrómetro de masas TSQ Vantage acoplado a una fuente ESI de nanoflujo y una cromatografía líquida nano-2D (NanoLC-2D). Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C en la placa del tomamuestras automático. Las muestras se inyectaron en una nano-columna fabricada en el propio laboratorio (diámetro de 150 mm) con una punta extraída, se compactaron hasta 15 cm con material de compactación de columna Ace 5 C18 AR (MAC-MOD Analytical, Chadds Ford, PA). Los péptidos se separaron por el  
 40 Nano2D-LC (Eksigent, Inc. Ultra NanoLC-2D) a un caudal de 1 ml/min. El disolvente A fue ácido fórmico al 0,1 % en agua y el disolvente B fue ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo. El gradiente fue del 15 % de B hasta el 25 % de B en 10 minutos seguido por el 25 % de B hasta el 95 % de B en 5 minutos, después, se disminuyó gradualmente hasta el 15 % de B en 2 minutos y la columna se re-equilibró durante 3 minutos mientras el tomamuestras automático escogía otra muestra para inyección.

- 45 **[0046]** El espectrómetro de masas (MS) TSQ Vantage se hizo funcionar en modo de iones positivos usando un voltaje de pulverización de 1,2 kV, con parámetros optimizados para calibrarlo con los péptidos. Los datos se adquirieron en modo de control de reacción múltiple (MRM). Durante estos experimentos MRM, la masa del péptido se detectó primero en la primera dimensión, o como MS1. Aunque se usa MS1 para realizar la cuantificación, la  
 50 técnica adolece de la ausencia de especificidad especialmente en matrices muy complejas como sangre y debido al hecho de que muchos péptidos tienen la misma masa intacta. Los iones de los péptidos se fragmentaron y detectaron en el espectrómetro de masas y esta segunda dimensión de fragmentación MS (MS2) proporcionó fragmentos únicos. La combinación de la masa específica del precursor y los iones únicos del fragmento se usaron para controlar selectivamente que se cuantificara el péptido. En este caso, se controlaron selectivamente múltiples  
 55 iones de fragmentos (también conocidos como reacciones) para cuantificar Aβ 17-28, produciendo un experimento MRM único. Aβ 17-28 tiene una masa de precursor (MS1) con una relación de carga a masa de 663,340 para el péptido endógeno y 666,340 para el péptido con marcador incorporado. Se controlaron tres de cada uno de los iones de fragmentos después de la fragmentación MS2. Los iones del fragmento también conocidos como iones de transición controlados tienen unas relaciones de masa a carga de 819,38, 966,45 y 1113,52. Los experimentos MRM  
 60 se detectan y representan como picos cromatográficos únicos que se procesaron por Xcalibur, que es el software de control de instrumento.

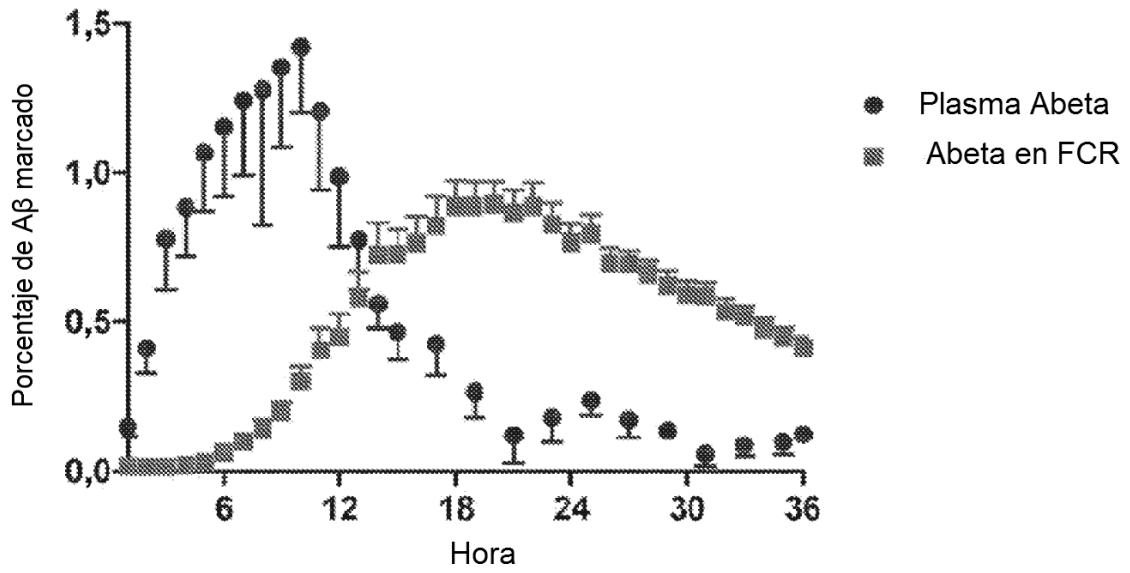
- [0047]** La Figura 2 muestra la diferencia entre la administración de un marcador oral (B) frente a un marcador intravenoso (A). Para cada una de las isoformas ensayadas, el pico de marcaje apareció entre aproximadamente 1 y  
 65 5 horas de administración oral y entre aproximadamente 5 y 10 horas de administración intravenosa. El marcador y

las muestras se administraron y recogieron, respectivamente, como se ha descrito anteriormente.

**[0048]** La Figura 3 muestra la cuantificación absoluta de isoformas de A $\beta$  en plasma, de nuevo medidas usando el protocolo anterior. Se añadieron patrones internos de amiloide-beta marcado con <sup>15</sup>N (ISTD) a la muestra antes del  
5 procesamiento. Las muestras se procesaron como se ha descrito anteriormente.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para medir el recambio *in vivo* de A $\beta$  en la sangre de un sujeto, comprendiendo el método:
  - 5 (a) determinar por espectrometría de masas la cantidad de A $\beta$  marcado, o la cantidad tanto de A $\beta$  marcado como de A $\beta$  no marcado en una muestra de sangre obtenida del sujeto; y
  - (b) calcular el recambio de A $\beta$  usando la cantidad de A $\beta$  marcado, o la cantidad tanto de A $\beta$  marcado como de A $\beta$  no marcado, determinada en la etapa (a), en el cual
    - 10 (i) el recambio de A $\beta$  se calcula a partir de la cantidad de A $\beta$  marcado, o la cantidad de A $\beta$  marcado y A $\beta$  no marcado, en una muestra obtenida entre 15 minutos y 4 horas después de que haya comenzado la administración oral o intravenosa al sujeto de al menos un aminoácido marcado con un isótopo no radiactivo estable; o
    - 15 (ii) el recambio de A $\beta$  se determina a partir del pico de producción de A $\beta$  marcado que aparece entre aproximadamente 1 y 5 horas después de que haya comenzado la administración del bolo oral al sujeto de al menos un aminoácido marcado con un isótopo no radiactivo estable, o entre aproximadamente 5 y 10 horas después de que haya comenzado la administración intravenosa mediante una infusión de 9 horas de al menos un aminoácido marcado con un isótopo no radiactivo estable al sujeto.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el cual la administración del bolo oral de la parte (b) (ii) se sustituye por un bolo IV.
3. El método de la reivindicación 1, en el cual el aminoácido marcado se administra por vía oral.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el cual se administraron entre aproximadamente 0,05 g y aproximadamente 8 g de aminoácido marcado con un isótopo no radiactivo estable.
5. El método de la reivindicación 1, en el cual el aminoácido marcado se administró por vía intravenosa.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el cual el aminoácido marcado se administró como una infusión entre aproximadamente 0,01 mg/kg/hora y aproximadamente 3 mg/kg/hora.
7. El método de la reivindicación 1, en el cual la etapa (a) comprende adicionalmente aislar inicialmente A $\beta$  de la muestra de sangre.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el cual la al menos una muestra de sangre se recogió después de aproximadamente 30 minutos después de la administración al sujeto de al menos un aminoácido marcado.
9. El método de la reivindicación 1, en el cual la cantidad de A $\beta$  marcado o A $\beta$  no marcado se selecciona del grupo
- 40 que consiste en A $\beta$  total, A $\beta$ <sub>38</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub>, y A $\beta$ <sub>42</sub>.
10. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente determinar la cuantificación absoluta de A $\beta$  en la muestra.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el cual se determina el recambio de A $\beta$  usando el producto del porcentaje de A $\beta$  marcado y la cuantificación absoluta de A $\beta$ .



**FIG. 1**

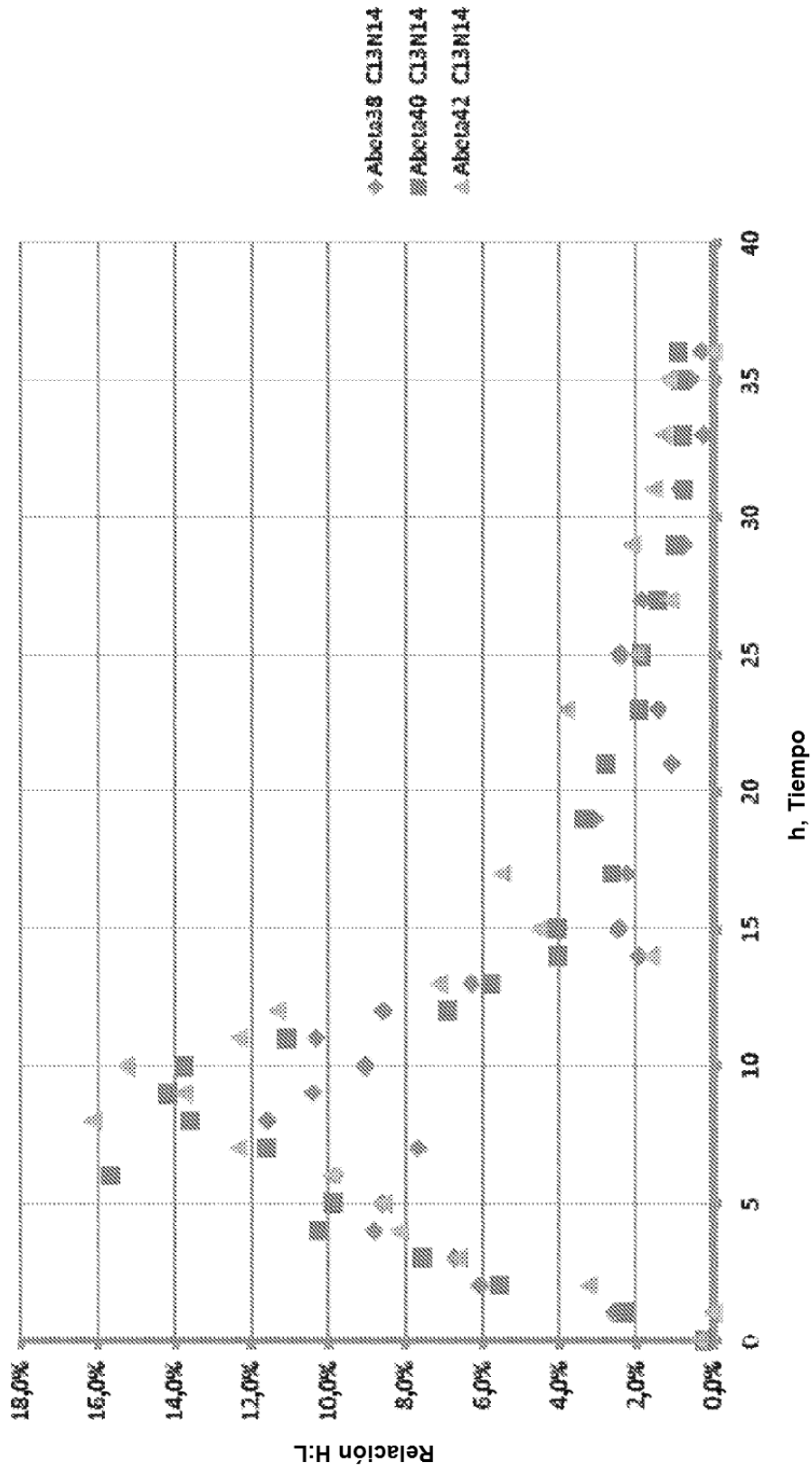


FIG. 2A

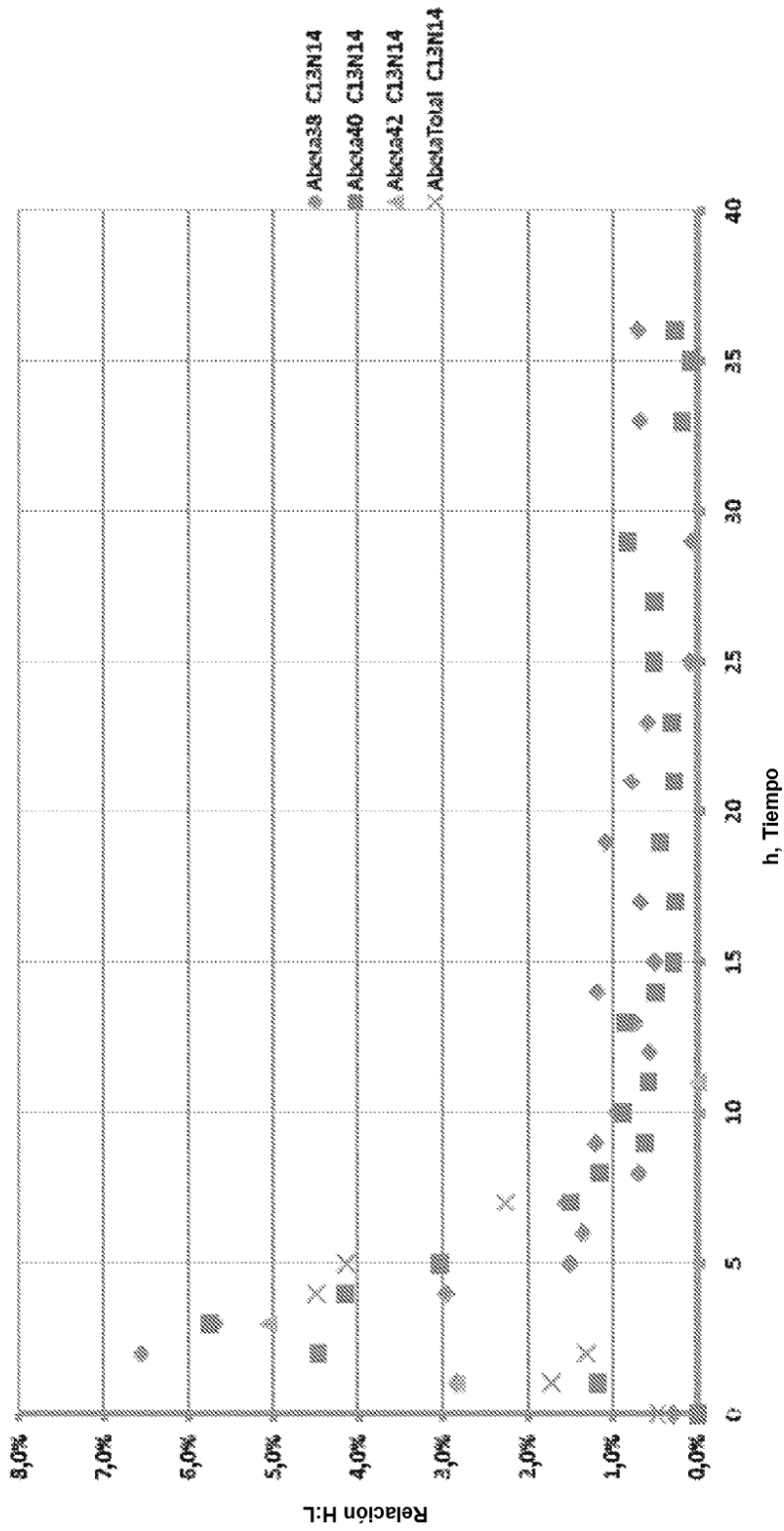


FIG. 2B



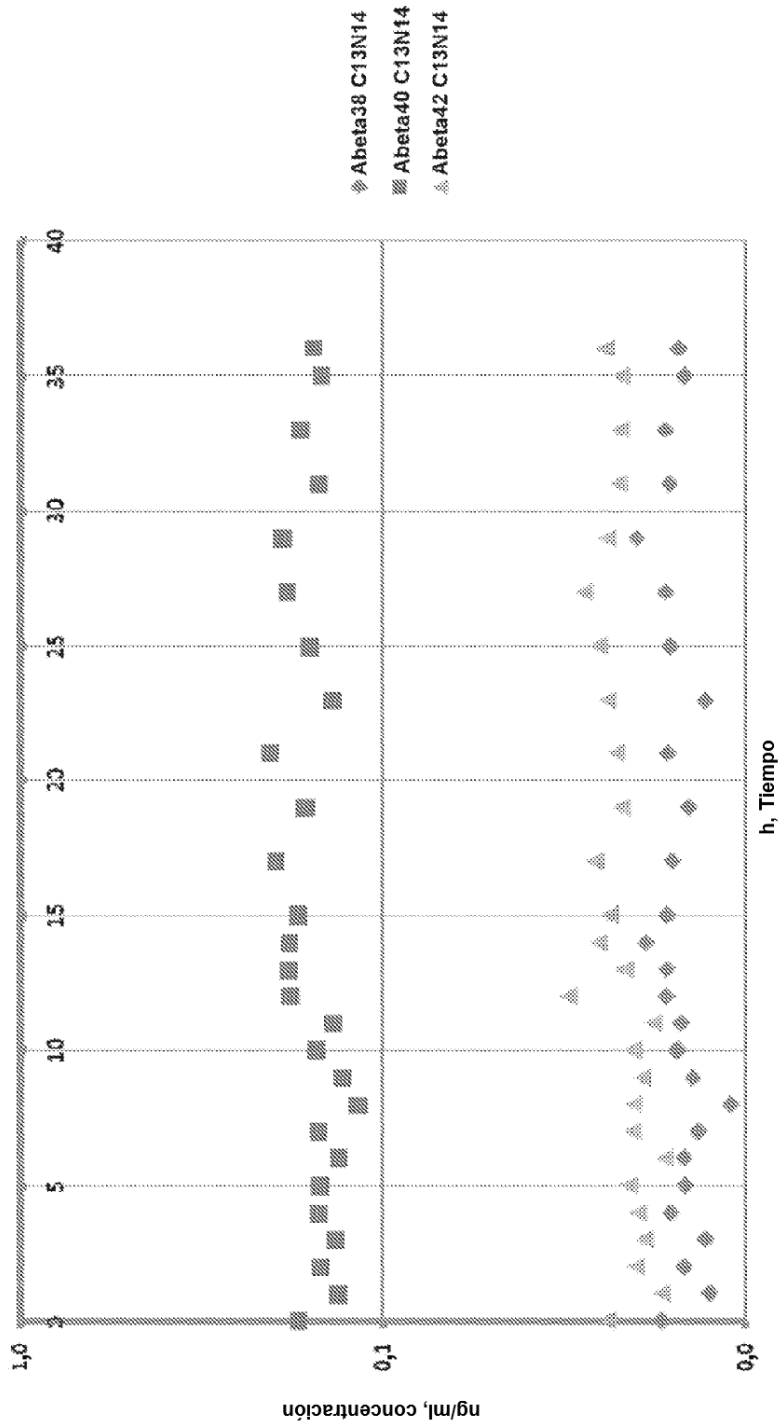


FIG. 3