

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 987**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2012 PCT/EP2012/068268**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13038014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2012 E 12759720 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2756311**

54 Título: **Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**16.09.2011 EP 11306171**

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

**11.12.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)  
3, rue Michel-Ange  
75016 Paris, FR y  
UNIVERSITÉ PARIS-SUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAVERNA, MYRIAM;  
VERPILLOT, ROMAIN;  
OTTO, MARKUS y  
KLAFKI, HANS**

74 Agente/Representante:

**ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia**

ES 2 645 987 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

Método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

- 5 La presente invención se refiere a métodos de diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, en particular, la enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) representa la causa más común de demencia representando más del 50 % de los casos. Es una de las tres enfermedades que son más costosas para la sociedad, junto con el cáncer y las enfermedades cardiovasculares. La enfermedad de Alzheimer afecta a 35 millones de personas en todo el mundo (Querfurth *et al.* (2010) *New England J. Med.* 362:329-344). Su incidencia se duplica cada 5 años después de los 65 años. Al estar estrechamente asociada con el envejecimiento de la población, la EA supone un reto importante para los equipos de investigación.

- 15 En la actualidad, los medicamentos disponibles pueden producir beneficios sintomáticos moderados, pero por el momento no existe tratamiento alguno disponible que pueda curar la EA o al menos detener la progresión de la enfermedad. Siempre que, en el futuro, productos terapéuticos innovadores con propiedades modificadoras de la enfermedad estén disponibles, se puede esperar un mayor beneficio cuando el tratamiento se inicie tan pronto como sea posible en el curso de la enfermedad. Obviamente, un prerrequisito esencial será la disponibilidad de mejores herramientas de diagnóstico que permitan un diagnóstico fiable y precoz opcionalmente diferencial. Parece ser que los cambios patológicos en el cerebro por EA comienzan muchos años antes de que los primeros síntomas clínicos se hagan evidentes (véase, p. ej., Fagan *et al.* (2009) *Ann. Neurol.* 65:176-83).

Los biomarcadores de EA bien documentados en el líquido cefalorraquídeo que pueden soportar el diagnóstico clínico son concentraciones aumentadas de la proteína Tau total y Tau fosforilada, así como una disminución selectiva en el péptido A $\beta$ 1-42. Además, los métodos de formación de imágenes del cerebro, tales como tomografía de resonancia magnética (TRM), tomografía por emisión de positrones (TEP) y formación de imágenes de amiloide *in vivo* pueden proporcionar información adicional importante. Sin embargo, se requieren biomarcadores adicionales o firmas de biomarcadores y métodos analíticos innovadores para mejorar el diagnóstico precoz y/o diferencial para detectar con fiabilidad pacientes con EA en las etapas iniciales de la enfermedad o con alto riesgo.

Los ensayos de diagnóstico se definen en términos de su sensibilidad (definida por el porcentaje de pacientes que padecen la enfermedad y ensayados como positivos, en una población de pacientes identificados por padecer dicha enfermedad mediante un ensayo de referencia) y por su especificidad (definida por el porcentaje de pacientes que padecen la enfermedad y que se ensayaron como negativos, en una población de pacientes identificados por no padecer dicha enfermedad mediante un ensayo de referencia). Son poco comunes los ensayos de diagnóstico con una alta sensibilidad y una alta especificidad (cerca del 100 %).

Por consiguiente, aún existe la necesidad de métodos que permitan un diagnóstico específico y sensible de la enfermedad de Alzheimer, en particular, un diagnóstico precoz de la enfermedad, antes de la aparición de los síntomas clínicos.

Los presentes inventores han demostrado que tal método de diagnóstico podría obtenerse por medio de la medición y combinación de los niveles de al menos dos catecolaminas en una muestra obtenida a partir de un fluido biológico de un sujeto a diagnosticar. Otra ventaja es, sin duda, que el presente método podría finalmente ser barato y disponible.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, es además de la opinión de los inventores que la medición de catecolaminas podría incluso ser un indicador temprano de una enfermedad neurodegenerativa puesto que las células productoras de catecolaminas (locus cerúleo) se ven posiblemente afectadas muy temprano en el proceso de la enfermedad.

Las catecolaminas son hormonas liberadas por las glándulas suprarrenales, que forman parte del sistema nervioso simpático y contienen un grupo catecol o 3,4-dihidroxifenil.

Algunos estudios previos se destinaron a determinar si existía un vínculo entre las catecolaminas y la enfermedad de Alzheimer. No obstante, hasta el momento, no se ha demostrado una clara correlación entre estos compuestos y la enfermedad de Alzheimer. De hecho, incluso si las técnicas de ensayo de los niveles de catecolaminas en diferentes muestras biológicas ahora están dentro del conocimiento general del experto en la técnica, se han obtenido

5 numerosos resultados contradictorios. Por ejemplo, Peskind *et al.* (1998) *Neuropsychopharmacology* 19:465-471 demostraron que la concentración de epinefrina en el líquido cefalorraquídeo fue mayor en pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer que en los sujetos de edad avanzada o jóvenes, mientras que Adolfsson *et al.* (1979) *Brit. J. Psychiatry* 135:216-223 demostraron que la correlación media de norepinefrina fue menor en el cerebro de los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, en vista de estos resultados, las catecolaminas no se consideraron como marcadores potenciales de la enfermedad de Alzheimer.

Adicionalmente, para conocimiento de los inventores, ningún estudio previo ha propuesto asociar o combinar los niveles de catecolaminas para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto.

10 Específicamente, la presente invención se basa en la cuantificación de catecolaminas por un único método que implica la combinación de los niveles respectivos de al menos dos catecolaminas, realizada directamente en muestras de un fluido biológico de un paciente.

15 Se ha descrito un método para determinar catecolaminas en la orina humana entre pacientes con EA y voluntarios sanos por Liu L. *et al.* (*J. Sep. Sci.*, 2011,34, 1198-1204).

La presente invención se refiere así pues a un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que presenta signos de demencia, que comprende las etapas de:

- 20 a1) medición del nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto;  
a2) determinación de un valor virtual por medio de la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) aplicando preferiblemente uno de los siguientes algoritmos:

25

$$V = \frac{[i]}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[i]}{([ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i]+[iii])};$$

$$V = \frac{[iii]}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[iii]}{([i]+[ii])}; \quad V = \frac{([i]+[ii])}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[ii])}{([ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[ii])}{([i]+[iii])};$$

$$V = \frac{([i]+[ii])}{[iii]}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[i])}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{[ii]};$$

$$V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[iii])}; \quad V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii])}; \quad V = \frac{([ii]+[iii])}{[i]}; \quad \text{o} \quad V = [i]+[ii]+[iii];$$

en donde V es el valor virtual a determinar e [i] es el nivel de dicha dopamina, [ii] es el nivel de dicha adrenalina e [iii] es el nivel de dicha noradrenalina, y

30 b) basándose en el valor virtual determinado en la etapa a2), determinar si dicho sujeto padece una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer;

*Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa*

35 Como se tiene por objeto en la presente memoria, el término "diagnóstico" se refiere a un método de determinación de la patología que aqueja a un sujeto.

En el contexto de la presente invención, un "sujeto" denota un mamífero humano o no humano, tal como un roedor (rata, ratón, conejo), un primate (chimpancé), un felino (gato), un canino (perro). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

40 En una realización preferida, el sujeto presenta signos de demencia.

Como se usa en la presente memoria, el término "demencia" se refiere a una grave pérdida de la capacidad cognitiva global en una persona que se mantiene previamente en su sano juicio, más allá de lo que podría esperarse del envejecimiento normal. Preferiblemente, dicho sujeto se ha diagnosticado previamente por presentar signos de demencia, en particular, por ensayo cognitivo.

Como conoce el experto en la técnica, la demencia no es sólo una enfermedad, sino más bien un síndrome de enfermedad no específica (es decir, un conjunto de signos y síntomas) en el que las áreas afectadas de la cognición pueden ser memoria, atención, lenguaje y resolución de problemas.

El método de la invención tiene la ventaja de permitir específicamente el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un paciente que ya presenta signos de demencia, lo que permite discriminar la enfermedad de Alzheimer de otras formas de demencia, tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Parkinson con demencia, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, depresión mental, demencia vascular, demencia frontotemporal, demencia semántica y demencia con cuerpos de Lewy.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "muestra de fluido biológico" abarca todas las muestras de fluidos corporales que pueden obtenerse de un sujeto. La muestra de fluido biológico puede seleccionarse en particular entre el grupo que consiste en la muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR), muestra de sangre, muestra de suero, plasma, orina y saliva. Preferiblemente, la muestra de fluido biológico es una muestra de LCR.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad neurodegenerativa" se refiere a una enfermedad o afección caracterizada por la degeneración neuronal y clínicamente por problemas con los movimientos, que afecta a las capacidades cognitivas tales como memoria, o se relaciona con todos los tipos de demencia. En particular, una enfermedad neurodegenerativa puede estar asociada con el deterioro, pérdida o pérdida potencial de las capacidades cognitivas y/o deterioro o pérdida de células cerebrales. Las enfermedades neurodegenerativas son bien conocidas por el experto en la técnica e incluyen enfermedad de Alzheimer, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, trastornos por priones tales como enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, atrofia de múltiples sistemas, esclerosis lateral amiotrófica, paraparesia espástica hereditaria, atrofia espinocerebelosa, ataxia de Friedreich, esclerosis múltiple, enfermedad de Charcot Marie Tooth, ELA/PCD de Guam, síndrome de Down, distrofia miotónica, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefalítico, ataxia primaria progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, FTD-17, enfermedad de granos argirófilos, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, enfermedad de Hallervorden-Spatz, panencefalitis esclerosante subaguda, distrofia muscular congénita Fukuyama, enfermedad de Kufs, síndrome de Cockayne, síndrome de Williams, depresión mental y miositis por cuerpos de inclusión. Más particularmente, la enfermedad neurodegenerativa según la invención puede seleccionarse entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), depresión mental, enfermedad de Huntington y deterioro cognitivo leve (DCL).

Preferiblemente, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy. Más preferiblemente, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad de Alzheimer" se refiere a una enfermedad neurodegenerativa asociada por la acumulación de péptidos  $\beta$ -amiloide en el cerebro, específicamente, en la materia gris del cerebro, formando depósitos o placas de péptido  $\beta$ -amiloide y con ovillos neurofibrilares compuestos de proteína Tau hiperfosforilada.

La enfermedad de Alzheimer (EA) puede dividirse en tres fases en cuanto a la progresión de la enfermedad de Alzheimer con el tiempo: enfermedad de Alzheimer preclínica, deterioro cognitivo leve (DCL) o pre-demencia debida a la enfermedad de Alzheimer y demencia debida a la enfermedad de Alzheimer (McKhann *et al.* (1984) *Neurology*, 34,939-44).

La enfermedad de Alzheimer pre-clínica, que es la primera fase de EA, se caracteriza por un estado en el que los síntomas clínicos o dificultades cognitivas no son detectables según los métodos usados actualmente. Esta etapa, que puede aparecer hasta 20 o 30 años antes de los primeros síntomas pre-clínicos ya implica trastornos bioquímicos del metabolismo que inducen el cambio de compuestos biológicos en términos de su nivel respectivo o sus estados conformacionales en diferentes fluidos biológicos (Jack Jr *et al.* (2010) *Lancet. Neurol.* 9:119-147).

La pre-demencia se caracteriza por las dificultades cognitivas leves que pueden aparecer hasta ocho años antes de que una persona cumpla con los criterios clínicos convencionales para el diagnóstico de la EA. El déficit más notable es la pérdida de memoria, que se muestra como dificultad para recordar hechos recientemente aprendidos y la incapacidad para adquirir nueva información. Problemas sutiles con las funciones ejecutivas de la atención, planificación, flexibilidad y pensamiento abstracto o alteraciones en la memoria semántica (memoria de significados y relaciones entre conceptos) también pueden ser un síntoma de las primeras etapas de la EA. Esta etapa de pre-demencia también puede denominarse deterioro cognitivo leve (DCL).

10 La demencia debida a la enfermedad de Alzheimer incluye las tres siguientes etapas:

- La enfermedad temprana de Alzheimer corresponde a la etapa en la que el deterioro del aprendizaje y la memoria han aumentado lo suficiente para establecer un diagnóstico definitivo convencional. En esta etapa, el paciente suele ser capaz de comunicar adecuadamente ideas básicas. Durante la realización de tareas motoras finas, como escribir, dibujar o vestirse, ciertas dificultades de coordinación y planificación de movimientos pueden estar presentes pero pasan comúnmente inadvertidas.

- La enfermedad de Alzheimer moderada corresponde a la etapa en la que el deterioro progresivo hace que los pacientes sean incapaces de realizar las actividades más comunes de la vida cotidiana. Las dificultades en el habla se hacen evidentes debido a una incapacidad para recordar el vocabulario, lo que conduce a frecuentes sustituciones incorrectas de palabras. Las capacidades de lectura y escritura también se pierden progresivamente. Las secuencias motoras complejas se vuelven menos coordinadas. Durante esta fase, los problemas de memoria empeoran, y la persona puede dejar de reconocer a los parientes cercanos (Förstl y Kurz (1999) European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience 249:288-290). La memoria a largo plazo, que anteriormente estaba intacta, se deteriora. Los cambios conductuales y neuropsiquiátricos son cada vez más frecuentes. Las manifestaciones comunes son errantes, irritabilidad y estado de ánimo lábil, lo que lleva al llanto, arrebatos de agresión no premeditada o resistencia al cuidado.

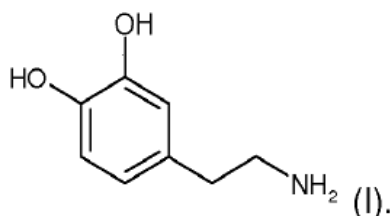
- La enfermedad avanzada de Alzheimer corresponde a la última etapa de la enfermedad en la que el paciente es completamente dependiente de los cuidadores. El lenguaje se reduce a frases simples o palabras incluso individuales, dando lugar eventualmente a la pérdida completa del habla. Aunque la agresividad aún puede estar presente, la apatía extrema y el agotamiento son resultados mucho más comunes.

Ventajosamente, el método de diagnóstico según la memoria descriptiva podría permitir el establecimiento de un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer antes de la aparición de los síntomas, tan pronto como durante la pre-demencia o la enfermedad de Alzheimer precoz.

### 35 *Catecolaminas*

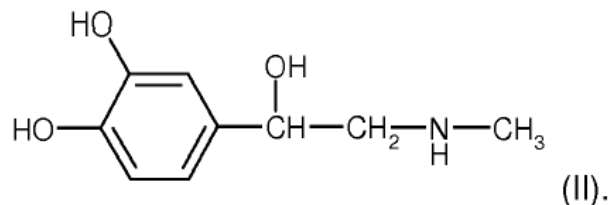
En el contexto de la invención, el término "catecolamina" se refiere a las hormonas liberadas por las glándulas suprarrenales, que forman parte del sistema nervioso simpático y contienen un grupo catecol o 3,4-dihidroxifenil. Tienen más específicamente la estructura distinta de un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo, una cadena intermedia de etilo y un grupo amina terminal. Las catecolaminas incluyen, en particular, adrenalina (también denominada epinefrina), noradrenalina (también denominada norepinefrina), y dopamina, todas las cuales se producen a partir de fenilalanina y tirosina.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "dopamina" se refiere a un neurotransmisor u hormona catecolamina que se presenta normalmente en la siguiente fórmula (I):

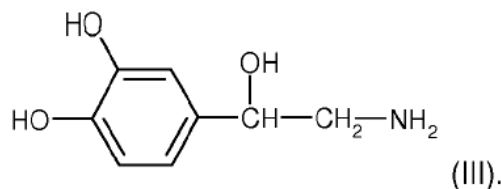


50 Como se usa en la presente memoria, los términos "adrenalina" y "epinefrina" se usan indistintamente y se refieren a una hormona y a un neurotransmisor que se sintetizan por metilación de noradrenalina. La adrenalina se representa

normalmente en la siguiente fórmula (II):



5 Como se usa en la presente memoria, los términos "noradrenalina" y "norepinefrina" se usan indistintamente y se refieren a un neurotransmisor que se sintetiza a partir de la dopamina por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa. La noradrenalina se representa normalmente en la siguiente fórmula (III):



10

En el contexto de la invención, el término "catecolamina" abarca tanto los compuestos nativos, como se define anteriormente en la presente memoria y los compuestos derivatizados correspondientes.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "derivatizado" o "derivatización" se refiere a la transformación de un compuesto químico en un producto (el compuesto derivatizado) de estructura química similar pero que soporta la desviación en términos de estructuras y propiedades del compuesto inicial, tales como cargas globales de moléculas, reactividad, solubilidad, propiedades ópticas, punto de ebullición, punto de fusión, estado de agregado o composición química. Las nuevas propiedades químicas resultantes se pueden usar para la cuantificación o la separación del producto derivatizado. Preferiblemente, las catecolaminas de la invención se derivatizan con un

20 fluoróforo que permite su detección, tal como un fluoróforo que comprende un resto de NHS reactivo, preferiblemente Fluoprobe<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 o FAM X-SE, o un fluoróforo que comprende un resto de tipo isotiocianato reactivo, preferiblemente FITC o 5-FITC.

En la presente invención, el nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina se mide en la etapa a1).

25

#### *Etapa de medición del nivel de al menos dos catecolaminas*

30 Como se usa en la presente memoria, el término "nivel" de un marcador bioquímico se refiere a la concentración, a la cantidad o a la actividad del marcador bioquímico. También puede referirse a la intensidad de la señal producida por dicho marcador bioquímico cuando se mide por un dispositivo de medición. De hecho, como conoce el experto en la técnica, la concentración, la cantidad o la actividad de un marcador bioquímico dado puede obtenerse con facilidad a partir de la intensidad de la señal producida por dicho marcador bioquímico cuando se mide por un dispositivo de medición, por ejemplo mediante la comparación de dicha intensidad de la señal con una curva estándar o con un calibrador. En particular, cuando el nivel del marcador bioquímico se mide por electroforesis

35 capilar, este nivel puede corresponder al área corregida medida para este marcador bioquímico, es decir, a la relación entre el área medida para este marcador bioquímico y el tiempo de migración que corresponde a este marcador bioquímico. De hecho, como es bien conocido por el experto en la técnica, la concentración de un compuesto puede obtenerse a partir de su absorbancia, su luminiscencia, tal como emisión de fluorescencia, sus propiedades químicas intrínsecas, tales como conductividad o potencialidad redox, a través de dependencias

40 logarítmicas o lineales entre las dos variables.

Preferiblemente, en el contexto de la invención, el nivel de un marcador bioquímico se refiere a la cantidad o concentración del marcador bioquímico, más particularmente a la cantidad molar o de masa o a la concentración molar o de masa del marcador bioquímico.

- Como se usa en la presente memoria, la expresión "medir el nivel de de al menos cada dos catecolaminas" significa que el nivel de cada marcador se mide por separado. Como conoce el experto en la técnica, puesto que las catecolaminas representan una familia de compuestos que comparten una estructura química principal similar, es posible determinar el nivel global de catecolaminas presentes en una muestra biológica sin diferenciar los niveles específicos de cada catecolamina. Sin embargo, en una realización particular de la presente invención, el nivel de cada una de los al menos dos catecolaminas se determina individualmente, aunque los niveles de cada una de al menos dos catecolaminas pueden medirse en un único experimento usando un solo dispositivo de medición en condiciones de análisis simultáneos.
- 5
- 10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "medir el nivel global de al menos dos catecolaminas" significa que el nivel global de al menos dos catecolaminas presentes en una muestra biológica se mide sin diferenciar los niveles específicos de cada una catecolamina. Dicha medida global permite disminuir el tiempo de análisis de la muestra biológica, en particular cuando los niveles se miden por electroforesis.
- 15 Técnicas para medir el nivel de un compuesto en una muestra biológica, en particular en una muestra de un fluido biológico, son bien conocidas por el experto en la materia. Los ejemplos de técnicas adecuadas incluyen electroforesis, en particular electroforesis en gel o electroforesis capilar, espectrometría, tal como espectrometría de masas o espectrofluorimetría, cromatografía, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de alto rendimiento ultra (UHPLC) y sus combinaciones (LC/MS, GC/MS), técnicas de inmunoensayo y técnicas basadas en electroquímica.
- 20 Preferiblemente, la etapa de medición del nivel de de al menos cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en la etapa a1) se realiza por electroforesis capilar.
- 25 Como se usa en la presente memoria, la expresión "electroforesis capilar" se refiere a un grupo de técnicas de separación de alto rendimiento que emplean capilares de sílice fundida de menor diámetro interno (recubiertos o sin recubrir) para la separación de especies a través de la aplicación de un campo eléctrico. La electroforesis capilar incluye, en particular, electroforesis capilar de zona (ECZ), electroforesis en gel capilar (EGC), electrocromatografía capilar (ECC), enfoque isoeléctrico capilar (EIEC), isotacoforesis capilar (CITP) y cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM).
- 30 En la electroforesis capilar de zona (ECZ), tienen lugar dos procesos: (i) el mecanismo por el cual las especies están separadas se denomina electromigración y depende de su carga con respecto al volumen hidrodinámico, e (ii) el mecanismo por el cual el electrolito de fondo migra a través el capilar se denomina electroósmosis. La causa por la que las especies se separan depende tanto de su movilidad electroforética ( $m/z$ ) como del flujo electroosmótico (FEO). Estos parámetros son vectores, y los módulos pueden añadirse o restarse dependiendo de su dirección. ECZ clásica requiere que el analito esté cargado.
- 35 En electroforesis en gel capilar (EGC), los capilares de sílice fundida neutralmente recubiertos se rellenan repetidas veces con un sistema lineal de polímero-gel/tampón. Además del mecanismo de separación por ECZ clásica, se produce un efecto de tamizado de la matriz de gel de polímero y a veces también efectos de complejación con tensioactivos.
- 40 En cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM), las micelas se emplean en el electrolito de fondo (EF) y los analitos se reparten por sí mismos entre micelas y el electrolito en masa.
- 45 La electrocromatografía capilar (ECC) usa canales capilares llenos con una fase estacionaria (medios porosos como materiales esféricos de embalaje o estructuras monolíticas), que combinan con mecanismos de retención en la fase estacionaria y la electromigración.
- 50 En el enfoque isoeléctrico capilar (EIEC), los analitos se separan en función de su punto isoeléctrico en un capilar en el que se establece un gradiente de pH.
- 55 En una realización preferida, la etapa de medición del nivel de cada una de al menos dopamina, adrenalina y noradrenalina en la etapa a1) se realiza por electroforesis capilar acoplada a detección por fluorescencia.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión "detección por fluorescencia" se refiere a las técnicas de detección óptica en donde se detecta el compuesto a examinar a través de la fluorescencia que se emite tras la

excitación con una fuente de excitación. Ejemplos de detección por fluorescencia son bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen la detección por fluorescencia inducida por láser, detección por fluorescencia basada en lámpara, detección por fluorescencia inducida por diodo emisor de luz.

- 5 En una realización preferida, la etapa de medición del nivel de de al menos cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en la etapa a1) se realiza por electroforesis capilar acoplada a fluorescencia inducida por láser, más preferiblemente por electroforesis capilar de zona acoplada a fluorescencia inducida por láser.

10 Como se usa en la presente memoria, la expresión "fluorescencia inducida por láser" o FIL se refiere a un método espectroscópico usado para el estudio de la estructura de las moléculas, detección de especies selectivas, visualización y mediciones de flujo. Las especies a examinar se excitan con un láser. Las especies excitadas serán después de algún tiempo, por lo general, en el orden de unos pocos nanosegundos a microsegundos, desexcitadas y emitirán una luz a una longitud de onda mayor que la longitud de onda de excitación. Se mide entonces, esta luz fluorescente.

15 En una realización preferida, la etapa a1) de medición del nivel de de al menos cada dos catecolaminas se implementa al menos dos veces, más preferiblemente al menos tres veces. Preferiblemente, la etapa a2) de determinación de un valor virtual se lleva entonces a cabo después de cada implementación de la etapa a1). El valor virtual usado en la etapa b) es entonces preferiblemente la media de los valores virtuales determinados en cada  
20 etapa a2).

Los inventores demostraron que tal realización permitió reducir el coeficiente de variación asociado a la medición de los niveles de catecolaminas, independientemente de la técnica de medida usada. Por lo tanto, tal disminución permite la obtención de un método de diagnóstico con un alto poder de diagnóstico.

25 *Medición de otros marcadores conocidos de enfermedad neurodegenerativa*

Los inventores demostraron que la medición del nivel de cada una de al menos dos catecolaminas o la medición del nivel global de al menos dos catecolaminas, además de los marcadores conocidos de enfermedad  
30 neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer y/o compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer y/o el valor de los parámetros conocidos por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, permitieron mejorar en gran medida la especificidad y la sensibilidad de los métodos previos de diagnóstico que sólo usan dichos marcadores conocidos de enfermedad neurodegenerativa, preferentemente enfermedad de Alzheimer.

35 Por consiguiente, en una realización particular, el nivel de al menos otro marcador conocido de dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer y/o al menos otro compuesto conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, se mide adicionalmente en la muestra de fluido biológico de dicho sujeto, y/o el valor de al menos otro parámetro conocido por asociarse con  
40 dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, se determina adicionalmente en dicho sujeto, en la etapa a1).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "marcador conocido de enfermedad neurodegenerativa" se refiere a compuestos que se han usado previamente en métodos para diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de  
45 enfermedades neurodegenerativas. Tales marcadores son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en la literatura. Los marcadores conocidos de enfermedad neurodegenerativa según la invención incluyen en particular los péptidos beta-amiloide A $\beta$ 1-42 y proteína tau que incluye la proteína tau no fosforilada y la proteína tau fosforilada, en particular, tau fosforilada 181.

50 Como se usa en la presente memoria, la expresión "compuesto conocido por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa" se refiere a compuestos que han demostrado previamente vincularse con una enfermedad neurodegenerativa, en particular compuestos que han demostrado previamente estar diferencialmente presentes en pacientes que padecen una enfermedad neurodegenerativa en comparación con los pacientes que no padecen dicha enfermedad neurodegenerativa. Tales compuestos son bien conocidos por los expertos en la materia y se  
55 describen en la literatura. Los compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa según la invención incluyen en particular formas truncadas N-terminal del péptido  $\beta$ -amiloide y fragmentos de los mismos, autoanticuerpos A $\beta$ , sAPP $\beta$ , sAPP $\alpha$ , colesterol, oxiesteroles, 24S-hidroxicolesterol, apolipoproteína E, antioxidantes tales como vitaminas C, E y A, licopeno,  $\beta$ -caroteno, urato, bilirrubina, isoprostanos, 8,12-iso-iPF2 $\alpha$ -VI,  $\alpha$ 1-antiquimotripsina, interleucina-3, interleucina-6, complejo receptor de la interleucina-6 soluble, fragmento C-terminal



del precursor de endotelina-1, región media de la pro-adrenomedulina, región media del péptido natriurético proatrial, moléculas pequeñas tales como monoaminas, hormonas y neurotransmisores tales como glutamato, GABA, histamina, agmatina,  $\beta$ -feniletilamina (PEA); serotonina y oxitocina, ubiquitina, proteína 52 de unión a FKBP52 (FKBP52), proteína 3 de unión a ácido graso (H-FABP), proteína B de unión a calcio S100 (S-100B), proteína FUS de unión a ARN (FUS), Erk1, Erk2, proteína ácida fibrilar glial (GFAP), clusterina, formaldehído, timosina y proteína quinasa R (PKR). Preferiblemente, compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa según la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en ubiquitina, sAPP $\beta$ , FKBP52, HPAPB, S-100B, FUS, Erk1, Erk2, GFAP, formaldehído, timosina y PKR. Preferiblemente, los marcadores conocidos de enfermedad neurodegenerativa y/o compuestos conocidos por asociarse con una enfermedad neurodegenerativa según la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en ubiquitina, A $\beta$ 1-42, proteína tau fosforilada 181, tau no fosforilada, sAPP $\beta$ , FKBP52, HPAPB, S-100B, FUS, Erk1, Erk2, GFAP, formaldehído, timosina y PKR.

Más particularmente, marcadores conocidos de la enfermedad de Alzheimer y/o compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad de Alzheimer según la invención se seleccionan preferiblemente entre el grupo que consiste en ubiquitina, A $\beta$ 1-42, sAPP $\beta$ , proteína tau fosforilada 181, tau no fosforilada y FKBP52. Marcadores conocidos de la enfermedad de Parkinson y/o compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad de Parkinson según la invención se seleccionan preferiblemente entre el grupo que consiste en proteína tau fosforilada 181 y tau no fosforilada. Marcadores conocidos de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y/o compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob según la invención se seleccionan preferiblemente entre el grupo que consiste en ubiquitina. Marcadores conocidos de la demencia frontotemporal y/o compuestos conocidos por asociarse con la demencia frontotemporal según la invención se seleccionan preferiblemente entre el grupo que consiste en proteína tau fosforilada 181 y tau no fosforilada.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "parámetro conocido por asociarse con una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer" se refiere a los parámetros de un sujeto que han demostrado previamente estar relacionados con una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer. Tales parámetros pueden ser cuantitativos o cualitativos. Tales parámetros son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en la literatura. Parámetros conocidos por asociarse con una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, según la invención incluyen, en particular, un resultado de un ensayo cognitivo, edad y sexo.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "ensayo cognitivo" se refiere a las evaluaciones de las capacidades cognitivas de los seres humanos y animales. Los ensayos cognitivos usados en el contexto de la invención pueden ser por ejemplo el mini examen del estado mental (MEEM).

Preferiblemente, en los métodos de la invención, los niveles o valores de al menos dos, más preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro, otros marcadores conocidos de la enfermedad de Alzheimer y/o compuestos conocidos por asociarse con la enfermedad de Alzheimer y/o parámetros conocidos por asociarse con la enfermedad de Alzheimer, que se seleccionan preferiblemente entre el grupo que consiste en ubiquitina, A $\beta$ 1-42, sAPP $\beta$ , proteína tau fosforilada 181, tau no fosforilada, FKBP52, edad, sexo y ensayos cognitivos, se determinan además en la etapa a1).

Preferiblemente, en los métodos de la invención, la edad del paciente se determina en la etapa a1).

Preferiblemente, en los métodos de la invención, los niveles de A $\beta$ 1-42 y/o tau fosforilada 181 se miden en la etapa a1).

Lo más preferiblemente, en los métodos de la invención, los niveles de A $\beta$ 1-42 y/o tau fosforilada 181 y/o la edad del paciente se determinan en la etapa a1).

#### *Etapa de determinación de un valor virtual*

Como se usa en la presente memoria, la expresión "niveles combinantes" o "combinación de niveles" se refiere a la aplicación de un algoritmo a los niveles medidos en la etapa a1) con el fin de obtener un valor virtual que permita establecer el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, como se define anteriormente. Más particularmente, la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) puede corresponder a:

- (i) la suma de los niveles medidos en la etapa a1),

(ii) determinación de una relación de los niveles medidos en la etapa a1), tales como:

- 5 - una relación del nivel de una catecolamina en el nivel de otra catecolamina, en particular una relación del nivel de dopamina en el nivel de adrenalina, una relación del nivel de dopamina en el nivel de noradrenalina, una relación del nivel de adrenalina en el nivel de noradrenalina, una relación del nivel de adrenalina en el nivel de dopamina, una relación del nivel de noradrenalina en el nivel de dopamina o una relación del nivel de noradrenalina en el nivel de adrenalina;
- 10 - una relación del nivel de una catecolamina en la suma de los niveles de otras dos catecolaminas, en particular una relación del nivel de la dopamina en la suma de los niveles de adrenalina y noradrenalina, una relación del nivel de adrenalina en la suma de los niveles de dopamina y noradrenalina o una relación del nivel de noradrenalina en la suma de los niveles de dopamina y noradrenalina;
- 15 - una relación de la suma de los niveles de dos catecolaminas en el nivel de otra catecolamina, en particular una relación de la suma de los niveles de dopamina y adrenalina en el nivel de noradrenalina, una relación de la suma de los niveles de dopamina y noradrenalina en el nivel de adrenalina o una relación de la suma de los niveles de adrenalina y noradrenalina en el nivel de dopamina;
- 20 - una relación del nivel de una catecolamina en la suma de los niveles de tres catecolaminas, en particular una relación del nivel de dopamina en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina, una relación del nivel de adrenalina en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina o una relación del nivel de noradrenalina en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina;
- 25 - una relación de la suma de los niveles de tres catecolaminas en el nivel de una catecolamina, en particular una relación de la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina en el nivel de dopamina, una relación de la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina en el nivel de adrenalina o una relación de la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina en el nivel de noradrenalina;
- 30 - una relación de la suma de los niveles de dos catecolaminas en la suma de los niveles de tres catecolaminas, en particular una relación de la suma de los niveles de dopamina y adrenalina en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina, una relación de la suma de los niveles de dopamina y noradrenalina en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina o una relación de la suma de los niveles de adrenalina y noradrenalina en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina;
- 35 - una relación de la suma de los niveles de tres catecolaminas en la suma de los niveles de dos catecolaminas, en particular una relación de la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina en la suma de los niveles de dopamina y adrenalina, una relación de la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina en la suma de los niveles de dopamina y noradrenalina o una relación de la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina en la suma de los niveles de adrenalina y noradrenalina; o

(iii) la aplicación de uno de los siguientes algoritmos:

$$\begin{aligned}
 &V = \frac{[i]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V = \frac{[i]}{([ii]+[iii])}; & V = \frac{[ii]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V = \frac{[ii]}{([i]+[iii])}; \\
 &V = \frac{[iii]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V = \frac{[iii]}{([i]+[ii])}; & V = \frac{([i]+[ii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V = \frac{([i]+[ii])}{([ii]+[iii])}; & V = \frac{([i]+[ii])}{([i]+[iii])}; \\
 &V = \frac{([i]+[ii])}{[iii]}; & V = \frac{([i]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V = \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[iii])}; & V = \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[i])}; & V = \frac{([i]+[iii])}{[ii]}; \\
 &V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[iii])}; & V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii])}; & V = \frac{([ii]+[iii])}{[i]}; & \text{o } V = [i]+[ii]+[iii];
 \end{aligned}$$

40 en donde V es el valor virtual a determinar e [i] es el nivel de dicha dopamina, [ii] es el nivel de dicha adrenalina e [iii] es el nivel de dicha noradrenalina.

La presente invención surge de hecho del hallazgo inesperado de los inventores de que la suma de los niveles, en

particular las concentraciones, de al menos dos catecolaminas a partir de una muestra de fluido biológico de un sujeto permite establecer un diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, con una mejor especificidad y sensibilidad que cuando se usa cada una de las catecolaminas por separado. Más específicamente y sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que las catecolaminas actúan en 5 sinergia para permitir el establecimiento de un diagnóstico.

Preferiblemente, cuando la etapa a1) de los métodos de la invención consiste en medir el nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina, la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) significa la suma de los niveles de 10 dopamina, adrenalina y noradrenalina medidos en la etapa a1).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "valor virtual" se refiere al valor obtenido mediante la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) como se define anteriormente. Como es conocido por el experto en la técnica, la naturaleza del valor virtual y su unidad dependerán del algoritmo usado para combinar los niveles medidos en la etapa a1).

15 *Etapa de determinación de una puntuación*

En una realización preferida, los métodos de la invención comprenden además una etapa a2b) de determinación de una puntuación mediante la combinación del valor virtual como se define anteriormente en la presente memoria en la 20 sección anterior "*Etapa de determinación de un valor virtual*", determinada en la etapa a2), y el nivel de al menos otro marcador conocido de la enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o de al menos otro compuesto conocido por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer y/o el valor de al menos otro parámetro conocido por asociarse con la enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, determinado además en la etapa a1), como se define en la sección 25 anterior "*Medición de otros marcadores conocidos de la enfermedad neurodegenerativa*", en un algoritmo iterativo o genético.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "algoritmo iterativo" se refiere a un procedimiento matemático que genera una secuencia para mejorar soluciones aproximadas para una clase de problemas. A partir de la 30 elección de una puntuación inicial considerada como una primera propuesta de solución, el algoritmo procede por iteraciones durante las cuales se determina una sucesión de soluciones aproximadas refinadas que se acercan progresivamente a la solución buscada.

Normalmente, los siguientes algoritmos pueden usarse cuando el valor virtual V se obtiene sumando los niveles de 35 al menos dos catecolaminas medidos en la etapa a1), y cuando el nivel de al menos otro marcador de dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o el nivel de al menos otro compuesto conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o el valor de al menos otro parámetro conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, se determinan además en la etapa a1):

40

$$\frac{V}{k_1 \times M_1} = \text{puntuación1}$$

$$\frac{k \times V}{k_2 \times M_2} = \text{puntuación2}$$

$$\frac{k' \times V}{k_3 \times M_3} = \text{puntuación3}$$

$$\frac{k' \times V}{k_4 \times M_4} = \text{puntuación4...}$$

en donde

- 5 V es la suma de los niveles de al menos dos catecolaminas medidos en la etapa a1), preferiblemente la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina medidos en la etapa a1),  
 k, k', k'', k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub> y k<sub>4</sub>, idénticos o diferentes, son coeficientes diferentes de 0,  
 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub>, son los niveles de otros marcadores de dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o de otros compuestos conocidos por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o los valores de otros parámetros conocidos por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, determinados además en la etapa a1). Por ejemplo, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>4</sub> pueden representar, respectivamente, la edad del paciente, el nivel de Aβ1-42, el nivel de tau fosforilada y el nivel de ubiquitina.
- 10
- 15 Asimismo puede usarse el siguiente algoritmo iterativo cuando el valor virtual V se obtiene sumando los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina medidos en la etapa a1), y cuando el nivel de Aβ1-42 y la edad del paciente se determinen adicionalmente en la etapa a1):

$$\frac{V}{k_1 \times [A\beta 1-42]} = \text{puntuación1}$$

$$\frac{\text{puntuación1}}{\text{edad}} = \text{puntuación2,}$$

20

en donde

- V es la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina medidos en la etapa a1),  
 K<sub>1</sub> es un coeficiente diferente de 0,  
 25 [Aβ1-42] es el nivel de Aβ1-42 determinado en la etapa a1), y  
 edad es la edad del paciente.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "algoritmo genético" se refiere a un heurístico de búsqueda que imita el proceso de la evolución natural. Los algoritmos genéticos pertenecen a la clase más amplia de algoritmos evolutivos, que generan soluciones a problemas de optimización usando técnicas inspiradas en la evolución natural, tal como herencia, mutación, selección y cruce. Como conoce un experto en la técnica, en un algoritmo genético, una población de secuencias, que codifica soluciones candidatas a un problema de optimización, evoluciona hacia mejores soluciones. Tradicionalmente, las soluciones se representan en binario como cadenas de 0 s y 1 s, pero otras codificaciones son también posibles. La evolución comienza por lo general a partir de una población de individuos generados al azar y ocurre en generaciones. En cada generación, se evalúa la aptitud de cada individuo de la población, se seleccionan múltiples individuos estocásticamente de la población actual, y se modifican para formar una nueva población. La nueva población se usa a continuación en la siguiente iteración del algoritmo. Comúnmente, el algoritmo termina cuando se haya producido cualquier número máximo de generaciones, o cuando se haya alcanzado un nivel de aptitud satisfactoria para la población.

30

35

40

45 Cuando el nivel de al menos otro marcador conocido de dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o al menos otro compuesto conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, se mide adicionalmente en la muestra de fluido biológico a partir de dicho sujeto en la etapa a1) o en la etapa a'1), la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) puede significar más particularmente la aplicación del siguiente algoritmo:

$$R = k_c \times \frac{[M]}{([i] + [ii] + [iii]) - n}$$

en donde  $k_c$  es una constante,  $n$  es otra constante,  $[i]$  es el nivel de dicha dopamina,  $[ii]$  es el nivel de dicha adrenalina e  $[iii]$  es el nivel de dicha noradrenalina, y  $[M]$  es el nivel de al menos otro marcador conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y/o al menos otro compuesto conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente,  $[M]$  es el nivel de A $\beta$ 1-42, más preferiblemente la concentración de A $\beta$ 1-42.

Como el experto en la materia conoce, las constantes  $k_c$  y  $n$  pueden elegirse empíricamente a partir de una cohorte de pacientes, incluyendo pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y pacientes no dementes de manera tal que se permita discriminar fácilmente a los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer de los pacientes no dementes.

En una realización preferida, en particular cuando  $[M]$  es la concentración de A $\beta$ 1-42,  $k_c$  es igual a 7.000. Tal valor se determinó empíricamente por los inventores con el fin de centrar gráficamente el valor  $R$  en torno a cero. Otra realización preferida, en particular cuando  $[M]$  es la concentración de A $\beta$ 1-42, y más particularmente cuando  $k_c$  es igual a 7.000,  $n$  es igual a 1. Tal valor se determinó empíricamente por los inventores con el fin de obtener un valor predeterminado igual a 0.

Los presentes inventores demostraron que era posible, usando el método de la invención, identificar como no dementes, los pacientes que fueron clasificados como pacientes con EA. Por lo tanto, se supone que estos pacientes son falsos negativos. Esto se logró en particular determinando sucesivamente (i) la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina y (ii) la combinación anterior definida del nivel de A $\beta$ 1-42 y de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina. El uso de estas combinaciones sucesivas, el poder de discriminación del método de invención se elevó a 98,5 % con una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 96,5 %.

Adicionalmente, el algoritmo definido anteriormente es en particular muy útil ya que permite el uso de un valor predeterminado igual a 0, lo que permite la fácil discriminación entre los pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer y los pacientes que no padecen enfermedad de Alzheimer.

#### *Etapa de comparación con un valor predeterminado*

En una realización preferida de la invención, el método de diagnóstico según la invención comprende además una etapa a3) de comparación del valor virtual determinado en la etapa a2) o la puntuación determinada en la etapa a2b) con un valor predeterminado. En una realización preferida alternativa de la invención, el método de diagnóstico según la invención comprende además una etapa a'2) de comparación del nivel global medido en la etapa a'1) con un valor predeterminado.

El valor predeterminado puede ser un valor umbral, tal como una mediana o la media o un intervalo de valores tal como un intervalo de confianza. Preferiblemente, el valor predeterminado según la invención corresponde al valor umbral que permite la obtención de un diagnóstico con la mejor especificidad y la mejor sensibilidad. Dicho valor predeterminado corresponde normalmente al valor umbral, determinado usando una población que comprende un número específico de pacientes conocidos por no padecer una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, y un número específico de pacientes conocidos por padecer una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, que permite distinguir a los pacientes que no padecen y los pacientes que padecen una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, con la mejor especificidad y la mejor sensibilidad. Preferiblemente, el valor predeterminado es directamente proporcional a la concentración de las catecolaminas que permiten discriminar un estado patológico de un estado no patológico en un sujeto dado.

Normalmente, cuando la etapa a1) del método de la invención consiste en la medición de los niveles de cada una de, preferiblemente, dopamina, adrenalina y noradrenalina derivatizada, en particular, los niveles de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina derivatizada con un fluoróforo que comprende un resto de NHS reactivo, preferiblemente con Fluoprobe<sup>®</sup>, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 o FAM X-SE, o con un fluoróforo que comprende un resto de tipo isotiocianato reactivo, preferiblemente con FITC o 5-FITC, usando ECZ-FIL, la separación electroforética se realiza

- preferiblemente en 25 min aplicando preferiblemente una tensión de 30 kV en presencia de un tampón borato de pH 9, FI (fuerza iónica) 40 mM, durante 10 min a una temperatura de preferiblemente 25 °C, la muestra biológica se mantiene preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 4 °C a 8 °C y las catecolaminas se detectan después de un tiempo de funcionamiento electroforético de preferiblemente 17 a 20 min después de una migración de 40 cm en el interior del capilar usando FIL con un láser tipo argón con una potencia preferiblemente de 3,5 mW y una longitud de onda de excitación de 488 nm, la fluorescencia se recoge preferiblemente con un filtro pasabanda de 520 nm, y cuando la etapa a2) consiste en la suma de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina medidos en la etapa a1), el valor predeterminado es preferiblemente 200.000 min<sup>-1</sup>.
- 10 Como conoce un experto en la técnica, el valor predeterminado depende del tipo de muestra biológica en el método usado para medir el nivel de los marcadores en la muestra biológica y en los algoritmos usados para la combinación de estos niveles y la obtención del valor virtual o la puntuación. De este modo, se proporciona preferiblemente el valor predeterminado mediante el uso de la misma técnica de ensayo que se usa para la medición de los niveles de marcadores del sujeto, y usando el mismo algoritmo que se usa para determinar el valor virtual o la puntuación de
- 15 los niveles medidos en la muestra de fluido biológico del sujeto, para evitar cualquier error en la normalización.

Preferiblemente, en los métodos de la invención, se determina además si el valor virtual determinado en la etapa a2) o la puntuación determinada en la etapa a2b), es superior o inferior al valor predeterminado.

- 20 Preferiblemente, cuando el valor virtual o la puntuación es superior al valor predeterminado, o cuando el nivel global es superior al valor predeterminado, es significativamente superior al valor predeterminado.

Preferiblemente, cuando el valor virtual o la puntuación es inferior al valor predeterminado, o cuando el nivel global es inferior al valor predeterminado, es significativamente inferior al valor predeterminado.

- 25 Normalmente, un valor virtual obtenido sumando los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina, que es inferior al valor predeterminado es indicativo de enfermedad de Alzheimer. De forma alternativa, normalmente, un nivel global de dopamina, adrenalina y noradrenalina, que es inferior al valor predeterminado es indicativo de enfermedad de Alzheimer.

30

#### *Método de seguimiento terapéutico*

- Dado que, como se muestra por los inventores, una asociación o combinación de los niveles de catecolaminas es indicativo de enfermedad de Alzheimer, la cuantificación de las catecolaminas también es útil para el seguimiento de
- 35 un tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método de seguimiento terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer de un sujeto que presenta signos de demencia, que comprende las etapas de:

- 40 a1) medición del nivel de dopamina, adrenalina y noradrenalina en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto antes del tratamiento;
- a2) determinación de un primer valor virtual mediante la combinación de los niveles medidos en la etapa a1), aplicando preferiblemente uno de los siguientes algoritmos:

$$\begin{aligned}
 V &= \frac{[i]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{[i]}{([ii]+[iii])}; & V &= \frac{[ii]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{[ii]}{([i]+[iii])}; \\
 V &= \frac{[iii]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{[iii]}{([i]+[ii])}; & V &= \frac{([i]+[ii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[ii])}{([ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[ii])}{([i]+[iii])}; \\
 V &= \frac{([i]+[ii])}{[iii]}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[i])}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{[ii]}; \\
 V &= \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[iii])}; & V &= \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii])}; & V &= \frac{([ii]+[iii])}{[i]}; & \text{o } & V &= [i]+[ii]+[iii];
 \end{aligned}$$

en donde V es el valor virtual a determinar e [i] es el nivel de dicha dopamina, [ii] es el nivel de dicha adrenalina e [iii] es el nivel de dicha noradrenalina;

- 5 b1) medición del nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto durante o después del tratamiento;  
 b2) determinación de un segundo valor virtual mediante la combinación de los niveles medidos en la etapa b1), aplicando preferiblemente uno de los siguientes algoritmos:

$$\begin{aligned}
 V &= \frac{[i]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{[i]}{([ii]+[iii])}; & V &= \frac{[ii]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{[ii]}{([i]+[iii])}; \\
 V &= \frac{[iii]}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{[iii]}{([i]+[ii])}; & V &= \frac{([i]+[ii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[ii])}{([ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[ii])}{([i]+[iii])}; \\
 V &= \frac{([i]+[ii])}{[iii]}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[iii])}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[i])}; & V &= \frac{([i]+[iii])}{[ii]}; \\
 V &= \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; & V &= \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[iii])}; & V &= \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii])}; & V &= \frac{([ii]+[iii])}{[i]}; & \text{o } & V &= [i]+[ii]+[iii];
 \end{aligned}$$

10 en donde V es el valor virtual a determinar y

c) basándose en el primer y segundo valor virtual determinados respectivamente en las etapas a2) y b2), determinar si dicho sujeto se beneficia de dicho tratamiento contra una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer;

o

20 a') medición de un primer nivel global de al menos dos catecolaminas en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto antes del tratamiento;

b') medición de un segundo nivel global de al menos dichas dos catecolaminas en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto durante o después del tratamiento; y

c') basándose en el primer y segundo nivel global determinados respectivamente en las etapas a') y b'), determinar si dicho sujeto se beneficia de dicho tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer.

25

Como se usa en la presente memoria, la expresión "enfermedad neurodegenerativa" tiene el mismo significado que el definido anteriormente en la presente memoria en la sección "*Diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa*". Preferiblemente, dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "tratamiento contra una enfermedad neurodegenerativa" se refiere a cualquier tratamiento útil en la prevención, reducción y/o detención de la progresión de dicha enfermedad neurodegenerativa.

Preferiblemente, las etapas a1) y b1) de medición del nivel de de al menos cada dos catecolaminas, y las etapas a') y b') de medición del nivel global de al menos dos catecolaminas, se llevan a cabo como se define anteriormente en la presente memoria en la sección "*Etapas de medición del nivel de al menos dos catecolaminas*".

Preferiblemente, en el método de seguimiento terapéutico de la invención, el nivel de al menos otro marcador conocido de la enfermedad de Alzheimer, y/o de al menos otro compuesto conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, se mide adicionalmente en la muestra de fluido biológico obtenida de dicho sujeto y/o el valor de al menos otro parámetro conocido por asociarse con dicha enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, se determina además en dicho sujeto en las etapas a1) y b1) o en las etapas a') y b'), en particular como se define anteriormente en la presente memoria en la sección "*Medición de otros marcadores conocidos de la enfermedad neurodegenerativa*".

Preferiblemente, las etapas a2) y b2) de determinación de un valor virtual se llevan a cabo como se define anteriormente en la presente memoria en la sección "*Etapas de determinación de un valor virtual*".

Preferiblemente, el método de seguimiento terapéutico de la invención comprende además las etapas a2b) y b2b) o las etapas a'b) y b'b) de determinación de una puntuación mediante la combinación de, respectivamente, el valor virtual determinado en la etapa a2) o b2) o el nivel global determinado en la etapa a') o b') y el nivel de al menos dicho otro marcador conocido de enfermedad de Alzheimer y/o de al menos dicho otro compuesto conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer y/o el valor de al menos dicho otro parámetro conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer determinado además en la etapa a1) o b1) o en la etapa a') o b'), en un algoritmo iterativo o genético, como se define anteriormente en la presente memoria en la sección "*Etapas de determinación de una puntuación*".

Preferiblemente, el método de seguimiento terapéutico de la invención comprende además una etapa a3) y una etapa b3) de la comparación de los valores virtuales determinados en las etapas a2) y b2) o las puntuaciones determinadas en las etapas a2b) y b2b) o en las etapas a'b) y b'b) con un valor predeterminado, en particular, como se define anteriormente en la presente memoria en la sección "*Etapas de comparación con un valor predeterminado*". Preferiblemente, el método de seguimiento terapéutico de la invención comprende además una etapa a'2) y una etapa b'2) de comparación de los niveles globales medidos en las etapas a') y b') con un valor predeterminado, en particular como se define anteriormente en la presente memoria en la sección "*Etapas de comparación con un valor predeterminado*".

En otra realización preferida, el método de seguimiento terapéutico de la invención comprende además una etapa pre-c) de comparación del primer valor virtual determinado en la etapa a2) o la primera puntuación determinada en la etapa a2b) con el segundo valor virtual determinado en la etapa b2) o la segunda puntuación determinada en la etapa b2b). En otra realización preferida, el método de seguimiento terapéutico de la invención comprende además una etapa pre-c') de comparación del primer nivel global medido en la etapa a') con el segundo nivel global medido en la etapa b').

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

50

### Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra el perfil electroforético obtenido a partir del análisis de una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) derivatizado por FluoProbe® como se describe en el Ejemplo 1. Las flechas indican los picos correspondientes a las catecolaminas: a representa adrenalina; b noradrenalina y c dopamina.

La **Figura 2** muestra un diagrama que representa en abscisas la distribución de las muestras de LCR analizadas en el Ejemplo 1 obtenido de pacientes no dementes, que son pacientes considerados por no padecer la enfermedad de Alzheimer por un ensayo de diagnóstico convencional (círculos) y pacientes considerados por padecer la enfermedad de Alzheimer por un ensayo de diagnóstico convencional (cuadrados), y la adición de



áreas corregidas de las catecolaminas (en  $\text{min}^{-1}$ ) en las ordenadas.

La **Figura 3** muestra el mismo diagrama que la **Figura 2** pero en donde los pacientes n.º 3 y n.º 16 se indican mediante flechas.

5

La **Figura 4** muestra los histogramas que representan el valor virtual (R) obtenido en 26 sujetos por aplicación del siguiente algoritmo:

$$R = \frac{K \times [A\beta 1 - 42]}{\sum Ac(Cath)} - 1,$$

10

en donde K es una constante igual a 7.000,  $[A\beta 1 - 42]$  representa la concentración de  $A\beta 1 - 42$  y  $\sum Ac(Cath)$  representa la suma de las áreas corregidas correspondientes a adrenalina, noradrenalina y dopamina. La línea discontinua representa la separación entre los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y los pacientes no dementes.

15

La **Figura 5** muestra un diagrama que representa en abscisas la distribución de las muestras de LCR analizadas en el Ejemplo 3 obtenido de pacientes no dementes, que son pacientes considerados por no padecer la enfermedad de Alzheimer por un ensayo de diagnóstico convencional (cuadrados) y pacientes considerados por padecer la enfermedad de Alzheimer por un ensayo de diagnóstico convencional (rombos), y el valor virtual obtenido aplicando los siguientes algoritmos en las ordenadas:

20

$$(A) \quad V = \sum Ac(Cath),$$

en donde  $\sum Ac(Cath)$  representa la suma de las áreas corregidas correspondientes a adrenalina, noradrenalina y dopamina;

25

$$(B) \quad V = \frac{\sum Ac(Cath)}{edad},$$

en donde  $\sum Ac(Cath)$  representa la suma de la edad áreas corregidas correspondientes a adrenalina, noradrenalina y dopamina.

30

Las líneas discontinuas representan la separación entre los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y los pacientes no dementes.

La **Figura 6** muestra un diagrama que representa en abscisas la distribución de las muestras de LCR analizadas en el Ejemplo 5 obtenido de pacientes no dementes, que son pacientes considerados por no padecer la enfermedad de Alzheimer por un ensayo de diagnóstico convencional (cuadrados) y pacientes considerados por padecer la enfermedad de Alzheimer por un ensayo de diagnóstico convencional (rombos), y el valor virtual obtenido aplicando el siguiente algoritmo en las ordenadas:

35

$$\text{puntuación1} = \sum Ac(\text{Cath})$$

$$\text{puntuación2} = \frac{\sum Ac(\text{Cath})}{\text{edad}}$$

$$\text{puntuación3} = \frac{K1 \times [A\beta1-42]}{\sum Ac(\text{Cath})}$$

$$\text{puntuación4} = \frac{K2 \times [\text{Tau}]}{\sum Ac(\text{Cath})}$$

en donde K1 es una constante igual a 7.000, [Aβ1-42] representa la concentración de Aβ1-42, K2 es una constante igual a 15.000, [Tau] representa la concentración de Tau, y ΣAc(Cath) representa la suma de las áreas corregidas correspondientes a adrenalina, noradrenalina y dopamina.

La línea discontinua representa la separación entre los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y pacientes no dementes.

Puntuación 1, puntuación 2, puntuación 3 y puntuación 4 se calcularon usando el algoritmo iterativo o al mismo tiempo en un contexto algoritmo genético; con el fin de excluir un falso positivo o negativo para aumentar el poder de discriminación del ensayo.

La **Figura 7** muestra histogramas que representan el valor virtual obtenido sumando las áreas corregidas de las catecolaminas en los 47 sujetos del Ejemplo 6, según la enfermedad del paciente (ED: enfermedad de Alzheimer, EPD: enfermedad de Parkinson con demencia, EP: enfermedad de Parkinson, nD: pacientes de control que padecen patologías sin demencias asociadas, ELA: esclerosis lateral amiloide y ECJ: enfermedad Creutzfeldt-Jacob).

La **Figura 8** muestra el perfil electroforético obtenido a partir del análisis de una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) derivatizado por FluoProbe® como se describe en el Ejemplo 1. Las letras muestran los picos correspondientes a ubiquitina y catecolaminas. a representa adrenalina; b noradrenalina, c dopamina y M: ubiquitina.

La **Figura 9** muestra histogramas que representan el nivel de ubiquitina (puntuación) obtenido en los sujetos del Ejemplo 6 que padecen la enfermedad de Alzheimer (ED) o enfermedad de Parkinson con demencia (EPD).

## Ejemplos

### Ejemplo 1

El presente ejemplo demuestra que la cuantificación y la combinación de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina permiten el establecimiento de un diagnóstico muy específico y sensible de la enfermedad de Alzheimer.

### Material y métodos

#### Recogida y almacenamiento de líquido cefalorraquídeo (LCR)

Cada muestra de LCR analizada en este estudio se cogió de pacientes alojados en el Departamento de Neurología de la Universidad de Ulm (Alemania) en 2008 y 2009. La recogida y análisis de estas muestras se aprobaron por el Comité de Ética de la Universidad de Ulm. Cada paciente dio su consentimiento informado por escrito para su participación en el estudio y se sometió a exámenes clínicos, neurológicos y neurorradiológicos y exámenes 5 neuropsicológicos incluyendo el Mini Examen del Estado Mental (MEEM) con el fin de investigar el funcionamiento cognitivo global. Si se había sugerido el deterioro cognitivo, una batería de ensayos psicométricos detallada que cubre las funciones ejecutivas, memoria, habilidades constructivas, inteligencia verbal premórbida y depresión se llevó a cabo con el fin de evaluar, caracterizar y diagnosticar el origen de estos trastornos cognitivos (Steinacker *et al.* (2008) Arch. Neurol. 65:1481-1487).

10

El LCR se alicuotó en las dos horas siguientes a la recogida y se almacenó a -80 °C.

#### Derivatización de LCR

15 El fluoróforo comercial (en forma de polvo) se diluyó en una solución de DMSO (pureza del 99 %) a una concentración de 10 mg/ml, se alicuotó y se almacenó a -20 °C. 1 µl de la solución de fluoróforo se añadió a 24 µl de tampón borato (solución de derivatización). A continuación se realizó una doble dilución en LCR mezclando 25 µl de LCR con 25 µl de la solución de derivatización. Para los fluoróforos que comprenden un resto de NHS reactivo (N-hidroxisuccinimidil éster) tal como Fluoprobe®, Alexa Fluor® 488 o FAM X-SE, la reacción de derivatización se 20 completó después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente. Para los fluoróforos que comprenden un resto de tipo isotiocianato reactivo tal como FITC o 5-FITC, la reacción de derivatización se completó después de 12 horas de incubación a 8 °C.

Para su uso como estándares, las catecolaminas que se almacenaron en forma de polvo a -20 °C se solubilizaron en 25 una solución de agua desionizada.

#### Análisis de electroforesis capilar acoplada a fluorescencia inducida por láser (EC-FIL)

##### • Preparación capilar

30

Los capilares usados estaban en sílice fundida y mostraron un diámetro de 50 µm interior y un diámetro de 375 µm exterior. Tenían 50 cm de largo para una longitud total efectiva de 40 cm. Cada nuevo capilar fue pre-tratado mediante la aplicación de una presión de 138 kPa en la entrada del capilar permitiendo llevar a cabo la siguiente 35 secuencia: NaOH 0,1 M durante 5 min, NaOH 1 M durante 5 min y agua desionizada durante 5 min. Cada solución de lavado y solución de electrolitos se filtró en filtros que presentan un diámetro de 0,2 µm de poros. Después de este pre-tratamiento, se realizó una etapa de lavado basada en agua desionizada y se realizó un enjuague con NaOH 0,1 M.

##### • Equilibrio capilar entre cada análisis

40

Entre cada análisis, el capilar se enjuagó mediante la aplicación de una presión de 138 kPa y agua desionizada a través del capilar durante 5 min, seguido de lavado con una solución DMSO/agua (50:50) durante 2 min y con NaOH diluido durante 5 min. Por último, el capilar estaba acondicionado por tampón de separación borato de pH 9, IS 40 mM, y mediante la aplicación de una presión de 138 kPa (en la dirección normal).

45

##### • Condiciones para la inyección de muestra

Los experimentos se llevaron a cabo usando una electroforesis capilar PA 800 ProteomLab Beckman Coulter acoplada a detección por FIL. Las muestras se introdujeron en el capilar por inyección hidrodinámica bajo una 50 presión de 3,4 kPa. El capilar se calentó a 25 °C y las muestras de LCR derivatizado se mantuvieron a 8 °C usando el módulo de almacenamiento de muestras PA 800.

##### • Análisis y detección

55

La separación electroforética se realizó en 25 min mediante la aplicación de una tensión de 30 kV en presencia de un tampón de migración borato de pH 9, IS 40 mM.

La detección de catecolaminas se llevó a cabo después de un tiempo de ejecución electroforético de 17 a 20 min después de una migración de 40 cm en el interior del capilar. La detección se obtuvo por emisión de fluorescencia

del fluoróforo vinculado a catecolaminas. Las catecolaminas se detectaron así por fluorescencia inducida por láser (FIL) con un láser de tipo argón con una potencia de 3,5 mW y una longitud de onda de excitación de 488 nm, siendo la emisión de fluorescencia recogida con un filtro pasabanda de 520 nm.

#### 5 Tratamiento de datos y evaluación de los criterios de diagnóstico

La **Figura 1** muestra el perfil electroforético obtenido a partir del análisis de una muestra de LCR derivatizado por Fluoprobe®.

- 10 Las áreas, áreas corregidas y altura de pico correspondientes a las catecolaminas se determinaron usando el software 32 Karat (Beckman Coulter). La combinación de la información se hizo mediante la suma o por una operación matemática que implica la asociación de al menos dos catecolaminas.

#### Resultados

- 15 ECZ-FIL permitió la integración de las áreas del pico relacionadas con las concentraciones de catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) en 46 muestras de LCR obtenidas de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer y los pacientes no dementes. Los resultados obtenidos de las 46 muestras de LCR se transfirieron en un diagrama que representa la distribución de las diferentes muestras de LCR analizadas en abscisa y los valores
- 20 virtuales obtenidos a partir de las áreas corregidas de las catecolaminas (en  $\text{min}^{-1}$ ) en las ordenadas. Los círculos corresponden a muestras de LCR de los pacientes que fueron considerados como pacientes no dementes por el ensayo de diagnóstico convencional y los cuadrados corresponden a las muestras de LCR de los pacientes que eran considerados por padecer la enfermedad de Alzheimer por el ensayo de diagnóstico convencional.
- 25 El cálculo de la simple adición de las áreas del pico corregidas correspondientes a las catecolaminas (es decir, las áreas del pico correspondientes a las catecolaminas dividido por el tiempo de migración de estos compuestos) ( $\Sigma Ac(Cath)$ ) reveló una distribución neta entre pacientes no dementes (círculos) y pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (cuadrados), a cada lado de un valor umbral, que se fijó en  $200.000 \text{ min}^{-1}$  y que permitió obtener el mejor poder de diagnóstico (**Figura 2**).
- 30 El poder de discriminación obtenido mediante la combinación de las tres catecolaminas dopamina, adrenalina y noradrenalina, nunca se notificó en la literatura hasta el momento, según el conocimiento de los inventores. La combinación de las catecolaminas mediante la adición de sus áreas (corregidas por el tiempo de ejecución) aumentó drásticamente el poder de discriminación que permitió alcanzar un poder de diagnóstico (incluyendo sensibilidad y
- 35 especificidad) superior a 90 % (**tabla 1**).

**Tabla 1:** Sensibilidad y especificidad del método de la invención

| Juicio clínico                 | Especificidad (%) | Sensibilidad (%) | Potencia (%) |
|--------------------------------|-------------------|------------------|--------------|
| Combinación de 3 catecolaminas | 96,4              | 89               | 93           |

#### Ventajas del método de la invención

- 40 El método según la invención es aplicable de forma rutinaria, con un bajo costo.

De hecho, las resoluciones obtenidas para la separación electroforética de las catecolaminas ( $> 1,5$ ) son compatibles con un método cuantitativo (**Figura 1**). La repetibilidad (desviación estándar relativa, DER) de las áreas

45 del pico fue inferior a 5 % y DER con un tiempo de ejecución fue inferior a 2 %.

Además, el tiempo total para el análisis de la muestra (incluyendo acondicionado con tampón de separación y equilibrio capilar) fue de sólo 48 min. El método según la invención permite así alcanzar una alta escala. Además, la paralelización es posible por la miniaturización del método o el uso de electroforesis de múltiples capilares.

- 50 Ventajosamente, una cantidad muy pequeña de la muestra de LCR (25  $\mu\text{l}$ ) es necesaria para poner en práctica el método según la invención. Un número muy elevado de análisis se puede realizar con este bajo volumen para una sola muestra.

- 55 El análisis descrito en la presente invención está además automatizado. De hecho, la electroforesis capilar PA 800 está totalmente automatizada y permite la programación de secuencias de para análisis de muestras durante varios días sin ninguna intervención exterior, minimizando por lo tanto la intervención y el coste del operador. Usando el

método descrito anteriormente, los inventores estiman que se podrían analizar 30 muestras de LCR durante más de 24 horas.

Finalmente, el coste del análisis es muy bajo. De hecho, usando 310 mg de tampón borato, 10 ml de agua, 200 mg de hidróxido de sodio, 750 µl de DMSO (99 %), 10 µg de fluoróforo y 55 cm de capilar de sílice fundida, corresponde a un coste de aproximadamente 5 €.

## **Ejemplo 2**

10 Este ejemplo demuestra que la cuantificación y la combinación de los niveles de dopamina, adrenalina y noradrenalina y de Aβ1-42 permiten mejorar aún más la especificidad y la sensibilidad del método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

### **Material y métodos**

15

#### *Pacientes*

Los pacientes estudiados fueron los mismos que los estudiados en el Ejemplo 1.

20 *Medición de los niveles de catecolaminas*

Los niveles de catecolaminas se midieron como se muestra en el Ejemplo 1.

#### *Ensayo y medición de Aβ1-42*

25

La concentración de Aβ1-42 en LCR se midió usando un ELISA tipo sándwich obtenido de Innogenetics, Bélgica. El límite de detección del ensayo fue de 50 pg/ml, con una linealidad en el intervalo de 200 pg/ml a 1.500 pg/ml. Para el análisis estadístico, una comparación de la distribución de Aβ1-42 entre los subgrupos en la población del estudio se basó en ensayos de rango no paramétricos (para dos grupos, ensayo U de Wilcoxon-Mann-Witney).

30

### **Resultados**

Como primera etapa, se llevó a cabo la suma de áreas del pico corregidas correspondientes a las catecolaminas como se describe en el Ejemplo 1.

35

La distribución de las respectivas áreas del pico corregidas de LCR de los 46 pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (EA) o no dementes (nEA) se notificó en un solo gráfico (**Figura 3**) que permitió clasificar a los pacientes EA vs nEA.

40 De manera concomitante, una relación R se calculó según la siguiente ecuación:

$$R = \frac{7000 \times [A\beta 1 - 42]}{\sum Ac(Cath)} - 1.$$

Las constantes de esta ecuación se fijaron de tal manera que el valor umbral se encontraba gráficamente en torno a cero, lo que permite fácilmente distinguir subgrupos de pacientes (**Figura 4**).

45

Como se ilustra en la **Figura 4**, el grupo de pacientes identificados por padecer la enfermedad de Alzheimer usando ensayos de diagnóstico convencionales incluyó realmente dos casos de falsos positivos (pacientes 3 y 16).

Por lo tanto, en vista de este análisis adicional, los pacientes 3 y 16 podrían considerarse como pacientes que padecen EA o están excluidos del ensayo, con el fin de determinar el poder de discriminación del método de la invención.

50

En ambos casos, la especificidad y la sensibilidad del ensayo se aumentaron de 96,4 % a 100 % y de 89 % a 96,5 %, respectivamente (**tabla 2**).

55

**Tabla 2:** Sensibilidad y especificidad del método de la invención

| Juicio clínico                          | Especificidad (%) | Sensibilidad (%) | Potencia (%) |
|---|-------------------|------------------|--------------|
| Combinación de 3 catecolaminas y Aβ1-42 | 100               | 96,5             | 98,5         |

**Ejemplo 3**

5 Este ejemplo demuestra que el poder de discriminación del método de la invención puede aumentarse mediante la combinación de los niveles de catecolaminas y otros parámetros conocidos por asociarse con la enfermedad de Alzheimer.

Material y métodos

10 *Pacientes*

Los pacientes estudiados fueron los mismos que los estudiados en el Ejemplo 1. Se determinó su edad.

*Medición de los niveles de catecolaminas*

15

Los niveles de catecolaminas se midieron como se muestra en el Ejemplo 1.

*Algoritmos usados*

20

Dos algoritmos se usaron para combinar los anteriores parámetros. En primer lugar, los niveles de catecolaminas se sumaron como se describe en el Ejemplo 1, sin incluir la edad de los pacientes. Los resultados del uso de este algoritmo se muestran en la **Figura 5B**. En segundo lugar, los niveles de catecolaminas se sumaron como se describe en el Ejemplo 1, a continuación, se dividieron por la edad del paciente. Los resultados del uso de este algoritmo se muestran en la **Figura 5A**.

25

Resultados

30

La comparación entre las **Figuras 5A y 5B** muestra el impacto de la inclusión de la edad de los pacientes como un parámetro adicional en los algoritmos usados en los métodos de la invención. Usando este algoritmo, los inventores observaron un aumento en el poder de discriminación entre pacientes no dementes y pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

**Ejemplo 4**

35

Este ejemplo también demuestra que el poder de discriminación del método de la invención puede aumentarse mediante la combinación de los niveles de catecolaminas y otros parámetros conocidos por asociarse con la enfermedad de Alzheimer.

Material y métodos

40

*Pacientes*

Los pacientes estudiados fueron los mismos que los estudiados en el Ejemplo 1. Se determinó su edad.

45

*Medición de los niveles de catecolaminas*

Los niveles de catecolaminas se midieron como se muestra en el Ejemplo 1.

*Medición del nivel de Aβ1-42*

50

Los niveles de Aβ1-42 se midieron como se muestra en el Ejemplo 2.

*Algoritmos usados*

55

Dos algoritmos se usaron para combinar los anteriores parámetros. En primer lugar, los niveles de catecolaminas se sumaron como se describe en el Ejemplo 1, sin incluir la edad de los pacientes o los niveles de Aβ1-42. En segundo lugar, los niveles de catecolaminas se sumaron como se describe en el Ejemplo 1, y se usaron en el siguiente algoritmo:

$$puntuación1 = \sum Ac(Cath)$$

$$puntuación2 = \frac{\sum Ac(Cath)}{edad}$$

$$puntuación3 = \frac{K1 \times [A\beta1-42]}{\sum Ac(Cath)}$$

en donde K1 es una constante igual a 7.000, [Aβ1-42] representa la concentración de Aβ1-42 y ΣAc(Cath) 5 representa la suma de las áreas corregidas correspondientes a adrenalina, noradrenalina y dopamina.

#### Resultados

Los inventores demostraron el impacto de la inclusión de la edad de los pacientes y el nivel de Aβ1-42 como 10 parámetros adicionales en los algoritmos usados en los métodos de la invención. Usando este algoritmo, los inventores observaron un aumento en el poder de discriminación entre pacientes no dementes y los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer. De hecho, el poder de discriminación alcanzó a continuación el 100 % en términos de especificidad y sensibilidad.

#### 15 Ejemplo 5

Este ejemplo aún demuestra que el poder de discriminación del método de la invención puede aumentarse mediante la combinación de los niveles de catecolaminas y otros parámetros conocidos por asociarse con la enfermedad de Alzheimer.

20

#### Material y métodos

##### *Pacientes*

25 Los pacientes estudiados fueron los mismos que los estudiados en el Ejemplo 1. Se determinó su edad.

##### *Medición de los niveles de catecolaminas*

Los niveles de catecolaminas se midieron como se muestra en el Ejemplo 1.

30

##### *Medición del nivel de Aβ1-42*

Los niveles de Aβ1-42 se midieron como se muestra en el Ejemplo 2.

##### 35 *Medición del nivel de Tau total*

LCR se recogió en tubos de polipropileno en hielo en 0,5 ml de alícuotas. En caso de contaminación con sangre debido al procedimiento, el LCR sanguíneo se recogió en un tubo distinto. Para fines científicos, sólo se usó LCR claro. Para este estudio, se tomó un total de 1 ml. Las alícuotas se centrifugaron a 4 °C a 10.000 x g durante 10 min 40 y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis, p-tau se midió mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) desarrollado. La proteína tau se midió por duplicado por un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que reconoce la proteína tau no fosforilada y normalmente fosforilada. La proteína tau hiperfosforilada no se reconoció por este ensayo (Innotest hTAU, Innogenetics, Zwijndecht, Bélgica). Para tau total, los inventores usaron un ELISA disponible comercialmente (Innogenetics, Bélgica).

45

*Algoritmos usados*

Los niveles de catecolaminas se sumaron como se describe en el Ejemplo 1, a continuación, se aplicó el siguiente algoritmo:

5

$$puntuación1 = \sum Ac(Cath)$$

$$puntuación2 = \frac{\sum Ac(Cath)}{edad}$$

$$puntuación3 = \frac{K1 \times [A\beta1-42]}{\sum Ac(Cath)}$$

$$puntuación4 = \frac{K2 \times [Tau]}{\sum Ac(Cath)}$$

10 en donde K1 es una constante igual a 7.000, [Aβ1-42] representa la concentración de Aβ1-42, K2 es una constante igual a 15.000, [Tau] representa la concentración de Tau, y  $\sum Ac(Cath)$  representa la suma de la áreas corregidas correspondientes a adrenalina, noradrenalina y dopamina.

Puntuación 1, puntuación 2, puntuación 3 y puntuación 4 se calcularon usando el algoritmo iterativo o al mismo tiempo en un contexto algoritmo genético; con el fin de excluir un falso positivo o negativo para aumentar el poder de discriminación del ensayo.

15

Los resultados del uso de este algoritmo se muestran en la **Figura 6**.

Resultados

20 La **Figura 6** muestra el impacto de la inclusión de la edad de los pacientes, el nivel de Aβ1-42 y el nivel Tau total como parámetros adicionales en los algoritmos usados en los métodos de la invención. Usando este algoritmo, los inventores observaron una casi completa discriminación entre pacientes no dementes y los pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer.

25 **Ejemplo 6**

Este ejemplo demuestra el poder de discriminación del método de la invención entre la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurológicas.

30 Materiales y métodos

*Pacientes*

35 Se analizaron 66 muestras "ciegas": muestras de 10 pacientes que padecen esclerosis lateral amiloide (ELA), de 15 controles no dementes (nD), de 10 pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (EA), de 11 pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson (EP), de 10 pacientes que padecen demencia de Parkinson (EDP) y de 5 pacientes que padecen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ).

*Análisis de las muestras*



Las muestras se analizaron de forma consecutiva. Cada muestra se analizó dos veces.

Los niveles de catecolaminas se midieron como se muestra en el Ejemplo 1.

5 El nivel de la ubiquitina se midió usando el mismo método.

Para cada muestra, se calculó el valor virtual basado en las áreas del pico dadas por las tres catecolaminas consideradas: la diferencia obtenida para la determinación de dos réplicas nunca excedió el 10 %.

10 Los datos mostrados en la **Figura 7** son el nivel medio de catecolaminas sumadas a partir de 2 análisis sucesivos realizados para cada muestra.

#### Resultados

15 Como se muestra en la **Figura 7**, el nivel medio de las catecolaminas sumadas es mucho menor cuando los pacientes padecen EA en comparación con los controles no dementes (nD). Por el contrario, el valor virtual de las catecolaminas de pacientes que padecen EP o ELA no fue significativamente diferente de los pacientes nD.

Por tanto, estos resultados demuestran la capacidad del método de la invención para discriminar EA de nD pero  
20 también EA de EP o de ELA.

Además, los inventores demostraron que, en el perfil electroforético capilar (**Figura 8**), un pico temprano correspondió a ubiquitina y se pudo medir de forma simultánea con respecto al análisis de catecolaminas. Esto dio lugar a la posibilidad de incluir el nivel de ubiquitina en el algoritmo para aumentar aún más el poder de  
25 determinación.

Por consiguiente, si el nivel de catecolaminas sumadas era inferior a 1.250.000, que corresponde al valor de corte identificado entre el paciente con EA y nD, se midió el nivel de ubiquitina en las muestras de LCR.

30 Como se muestra en la **Figura 9**, la determinación del nivel de ubiquitina en estas muestras, discriminadas en primer lugar sobre la base de la suma de los niveles de catecolaminas, permitió distinguir significativamente EA de EPD.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que presenta signos de demencia, que comprende las etapas de:

5

a1) medición del nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto;

a2) determinación de un valor virtual por medio de la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) aplicando uno de los siguientes algoritmos:

10

$$V = \frac{[i]}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[i]}{([ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i]+[iii])};$$

$$V = \frac{[iii]}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{[iii]}{([i]+[ii])}; \quad V = \frac{([i]+[ii])}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[ii])}{([ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[ii])}{([i]+[iii])};$$

$$V = \frac{([i]+[ii])}{[iii]}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{([ii]+[i])}; \quad V = \frac{([i]+[iii])}{[ii]};$$

$$V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii]+[iii])}; \quad V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[iii])}; \quad V = \frac{([ii]+[iii])}{([i]+[ii])}; \quad V = \frac{([ii]+[iii])}{[i]}; \quad \text{o} \quad V = [i]+[ii]+[iii];$$

en donde V es el valor virtual a determinar e [i] es el nivel de dicha dopamina, [ii] es el nivel de dicha adrenalina e [iii] es el nivel de dicha noradrenalina,

15

y

b) basándose en el valor virtual determinado en la etapa a2), determinar si dicho sujeto padece enfermedad de Alzheimer.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el valor virtual se determina en la etapa a2) sumando los niveles de de al menos cada dopamina, adrenalina y noradrenalina medidos en la etapa a1).

20

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicha muestra de fluido biológico se selecciona entre el grupo que consiste en una muestra de fluido cefalorraquídeo, suero, plasma, orina y saliva.

25

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos otro marcador conocido de la enfermedad de Alzheimer y/o de al menos otro compuesto conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer se mide además en la muestra de fluido biológico obtenido de dicho sujeto y/o el valor de al menos otro parámetro conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer se determina además en dicho sujeto en la etapa a1).

30

5. El método según la reivindicación 4, en donde al menos dicho otro marcador conocido de enfermedad de Alzheimer y/o al menos otro compuesto conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer se seleccionan entre el grupo que consiste en ubiquitina, Aβ1-42, sAPPβ, proteína tau fosforilada 181, tau no fosforilada, FKBP52, HFABP, S-100B, FUS, Erk1, Erk2, GFAP, formaldehído, timosina y PKR.

35

6. El método según la reivindicación 4 o 5, en donde al menos dicho otro parámetro conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer se selecciona entre el grupo que consiste en edad, sexo y ensayo cognitivo.

40

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende además una etapa a2b) de determinación de una puntuación mediante la combinación del valor virtual determinado en la etapa a2) y el nivel

de al menos dicho otro marcador conocido de la enfermedad de Alzheimer y/o de al menos dicho otro compuesto conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer y/o el valor de al menos dicho otro parámetro conocido por asociarse con la enfermedad de Alzheimer determinados además en la etapa a1) en un algoritmo iterativo o genético.

- 5
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una etapa a3) de comparación del valor virtual determinado en la etapa a2) o la puntuación determinada en la etapa a2b) con un valor predeterminado.
- 10 9. El método según la reivindicación 8, en donde se determina si el valor virtual determinado en la etapa a2) o la puntuación determinada en la etapa a2b) es superior o inferior al valor predeterminado.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la medición del nivel de al menos cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en la etapa a1) se realiza por electroforesis capilar.
- 15 11. El método según la reivindicación 10, en donde la medición del nivel de al menos cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en la etapa a1) se realiza por electroforesis capilar acoplada a fluorescencia inducida por láser.
- 20 12. Un método de seguimiento terapéutico de un tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer de un sujeto que presenta signos de demencia, que comprende las etapas de:
- a1) medición del nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto antes del tratamiento;
- 25 a2) determinación de un primer valor virtual mediante la combinación de los niveles medidos en la etapa a1) aplicando uno de los siguientes algoritmos:

$$V = \frac{[i]}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[i]}{([ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i] + [iii])};$$

$$V = \frac{[iii]}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[iii]}{([i] + [ii])}; \quad V = \frac{([i] + [ii])}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [ii])}{([ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [ii])}{([i] + [iii])};$$

$$V = \frac{([i] + [ii])}{[iii]}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{([ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{([ii] + [i])}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{[ii]}$$

$$V = \frac{([ii] + [iii])}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([ii] + [iii])}{([i] + [iii])}; \quad V = \frac{([ii] + [iii])}{([i] + [ii])}; \quad V = \frac{([ii] + [iii])}{[i]}; \quad \text{o} \quad V = [i] + [ii] + [iii];$$

- 30 en donde V es el valor virtual a determinar e [i] es el nivel de una de dicha dopamina, [ii] es el nivel de dicha adrenalina e [iii] es el nivel de dicha noradrenalina;
- b1) medición del nivel de cada dopamina, adrenalina y noradrenalina en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto durante o después del tratamiento;
- 35 b2) determinación de un segundo valor virtual mediante la combinación de los niveles medidos en la etapa b1) aplicando uno de los siguientes algoritmos:

$$V = \frac{[i]}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[i]}{([ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[ii]}{([i] + [iii])};$$

$$V = \frac{[iii]}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{[iii]}{([i] + [ii])}; \quad V = \frac{([i] + [ii])}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [ii])}{([ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [ii])}{([i] + [iii])};$$

$$V = \frac{([i] + [ii])}{[iii]}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{([ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{([ii] + [i])}; \quad V = \frac{([i] + [iii])}{[ii]}$$

$$V = \frac{([ii] + [iii])}{([i] + [ii] + [iii])}; \quad V = \frac{([ii] + [iii])}{([i] + [iii])}; \quad V = \frac{([ii] + [iii])}{([i] + [ii])}; \quad V = \frac{([ii] + [iii])}{[i]}; \quad \text{o} \quad V = [i] + [ii] + [iii];$$

en donde V es el valor virtual a determinar e [i] es el nivel de una de dicha dopamina, [ii] es el nivel de dicha adrenalina e [iii] es el nivel de dicha noradrenalina;

5

y

c) basándose en el primer y segundo valor virtual determinados respectivamente en las etapas a2) y b2), determinar si dicho sujeto se beneficia de dicho tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer;

o

10

a') medición de un primer nivel global de al menos dos catecolaminas en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto antes del tratamiento;

b') medición de un segundo nivel global de al menos dichas dos catecolaminas en una muestra de fluido biológico de dicho sujeto durante o después del tratamiento; y

15

c') basándose en el primer y segundo nivel global determinados respectivamente en las etapas a') y b'), determinar si dicho sujeto se beneficia de dicho tratamiento contra la enfermedad de Alzheimer.

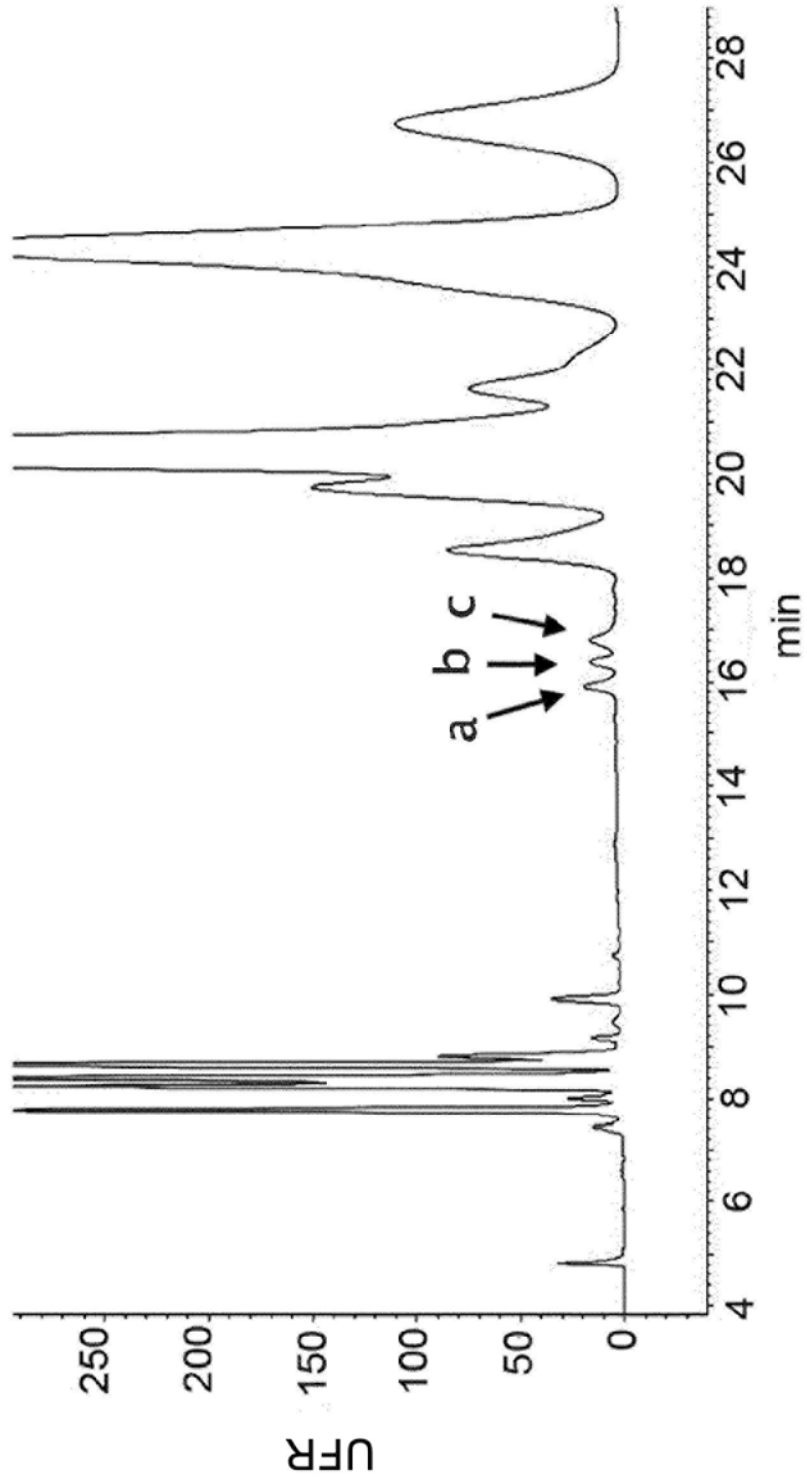


FIG.1

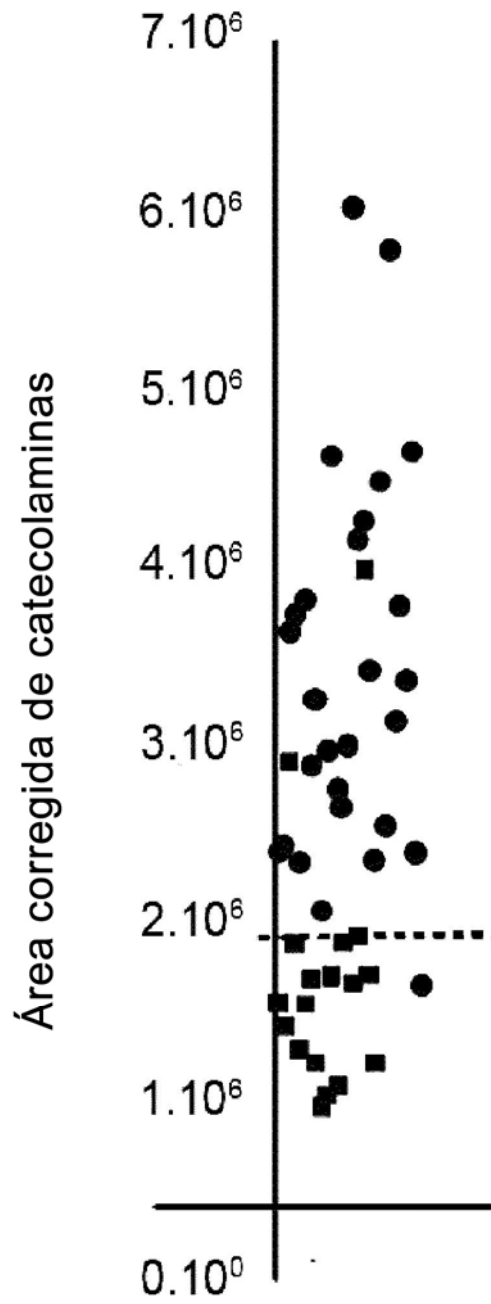


FIG.2

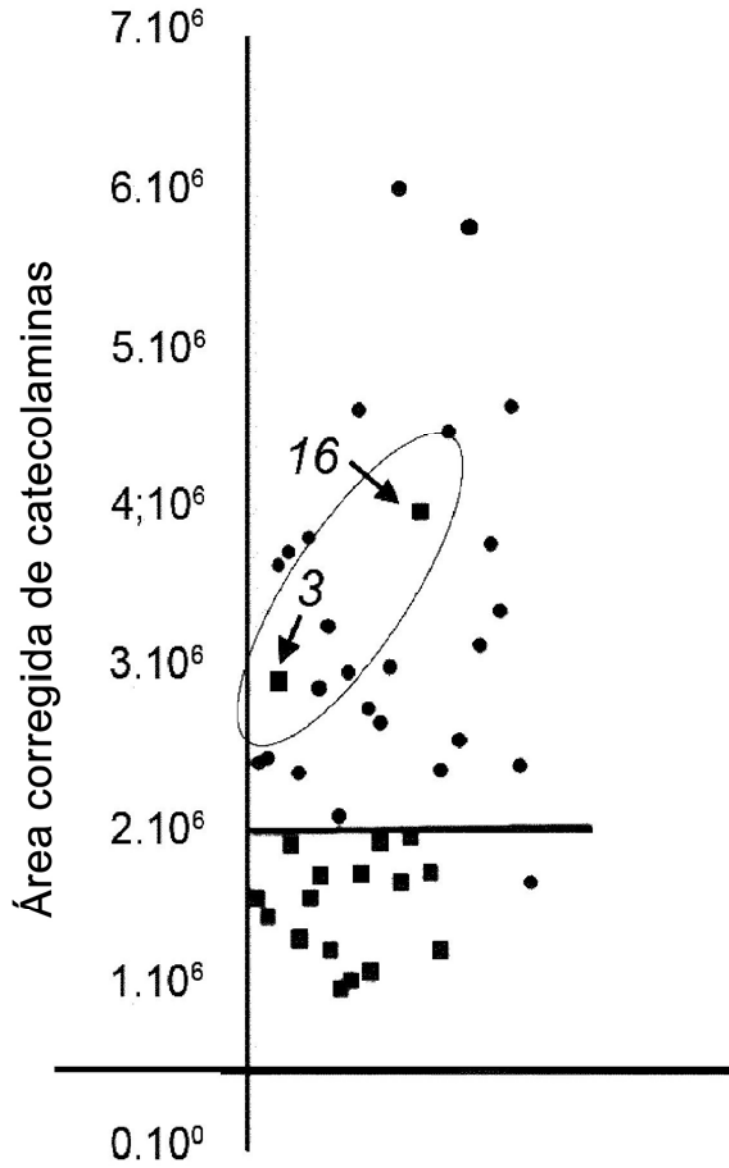


FIG.3

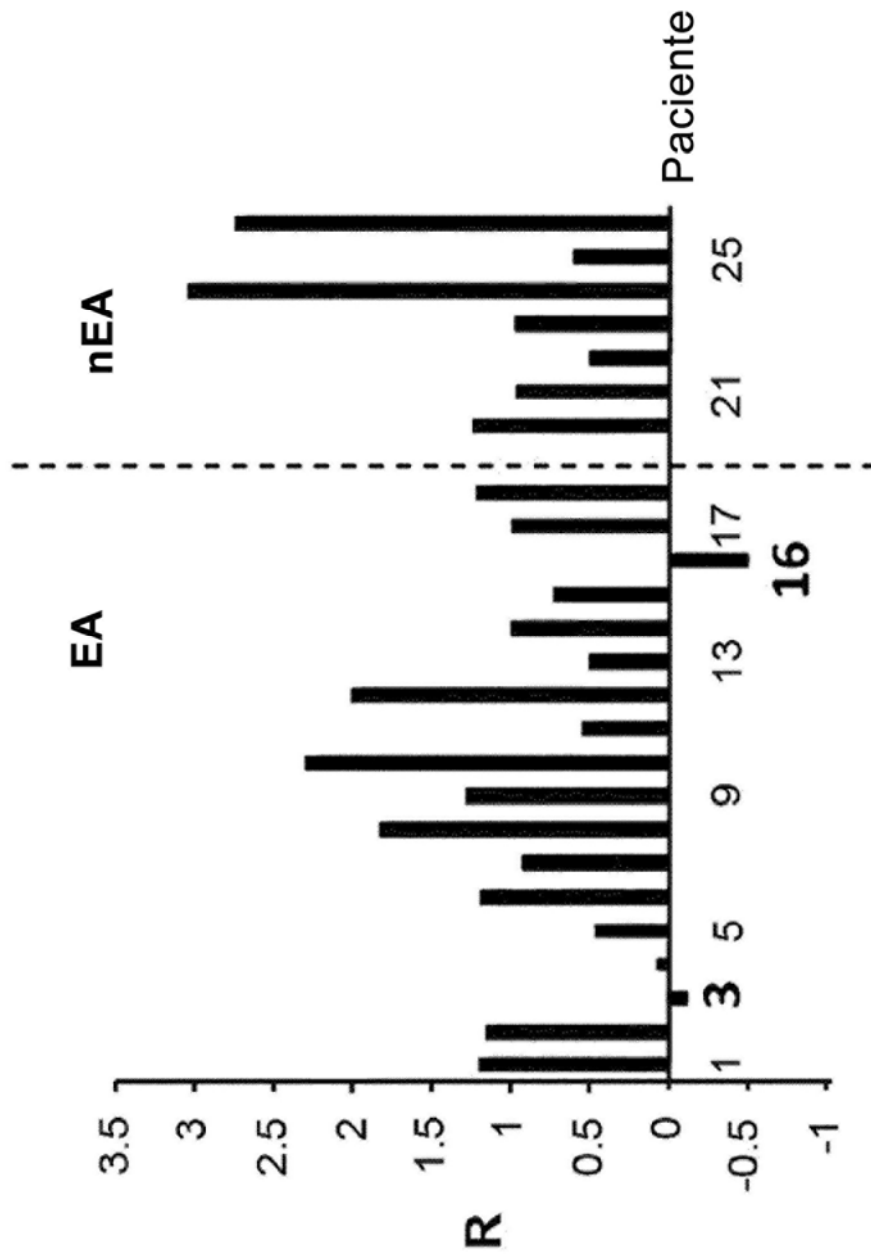


FIG.4



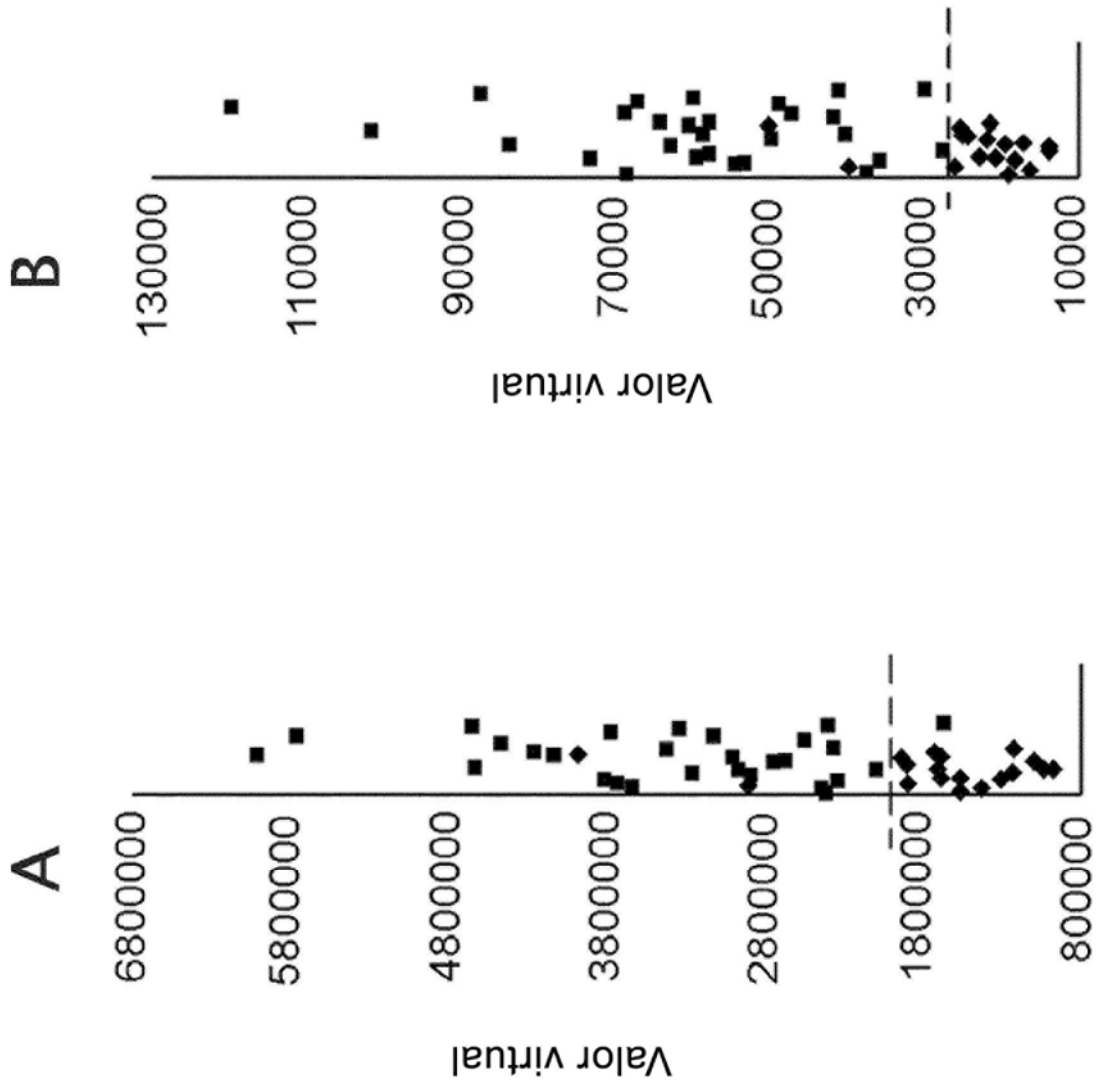


FIG.5

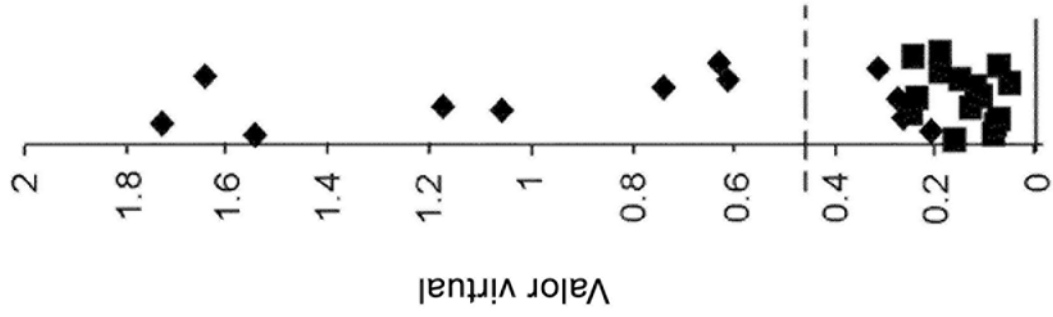
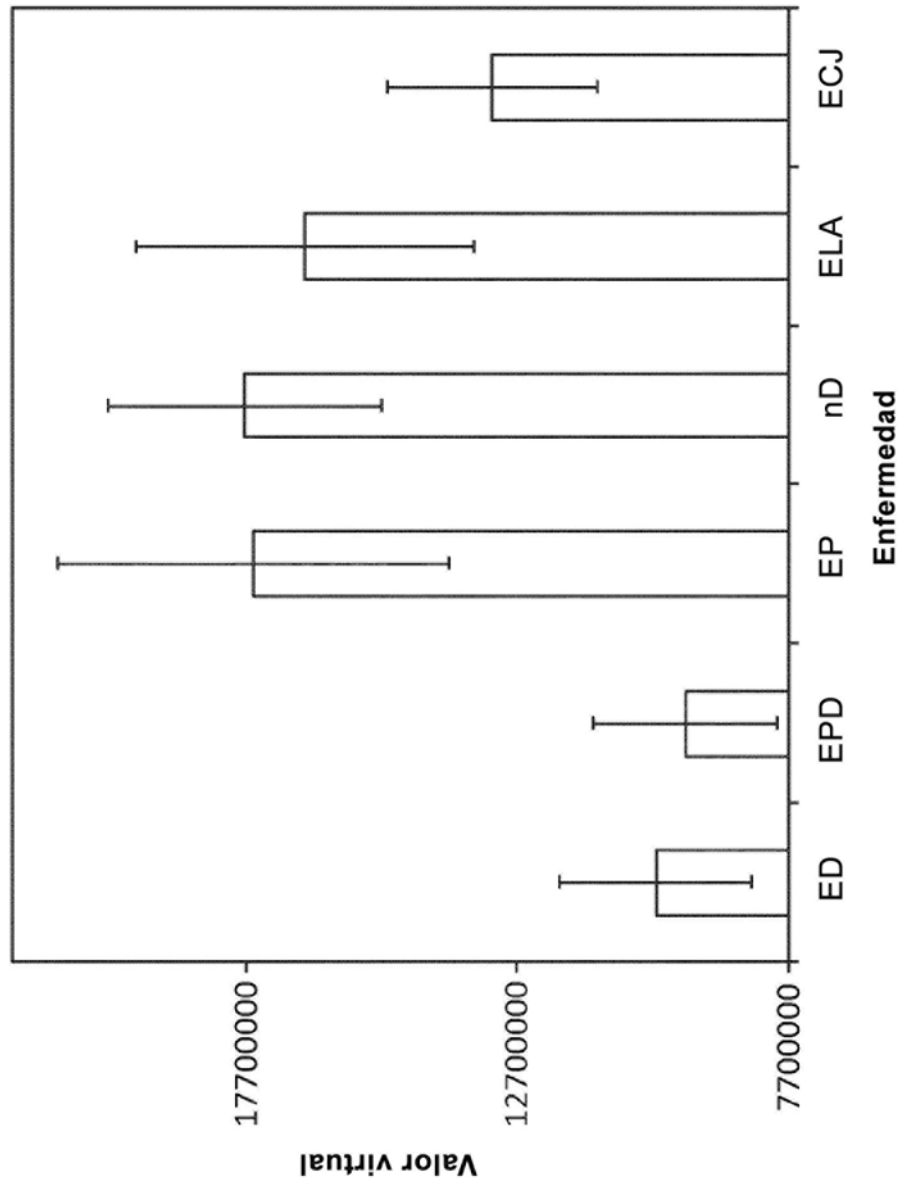
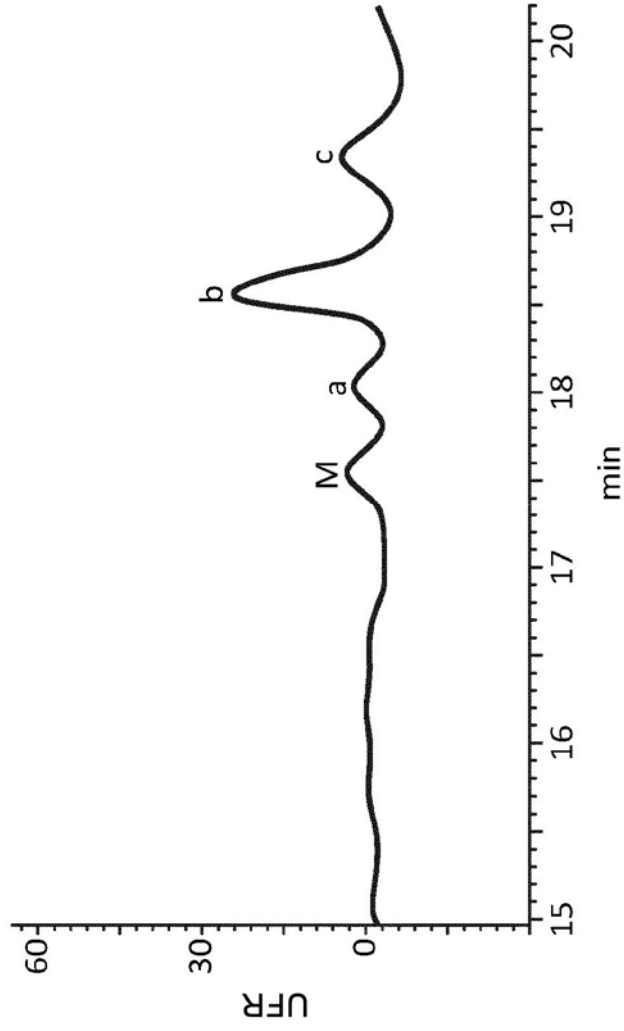


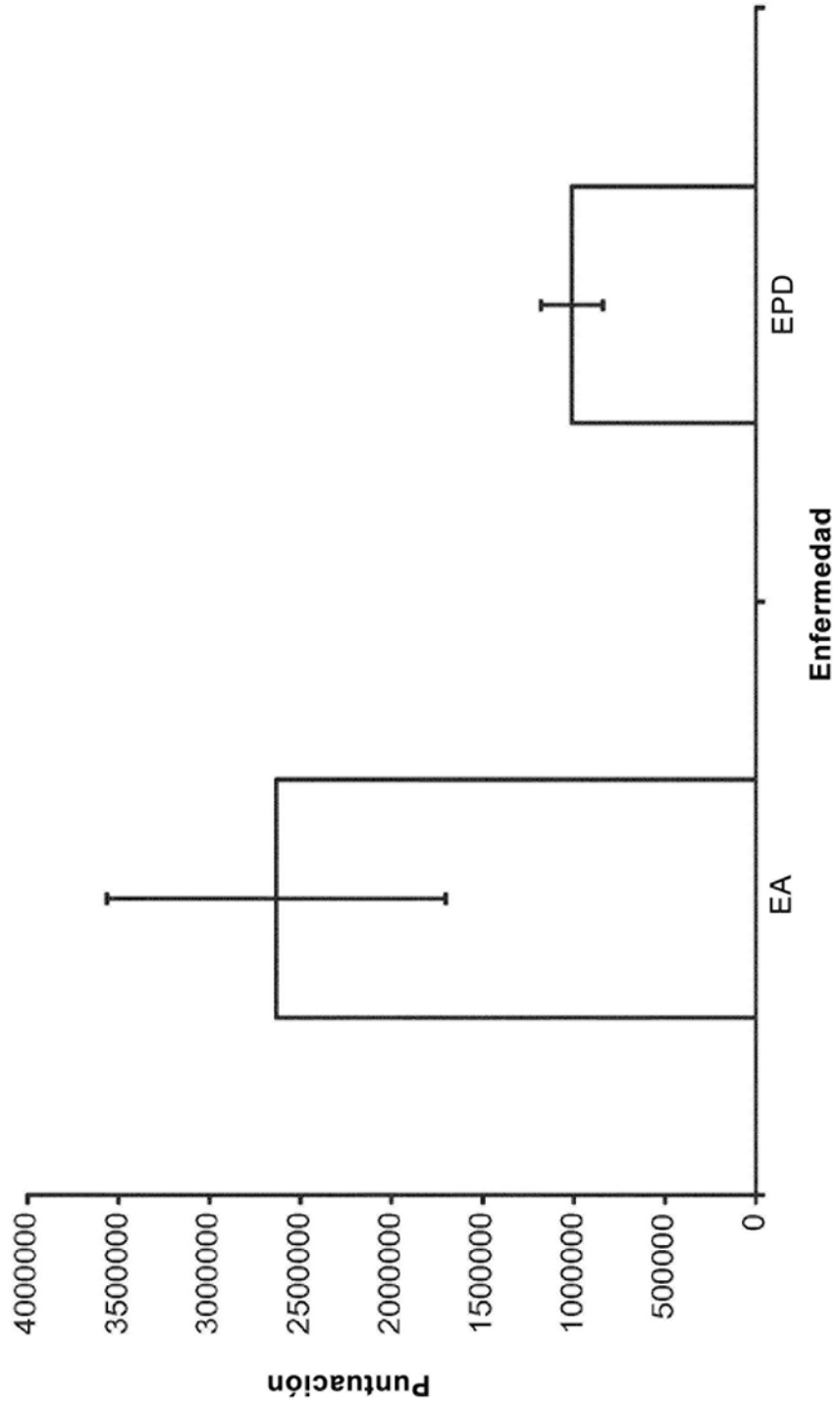
FIG.6

**FIG.7**





**FIG.8**



**FIG.9**