

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 576**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/IB2013/052206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13140349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13720082 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2828660**

54 Título: **Un método y un kit para la detección de anticuerpos anti-beta-amiloides**

30 Prioridad:

20.03.2012 IT RM20120103
02.08.2012 IT RM20120383

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO -
BICOCCA (100.0%)**
Piazza dell'Ateneo Nuovo, 1
20126 Milano, IT

72 Inventor/es:

PIAZZA, FABRIZIO y
FERRARESE, CARLO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 664 576 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un método y un kit para la detección de anticuerpos anti-beta-amiloide

5 La presente descripción se refiere a un método in vitro para la determinación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide y de daño endotelial (mediante la dosificación del biomarcador inhibidor de la ruta del factor tisular, TFPI) en muestras de fluido cerebroespinal.

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

10 La acumulación cerebral y cerebrovascular de un péptido de 4 kDa denominado beta-Amiloide (Abeta) o proteína beta-amiloide, es ampliamente aceptado como el evento neuropatológico clave en la enfermedad de Alzheimer (AD). Las características principales de la AD son, de hecho, placas amiloides, principalmente formadas por agregados Abeta (Abeta40 y Abeta42), y deposición de Abeta a nivel de vasos, también conocida como Angiopatía Amiloide Cerebral, derivada por proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) por beta- y gamma-secretasa.

15 Diversos mecanismos parecen ser responsables de la formación de estas acumulaciones, entre las que se incluyen un mal funcionamiento de los sistemas de eliminación de agregados tóxicos o un mal funcionamiento de los sistemas de defensa celular a nivel cerebral. Las metodologías terapéuticas definidas como "Terapias modificadoras de amiloides (Abeta-DMT)", y en particular las fundamentadas en la inmunización activa y pasiva, se basan precisamente en una posible restauración y potenciación de estos mecanismos.

20 Estímulos fuertes para el uso de estas terapias provienen de evidencias previas en modelos de animales transgénicos, en los que se ha demostrado que la inmunización es capaz de prevenir, y algunas veces de reducir, la presencia de placas de beta-amiloide. Inicialmente, se llevaron a cabo metodologías de inmunización activa en pacientes, mediante la administración de proteína beta-amiloide y, de ese modo, se fomentó una producción endógena espontánea de anticuerpos dirigida contra el antígeno inyectado. Debido a la imposibilidad de monitorizar la producción de anticuerpos en el paciente mediante esta estrategia, además del hecho de que la proteína beta-amiloide se distribuye de forma ubicua en el cuerpo y altamente dishomogénea de un paciente a otro en términos de deposición y niveles circulantes, estos ensayos clínicos se suspendieron en la fase 1 o 2, debido a la aparición de episodios de meningoencefalitis aguda.

25 Gracias a los progresos notables en términos de preparaciones farmacéuticas y gracias al notable avance del conocimiento científico en el campo de la producción y caracterización de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide, la investigación clínicofarmacéutica hoy en día se dedica casi exclusivamente a ensayos clínicos basados en la inyección de anticuerpos humanizados por vía sistémica. Esta técnica de inmunización, denominada "pasiva", conlleva la ventaja de ser capaz de controlar mejor el título de anticuerpos circulantes y de interrumpir hipotéticamente la actividad farmacológica en caso de necesidad.

30 De hecho, a pesar de la mayor seguridad de estas estrategias terapéuticas, persisten algunos riesgos colaterales, entre los cuales el más relevante es el desarrollo de edema vasogénico (VE).

35 En modelos animales, se ha demostrado que estos fenómenos adversos, como el edema vasogénico y la respuesta neuroinflamatoria, están estrictamente relacionados con la dosis terapéutica de los anticuerpos administrados. Realmente, los animales tratados con dosis bajas no mostraron la ocurrencia de los efectos adversos mencionados anteriormente. Además, es de particular interés el hecho de que, al disminuir la dosis terapéutica en animales que comenzaban a mostrar signos de inquietud, los efectos adversos podrían revertirse.

40 Por lo tanto, es esencial poder dosificar los niveles de anticuerpos presentes a nivel cerebral, en el fluido cerebroespinal (CSF), es decir, los niveles de anticuerpos que realmente alcanzan el distrito cerebral y, por lo tanto, tienen un efecto farmacológico central. De ello se deduce que, para poder evaluar efectivamente un aumento de dichos niveles en el CSF, es esencial disponer de una dosis altamente sensible y capaz de detectar también la presencia de los autoanticuerpos espontáneamente presentes en condiciones basales, es decir, antes del tratamiento. Además, gracias a evidencias muy recientes derivadas de estudios clínicos y ensayos farmacológicos, se sabe que conocer la situación exacta del deterioro cerebrovascular en los sujetos que inician la terapia es fundamental, ya que los sujetos con predisposición a daño endotelial o portadores de factores de riesgo cerebrovascular tales como la presencia del haplotipo APOE4 pueden incurrir en un porcentaje del 3% al 5% más alto de VE en desarrollo y, por lo tanto, incluso la muerte.

45 50 55 60 65 Las técnicas comunes que permiten evaluar la deposición de beta-amiloide y la presencia de daño endotelial cerebral son técnicas de generación de imágenes con PET y MRI. Sin embargo, estas técnicas son muy costosas, aún no validadas por completo ni reconocidas en la rutina clínica, requieren personal altamente calificado e instrumentos específicos, no son indicativas de una respuesta biológica real y por lo tanto se usan solo en casos excepcionales y van acompañadas de una investigación fisicoquímica. Además, debe señalarse que estas técnicas no muestran nada con respecto a la concentración de anticuerpos espontáneamente presentes en el CSF

(autoanticuerpos), ni a cuánto han aumentado después del tratamiento o, de nuevo, a su conexión con el deterioro cerebrovascular.

Recientemente, sin embargo, tales evidencias fueron revisitadas y adquirieron aún mayor relevancia después de que el Alzheimer Association Research Workgroup definió el concepto de ARIA, es decir, de "anormalidades en las imágenes relacionadas con amiloide" representadas por el desarrollo de edema vasogénico y/o derrame sulcal (ARIA-E) usando secuencias FLAIR, y señales de deposición de hemosiderina (ARIA H) en secuencias T2 * en gradiente de eco (T2 *-GRE), en pacientes con Alzheimer tratados con el anticuerpo monoclonal bapineuzumab, y posteriormente confirmados también en otros tratamientos, como por ejemplo con semagacestat y solanezumab.

Esto resulta aún más interesante dadas las muchas similitudes compartidas entre el ARIA presente en estos pacientes con AD y una subclase muy específica de pacientes que padecen inflamación relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (CAA-ri), en la que un mecanismo autoinmune específico por autoanticuerpos contra la proteína beta-amiloide parece ser la base del mecanismo etiopatogénico y la aparición de ARIA en estos sujetos. Sin embargo, debe destacarse que, hasta la fecha, los mecanismos patogénicos subyacentes al ARIA, tanto en AD como en CAA-ri, aún se desconocen en gran parte. Hasta la fecha, un diagnóstico firme de CAA-ri, esencial para un tratamiento correcto de fases agudas, solo es posible con biopsia cerebral, es decir, mediante una investigación muy invasiva y arriesgada para el paciente, dada la mayor propensión al sangrado característico de la patología, y una investigación precisa por RMN. Si los autoanticuerpos resultan ser el mecanismo real que caracteriza la fase aguda de la enfermedad y se correlacionan directamente con su concentración en el CSF, obviamente, por lo tanto, se podría utilizar una herramienta de diagnóstico alternativa mucho menos arriesgada e invasiva para el diagnóstico de CAA-ri.

En cuanto a la dosificación de anticuerpos dirigidos contra la proteína beta-amiloide, hasta la fecha hay solo un estudio en la literatura (Du Y et al.), publicado en 2001 en la revista Neurology, que describe un método para la dosificación plasmática de autoanticuerpos (es decir, los que se presentan naturalmente en el plasma) dirigido contra la proteína Abeta40. Este método se basa exclusivamente en una mera metodología ELISA y representa todo el único método que se puede encontrar en la literatura para la dosificación del título de anticuerpos contra la proteína Abeta en el plasma de pacientes que padecen de AD y del síndrome de Down.

Hasta la fecha, sin embargo, las evidencias netas que indican la distribución exacta del título de anticuerpos en plasma en sujetos con AD en comparación con la población sana siguen siendo pocas y no muy claras. De hecho, el título plasmático de la proteína anti-Abeta de autoanticuerpos parece disminuir de acuerdo con algunos (Du Y y col., Weksler ME y col., Song MS y col.), no varían según otros (Hyman BT et al., Baril L et al.), o incluso aumentó de acuerdo con otros (Nath A et al.).

Esto es ciertamente verdadero y se destacó en lo que respecta a la dosificación de autoanticuerpos a nivel de CSF (Du Y et al.). De hecho, a pesar de que en plasma el título de anticuerpos es suficientemente alto para dosificarse de forma relativamente directa, el método descrito por Du Y et al. es casi inútil para la dosificación en el CSF, en el que los autoanticuerpos están presentes a una concentración extremadamente baja y, por lo tanto, no dosificables con suficiente sensibilidad y fiabilidad por la metodología ELISA utilizada por Du Y et al. En la sección de discusión de los dos títulos de Du Y et al., los mismos autores especifican que podrían aislar y purificar los anticuerpos solo a partir de plasma y no de CSF, ya que se necesitaría una cantidad demasiado grande.

En la solicitud de patente WO2011009435 se describe un método ELISA para la detección de autoanticuerpos en muestras de plasma y también de CSF, aunque no informa de datos que resalten la mayor sensibilidad de este método en comparación con el descrito en la técnica anterior para la dosificación en el CSF.

La solicitud de patente internacional WO2010128139 describe un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (AD) en un sujeto, que comprende: (a) determinar, en una muestra derivada de un fluido corporal de dicho sujeto, la cantidad de anticuerpos capaces de unirse a la isoforma específica pGLU del péptido $\alpha\beta$ -amiloide; y (b) comparar la cantidad de dichos anticuerpos con una cantidad de referencia; en el que la cantidad de dichos anticuerpos en comparación con la cantidad de referencia es indicativa de que el sujeto se ve afectado por AD.

En cuanto a la dosificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en muestras de CSF, el problema principal sigue siendo la muy baja concentración de autoanticuerpos presentes, valores tan bajos que es demostrable que todos están comprendidos entre cero, es decir, blanco, y el primer punto del estándar de la curva de calibración, es decir, se confunden fácilmente con el ruido de fondo. Sin embargo, es relevante la evidencia de que, a pesar del compromiso masivo de la industria farmacéutica y de la investigación en general para identificar anticuerpos terapéuticos cada vez más efectivos y seguros, se sabe muy poco o nada sobre la concentración de autoanticuerpos que se produce espontáneamente a nivel cerebral en pacientes con AD y CAA en general. El razonamiento perseguido hasta la fecha ha sido el de asumir una menor presencia de anticuerpos en pacientes con AD; por lo tanto, la atención se ha centrado únicamente en la administración exógena, por vía sistémica, de anticuerpos terapéuticos capaces de demostrar una ralentización de la patología. Hasta la fecha, tales evidencias solo son respaldadas por la demostración de que en los modelos con AD en animales, tales terapias realmente disminuyen la deposición de Abeta a nivel cerebral. Sin embargo, debido a la dificultad técnico-experimental en la dosificación de

autoanticuerpos, presente en una concentración muy baja al nivel de CSF, todavía no se sabe con exactitud si los sujetos con AD exhiben realmente un título disminuido de anticuerpos antes de la terapia y, sobre todo, no se conoce cuántos anticuerpos terapéuticos realmente logran pasar la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, tener un efecto terapéutico en el distrito cerebral, o, una vez más, cuál es su tendencia de concentración durante la administración terapéutica, o incluso más importante, cuál es su concentración durante la aparición de las anomalías radiológicas (ARIA). Lo mismo se aplica a la concentración de CSF de anticuerpos producidos de forma natural durante la fase aguda de CAA-ri y después de la terapia inmunosupresora, siguiendo una resolución clínicorradiológica de los síntomas en la fase de remisión.

Por lo tanto, se percibe altamente el problema de proporcionar un método para dosificar con una alta sensibilidad la concentración de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide presente en muestras de CSF se siente mucho.

RESUMEN DE LA INVENCION

El método de la presente invención se basa en la selección y desarrollo de una etapa de concentración de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide presentes originalmente en una muestra de líquido cefalorraquídeo y en la posterior detección de los anticuerpos concentrados en un ensayo inmunoenzimático o un radioinmunoanálisis.

Los inventores han descubierto que con microperlas magnéticas, revestidas adecuadamente con una macromolécula capaz de unirse a anticuerpos dirigidos contra la proteína beta-amiloide, se obtiene una muestra concentrada a partir de la cual es posible detectar cuantitativamente la concentración de anticuerpos presentes en la muestra de partida, incluso cuando esta concentración es extremadamente baja. Los inventores han demostrado que el paso de concentrarse en microperlas determina un aumento en la sensibilidad del ensayo inmunoenzimático o radioinmunoensayo utilizado para determinar la concentración de anticuerpos. Las microperlas, al ser magnéticas, pueden eliminarse fácilmente con un imán, por lo que no dejan volúmenes muertos que puedan causar la pérdida de una muestra.

También se han desarrollado etapas particularmente efectivas del método descrito en este documento, que se describirán en profundidad en la descripción detallada de la invención.

Mediante el método de la presente invención, por primera vez en el estado de la técnica, podría dosificarse la concentración real de anticuerpos presentes en el CSF de sujetos en tratamiento con terapias de inmunización activa y/o pasiva, y de Abeta-DMT en general, permitiendo así un control más efectivo de la terapia y para prevenir la aparición de ARIA en el paciente; sin embargo, también podría dosificarse la concentración de anticuerpo que se produce espontáneamente en el CSF de los pacientes candidatos para una posible terapia, como una exploración preterapéutica y/o de diagnóstico, de acuerdo con una personalización terapéutica mejorada.

Un primer objeto de la presente invención es un método in vitro para la detección de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en una muestra de fluido cerebroespinal de acuerdo con la reivindicación 1.

Un objeto adicional de la presente invención es un método in vitro para monitorizar un tratamiento de inmunización activo y/o pasivo de la enfermedad de Alzheimer, a partir de una muestra de CSF de un paciente que lo padece, que comprende los pasos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Aun otro objeto de la presente invención es un método in vitro para el diagnóstico de la angiopatía amiloide cerebral (CAA) y de la inflamación, autoinmunidad y edema vasogénico relacionados con CAA (CAA-ri) de una muestra de CSF de un paciente que comprende los pasos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Otro objeto más de la presente invención es un método in vitro para el diagnóstico o la monitorización terapéutica de anomalías radiológicas (ARIA) de una muestra de CSF de un paciente que comprende las etapas del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un paso adicional de comparar la concentración determinada de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide con un valor de referencia estándar.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la etapa a) de concentrar la muestra de acuerdo con una realización del método de la presente invención.

Figura 2. Representación esquemática de la etapa b) de análisis de la muestra mediante ensayo con inmunoenzimas de acuerdo con una realización del método de la presente invención.

Figura 3. Presenta una comparación entre los valores de Absorbancia (OD) encontrados al analizar tres clones de anticuerpos diferentes disponibles comercialmente contra Abeta (clon G2-11, distribuido por The Genetics Company; clones 6E10 y 4G8, distribuidos por Covance), a la misma concentración conocida de 0.25 µg/ml, sin realizar ninguna concentración con microperlas magnéticas. En la columna del lado izquierdo, se presentan los valores de OD para los tres anticuerpos comerciales ensayados mediante el procedimiento de ELISA descrito en el estado de la

técnica. La columna del lado derecho presenta los valores OD que se pueden obtener con nuestro nuevo método ELISA. Como anticuerpo secundario, una IgG antihumana conjugada con Hrp producida en cabra, (anticuerpo anti-IgG humana (molécula completa) -Peroxidasa producida en cabra, SIGMA # A8667), o proteína A conjugada con Hrp (proteína A, conjugada con Hrp, Millipore # 18-160).

5
 10
 15
 Figura 4a. Curva de calibración. Resultados obtenidos con el procedimiento ELISA descrito en el estado de la técnica (estándares utilizados sin pre-enriquecimiento), utilizando, a diferencia de lo enseñado en el estado de la técnica, el anticuerpo G2-11 como anticuerpo para la curva de calibración, y como anticuerpo secundario una IgG antihumana conjugada con Hrp, producida en cabra (Conti et al 2010). Se puede ver que la curva de calibración con el método en el estado de la técnica no era lo suficientemente sensible y precisa para la dosificación de muestras de CSF, tanto para muestras no tratadas como para CSF concentrado con microperlas de acuerdo con el método descrito por los inventores. De hecho, se puede observar que las muestras de CSF demuestran un valor de OD muy bajo, que cae dentro de los puntos de la curva de calibración comprendida entre cero (blanco) y el primer punto de la curva, es decir, totalmente no mensurable en términos prácticos.

20
 25
 30
 35
 40
 45
 Figura 4b. Curva de calibración. Resultados obtenidos utilizando como anticuerpo para la curva de calibración el anticuerpo 4G8 y como anticuerpo secundario la Proteína A conjugada con Hrp (los estándares de la curva siempre se utilizaron sin preenriquecimiento) pero con una selección particular y combinación de reactivos para la detección implementada por los inventores y no descrita en el estado de la técnica. La figura muestra cómo la selección del clon 4G8 + protA-HRP tiene una mayor sensibilidad en comparación con el método descrito en el estado de la técnica, sobre todo para aquellos valores de concentración de los estándares muy bajos y que han demostrado ser inutilizables en el estado de la técnica. Además, se presentan los valores típicos que pueden obtenerse analizando muestras de CSF obtenidas de pacientes que padecen AD, CAA-ri y controles. Se puede observar que para los 3 casos que se muestran, la DO está perfectamente comprendida dentro del rango de linealidad de la curva estándar.

Figura 4c. Concentración típica de estándares de calibración y valores de absorbancia (OD) relacionados. Se muestran resultados típicos, obtenidos con:

- 1) Procedimiento ELISA descrito en el estado de la técnica (G2-11 + IgG-HRP anti-humana, Conti et al., 2010)
- 2) Procedimiento de ELISA implementado por los inventores (4G8 + protA-HRP)

Como de costumbre, los estándares no se someten a ningún proceso de enriquecimiento con perlas magnéticas.

35
 40
 45
 50
 55
 La Figura muestra cómo, para una curva de calibración típica, nuestro novedoso método ELISA resulta ser ultrasensible en el rango de detección esperado para la cuantificación de anticuerpos anti-Abeta en el SCF (entre 0.14 y 0.04 µg/mL). Además, se muestra cómo, en comparación con el antiguo método ELISA descrito en el estado de la técnica con el anticuerpo G2-11, a la misma concentración de 0.134 µg/mL, el valor de DO detectable con nuestro nuevo método ELISA es 1.072, en comparación con el 0.142 detectable con el método de ELISA descrito en el estado de la técnica. Esto demuestra cómo nuestro nuevo método es unas 10 veces más sensible a dichos valores de concentración. Además, se observa que para todos los patrones con una concentración inferior a 0.134 µg/mL, el método anterior no pudo discriminar ningún valor desconocido del blanco.

Figura 5. Dosificación de TFPI en muestras de CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD) en comparación con controles sanos (CTL) y otros pacientes con patología neurodegenerativa sin componente vascular (controles neurodegenerativos). Los resultados se obtuvieron modificando el procedimiento experimental descrito en Quantikine Human TFPI ELISA KIT - R & D Systems. En particular, el protocolo proporcionado por la compañía fabricante se ensayó y modificó para utilizar el KIT también para la dosificación en el CSF (la descripción del método usado está en la sección EJEMPLOS, Ejemplo 7). Como se puede observar en la figura, los valores de TFPI en el CSF de 44 pacientes con AD demostraron un aumento significativo en comparación con un grupo de 30 controles sanos y 5 sujetos que padecen una patología neurodegenerativa como la esclerosis lateral amiotrófica, una patología para la que no se informa de asociación con daño cerebrovascular.

Figura 6. Marco de Resonancia Magnética Nuclear de un paciente CAA-ri (caso 6); cerebro MRI FLAIR de corona, muestra lesiones bilaterales de materia blanca subcortical durante la fase aguda de la enfermedad (A), reduciendo después de 3 meses con remisión espontánea de los síntomas (B); indica MR cerebral con sesiones axiales de secuencias en estrella T2 o de eco de gradiente (C) detecta la presencia de microhemorragias múltiples y bilaterales en la materia blanca (flechas). No se observó una mejora del contraste después de la inyección de gadolinio (datos no mostrados).

Figura 7. Evidencia neuropatológica en el análisis bióptico del lóbulo temporal derecho, caso # 6. Las tinciones de H & E (A, D) y Masson tricrómico (B) muestran un engrosamiento del lecho vascular leptomeníngeo y parenquimal, con reducción del lumen. Además, las infiltraciones linfomonocíticas se destacaron en el espacio perivascular y en el engrosamiento del lecho vascular (CD45 inmunotinción, F). El material emergido del lecho vascular demostró ser intensamente inmunorreactivo para la proteína Aβ (anticuerpo monoclonal 4G8, C) con propiedades ópticas y tinción

típica de la proteína amiloide (fluorescencia amarilla después del tratamiento con tioflavina S, E). Los anticuerpos anti-A β detectaron además numerosos depósitos difundidos en el neuropilum cortical (4G8, flecha, C), en ausencia de cambios neurofibrilares (datos no mostrados). Además, se encontraron astrogliosis severa y activación microglial en la corteza cerebral y en la materia blanca subcortical.

5 Barra representada en A = 50 μ m. Todas las demás figuras tienen el mismo grado de aumento. D, E y F se realizaron en secciones adyacentes.

Figura 8. Concentración de anticuerpos anti-A β en el CSF

10 A) Concentración de autoanticuerpos anti-A β en el CSF de sujetos sanos (CTL, n = 25), angiopatía amiloide cerebral (CAA, n = 8), esclerosis múltiple (MS, n = 14), inflamación relacionada con CAA durante la fase aguda (apCAA-ri, n = 10) y CAA-ri en la fase de remisión (rpCAA-ri, n = 7). * p <0.0001 apCAA-ri frente a CTL y MS. § p <0.0025 apCAA-ri vs CAA. # p <0.0006 apCAA-ri vs rpCAA-ri. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

15 B) Representación caso por caso de la tendencia de los anticuerpos antes y después de la fase de remisión de los síntomas en pacientes apCAA-ri y rpCAA-ri (p = 0.0009). Los casos 6 y 8 se muestran en la figura y representan los 2 pacientes en los que se observó una remisión espontánea de los síntomas sin ningún tratamiento farmacológico.

20 Figura 9. Reducción progresiva a lo largo del tiempo de los anticuerpos anti-A β en el CSF de un paciente CAA-ri (caso 5) después de cada inyección intravenosa (flechas) y durante el tratamiento oral (línea) con esteroides, hasta alcanzar valores promedio que se pueden encontrar en controles sanos (las líneas de puntos representan el valor promedio y el 95% del valor medio superior e inferior que se puede encontrar en sujetos de control sanos).

25 Figura 10. Concentración de A β 40, A β 42, tau y P-181 tau y progresión relacionada de niveles en el CSF de pacientes que sufren inflamación relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (CAA-ri, n = 7) durante la fase aguda (apCAA-ri) y después de la fase de remisión de los síntomas (rpCAA-ri). A) A β 40 (p = 0.009, apCAA-ri frente a rpCAA-ri, p = 0.032 rpCAA-ri frente a CTL), B) A β 42 (p = 0.015, apCAA-ri frente a rpCAA-ri; p = 0.002, rpCAA-ri frente a CTL), C) tau (p = 0.004, apCAA-ri frente a rpCAA-ri; p = 0.012, apCAA-ri frente a CTL) y D) P-181 tau (p = 0.007, apCAA-ri frente a rpCAA-ri; p = 0.044, apCAA-ri frente a CTL). Los casos 6 y 8 están indicados en la figura y representan los 2 pacientes en los que se observó una remisión espontánea de los síntomas sin ningún tratamiento farmacológico (las líneas discontinuas representan el valor medio y el 95% del valor medio superior e inferior que se puede encontrar en sujetos de control sanos).

35 Figura 11. Demostración de la existencia de una fuerte correlación entre anticuerpos anti-A β y valores de licor (CSF) de A β 40 (A, Pearson r = 0.85, p = 0.002) y A β 42 (B, Pearson r = 0.65, p = 0.042) en la población total de 10 apCAA-ri. Las líneas continuas y discontinuas representan la línea de regresión y el intervalo de confianza del 95%, respectivamente).

40 Figura 12. Valores de CSF de TFPI. Leyenda: concentración de TFPI en el CSF de sujetos sanos, angiopatía amiloide cerebral (CAA, n = 8), Esclerosis Lateral Amiotrófica (OND) e inflamación relacionada con CAA (CAA-ri, n = 10). * p <0.0001 CTL vs CAA-ri, CAA y AD. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

45 Figura 13. Valores de CSF de tau, P-181 tau y análisis de correlación relacionado con los valores de TFPI. Leyenda: Valores de tau y P-181 tau en el CSF de pacientes con AD y controles sanos (cuadros superiores). Los recuadros inferiores informan las correlaciones surgidas entre la concentración de CSF de TFPI y de tau y P-181 tau (p <0.0051, r = 0.47, p <0.0041, r = 0.49, respectivamente).

50 Figura 14. Tendencia de los valores de TFPI en el CSF de los pacientes durante apCAA-ri y rpCAA-ri. Leyenda: representación caso por caso de la tendencia del TFPI del CSF antes y después de la fase de remisión de los síntomas en pacientes apCAA-ri y rpCAA-ri (p = 0.01). (Las líneas punteadas representan el valor medio y el 95% del valor medio superior e inferior que se puede encontrar en sujetos de control sanos).

55 Figura 15. Como se muestra en la Figura, los niveles de anticuerpos anti-A β presentes en el CSF de pacientes con Alzheimer se evaluaron mediante el método de la presente invención, observando que los pacientes portadores del factor de riesgo genético ApoE epsilon4 (portadores APOE4) tienen una mayor concentración fisiológica de autoanticuerpos (12.84 ng/mL \pm 21.23) en comparación con los portadores NON-APOE4 (2.874 ng/mL \pm 3.063; p <0.001), en apoyo de una mayor predisposición por parte de los portadores de APOE4 para desarrollar ARIA, tanto espontáneamente como después de la administración de Abeta -DMT.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona por primera vez un método de alta sensibilidad destinado a la detección de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en una muestra de fluido cerebroespinal.

65

Para los fines de la presente descripción, por "anticuerpo contra proteína beta-amiloide" se entiende cualquier anticuerpo que sea capaz de unirse selectivamente a cualquier porción de la proteína beta-amiloide, en la literatura también denominada Abeta, o isoformas de la misma, como, por ejemplo, Abeta40, Abeta42, Abeta43, o cualquier posible forma truncada, racémica o isomérica de los mismos (p. Ej., Abeta11-42, Abeta17-42, Abeta9-42, Abeta1-28, Abeta25-35, Abeta10-20, o más en general AbetaX-40 o AbetaX-42) o sus respectivos diversos monómeros, dímeros u oligómeros, formas solubles, insolubles, fibrilares o protofibrilares.

Los anticuerpos detectados podrían ser autoanticuerpos, es decir, anticuerpos producidos por el sistema inmune del paciente del que se ha recogido el fluido cerebroespinal, o anticuerpos no producidos por el sistema inmune del paciente, como, por ejemplo, anticuerpos para uso terapéutico administrados al paciente (como, por ejemplo, Solanezumab, Ponezumab, Bapineuzumab, Gantenerumab, BAN2401, BIIB037, inmunoglobulinas administradas por vía intravenosa (IVIG) tales como Gammagard, Octagam, Newgam). Por lo tanto, los anticuerpos detectados podrían ser tanto endógenos como exógenos.

La muestra de líquido cefalorraquídeo (también conocida como licor, fluido cefalorraquídeo, fluido raquídeo-espinal, fluido (líquido) cefalorraquídeo o con el acrónimo CSF) que se analizará podría obtenerse según las diversas técnicas comúnmente utilizadas para la recolección de CSF. El método de acuerdo con la invención, como ya se anticipó, comprende dos etapas a) y b), respectivamente, de concentrar la cantidad de dichos anticuerpos de la muestra de CSF con microperlas magnéticas recubiertas con macromoléculas capaces de unirse a dichos anticuerpos, y de analizar la muestra concentrada obtenida por ensayo inmunoenzimático o por radioinmunoensayo.

a) Etapa de concentración con microperlas magnéticas

Las microperlas magnéticas adecuadas para el método descrito aquí podrían ser partículas uniformes, típicamente de 0.5 a 500 µm de diámetro, cuya superficie está recubierta con macromoléculas capaces de unirse a anticuerpos dirigidos contra la proteína beta-amiloide, como por ejemplo proteína G, proteína A, biotina, estreptavidina, cualquier porción de la proteína Abeta y/o isoformas de la misma, como por ejemplo Abeta40, Abeta42, Abeta43, o cualquier posible forma truncada, racémica o isomérica de los mismos (por ejemplo, Abeta11-42, Abeta17-42, Abeta9-42, Abeta1-28, Abeta25-35, Abeta10-20, o más en general AbetaX-40 o AbetaX-42) o sus respectivos diversos monómeros, dímeros u oligómeros, formas fibrilares o protofibrilares solubles o insolubles.

El recubrimiento de las microperlas con las macromoléculas podría llevarse a cabo mediante adsorción o conjugación, como sabe el técnico en el campo.

Tipos de microperlas adecuadas son, por ejemplo, Invitrogen Dynal AS Dynabeads Proteína G, Proteína A o Proteínas A/G, perlas MagSi-Proteína A y/o Proteína G, perlas Millipore Magnetic, perlas Miltenyi Biotec MACS® Technology, o cualquier otro tipo de perlas magnéticas con las mismas características descritas anteriormente y que pueden utilizarse tanto con procedimientos manuales como con todas las plataformas robotizadas y automatizadas posibles (por ejemplo, producidas y/o comercializadas por Beckmann®, Tecan®, IDS®, Xyriil®, Stratek®, Hamilton®, Roche®, PerkinElmer®, etc.).

En una realización de la invención, como perlas también pueden usarse perlas de agarosa A/G o perlas de sefarosa, que sin embargo no pueden usarse fácilmente en plataformas automatizadas y que podrían dar un menor rendimiento de concentración con posible pérdida de alguna parte de la muestra.

En una realización, un volumen de al menos 200 µl, por ejemplo 400 o 500 µl de muestra de CSF por analizar, se adsorbe sobre las microperlas, por ejemplo incubando bajo agitación en un mismo tubo de ensayo la muestra y una cantidad adecuada de microperlas (por ejemplo, 75 µl) durante un período de tiempo adecuado para unir los anticuerpos presentes en la muestra a las microperlas, (por ejemplo, 30, 40, 50, 60 minutos).

Después de la etapa de adsorción, el tubo de ensayo que contiene la muestra y las microperlas se coloca cerca de un imán para poder descartar el sobrenadante con técnicas convencionales, como por pipeta o succión, sin perder el sustrato de interés, o por automatización y plataformas robotizadas. El sobrenadante podría almacenarse y utilizarse como material de control en el posterior ensayo inmunoenzimático o radioinmunoensayo.

En general, las etapas de adsorción de la muestra en las microperlas y de descartar el sobrenadante podrían estar precedidas y/o seguidas por uno o más lavados de las microperlas con un regulador de lavado, como por ejemplo PBS + Tween según técnicas convencionales.

Después de descartar el sobrenadante y, cuando se desee, de haber lavado adecuadamente las microperlas, los anticuerpos unidos podrían eluirse de las microperlas con un regulador de elución adecuado, por ejemplo cuando sea necesario liberar epítomos adecuados para la posterior detección de anticuerpos.

En el caso de que las microperlas se recubran con proteína A o proteína G, el regulador de elución se puede hacer de un volumen comprendido entre 30 y 50 µl de citrato 0.1 M a pH 3.2. Al eluir la muestra, el pH ácido se neutralizará fácilmente con un regulador básico concentrado (por ejemplo, tris base 1M, pH 9). La adición del

regulador de neutralización es importante para evitar que el pH ácido utilizado en la fase de elución pueda desnaturalizar los anticuerpos dirigidos contra la proteína beta-amiloide de los que se va a determinar la concentración, o crear artefactos de los mismos que puedan generar falsos positivos durante el posterior ensayo inmunoenzimático.

5 En una realización alternativa, en el que las microperlas están recubiertas con proteína beta-amiloide y/o isoformas de las mismas, como por ejemplo Abeta40, Abeta42, Abeta43, o cualquier posible forma truncada, racémica o isomérica de los mismos (por ejemplo, Abeta11-42, Abeta17-42, Abeta9-42, Abetal-28, Abeta25-35, Abeta10-20, o más en general AbetaX-40 o AbetaX-42) o sus respectivos diversos monómeros, dímeros u oligómeros, formas fibrilar o protofibrillar solubles o insolubles) y, por lo tanto, se unirán específicamente solo a los anticuerpos anti-proteína beta-amiloide contenidos en la muestra de CSF a analizar, las microperlas podrían se puede utilizar directamente en la siguiente etapa de análisis con inmunoenzima o radioinmunoanálisis, evitando la etapa de elución y, por lo tanto, con un método más rápido, más sensible y menos costoso.

15 La muestra concentrada con las microperlas magnéticas (eluidas o no eluidas por la misma) se someterá posteriormente a una segunda etapa de b) análisis mediante ensayo inmunoenzimático o radioinmunoensayo.

Análisis por ensayo inmunoenzimático

20 En la realización en la que en la etapa a) se realiza la elución como se describió anteriormente, dicho ensayo inmunoenzimático proporciona las siguientes etapas:

I) proporcionar una fase sólida recubierta con proteína beta-amiloide;

25 dicha fase sólida podría ser una fase sólida utilizada convencionalmente en ensayos inmunoenzimáticos o en inmunoensayos, como, por ejemplo, una microplaca en la que los pozos están recubiertos con la proteína beta-amiloide como se definió anteriormente, bloqueados adecuadamente para evitar el ruido de fondo con métodos también convencionales, como por tratamiento con una solución de regulador fosfato (pH 7.4) con albúmina bovina al 1%, 5% de suero y 0.05% Tween.

30 El tiempo de incubación de la solución de bloqueo será fácilmente identificable por el técnico medio en el campo y podría, por ejemplo, ser de aproximadamente 30, 40, 50, 60, 90 minutos. Para eliminar el material no unido, la fase sólida se puede enjuagar una vez o más con reguladores de lavado convencionales adecuados, como PBS + Tween al 0.05%.

35 II) incubar dicha fase sólida con el material concentrado obtenido de la etapa a);

40 en la etapa II) la muestra concentrada con las microperlas magnéticas se agregará a la fase sólida, permitiendo así la unión de los anticuerpos a la proteína beta-amiloide y/o isoformas de la misma como, por ejemplo, Abeta40, Abeta42, Abeta43, o cualquier posible forma truncada, racémica o isomérica de los mismos (por ejemplo, Abeta11-42, Abeta17-42, Abeta9-42, Abeta1-28, Abeta25-35, Abeta10-20, o más en general AbetaX-40 o AbetaX-42) o sus respectivos diversos monómeros, dímeros u oligómeros, formas fibrilar o protofibrillar solubles o insolubles) en la fase sólida. El tiempo de incubación será fácilmente identificable por el técnico medio en el campo y podría, por ejemplo, ser de aproximadamente 30, 40, 50, 60 minutos, hasta una incubación también durante la noche. Para eliminar el material no unido, la fase sólida se puede enjuagar una vez o más con reguladores de lavado convencionales adecuados, como PBS + Tween al 0.05%.

45 III) incubar la fase sólida obtenida en la etapa II) con una proteína conjugada a una enzima, o a un marcador radiactivo capaz de unirse a anticuerpos humanos, seguido de enjuague para eliminar dicha proteína conjugada no unida;

50 en caso de que se lleve a cabo un ensayo inmunoenzimático, según la presente invención, la proteína conjugada con una enzima podría ser, por ejemplo, proteína A conjugada con enzima peroxidasa de rábano picante (**HRP**), proteína G conjugada con enzima Hrp, anticuerpos conjugados con enzima Hrp o a fosfatasa alcalina (**ALP**) o a beta galactosidasa, o a una molécula fluoresceinada o a una molécula luminiscente (por ejemplo, luminol) capaz de unirse selectivamente a Igs de cualquier especie; además, podría utilizarse cualquier reactivo capaz de unirse a Igs y producir una señal detectable en el espectro de UV visible o bajo fluorescencia, no solo anticuerpos y proteínas conjugadas sino también nanopartículas o liposomas adecuadamente funcionalizados.

60 En el caso de que se use en cambio un radioinmunoensayo, una proteína conjugada a un marcador radioactivo, podría utilizarse por ejemplo proteína G conjugada a I-125, I-131 o I-99, A conjugada a I-125, I-131 o I-99, anticuerpo anti-IgG conjugado a I-125, I-131 o I-99.

65 Cada anticuerpo específico presente en la muestra se unirá al agente radioactivo y, durante la segunda etapa de la incubación, los complejos antígeno-anticuerpo pueden precipitarse gracias a un agente precipitante (si está en solución) o lavarse con un regulador de lavado adecuado.

IV) detectar la señal de dicha proteína conjugada.

En caso de un ensayo inmunoenzimático, después del lavado para eliminar el exceso de proteína conjugada no unida, se agregará al pozo una solución de sustrato adecuado, seleccionada de acuerdo con procedimientos convencionales con base en la enzima conjugada a la proteína, para permitir desarrollo de la señal que luego podría cuantificarse según técnicas estándar. La señal podría, por ejemplo, cuantificarse mediante la lectura de absorbancia o fluorescencia con una herramienta adecuada, dependiendo del tipo de enzima y del sustrato relacionado utilizado. La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra por analizar.

En caso de un radioinmunoensayo, después de la centrifugación y la sedimentación del líquido sobrenadante, o después de la etapa de lavado en el caso del ensayo RIA o IRMA con anticuerpos que se adhieren a la fase sólida, la precipitación de radiactividad se cuenta a través de un contador gamma. La resistencia a la radioactividad será proporcional a la concentración del anticuerpo específico presente en la muestra que se deriva del paciente. La concentración de anticuerpos podría medirse cuantitativamente a través de una curva de calibración.

En una realización, la proteína conjugada podría ser proteína A conjugada con peroxidasa de rábano picante (A-HRP). En los ensayos inmunoenzimáticos descritos en el estado de la técnica, se usan dos anticuerpos secundarios diferentes: uno para muestras que tienen un título conocido (por ejemplo, los utilizados para elaborar la curva estándar, por ejemplo, anticuerpo IgG anti-ratón) y uno para muestras desconocidas (anticuerpo IgG antihumano). El uso de proteína A conjugada con HRP en el método de la presente invención implica la ventaja adicional de tener el mismo sistema de detección tanto para muestras que tienen un título conocido, generalmente de origen murino, como para que la muestra desconocida sea analizada, obviando diferencias, en términos de sensibilidad, dada por la especificidad de especie de los anticuerpos y, por lo tanto, hace que el método sea más versátil, por ejemplo utilizable en muestras de origen humano así como de origen murino, de rata o de otras especies. De hecho, la proteína A conjugada con HRP se une de forma altamente específica a IgG humana y de ratón, obviando el problema de tener dos anticuerpos secundarios diferentes, lo que puede producir diferente sensibilidad y especificidad de especie, lo que hace el resultado menos confiable durante la extrapolación de la concentración de muestra desconocida de la curva estándar. Además, la selección de proteína A-HRP permite, en el paso IV) detectar la señal, usar un sustrato emisor de fluorescencia, y por lo tanto con una sensibilidad mayor en comparación con sustratos emisores de absorbancia, en caso de que sea necesario; por ejemplo, utilizando la tecnología ultra RED Amplex que amplifica la señal HRP.

La invención también se refiere a un método in vitro para la cuantificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en una muestra de CSF.

Los métodos que permiten una cuantificación de estos anticuerpos en el CSF no se conocen en la literatura; tal cuantificación obviamente es de fundamental importancia tanto para el diagnóstico como para el pronóstico, así como para monitorizar el curso de las terapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y de CAA.

El objeto de la presente invención es también un método in vitro de alta sensibilidad para la cuantificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en una muestra de CSF, que comprende las siguientes etapas:

a) concentrar la cantidad de dichos autoanticuerpos de dicha muestra con microperlas magnéticas recubiertas con macromoléculas capaces de unirse a dichos autoanticuerpos;

b) analizar la muestra concentrada obtenida en la etapa a) mediante un ensayo inmunoenzimático o mediante radioinmunoanálisis.

c) analizar una muestra que comprende anticuerpos anti-proteína beta-amiloide que tienen un título conocido con el mismo ensayo usado en la etapa b) y elaborar la curva de calibración relacionada.

Las etapas a) y b) podrían llevarse a cabo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

De acuerdo con el método de la invención, en la etapa c) un anticuerpo que tiene un título conocido, capaz de unirse selectivamente a cualquier porción de la proteína beta-amiloide, se analizará de acuerdo con el mismo procedimiento utilizado en la etapa b) para elaborar una curva de calibración según técnicas convencionales.

Por ejemplo, partiendo de una solución de anticuerpo más concentrada que tenga un título conocido, se podrían preparar los diversos puntos de la curva de calibración relacionados con las diluciones sucesivas. Dicho anticuerpo podría ser cualquier anticuerpo policlonal, monoclonal, fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos tales como Fab, Fab2, scFv que tengan un título conocido y específico para la proteína beta-amiloide, por lo tanto dirigidos contra un epítipo específico de la proteína beta-amiloide.

En una realización, dicho anticuerpo o un fragmento del mismo podría dirigirse contra un epítipo comprendido en la región N-terminal o central, como en el interior de la secuencia de aminoácidos 1-28 de la proteína beta-amiloide, por ejemplo podría reconocer epítopos correspondientes a los aminoácidos o comprendidos entre los aminoácidos 1-5, 1-16, 17-24, 13-28. También la región C-terminal podría estar sujeta a reconocimiento, por ejemplo, la secuencia comprendida entre los aminoácidos 33-42 o 33-40. Los ejemplos de anticuerpos comercialmente disponibles que se podrían usar para la elaboración de la curva de calibración son 4G8, 6 E10, G2-11, 3D6, m266, Solanezumab, Ponezumab, Bapineuzumab, Gantenerumab, BAN2401, BIIB037, inmunoglobulinas administradas por vía intravenosa (IVIG) como Gammagard, Octagam, Newgam.

Para la realización de la presente invención, el anticuerpo que tiene un título conocido podría ser un anticuerpo perteneciente a cualquier especie, por ejemplo un anticuerpo murino que pertenece a la clase IgG2a o IgG2b, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado que pertenece a la clase IgG. En una realización, este anticuerpo humano o humanizado podría pertenecer a una de las clases IgG2a, IgG2b o IgG1. El uso de anticuerpos pertenecientes a estas clases para la elaboración de la curva de calibración resultará particularmente interesante cuando se utilice la proteína A o la proteína G como anticuerpo secundario, ya que las proteínas A/G tienen una mayor afinidad por su región Fc.

La curva de calibración elaborada con el anticuerpo de concentración conocida podría usarse para determinar los anticuerpos de concentración de anticuerpos en muestras con un título desconocido. Por ejemplo, la lectura de la señal de absorbancia o fluorescencia obtenida con las muestras que tienen un título conocido a diferentes concentraciones permitirá elaborar una curva de regresión a partir de la cual extrapolar la concentración de anticuerpos en la muestra de CSF de título desconocido que se analiza de acuerdo a los métodos convencionales bien conocidos por el técnico en el campo.

En una realización, la invención podría por lo tanto proporcionar un método in vitro para controlar la respuesta a la terapia de inmunización activa o pasiva en un paciente que padece la enfermedad de Alzheimer.

Una de las estrategias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer es la inmunización activa y/o pasiva de los pacientes que padecen esta enfermedad. La inmunización activa contempla la administración de péptidos Abeta (o análogos de los mismos) a los pacientes, mientras que la inmunización pasiva contempla la administración de anticuerpos humanizados contra la proteína beta-amiloide. Para poder controlar el efecto terapéutico obtenido con este tipo de terapias, puede ser necesario dosificar con extrema precisión y exactitud la cantidad de autoanticuerpos en el CSF antes, después y durante el tratamiento.

En la investigación clínica, la dosificación de autoanticuerpos en el CSF podría resultar extremadamente útil para la selección de sujetos adecuados como candidatos para ensayos clínicos, lo que permite una mejor estratificación al ingreso y un mejor control del paciente durante el mismo ensayo. La posibilidad de dosificar dichos anticuerpos de manera preliminar y/o durante la aplicación de un método terapéutico permite no solo monitorizar el efecto farmacológico de los mismos a nivel central (en el CSF), sino también derivar de tal seguimiento información útil para la mejora de la estrategia terapéutica, que permite una mejor personalización y seguridad del tratamiento. Tal personalización podría llevarse a cabo, por ejemplo, modificando las dosis terapéuticas del tratamiento de inmunización terapéutica dependiendo de la progresión de la concentración de anticuerpos en el CSF (un mecanismo hasta la fecha considerado responsable del efecto terapéutico, pero también de la posible aparición de efectos adversos tales como ARIA).

La detección y dosificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en el CSF son sin duda un primer paso fundamental para controlar la posible efectividad de los tratamientos contra la enfermedad de Alzheimer y aumentar su seguridad terapéutica.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método in vitro para la monitorización de un tratamiento de inmunización activo y/o pasivo de la enfermedad de Alzheimer, y de todo el Abeta-DMT en general, tal como, por ejemplo, inhibidores de secretasa responsables de la producción de Abeta, o de terapias dirigidas a la proteína tau, a partir de muestras de CSF de un paciente, que comprende las etapas descritas anteriormente.

El método in vitro para la monitorización de un tratamiento de inmunización activo y/o pasivo de la enfermedad de Alzheimer según la invención comprende, por lo tanto, llevar a cabo los pasos del método cuantitativo (según cualquiera de sus realizaciones) de la invención como se describe aquí, llevado a cabo, por ejemplo en muestras plurales de CSF recogidas en diferentes momentos de dicho tratamiento. Por ejemplo, las muestras podrían recogerse antes, durante (n veces) y/o después del tratamiento de inmunización, y los datos de cuantificación obtenidos por el método cuantitativo de la invención para cada muestra podrían compararse entre sí, construyendo así una progresión en el tiempo de la concentración de anticuerpos contra la proteína beta-amiloide en el CSF.

El método cuantitativo de la presente invención también podría utilizarse como un método para el diagnóstico de la angiopatía amiloide cerebral (CAA y CAA-ri) y también como una herramienta válida para el control de la progresión terapéutica en estas patologías, como para evaluar la efectividad de un tratamiento con esteroides de los mismos.

La inflamación relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (CAA-ri) es una patología rara que comparte muchos aspectos con la enfermedad de Alzheimer, en particular en términos de deposición cerebrovascular de Abeta. Recientemente se ha demostrado (Di Francesco et al., 2011) que en pacientes con CAA-ri puede detectarse un fenómeno autoinmune contra Abeta, con un posible aumento agudo y a veces letal de los niveles de autoanticuerpos contra Abeta; el método de la presente invención es, por lo tanto, extremadamente útil para diagnosticar la patología, en asociación con RMN, en estos sujetos, evitando así una intervención altamente invasiva tal como una biopsia cerebral.

Un objeto adicional de la presente invención es un método in vitro para el diagnóstico o la monitorización terapéutica de la inflamación relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (CAA-ri) a partir de una muestra de CSF de un paciente que comprende los pasos de una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

El método de diagnóstico podría proporcionar un paso en el que se compara un valor de concentración determinado con un valor de referencia estándar (por ejemplo, deriva de un conjunto significativo de individuos sanos) y, cuando está por encima de este valor umbral, indica que la enfermedad está presente.

El valor de referencia estándar o valor umbral (corte) de anticuerpos anti-A β podría determinarse, por ejemplo, mediante curvas ROC (Característica Operativa de Receptor) obtenidas mediante la elaboración de las concentraciones de un conjunto (estadísticamente significativo) de muestras de individuos sanos e individuos que sufren de CAA-ri. Mediante dicha elaboración, se determinaron, por ejemplo, valores de umbral que varían entre 30 y 40 ng/mL, como por ejemplo de 32, 33, 34,22, 35 ng/mL.

Además, los ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con anticuerpos anti-proteína beta-amiloide (como, por ejemplo, el anticuerpo humanizado Bapineuzumab) destacaron que algunos de los sujetos inscritos en el ensayo clínico habían desarrollado edema vasogénico (VE) después de la administración del agente terapéutico. Por lo tanto, el VE parece ser un efecto secundario muy grave, se produce con mayor frecuencia en sujetos tratados con altas dosis de anticuerpos y que son portadores alélicos de APOE-4, lo que condujo a protocolos terapéuticos de suspensión y nueva verificación. Una de las hipótesis para explicar el vínculo patogénico entre la administración de anticuerpos de anti-Abeta y VE parece ser una respuesta inmune anómala dirigida a la deposición cerebrovascular de Abeta, en particular en pacientes con una predisposición al daño cerebrovascular, según un mecanismo que podría ser análogo a lo descrito también para CAA-ri.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para controlar un tratamiento de inmunización activo y/o pasivo de la enfermedad de Alzheimer que comprende las etapas de medición y comparación cuantitativa del anticuerpo anti-beta-amiloide en el CSF como se describe anteriormente, y en el que también el TFPI en el CSF es medido.

De manera análoga a lo anterior, la presente invención proporciona un método de ayuda para el diagnóstico y la monitorización del tratamiento de CAA y CAA-ri, que comprende las etapas de medición y comparación cuantitativa del anticuerpo anti-beta-amiloide en CSF como se describió anteriormente, y pasos análogos en los que también se mide el TFPI en el CSF. La proteína TFPI, de hecho, es un marcador de daño endotelial cuyo aumento con el tiempo en el CSF de pacientes monitorizados podría indicar un aumento del riesgo de VE durante la terapia contra el Alzheimer. La presencia de tal aumento, por lo tanto, puede ser una luz de advertencia para los efectos secundarios extremadamente peligrosos descritos anteriormente.

El método de diagnóstico de CAA y CAA-ri podría proporcionar también un paso en el que el valor de concentración determinado de TFPI se compara con un valor de referencia estándar y, cuando está por encima de este valor umbral, indica que la enfermedad está presente. También se podría determinar el valor umbral (límite) del TFPI, por ejemplo, elaborando las curvas ROC (Característica Operativa de Receptor) obtenidas con las concentraciones de un conjunto (estadísticamente significativo) de muestras de CSF de individuos sanos y personas que padecen CAA-ri. Mediante dicha elaboración, se determinaron, por ejemplo, valores de umbral que oscilan entre 0.70 y 0.90 ng/mL, por ejemplo de 0.75, 0.80, 0.82, 0.85 ng/mL.

El método cuantitativo de la presente invención podría utilizarse también como un método para el diagnóstico o la monitorización de la aparición de anomalías radiológicas (ARIA). Como se muestra en la Figura 15 y en la sección experimental, ahora se ha descubierto que la concentración de autoanticuerpos contra la proteína beta-amiloide en el CSF de pacientes está relacionada con el desarrollo de anomalías radiológicas relacionadas con AD y con CAA-ri, comúnmente referido como ARIA. El método de diagnóstico podría proporcionar un paso en el que el valor de concentración determinado se compara con un valor de referencia estándar (por ejemplo, derivado de un conjunto significativo de individuos sanos) y, cuando está por encima de este valor umbral, indica que se desarrollarán anomalías radiológicas (ARIA). En particular, el método podría usarse en sujetos de alto riesgo, como aquellos con mayor deposición de Abeta, o portadores de genotipo de ApoE epsilon4, o de nuevo en sujetos con otros factores de riesgo, tales como una concentración aumentada de marcador de daño bioendotelial TFPI. En una realización del método de diagnóstico de CAA-ri y de ARIA en otras patologías como Alzheimer, la concentración de ambos anticuerpos anti-A β y TFPI se determinará y se comparará con los valores umbral como se describió anteriormente. En esta realización, al monitorizar ambos parámetros, se podría tener una sensibilidad y especificidad

de diagnóstico del 100%, como se demuestra mediante la predicción diagnóstica mediante análisis ROC y la determinación de los puntos de corte obtenidos.

5 La dosificación de TFPI en el CSF podría llevarse a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático, como, por ejemplo, un sándwich de ELISA que comprende los siguientes pasos:

I) proporcionar una fase sólida recubierta con un anticuerpo específico para TFPI humano;

10 Dicha fase sólida podría ser una fase sólida utilizada convencionalmente en ensayos inmunoenzimáticos o inmunoensayos, recubiertos con anticuerpos que reconocen la secuencia completa, secuencias alternativas, secuencias truncadas o partes de TFPI humano.

15 Después de la inmovilización, para evitar ruidos de fondo, la fase sólida se bloquea adecuadamente con métodos también convencionales, como por tratamiento con una solución regulador de fosfato (pH 7.4) con albúmina bovina al 1%, suero al 5% y Tween al 0.05%.

20 El tiempo de incubación de la solución de bloqueo será fácilmente identificable por el técnico medio en el campo y podría, por ejemplo, ser de aproximadamente 30, 40, 50, 60, 90 minutos. Para eliminar el material no unido, la fase sólida se puede enjuagar una vez o más con reguladores de lavado convencionales adecuados, como PBS + Tween al 0.05%.

II) incubar dicha fase sólida con la muestra de CSF a analizar;

25 El tiempo medio de incubación será fácilmente identificable por el técnico medio en el campo y podría, por ejemplo, ser de aproximadamente 30, 40, 50, 60, 90 minutos. Para eliminar el material no unido, la fase sólida se puede enjuagar una vez o más con reguladores de lavado convencionales adecuados, como PBS + Tween al 0.05%.

30 III) incubar la fase sólida obtenida en la etapa II) con una proteína conjugada con una enzima, o un marcador radioactivo capaz de unirse a anticuerpos humanos, seguido de un enjuague para eliminar dicha proteína conjugada no unida;

35 En caso de que se haya llevado a cabo un ensayo ELISA, de acuerdo con la presente invención, la proteína podría estar, por ejemplo, conjugada con una enzima tal como peroxidasa de rábano picante (**HRP**) o fosfatasa alcalina (**ALP**) o beta galactosidasa.

IV) detectar la señal de dicha proteína conjugada.

40 En caso de un ensayo inmunoenzimático, después del lavado para eliminar el exceso de proteína conjugada no unida, se agregará en el pozo una solución de sustrato adecuado, seleccionada de acuerdo con procedimientos convencionales basados en la enzima conjugada a la proteína, para permitir el desarrollo de la señal que luego podría cuantificarse según las técnicas estándar. La señal podría, por ejemplo, cuantificarse mediante la lectura de absorbancia o fluorescencia con una herramienta adecuada, dependiendo del tipo de enzima y sustrato relacionado utilizado. La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra por analizar.

45 En caso de un radioinmunoensayo, después de la centrifugación y la sedimentación del sobrenadante, o después de la etapa de lavado en el caso del ensayo RIA o IRMA con anticuerpos que se adhieren a la fase sólida, se cuenta la radiactividad del precipitado a través de un contador gamma. La resistencia a la radiactividad será proporcional a la concentración del anticuerpo específico presente en la muestra que se deriva del paciente. La concentración de anticuerpos podría medirse cuantitativamente a través de una curva de calibración.

50 En una realización, el método de la presente invención proporcionará la cuantificación simultánea de anticuerpos contra la proteína TFPI y anticuerpos anti-proteína beta-amiloide presente en la muestra de CSF (ensayo CO-ELISA).

55 En esta realización, la fase sólida se recubrirá tanto con la proteína beta-amiloide como con los anticuerpos dirigidos contra la proteína TFPI, y la proteína conjugada utilizada en la etapa iii) debería poseer una longitud de onda diferente para permitir una lectura conjunta de la Ig que se une a la proteína beta-amiloide y del TFPI.

60 A continuación se describen experimentos y ejemplos destinados a ilustrar mejor lo que se ha informado en la presente descripción; tales ejemplos de ninguna manera deben interpretarse como limitativos de la presente descripción y de las reivindicaciones posteriores.

65 La presente invención también se refiere a un método de terapia y/o monitorización de la enfermedad de Alzheimer, proporcionando uno o más pasos de cuantificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en muestras de fluido cerebrospinal del paciente o pacientes por tratar y/o en tratamiento de acuerdo con la presente descripción,

comprendiendo dicho método opcionalmente también una o más etapas en donde para cada una de dichas muestras la concentración de uno o más marcadores de daño endotelial, como, por ejemplo, de TFPI, se determina de acuerdo con métodos estándar aplicados al CSF como se describe aquí.

- 5 Todo lo que se ha descrito anteriormente en relación con el método de cuantificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en muestras de líquido cefalorraquídeo y de uno o más marcadores de daño endotelial (como por ejemplo, del TFPI) se aplica al método de terapia y/o (pronóstico) de la invención.

Ejemplos

- 10 Ejemplo 1 Procedimiento para concentración con microperlas magnéticas
- 1) Lavar dos veces con PBS, pH 7.4, + 0.02% Tween, 75 µl de microperlas magnéticas conjugadas con proteína A (Invitrogen Dynal AS Dynabeads® proteína G) para cada muestra por analizar;
- 15 2) añadir a las microperlas magnéticas lavadas un volumen de muestra comprendido entre 200 y 500 µl de CSF de un paciente e incubar bajo agitación durante 40 minutos a temperatura ambiente;
- 3) colocar las microperlas magnéticas en el imán durante 2 minutos; opcionalmente almacenar sobrenadante en otro tubo de ensayo (actuará como control de la eficiencia del proceso);
- 20 4) retirar del imán y lavar con 500 µl de regulador de citrato-fosfato, pH 5 + 0.02% de Tween, repetir dos veces;
- 5) luego proceder con la fase de elución, agregando 30 µl de citrato 0.1M a pH 3.1 a las microperlas magnéticas;
- 25 6) agitar durante 2 minutos;
- 7) colocar el tubo en el imán durante 1 minuto e inmediatamente transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio (tubo de polipropileno de baja afinidad Eppendorf) que contenga 40 µl de Tris Base 1M, pH 9 (solución reguladora);
- 30 8) repetir los pasos 5), 6) y agregar el eluido al mismo tubo de ensayo utilizado en 7) (volumen total: 100 µl);
- 9) usar los 100 µl completos de eluido para el ELISA.
- 35 Ejemplo 2 Recubrimiento de la microplaca con proteína Abeta42
- 1) disolver la proteína Abeta42 en regulador Tris Base 1 M, pH 9, a una concentración de 1 µg/µl;
- 40 2) preparar una solución de recubrimiento de Abeta en NaHCO₃ 50 mM, pH 9.6, a una concentración de 0.01 µg/µl;
- 3) someter a sonicación durante 1 minuto en hielo, esperar 1 minuto, someter a sonicación nuevamente durante 1 minuto;
- 45 4) agregar 100 µl de una solución de recubrimiento por pozo de la placa ELISA (concentración final: 1 µg/µl);
- 5) incubar durante la noche.
- 50 Ejemplo 3 dosificación inmunoenzimática
- 1) el día siguiente al recubrimiento realizado como se describe en el ejemplo 2, llevar a cabo 3 lavados con PBS + Tween al 0.05% (PBST), 200 µl/pozo;
- 55 2) realizar bloqueo para excluir unión específica, mediante el uso de una solución compuesta de 5% de suero y 1% de BSA en PBST, 1.5 h a temperatura ambiente bajo oscilación;
- 3) repetir el paso de lavado descrito en 1);
- 60 4) agregar 100 µl de la solución que contiene el anticuerpo primario 4G8 (dirigido hacia la porción de aminoácidos 17-24 de la proteína Abeta), para construir la curva estándar. Los estándares se llevan a cabo mediante diluciones en serie del anticuerpo primario. El rango sugerido para la curva estándar para la dosificación de anticuerpos en el CSF es de 0.24 a 0.03 µg/ml. En los pozos que se utilizarán como blanco, agregar solo 100 µl de PBS. Además, se proporciona un blanco adicional para eluidos, que comprende 60 µl de citrato 0.1 M, pH 3.1, más 40 µl de Tris Base 1M, pH 9.
- 65

5) añadir 100 µl de la muestra de CSF concentrada en el Ejemplo 1 en los pozos. Dejar en agitación a 4°C durante la noche.

6) repetir el paso de lavado descrito en 1);

7) agregar 100 µl de la solución que contiene proteína A-HRP a una concentración de 0.2 µg/mL.

Dejar en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.

8) repetir el paso de lavado descrito en 1);

9) agregar 100 µl por pozo de TMB. Incubar en la oscuridad durante un período de aproximadamente 5-10 minutos, a temperatura ambiente.

10) agregar 100 µl por pozo de una solución que tenga un pH ácido, como 0.5N HCl

11) leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm, luego restar el valor del blanco (pozo en el cual no se agregaron ni el estándar ni la muestra desconocida). Después de la extrapolación de la muestra desconocida de la curva estándar, ajustar el valor según la dilución inicial y/o el factor de concentración.

Ejemplo 4 Preparación de patrones y reactivos ELISA

El antígeno, compuesto por la proteína Abeta (Abeta 40 o Abeta42 o sus respectivas formas oligoméricas diferentes) se adsorbe (revestimiento) en el fondo de los pozos de una microplaca ELISA. Durante la primera incubación, los estándares compuestos de concentraciones conocidas de anticuerpos anti-Abeta de origen murino, controles y muestras de CSF desconocidas por analizar se distribuyen en los pozos con Abeta y se incuban durante la noche.

Posteriormente, después del lavado con regulador PBS, se agrega proteína A conjugada con HRP (proteína A-HRP), que actúa como detector para anticuerpos que se han unido específicamente durante la primera incubación.

Después del lavado para eliminar el exceso de proteína A-HRP no unida, se agrega una solución de sustrato al pozo, para permitir el desarrollo de la tinción que posteriormente se cuantificará mediante lectura de absorbancia, o posiblemente mediante lectura de fluorescencia. De hecho, la fuerza de este producto teñido es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-Abeta presentes en la muestra original, extrapolada de una curva de calibración estándar a concentraciones conocidas.

Ejemplo 5 Pruebas comparativas

Probamos la diferente sensibilidad para la dosificación plasmática del ELISA publicada, que utilizó el clon G2-11 como anticuerpo primario, o el clon 3D6 en la publicación de Dodel et al 2001 o Conti et al 2010, en comparación con una realización del método de la presente invención.

Específicamente, los anticuerpos de los clones G2-11, 6E10 y 4G8 se probaron como anticuerpos primarios, con el fin de identificar cuál podría ser el mejor para asociar a nuestro método ELISA.

Al probar una solución que tiene una concentración conocida (0.25 µg/mL) de anticuerpo anti-Abeta 4G8, nuestro nuevo ELISA demostró 3.5 veces más sensibilidad, en términos de absorbancia con respecto a los puntos más altos de la curva, en comparación con el uso, por ejemplo, del clon G2-11 previamente publicado (1.469 frente a 0.426) (ver Figura 3).

El clon 4G8 arrojó los mejores resultados, demostrando ser el mejor sobre todo cuando está asociado al novedoso sistema de detección (proteína A-HRP).

A modo de ejemplo, en la Figura 3 se presenta una tabla que indica los resultados, en términos de Absorbancia (OD), obtenidos dosificando la misma muestra que tiene una concentración conocida de anticuerpos con el ELISA anterior (es decir, usando el sistema de detección con una IgG anti-cabra (IgG antihumana (molécula completa) - anticuerpo anti-peroxidasa SIGMA # A8667) en la columna del lado izquierdo, en comparación con una realización del método de la presente invención (usando Proteína A conjugada con HRP, columna del lado derecho).

Las Figuras 4A y 4B muestran la diferente sensibilidad de la curva estándar en la detección de muestras que tienen bajas concentraciones de anticuerpos. De hecho, la dosificación de 3 muestras diferentes de CSF derivadas de un paciente con AD, un paciente con CAA-ri y un control, después de un tratamiento adecuado de concentración con microperlas tal como lo describieron los inventores, resultó totalmente ineficaz al usar el método descrito en el estado de la técnica, mientras que el nuevo método ELISA (4G8 + protA-HRP) de los inventores demostró ser altamente sensible y efectivo. De hecho, las tres muestras analizadas cayeron perfectamente dentro del rango de

linealidad de la curva de calibración estándar, como evidencia de la efectividad de nuestra novedosa técnica como método "ultrasensible" para la dosificación de anticuerpos anti-Abeta en el CSF.

5 Además, la Figura 4C muestra cómo, para una curva de calibración típica, el nuevo método de ELISA descrito aquí es en realidad 10 veces más sensible en comparación con el antiguo método de ELISA en el rango de detección esperado para la dosificación de los anticuerpos anti-Abeta en el CSF (rango de 0.14 y 0.04 µg/mL).

10 De hecho, la presente invención muestra una curva de calibración capaz de detectar la concentración de anticuerpos en un rango de linealidad de curva de entre 0.18 y 0.03 µg/mL, mientras que el antiguo método de ELISA descrito en el estado de la técnica con el anticuerpo G2-11 demostró ser capaz de cuantificando muestras con una concentración mucho mayor, por lo tanto, siendo ineficaces en el CSF.

15 Se puede inferir cómo, en términos de absorbancia, a la concentración comparable de 0.134 µg/mL, el valor de DO detectable con nuestro nuevo método ELISA es 1.072, en comparación con el 0.142 detectable con el método ELISA descrito en el estado de la técnica, es decir, aproximadamente 10 veces más sensible, mientras que para todos los estándares inferiores a 0.134 µg/mL, el método anterior no fue capaz de discriminar ningún valor del blanco.

20 Además, probamos y descartamos posibles interferencias dadas por el efecto matriz. De hecho, el CSF y el CSF no tratados después de la concentración con microperlas entregaron valores de absorbancia idénticos a los de un pozo ELISA en el que la proteína Abeta no se había adsorbido, y de todos modos comparable al blanco.

25 Asimismo, se probó y confirmó la falta de interferencia de la proteína A conjugada con HRP con el recubrimiento Abeta. La etapa de preenriquecimiento además resultó útil también en términos de reducción de fondo, devolviendo valores decididamente más bajos como "en blanco" (Absorbancia de 0.077, en comparación con 1.11 con el antiguo ELISA). Luego, se probó el volumen mínimo indispensable para dosificar autoanticuerpos anti-Abeta 42 en el CSF de sujetos de control, como hidrocéfalos con presión normal, en los cuales la concentración de anticuerpos debería estar fisiológicamente entre las más bajas esperadas. El volumen de CSF utilizado para la etapa de concentración en los controles fue de entre 400 y 500 µl.

30 Dicho volumen de CSF inicial de 500 µl se trató luego con 75 µl de microperlas magnéticas conjugadas con proteína A, y se eluyó (etapa de enriquecimiento específico de CSF Ig) con 60 µl de solución de citrato 0.1 M, pH 3.2, e inmediatamente se añadieron 40 µl de solución regulador (1M TRIS Base, pH 9) para preservar las condiciones nativas de Ig. El volumen resultante total (100 µl) se utilizó para la dosis de ELISA ultrasensible inventada por nosotros.

35 Por lo tanto, la concentración media de autoanticuerpos contra la proteína Abeta en el sujeto control, ajustada por el factor de concentración, demostró ser de aproximadamente 16 ng/ml.

40 Ejemplo 6 Parámetros de precisión y prueba de recuperación del método de acuerdo con una realización:

Los parámetros de precisión intraensayo, es decir, la variabilidad dentro de la misma microplaca de valores comparables de retorno para lecturas repetidas, se ensayaron mediante reproducción exacta de los procedimientos descritos en los ejemplos 1, 2 y 3 precedentes.

45 Precisión intraensayo (media obtenida por dosificación por triplicado de 3 muestras diferentes de CSF procedentes de 3 sujetos) = CV 3.27%

50 Los parámetros de precisión entre ensayos, es decir, la variabilidad del método de entregar valores comparables para lecturas repetidas durante varios ensayos realizados en días diferentes, se ensayaron mediante la reproducción exacta de los procedimientos descritos en los ejemplos 1, 2 y 3 precedentes.

Precisión entre ensayos (media obtenida por dosificación, repetida 7 veces en 5 diferentes ELISA, de la misma muestra de CSF procedente del mismo paciente) = CV 3.69%

55 Además, se probó la precisión intraensayo de la única etapa de concentración con microperlas magnéticas (es decir, mediante la reproducción exacta de los procedimientos descritos en el ejemplo 1) con 3 enriquecimientos diferentes de la misma muestra realizados en días consecutivos, congelados a -20°C, y luego dosificados en el mismo ELISA después de la reproducción exacta de los procedimientos descritos en el Ejemplo 2) y 3) = CV 2.33%

60 La prueba de recuperación (realizada por adición (siembra por contacto) de 0.125 µg/ml de anticuerpo 4G8 en 500 µl de CSF sometida a todas las etapas de enriquecimiento como se describe en los ejemplos 1), 2) y 3)) demostró ser del 98%.

65 Como control negativo, se evaluó el sobrenadante (descarte) obtenido como se describe en 3) del Ejemplo 1) "procedimiento para concentrar con microperlas magnéticas". El procedimiento demostró ser 100% efectivo para

todas las pruebas realizadas (> 20 pruebas repetidas) entregando cada vez un valor de concentración igual a 0, es decir, al blanco.

Finalmente, también se probó la especificidad de la prueba, recubriendo algunos pozos de la placa ELISA con las mismas concentraciones utilizadas para la curva de calibración estándar (ver arriba), en la que Abeta42 fue reemplazado por Abeta42 mezclado (Anaspect), es decir, un péptido sintético compuesto exactamente de los mismos aminoácidos que componen la proteína Abeta42, pero en orden abierto, en un regulador Tris Base 1M, pH 9. La prueba mencionada anteriormente demostró que en dichos pozos no se detectaba ninguna señal, como evidencia de una especificidad del 100% de nuestro método hacia Abeta40 y Abeta42.

Ejemplo 7 Medición mediante ensayo inmunoenzimático de TFPI en muestras de CSF de pacientes con AD

En este ejemplo específico, se usó un ELISA de ensayo inmunoenzimático que comprende placas de 96 pozos recubiertas con un anticuerpo murino específico para TFPI (Quantikine Human TFPI ELISA - R & D Systems). Se puede construir un ELISA diferente internamente, por ejemplo, específico para las diferentes formas truncadas o isoformas de TFPI. Específicamente, el presente KIT no se comercializa para la dosificación de TFPI; por lo tanto, después de haber aprobado su especificidad y sensibilidad (resultados no mostrados) procedimos de la siguiente manera, modificando el protocolo indicado por la empresa fabricante:

1) El estándar proporcionado se diluyó con diluyente adecuado proporcionado para construir la curva estándar (de acuerdo con las indicaciones del fabricante) que a partir de entonces serviría para extrapolar el valor desconocido de la muestra;

2) Se añadieron 100 µl de regulador diluyente proporcionado en el kit a cada pozo;

3) Se añadieron inmediatamente 50 µl de Estándar o de muestra (CSF) diluido 1: 2;

4) Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas;

5) Se realizaron 4 lavados con 300 µl de Regulador de Lavado, invirtiendo la placa en papel secante para eliminar completamente el líquido cada vez;

6) Se añadieron 200 µl de anticuerpo secundario (Conjugado, proporcionado en el kit), incubando durante 120 minutos a temperatura ambiente;

7) Se realizaron 4 lavados con 300 µl de regulador de lavado, invirtiendo la placa en papel secante para eliminar completamente el líquido cada vez;

8) Se añadieron 200 µl de solución de sustrato (solución de sustrato proporcionada en el kit), incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad;

9) Se añadieron 50 µl de solución de parada en cada pozo. El color pasaría de azul a amarillo. Inmediatamente, se leyó la absorbancia a 450 nm. La absorbancia de la muestra se multiplicó por 2, factor por el cual se había diluido.

8 Estudio relacionado con la participación de autoanticuerpos anti-Aβ en el desarrollo de CAA-ri.

8.1 Materiales y métodos - Reclutamiento de pacientes

Se reclutaron muestras de CSF provenientes de 10 pacientes (7 italianos, 2 casos de Brasil, 1 de Japón) con CAA-ri mediante una colaboración internacional. El diagnóstico probable de CAA-ri se realizó sobre la base de características clínicas y de neuroimágenes conocidas en la literatura, pero a ciegas con respecto a la concentración de CSF de autoanticuerpos anti-Aβ.

Todos los pacientes de CAA-ri exhibieron síntomas neurológicos agudos o subagudos que comprendían confusión mental, convulsiones y déficits neurológicos focales. La resonancia magnética cerebral, evaluada durante la fase aguda, mostró signos de inflamación de la materia blanca compatible con edema vasogénico (secuencias FLAIR) y con la presencia de microsangrados más dispersos en toda la corteza cerebral (T2 * -GRE). Además, los casos 5 y 6 también se confirmaron mediante biopsia cerebral estereotáctica, que muestra la deposición de Aβ alrededor de vasos cerebrales y signos de neuroinflamación. El análisis del genotipo APOE se realizó para todos los sujetos, de acuerdo con los procedimientos estándar adoptados en cada centro de reclutamiento.

Las muestras de CSF de los pacientes con CAA-ri se recogieron durante la fase aguda de la enfermedad (apCAA-ri) y se almacenaron inmediatamente a -20°C. Se recogieron alícuotas de CSF de 7 pacientes incluso después del tratamiento con esteroides (rpCAA-ri), mientras que para los casos 6 y 8 se recogió una muestra de CSF incluso después de la resolución espontánea de los síntomas, por lo tanto, en ausencia de cualquier tratamiento farmacológico.

Como sujetos de control para la presencia de angiopatía amiloide cerebral, pero sin signos de neuroinflamación, se recolectó CSF de 8 pacientes con CAA no inflamatoria (diagnosticada según los criterios de Boston, Knudsen 2001). Como grupo de control de enfermedad autoinmune e inflamatoria, pero relacionada con CAA, incluimos 14 pacientes sin tratamiento previo con esclerosis múltiple (EM), con bandas oligoclonales positivas (OCB +), diagnosticadas según los criterios de McDonald's. Como controles no CAA, no inflamatorios, incluimos 25 CSF provenientes de 12 sujetos con hidrocefalia de presión normal y 13 pacientes con trastorno de conversión.

Modos de recolección de CSF y dosificación de AB40, AB42, tau y P-181

Todos los CSF se recogieron por punción lumbar a nivel vertebral L4/L5 o L3/L4, divididos en alícuotas de 0.5 ml cada uno en tubos de polipropileno y se almacenaron inmediatamente a -20°C hasta el momento del análisis. Se evaluaron el recuento de células presentes en el CSF, glucosa y proteínas totales. Las concentraciones de Aβ40, Aβ42, tau y P-181 tau se evaluaron mediante kits de ELISA comerciales (Millipore e Innogenetics, respectivamente), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dosificación de autoanticuerpos anti-Aβ

Para la dosificación de autoanticuerpos, se usó el método in vitro para la cuantificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en una muestra de fluido cerebroespinal descrito en este documento. Mediante dicho método, se evaluó la concentración de anticuerpos producidos de forma natural contra Aβ mediante preenriquecimiento con perlas magnéticas y posterior dosificación de anticuerpo con el método ELISA. Para aumentar la sensibilidad de la técnica ELISA, las muestras se concentraron mediante pretratamiento con perlas magnéticas, con el fin de enriquecer el contenido total de IgG. En resumen, se incubaron aproximadamente 200-300 µl de CSF con perlas magnéticas conjugadas con proteína G (Dynebeads Protein G) durante 40 min, bajo agitación continua a temperatura ambiente (rt), y se eluyeron mediante ligera acidificación con citrato 0.1 M (pH 3.1). Después del enriquecimiento magnético, los eluidos se analizaron directamente mediante nuestro novedoso método ELISA. Los pozos de una placa de 96 pozos se recubrieron con Aβ42 (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont CA, USA), 1 pg/pozo, se disolvieron en regulador de carbonato 50 mM (pH 9.6) a 4°C, durante la noche. La placa se lavó después con PBS/ Tween 20 al 0.05% (PBST), se bloqueó con FCS al 5%, BSA al 1% en PBST durante 90 minutos, a temperatura ambiente, y se lavó de nuevo. Para la generación de la curva estándar, se utilizó un anticuerpo anti-Aβ42 humano, producido en ratón y selectivo para el N-terminal de Abeta (clon 4G8, Covance), en diferentes concentraciones, mediante diluciones en serie (0,4 µg/ml a 0.03). µg/mL). Después de cargar las muestras y los patrones, la placa de ELISA se incubó durante la noche, a 4°C. Al día siguiente, los pozos se lavaron con PBST y se incubaron durante 2 horas con proteína A conjugada con HRP (Millipore), a temperatura ambiente. Luego, la placa se lavó de nuevo con TBST y se incubó durante 10 min con TMB, en la oscuridad. Después de la adición de la solución de extinción, se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas (BIORAD Modelo 550). La concentración de autoanticuerpos se extrapoló a partir de la curva estándar.

Todas las muestras se analizaron a ciegas, sin que el operador conociera el diagnóstico. Como control de calidad del proceso de enriquecimiento con perlas magnéticas, se analizaron todos los sobrenadantes (descartes de proceso) para confirmar el agotamiento total de IgGs por las perlas. La especificidad de ELISA hacia el Aβ humano se verificó mediante la exclusión de la reactividad cruzada hacia el péptido Aβ1-42 codificado (ANASPEC, Fremont, CA, USA), Mediante el recubrimiento de 1µg de péptido. La recuperación de anticuerpos anti-Aβ en la matriz de CSF se evaluó mediante la prueba de adición de diferentes concentraciones del anticuerpo comercial 4G8 a las diferentes concentraciones utilizadas para generar la curva estándar del ELISA, obteniendo una recuperación del 98%. La precisión intraensayos demostró ser 3.3% del Coeficiente de Variación (CV); la precisión interensayo demostró ser del 3.7% del CV.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad-Prism (Prism 3.0, GraphPad Software, Inc.). Para evaluar las diferencias intergrupales, se utilizó la prueba de análisis de varianza unidireccional, seguida por la prueba de comparación múltiple de Tukey, o se utilizó una prueba t no aparejada para el análisis de grupos de datos que pasaron una prueba de normalidad. Se utilizó una prueba t pareada para evaluar las diferencias en la concentración de anticuerpos antes y después de la remisión clínica. Los valores con p <0.05 se consideraron significativos. Las variables continuas se expresan como media ± desviación estándar (MEAN±SD).

8.2 Resultados, características de los pacientes y análisis histopatológico

La edad fue comparable entre los diferentes grupos de sujetos: controles sanos (59.0 años ± 20.0), CAA (59.6 años ± 11.4), EM (52.5 años ± 12.2), CAA-ri (68.5 años ± 5.6). El número de Hombres/Mujeres resultó ser: controles sanos 12/13, CAA 5/3, MS 11/3, CAA-ri 3/7.

Un análisis sociodemográfico de pacientes con CAA-ri se presenta en la Tabla 1, mientras que las características clínicas y el tratamiento farmacológico adoptado de cada paciente con CAA-ri se presentan a continuación:

Caso 1: trastorno conductual progresivo y demencia. Se trató con metilprednisolona 1 g/día durante 5 días, con un leve beneficio.

5 Caso 2: declive cognitivo progresivo y ataques generalizados. Se trató con metilprednisolona, 1 g/día durante 5 días y posteriormente 1 g/semana durante 7 semanas, con una mejoría clínica moderada.

Caso 3: pérdida progresiva de memoria y trastorno del estado de ánimo. Se trató con dexametasona 24 mg /día durante 20 días, con una mejora clínica notable, como se describió previamente.

10 Caso 4: hemiparesia y desorientación izquierdas rápidas y progresivas. Se trató con dexametasona 24 mg /día durante 1 mes, posteriormente se suspendió debido a la aparición de neumonía. Falleció a partir de entonces debido a complicaciones infecciosas.

15 Caso 5: Hemisíndrome progresivo del lado izquierdo con ataques homolaterales parciales. Inicialmente tratado 6 veces con metilprednisolona, 1 g/día durante 3 días, seguido de terapia oral con metilprednisolona. Marcada mejora clínica como se informó anteriormente.

20 Caso 6: deterioro cognitivo progresivo y confusión mental. Remisión espontánea de los síntomas sin ningún tratamiento farmacológico.

Caso 7: declive cognitivo transitorio leve. Remisión espontánea de los síntomas sin ningún tratamiento farmacológico.

25 Caso 8: confusión mental transitoria. Remisión espontánea de los síntomas sin ningún tratamiento farmacológico.

Caso 9: confusión mental transitoria y ataques generalizados. Se trató con prednisona 80 mg/día durante 10 días, con remisión de los síntomas.

30 Caso 10: deterioro cognitivo progresivo y parkinsonismo. Se trató con dexametasona 12 mg/día durante 15 días y luego se redujo progresivamente durante otras 2 semanas, sin mejoría significativa.

Tabla 1. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes de CAA-ri.

Paciente #	Género (M/F)	Edad (a.o.)	APOE	País	Tratamiento	rpCAA-ri recolección CSF
1	F	68	ε3/ε4	Brasil	I.V: esteroide	Si
2	M	62	ε3/ε3	Brasil	I.V: esteroide	Si
3	M	68	ε4/ε4	Italia	I.V: esteroide	Si
4	F	76	No probado	Italia	I.V: esteroide	Si
5	M	56	ε3/3ε	Japón	I.V: esteroide	Si
6	M	71	ε3/3ε	Italia	Sin tratamiento	Si
7	M	72	ε4/ε4	Italia	Sin tratamiento	No
8	F	72	ε3/3ε	Italia	Sin tratamiento	Si
9	M	71	ε4/ε4	Italia	Esteroides orales	No
10	M	67	ε4/ε4	Italia	I.V: esteroide	No

APOE, apolipoproteína E; a.o., edad al inicio de la enfermedad; rpCAA-ri, paciente con angiopatía amiloide cerebral en fase de remisión.

35

La Tabla 2 presentada a continuación muestra con más detalle las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes con CAA-ri.

Caso #	Género edad	APOE	Aspectos clínicos				Aspectos neuroradiológicos				
			Fase aguda (colección LQR desde el inicio)	Tratamiento	Remisión (colección LQR desde el inicio)	Fase aguda			Remisión		
						ARIA-E (FLAIR)	C.E.	ARIA-H (T2* -GRE)	ARIA-E (FLAIR)	C.E.	ARIA-H (T2* -GRE)
1	68/F	ε3/ε4	trastorno del estado de ánimo, deterioro cognitivo, agitación (19 m)	MPS 1g/d IV 5 d	Reducción de deterioro y agitación cognitiva (11 m.)	Múltiples áreas, bilateral, principalmente FI	No	> 70	Poco reducido	No	Invariable
2	62/M	ε3/ε3	deterioro cognitivo, alucinaciones visuales, crisis de GTC (6 m.)	MPS 1g/ IV 5 d	Reducción de deterioro cognitivo, alucinaciones y crisis (7 m.)	Áreas múltiples, bilat., principalmente FI y PI	No	> 130	Poco reducido	No	Invariable
3	68/M	ε4/ε4	pérdida de memoria, trastorno del estado de ánimo (4 m)	DMX 24 mg/d IV 20 días	Remisión de pérdida de memoria y trastorno del estado de ánimo (7 m)	3 hinchazones mayores LI FL, TI-PI, Rt PI	No	> 200	Reducido	No	Invariable
4	76/F	N/A	hemiparesia del lado izquierdo, deterioro cognitivo (2 m)	DMX 24 mg/ día IV 30 días	Remisión casi total de hemiparesia y deterioro cognitivo (4 m)	2 hinchazones mayores TI-PI bilat	SI, leptomeníngeo	28	Muy reducido	No	Invariable
5	59/M (biopsia)	ε3/ε3	la hipotesia del lado izquierdo en crisis parciales (3 m)	MPS 1 g/d IV 3 d-6 veces	Remisión de trastorno sensible y crisis (7 m.)	1 mayor hinchazón Rt PI	SI, leptomeníngeo	No	Muy reducido	No	No
6	71/M (biopsia)	ε3/ε3	Deterioro cognitivo y confusión mental (5 m.)	No	Remisión casi total de deterioro cognitivo y confusión (8 m)	Múltiple, principalmente Rt PI y bilat TI	SI, sulcal leptomeníngeo	N/A	Muy reducido	No	50
7	72/M	ε4/ε4	deterioro cognitivo (2 m)	No	Remisión casi total de deterioro cognitivo (N/A)	Giant Rt TI-PI-OI	Solo 1, sulcal	55	Muy reducido	No	Invariable
8	72/F	ε3/ε3	Deterioro cognitivo leve en crisis de GTC (2 m.)	No	Remisión casi total de deterioro cognitivo, desaparición de crisis (5 m)	Moderado, bilat FL, Rt posterior	No	50	Poco reducido	No	Invariable

Caso #	Género edad	APOE	Aspectos clínicos			Aspectos neuroradiológicos					
			Fase aguda (colección LQR desde el inicio)	Tratamiento	Remisión (colección LQR desde el inicio)	Fase aguda			Remisión		
						A RA-E (FLAIR)	C.E.	ARA-H (T2*-GRE)	ARA-E (FLAIR)	C.E.	ARA-H (T2*-GRE)
9	71/M	ε4/ε4	Crisis de GTC y decaimiento cognitivo transitorio (1 m)	PRD 80 mg/d oral 15 d	Remisión de deterioro cognitivo y crisis (N/A)	L1 F1, RT PL-T1-O1	Mínimo, leptomeníngeo	> 500	Reducido	No	Invariable
10	67/M	ε4/ε4	decaimiento, exploración del habla, rostro expresivo (3 m.)	DMX 32 mg/d IV 15d	Reducción de los síntomas del comportamiento, signos de parkinsonismo sin variación (N/A)	Áreas múltiples, bilateral, principalmente Rt Pt	Marcado, leptomeníngeo	10	Reducido	No	Sin variación

Análisis histopatológico

Como se presenta en la Figura 6, el diagnóstico de CAA-ri se confirmó inmunohistológicamente en 2 pacientes: para el caso # 6, paciente no tratado con inmunosupresor, se confirmó la deposición de A β alrededor de los vasos cerebrales y la presencia de signos de neuroinflamación típicos de CAA-ri. El caso # 5 ya había confirmado la presencia de una imagen patológica de CAA-ri en el análisis bióptico, como se informó previamente en Sakaguchi et al. 2010.

Dosificación en CSF de autoanticuerpos anti-A β

Como se muestra en la Figura 8a, la concentración de autoanticuerpos anti-A β en el CSF de pacientes con CAA-ri durante la fase aguda (52.8 ng/mL \pm 21.9) demostró un aumento significativo en comparación con: controles sanos (18.1 ng/mL \pm 5.7; p <0.0001), controles CAA no inflamatorios (24.0 ng/mL \pm 6.6; p <0.0025) y pacientes con EM (19.7ng/mL \pm 2.5; p <0.0001). Además, la concentración de autoanticuerpos de pacientes con CAA-ri demostró volver a los valores normales (es decir, comparables a los controles) después de la fase de remisión de la patología (14.5 ng/mL \pm 8.8; p<0.0006 frente a apCAA-ri). No surgió una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de controles y CAA o rpCAA-ri (Figura 8a). Además, es digno de mención el hecho de que se observó la misma reducción de la concentración de anticuerpo tanto después del tratamiento con terapia esteroide como después de una remisión espontánea de los síntomas, es decir, sin tratamiento. De hecho, los casos 1-5 mostraron una reducción de anticuerpos después del tratamiento con esteroides (intravenoso), mientras que para los casos 6 y 8 la disminución de la concentración de anticuerpos resultó espontánea. La Figura 8b muestra la tendencia específica de la disminución previa/posterior a la remisión de la concentración de anticuerpos en el CSF, ilustrada en el caso.

Progresión en el tiempo de anticuerpos anti-A β durante el tratamiento con esteroides

Se monitorizó el tiempo de progresión del cambio de la concentración de anticuerpos anti-A β en el paciente #5, en el que se confirmó el diagnóstico mediante biopsia cerebral. Como se muestra en la Figura 9, la concentración de anticuerpo, en comparación con la primera dosificación durante la fase aguda de la enfermedad, mostró una reducción progresiva después de cada administración IV de esteroides, hasta alcanzar los niveles de concentración detectables en los sujetos control. La reducción de anticuerpos sigue también la mejora paralela del cuadro clínico, como también confirmó mi investigación de MRI contextual para cada recolección de CSF.

Tendencias A β 40, A β 42, tau y P-181 tau

Se comparó el perfil de CSF de A β 40, A β 42, tau y P-181 tau en pacientes apCAA-ri y rpCAA-ri. La concentración de A β 40 y A β 42 en el grupo apCAA-ri demostró ser significativamente mayor en comparación con el grupo rpCAA-ri (2107.0 pg/mL \pm 446.4 vs 1202.0 pg/mL \pm 618.3, p = 0.009; y 640.0 pg/mL \pm 338.3 vs 234.5 pg/mL \pm 168.8; p = 0.015, respectivamente), alcanzando los niveles detectables en controles sanos (1864.0 pg/mL \pm 669.2, p = 0.032 y 747.0 pg/mL \pm 342.2; p = 0.002 vs rpCAA-ri, respectivamente) y en línea con datos presentes en la literatura. Tau (335.9 pg/mL \pm 312.7) en pacientes apCAA-ri demostró ser alta en comparación con rpCAA-ri (85.2 pg/mL \pm 70.0; p = 0.0041) y con controles sanos (131.4 pg/mL \pm 115.4; p = 0.012), como se muestra en la Figura 5b. P-181 tau (47.0 pg/mL \pm 30.5) durante la fase apCAA-ri resultó alta en comparación con rpCAA-ri (22.8 pg/mL \pm 7.6; p = 0.007) y controles (29.0 pg/mL \pm 16.1; p = 0.044) La tendencia de concentración de A β 40, A β 42, tau y P-181 tau para cada paciente individual durante apCAA-ri y rpCAA-ri se informa en las Figuras 10a, b, c y d.

Correlación entre la concentración de anticuerpos anti-A β y, respectivamente, los niveles de CSF de A β 40 y A β 42.

El análisis de correlación en apCAA-ri mostró una evidente correlación entre la concentración de anticuerpos y las formas circulantes de A β 40 (r = 0.85, p = 0.002) y A β 42 (r = 0.65, p = 0.042), como se representa en la Figura 11.

Niveles fisiológicos de autoanticuerpos en el CSF de sujetos con Alzheimer

Como se muestra en la Figura 15, se evaluaron los niveles de anticuerpos anti-A β presentes en el CSF de pacientes con Alzheimer, observando que los pacientes portadores del factor de riesgo genético ApoE epsilon4 (portadores APOE4) tienen una mayor concentración fisiológica de autoanticuerpos (12.84 ng/mL \pm 21.23) en comparación con los pacientes APOE4 NO portadores (2.874 ng/mL \pm 3.063; p<0,001), en apoyo de una mayor predisposición a desarrollar ARIA, tanto espontáneamente como después de la administración de Abeta-DMT.

8.3 Discusión

La etiopatogenia CAA-ri aún permanece desconocida, aunque el mecanismo que conduce al proceso inflamatorio parece ser secundario a una reacción autoinmune contra la proteína A β presente en el SNC. Las observaciones esporádicas tienden a confirmar esta hipótesis, con el reclutamiento de células T CD4 + específicas en los sitios de deposición de A β y un aumento de anticuerpos anti-A β en el CSF, a pesar de que estas observaciones se han

realizado solo en casos clínicos individuales, y la dosis de la concentración de anticuerpos anti-A β que se han realizado con métodos antiguos sujetos a amplios márgenes de error.

5 También se han avanzado recientemente especulaciones similares en AD, aunque incluso en esta patología la dosificación de autoanticuerpos anti-A β ha conducido a resultados escasos y contradictorios, restringidos principalmente a nivel plasmático, solo debido a dificultades técnicas experimentales en la dosificación de anticuerpos en el CSF. En realidad, la dosificación de autoanticuerpos anti-A β en pacientes con AD ha demostrado ser reducida para algunos autores, no variada para otros, e incluso aumentada en otro estudio. Como se mencionó, el principal problema de estos resultados contradictorios se debió a la muy baja concentración de estos anticuerpos en el CSF humano, además de los problemas relacionados con el diseño y el poder de los estudios citados anteriormente.

15 Gracias al método descrito aquí para la concentración y dosificación de anticuerpos, logramos por primera vez confirmar una implicación directa de estos anticuerpos anti-A β durante el transcurso de CAA-ri, en un registro de casos compuesto por 10 pacientes. Además, demostramos que la concentración de anticuerpos aumentó durante la fase aguda de la enfermedad, en comparación con los sujetos control sanos, los sujetos con MS y los pacientes con CAA no inflamatoria, hasta alcanzar niveles que pueden considerarse "normales", es decir, comparables a lo que está presente en los controles, durante las fases de remisión clínica y radiológica.

20 Además, siguiendo la evolución en el tiempo de los anticuerpos anti-A β durante el tratamiento con esteroides, demostramos una disminución de los mismos no solo después de la terapia, sino también después de una remisión espontánea, como evidencia adicional de un papel específico del aumento de la concentración de anticuerpos anti-A β en la determinación de la fase aguda de la enfermedad. Esto es particularmente relevante, ya que podríamos demostrar definitivamente que este evento no es secundario a un efecto específico del tratamiento farmacológico, sino que se correlaciona estrictamente con la progresión de la enfermedad. Esta evidencia está respaldada además por la ausencia de un aumento de anticuerpos anti-A β en pacientes que padecen una enfermedad autoinmune e inflamatoria no relacionada con CAA, representada por OCB+MS.

30 En general, los datos divulgados aquí apoyan firmemente la idea de que la patogénesis de CAA-ri es causada por un proceso autoinmune específico hacia la proteína A β , directamente mediada por autoanticuerpos anti-A β .

35 El mismo mecanismo patogénico podría ser fundamental en la determinación del edema vasogénico reversible que se puede encontrar en alrededor del 5-10% de los pacientes con AD incluidos en los ensayos clínicos con el anticuerpo monoclonal dirigido contra A β , denominado bapineuzumab, efectos adversos que incluso conllevaron interrupción de los protocolos terapéuticos en curso. En consecuencia, las evidencias recientes obtenidas mediante estudios de IRM con las secuencias denominadas ARIA-E (anomalías radiológicas relacionadas con amiloide (imagen) sugestivas de edema vasogénico), destacaron que hasta el 17% de los pacientes tratados con bapineuzumab muestran signos de VE, incluso en ausencia de correlaciones clínicas y en conexión directa con la dosis terapéutica y la presencia del factor de riesgo vascular APOE ϵ 4.

40 En apoyo, Schroeter et al. demostró además que la inmunización pasiva en ratones PDAPP está estrictamente relacionada con la incidencia de microhemorragias, limitada a la deposición focal de A β a nivel perivascular. Parece claro cómo este fenómeno podría estar estrechamente relacionado con el grado de CAA, y modulado (y modulable) por la concentración de la dosis de anticuerpos anti-A β . Esto podría significar que una modulación adecuada de la concentración de anticuerpos administrados anti-A β , capaz de mantener sus concentraciones dentro de valores que pueden considerarse "seguros", podría eliminar o al menos retrasar drásticamente la deposición de A β a nivel cerebral y cerebrovascular, sin incurrir en los efectos adversos enumerados, como VE (ARIA) y daño endotelial.

50 Además, se destacó un efecto patogénico compartido por AD y CAA por la eliminación demostrada de la proteína A β del SNC de pacientes con AD durante los ensayos clínicos con bapineuzumab, lo que sugiere un drenaje masivo de A β desde la forma depositada y/o vascular del parénquima a la forma en circulación, particularmente durante las primeras fases del tratamiento y antes de una desaparición completa de las placas amiloides. Esto está perfectamente en línea con lo que observamos en pacientes que sufren de CAA-ri, donde los niveles circulantes de A β 40 y A β 42 demostraron ser comparables a los detectables en controles sanos y sujetos apCAA-ri, mientras que dichos niveles vuelven a reducirse significativamente en la remisión fases de la enfermedad, hasta alcanzar incluso las concentraciones normalmente detectables en pacientes con AD. Del mismo modo, los marcadores para la degeneración axonal (tau y P-181 tau) se incrementaron en CAA-ri, junto con el aumento espectacular de los autoanticuerpos anti-A β , seguidos por un retorno dentro del rango de controles sanos en rpCAA-ri. Esto demuestra definitivamente que los anticuerpos anti A β no son simplemente los principales actores durante la fase aguda de CAA-ri, sino que el aumento de los niveles de A β 40 y A β 42 en el CSF parece ser el mecanismo por el cual actúan dichos anticuerpos, eliminando A β de las placas y/o los vasos, un mecanismo que, sin embargo, está respaldado por las fuertes correlaciones detectables entre los niveles de proteína amiloide y de los propios anticuerpos. Por otra parte, la alta prevalencia de pacientes portadores de haplotipo APOE ϵ 4 refuerza aún más la mayor susceptibilidad de estos pacientes hacia la predisposición al daño endotelial, como se describió previamente también para la AD.

Considerando las altas expectativas puestas en los ensayos clínicos en curso para la inmunización pasiva hacia A β , una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos compartidos por CAA y AD es fundamental para garantizar todos los efectos beneficiosos de los ensayos clínicos de la forma más segura y efectiva posible. En este contexto, CAA-ri podría representar un modelo humano espontáneo de los mecanismos fisiopatológicos detectables en los sujetos con AD que exhibieron VE durante el tratamiento con bapineuzumab.

Nuestros datos representan un importante avance para la comprensión de los mecanismos patogénicos en la base de la reacción inflamatoria que se manifiesta durante CAA-ri, abriendo, además, perspectivas interesantes para el tratamiento de todas aquellas patologías correlacionadas con un procesamiento anómalo de la proteína precursora de amiloide y a la deposición de A β en el CNS, como CAA y AD. Los resultados previsibles de nuestro nuevo método para la dosificación de anticuerpos anti-A β en el CSF podrían conducir a una validación de modelos futuros y accesibles para el estudio de mecanismos patogénicos en la base de estas patologías y para controlar la efectividad de las nuevas terapias modificadoras de amiloides.

Además, a partir de nuestras consideraciones, es posible suponer estudios futuros que correlacionen la dosificación de anticuerpos anti-amiloide (según la técnica inventada por nosotros) con los datos de MRI relacionados (con las secuencias apropiadas para la identificación de ARIA) y deposición de proteína beta-amiloide con PET, como por ejemplo con los datos de PET a compuesto B C11 Pittsburgh en los cerebros de los pacientes, obteniendo de ese modo directamente consideraciones in vivo significativas sobre la eliminación y deposición de la proteína beta-amiloide cerebral.

Finalmente, dado que el diagnóstico final de CAA-ri aún requiere el uso de un método altamente invasivo y arriesgado como la biopsia cerebral, esperamos que el uso de nuestro método para la dosificación de concentraciones de autoanticuerpos anti-A β en el CSF, en asociación con las evidencias clínico-radiológicas, pronto pueden proponerse como un biomarcador válido y alternativo para apoyar el diagnóstico.

9 Dosificación de niveles de TFPI en el CSF como índice de daño endotelial

La investigación sobre los niveles de TFPI en el CSF de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD, 0.84 ng/mL \pm 0.19) y la inflamación relacionada con la angiopatía amiloide cerebral (CAA-ri, 1.10 ng/mL \pm 0.38) se amplió en comparación con los niveles detectables en un grupo de sujetos control sanos (CTL, 0.48 ng /mL \pm 0.29), de controles que padecen una enfermedad neurodegenerativa sin complicaciones vasculares, como pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (OND, 0.30 ng/mL \pm 0.15), y de pacientes que sufre de angiopatía amiloide cerebral sin componente inflamatorio (CAA, 1.04 ng/mL \pm 0.57).

Como puede inferirse de la Figura 12, la concentración de TFPI en pacientes con AD, CAA y CAA-ri demostró un aumento significativo con respecto tanto al CTL como al OND (p <0.001, respectivamente), como evidencia no solo de la efectividad de nuestro biomarcador para identificar la presencia de daño endotelial, pero también de una posible correlación directa de los mismos con los niveles de depósito amiloide cerebrovascular.

De hecho, las 3 categorías (AD, CAA y CAA-ri) de los pacientes analizados se caracterizan patológicamente por una fuerte deposición de beta-amiloide, tanto a nivel parenquimatoso como cerebrovascular.

Por otra parte, TFPI también demostró estar directamente correlacionado con los marcadores de neurodegeneración y daño axonal, tau y P-181 tau, en pacientes con AD, como evidencia de que el TFPI puede representar un índice de muerte neuronal (p <0.0051, r = 0.47; p <0.0041, r = 0.49, respectivamente) secundario al grado de deposición de amiloide (CAA) (Figura 13).

Los datos clínicos y sociodemográficos de los CTL y AD se presentan en la Tabla 2, mientras que los valores respectivos de los pacientes con CAA y CAA-ri se presentaron previamente en las Tablas 1 y 2.

Tabla 3. Características sociodemográficas de los pacientes con AD y controles relacionados utilizados para la dosificación del TFPI en el CSF.

Variable	Controles n=30	AD n=44
edad (años)	70.7 \pm 12.0	71.9 \pm 7.3
Género (F/M)	17/13	22/22
MMSE ajustado	28.6 \pm 1.9	21.7 \pm 6 #
ApoE4 (% portadores)	23.0	50.0*
TFPI (ng mL)	0.48 \pm 0.29	0.84 \pm 0.19*
tau (pg/mL)	131.6 \pm 104.7	743.8 \pm 457.6*

Variable	Controles n=30	AD n=44
P-181 tau (pg/mL)	24.92 ± 14.76	65.28 ± 30.34*
Abeta42	866.1 ± 209.1	428.4 ± 170.5*
Índice de enlaces	0.51 ± 0.07	0.56 ± 0.2
Índice de daño de BBB	7.0 ± 4.7	8.0 ± 6.5

* p <0.0001 frente a CTL; #p<0.05 vs CTL. MMSE, Miniexamen de estado mental. BBB, barrera hematoencefálica

10. Dosificación de la concentración de TFPI en el CSF de pacientes con CAA-ri

5 Habiendo detectado una tendencia decreciente en la concentración de anticuerpos anti-Aβ en el CSF de pacientes con CAA-ri durante la fase de remisión de la enfermedad (Figura 8b), los inventores verificaron si dicha tendencia también se confirmaba por su biomarcador de daño endotelial, TFPI.

10 Como puede verse en la Figura 14, los valores de TFPI siguen exactamente la misma tendencia encontrada anteriormente para los autoanticuerpos (p = 0.013, apCAA-ri frente a rpCAA-ri), como una prueba más del mecanismo de acción descrito anteriormente (Figura 8b). Es decir, los autoanticuerpos actúan durante las fases agudas de la enfermedad eliminando la proteína Aβ (Figuras 10a y b), desencadenando fenómenos adversos debido a una eliminación rápida de Aβ vascular y parenquimatosa, con toda probabilidad causada por las altas concentraciones de anticuerpos detectables durante apCAA-ri, análogamente a lo que se puede suponer durante la aparición de VE (ARIA) en pacientes con AD sometidos a inmunización terapéutica.

15 Dichas evidencias demuestran que TFPI puede utilizarse como un nuevo biomarcador de daño endotelial válido como consecuencia del depósito de amiloide en enfermedades neurodegenerativas y como un índice de daño endotelial como consecuencia de la eliminación de Aβ por anticuerpos anti-Aβ, ambos en modelos espontáneos de enfermedad, como CAA-ri, y para el seguimiento de la acción terapéutica durante los ensayos de inmunización en AD o en terapias modificadoras de la enfermedad en general.

11. Análisis de la predicción diagnóstica mediante análisis ROC y determinación de corte

25 Como último análisis, se realizó una prueba de predicción estadística para evaluar la efectividad de nuestros marcadores para hacer un diagnóstico de enfermedad, mediante la comparación de curvas ROC para los dos biomarcadores propuestos (anticuerpos anti-Aβ y TFPI) en 25 controles sanos, en comparación con los 10 pacientes que sufren de CAA-ri disponibles para los inventores.

30 Actuamos con dos modelos:

1) Análisis de la curva ROC (Característica Operativa del Receptor) para determinar la predictividad de un biomarcador individual

35 Biomarcador 1: anticuerpos anti-Aβ

40 Esta prueba nos permitió demostrar que la dosificación de anticuerpos anti-Aβ en el CSF de pacientes apCAA-ri es altamente predictiva para discriminar la patología (AUC= 0.97). Del análisis, además, fue posible definir un valor de corte, en términos de concentración de anticuerpos, por debajo del cual el sujeto no es clasificable como afectado por CAA-ri. Dicho corte, para una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% establecido por la prueba, demostró ser de <34.22 ng/mL.

Biomarcador 2: TFPI

45 Esta prueba nos permitió demostrar que la dosificación de TFPI en el CSF de pacientes apCAA-ri es altamente predictiva para discriminar la patología (AUC = 0.99). Del análisis, además, fue posible definir un valor de corte, en términos de concentración de TFPI, por debajo del cual el sujeto no es clasificable como afectado por CAA-ri. Tal límite, para una sensibilidad del 100% y una especificidad del 89% establecida por la prueba, demostró ser de <0.82 ng/mL.

50 2) Análisis de predictividad mediante la utilización concomitante de ambas curvas ROC

55 Mediante un análisis que tomaría en cuenta de forma concomitante los valores detectables para el biomarcador 1 y para el biomarcador 2, en el mismo paciente se encontraron sensibilidad y especificidad cercanas al 100%, lo que confirma que el uso concomitante de los dos biomarcadores permite una casi absoluta capacidad para discriminar a un paciente CAA-ri de un sujeto saludable. En resumen, aunque reconocemos que el registro de casos en cuestión

necesariamente tendrá que ampliarse y reconfirmarse en un número mayor de casos, al evaluar concomitantemente los niveles de TFPI y de anticuerpos anti-A β , es posible proporcionar una prueba de diagnóstico altamente predictiva, por lo tanto, recomendable como una herramienta de diagnóstico válida, alternativa a la biopsia cerebral aún esencial para un diagnóstico firme de CAA-ri.

5 Los mismos valores de Especificidad y Sensibilidad se detectaron también después del análisis multivariado en el que se tomaron en cuenta otras posibles variables que podrían haber afectado la prueba, como el sexo, la edad, tau y P-181 tau.

10 Referencias

Y. Du, R. Dodel, H. Hampel, K. Buerger, S. Lin, B. Eastwood, K. Bales, F. Gao, H.J. Moeller, W. Oertel, M. Farlow, S. Paul, Reduced levels of amyloid betapeptide antibody in Alzheimer disease, *Neurology* 57(5) (2001) 801-805.

15 M.E. Weksler, N. Relkin, R. Turkenich, S. LaRusse, L. Zhou,, por ejemplo, Szabo, Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals, *Exp. Gerontol.* 37(7) (2002) 943-948.

20 M.S. Song, I. Mook-Jung, H.J. Lee, J.Y. Min, M.H. Park, Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer disease in elderly Korean patients, *J. Int. Med. Res.* 35(3) (2007) 301-306.

B.T. Hyman, C. Smith, I. Buldyrev, C. Whelan, H. Brown, M.X. Tang, R. Mayeux, Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer disease, *Ann. Neurol.* 49(6) (2001) 808-810.

25 L. Baril, L. Nicolas, B. Croisile,, por ejemplo, Crozier, C. Hessler, A. Sassolas, J.B. McCormick, E. Trannoy, Immune response to Abeta-peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer disease and control subjects, *Neuroci. Lett.* 355 (2004) 226-230.

30 A. Nath, E. Hall, M. Tuzova, M. Dobbs, M. Jons, C. Anderson, J. Woodward, Z. Guo, W. Fu, R. Kryscio, D. Wekstein, C. Smith, W.R. Markesbery, M.P. Mattson, Autoantibodies to amyloid betapeptide (Abeta) are increased in Alzheimer disease patients and Abeta antibodies can enhance Abeta neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development, *Neuromol. Med.* 3 (2003) 29-39.

35 Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jäckel S, Wei X, Buerger K, Höft C, Hemmer B, Möller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer disease. *Ann Neurol.* 2002 Aug;52(2):253-6.

40 Di Francesco JC, Brioschi M, Brighina L, Ruffmann C, Saracchi E, Costantino G, Galimberti G, Conti E, Curtò NA, Marzorati L, Remida P, Tagliavini F, Savoiaro M, Ferrarese C, Anti-A β autoantibodies in the CSF of a patient with CAA-related inflammation: a case report. *Neurology.* 2011 Mar 1;76(9):842-4.

Conti E, Galimberti G, Piazza F, Raggi ME, Ferrarese C. Increased soluble APPalpha, Abeta 1-42, and anti-Abeta 1-42 antibodies in plasma from Down syndrome patients.

45 *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2010;24:96 -100.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para la cuantificación de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide en una muestra de líquido cefalorraquídeo que comprende los siguientes pasos:
- 5 a) concentrar la cantidad de dichos anticuerpos de dicha muestra con microperlas magnéticas recubiertas con macromoléculas capaces de unirse a dichos anticuerpos;
- 10 b) analizar la muestra concentrada obtenida en la etapa a) mediante ensayo inmunoenzimático o mediante radioinmunoensayo;
- 15 c) analizar una muestra que comprende anticuerpos anti-proteína beta-amiloide que tiene un título conocido con el mismo ensayo utilizado en la etapa b) y elaborar la curva de calibración relacionada, donde dicho anticuerpo que tiene un título conocido es un anticuerpo murino perteneciente a la clase IgG2a o IgG2b o un anticuerpo humano o humanizado que pertenece a la clase IgG2b o IgG1 en donde
- dicha etapa de concentración a) comprende una etapa de absorción de dicha muestra de fluido cerebroespinal sobre dichas microperlas y una etapa de elución de dichos anticuerpos a partir de dichas microperlas;
- 20 dicho paso de análisis b) comprende los siguientes pasos:
- I) proporcionar una fase sólida recubierta con proteína beta-amiloide y/o isoformas de la misma;
- 25 II) incubar dicha fase sólida con el material concentrado obtenido de la etapa a) permitiendo de este modo la unión de dichos autoanticuerpos a la proteína beta-amiloide en dicha fase sólida, seguido de enjuague para eliminar el material no unido;
- 30 III) incubar la fase sólida obtenida en la etapa II) con una proteína conjugada con una enzima, o un marcador radioactivo capaz de unirse a anticuerpos humanos, seguido de enjuague para eliminar dicha proteína conjugada no unida;
- IV) detectar la señal de dicha proteína conjugada.
- 35 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo que tiene un título conocido se selecciona de: 4G8, 6 E10, G2-11, 3D6, m266, Solanezumab, Ponezumab, Bapineuzumab, Gantenerumab, BAN2401, BIIB037, inmunoglobulinas administradas por vía intravenosa (IVIG), Gammagard, Octagam, Newgam.
- 40 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho anticuerpo que tiene un título conocido es específico para un epítipo comprendido en la secuencia de aminoácidos en la posición 1-28 de la proteína beta-amiloide.
- 45 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo que tiene un título conocido reconoce el epítipo correspondiente a la secuencia de aminoácidos en la posición 17-24 de la proteína beta-amiloide.
- 50 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha proteína conjugada es una proteína conjugada con una enzima, seleccionada en el grupo que comprende: proteína A conjugada a Hrp, Proteína G conjugada a Hrp, biotina conjugada, estreptavidina conjugada, anticuerpos conjugados con la enzima Hrp o con fosfatasa alcalina (ALP) o con beta galactosidasa o con una molécula fluoresceinada o con una molécula luminiscente.
- 55 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha proteína conjugada con un marcador radiactivo se selecciona en el grupo que comprende: proteína G conjugada con I-125, I-131 o I-99, A conjugada con I-125, I-131 o I-99, anticuerpo anti-IgG conjugado a I-125, I-131 o I-99.
- 60 7. Un método in vitro para monitorizar un tratamiento de inmunización activo y/o pasivo de la enfermedad de Alzheimer, en donde las etapas del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 se llevan a cabo en más muestras de CSF recogidas en diferentes momentos de dicho tratamiento y los datos de cuantificación obtenidos de cada muestra se comparan entre sí, construyendo así una progresión en el tiempo de la concentración de anticuerpos contra la proteína beta-amiloide en el CSF.
- 65 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además una etapa de determinar para cada una de dichas muestras la concentración de uno o más marcadores de daño endotelial.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho marcador de daño endotelial es el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI).

- 5 10. Un método in vitro para el diagnóstico o la monitorización terapéutica de la angiopatía amiloide cerebral (CAA), incluso asociada a inflamaciones y edema vasogénico (CAA-ri), de una muestra de CSF de un paciente que comprende los pasos del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y una etapa adicional de comparación de la concentración determinada de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide con un valor de referencia estándar.
- 10 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho valor de referencia estándar se determina mediante una curva ROC obtenida elaborando las concentraciones de un conjunto de muestras de individuos sanos e individuos que padecen CAA o CAA-ri.
- 15 12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que dicho valor de referencia está comprendido entre 30 y 40 ng/mL.
- 20 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende una etapa adicional de determinar la concentración de TFPI en una muestra de CSF de dicho paciente y de comparar el valor determinado con un valor de referencia estándar.
- 25 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho valor de referencia estándar de TFPI se determina mediante una curva ROC obtenida elaborando las concentraciones de un conjunto de muestras de individuos sanos e individuos que padecen CAA o CAA-ri.
- 30 15. El método de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que dicho valor de referencia estándar de TFPI está comprendido entre 0,70 y 0,90 ng/mL.
- 35 16. Un método in vitro para el diagnóstico o la monitorización terapéutica de anomalías radiológicas (ARIA) de una muestra de CSF de un paciente que comprende los pasos del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una etapa adicional de comparación de la concentración determinada de anticuerpos anti-proteína beta-amiloide con un valor de referencia estándar.
- 40 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende una etapa adicional de determinar la concentración de TFPI en una muestra de CSF de dicho paciente y de comparar el valor determinado con un valor de referencia estándar.
- 45 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho valor de referencia estándar de TFPI se determina mediante una curva ROC obtenida elaborando las concentraciones de un conjunto de muestras de individuos sanos y de individuos que padecen CAA o CAA-ri.
19. El método de acuerdo con la reivindicación 18 o 18, en donde dicho valor de referencia estándar de TFPI está comprendido entre 0.70 y 0.90 ng/mL.
20. Un kit para la detección de anticuerpos de proteína beta-amiloide que comprende microperlas magnéticas recubiertas con macromoléculas capaces de unirse a dichos anticuerpos y una o más alícuotas de anticuerpos que tienen un título conocido contra proteína beta-amiloide, en donde dicho anticuerpo que tiene un título conocido es un anticuerpo murino que pertenece a la clase IgG2a o IgG2b o un anticuerpo humano que pertenece a la clase IgG2b o IgG1.

ETAPA DE PRE ENRIQUECIMIENTO: INMUNOPRECIPITACIÓN DE PERLAS MAGNÉTICAS

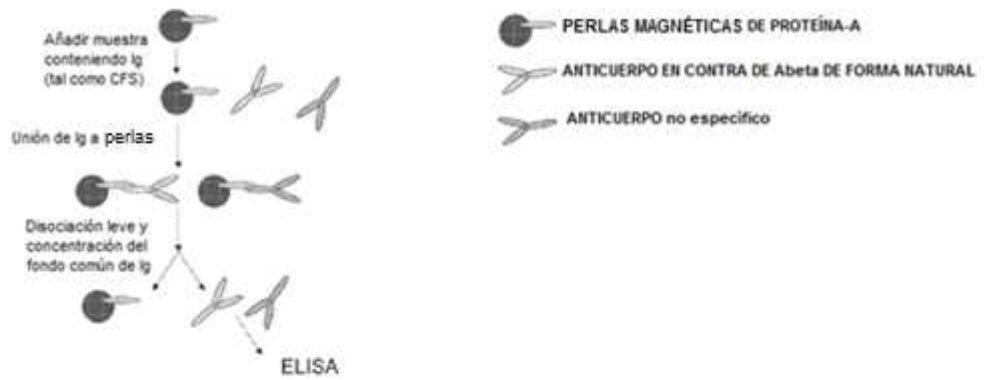


Figura 1

ELISA

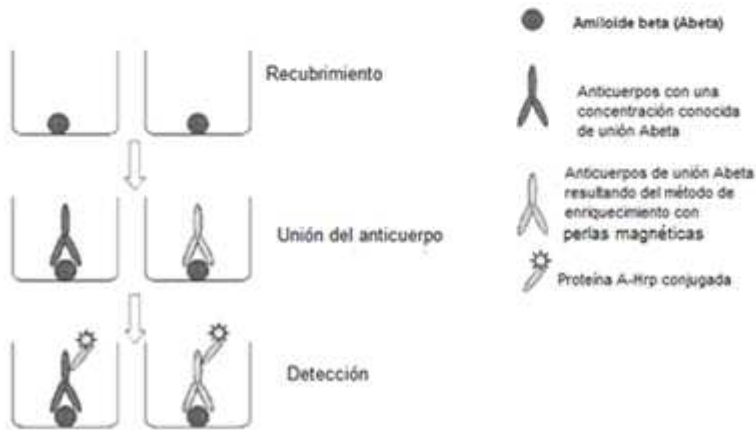


Figura 2

	Anti IgG Hrp humana conjugada	Proteína A-Hrp conjugada
G2-11	0,426	0,0125
6E10	1,415	0,8625
4G8	1,416	1,469

Figura 3

Curva de calibración obtenida con la ELISA descrita en el estado de la técnica (G2-11 + anti IgG-HRP humana, Conti et al., 2010)

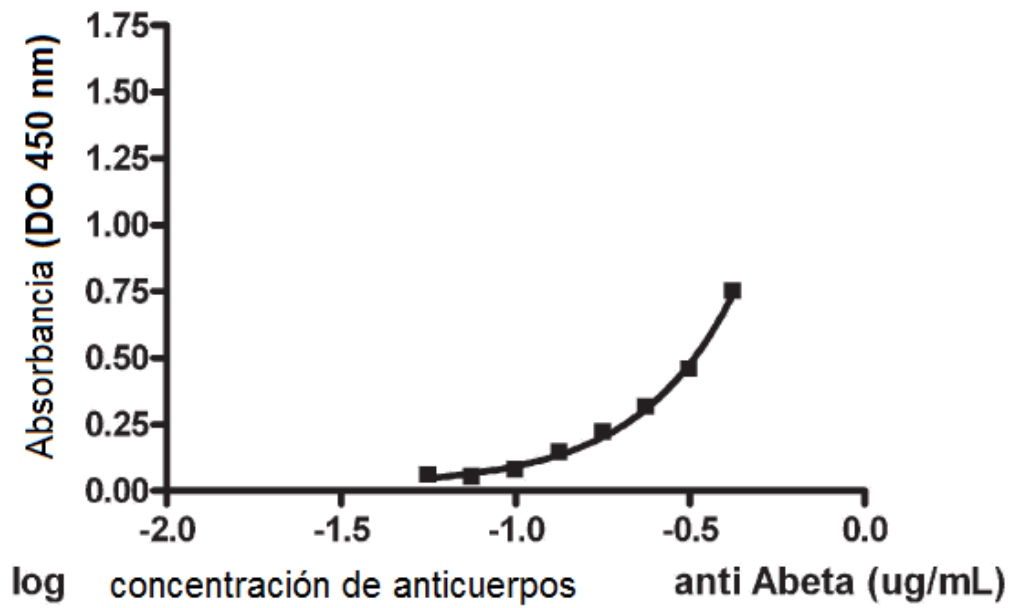
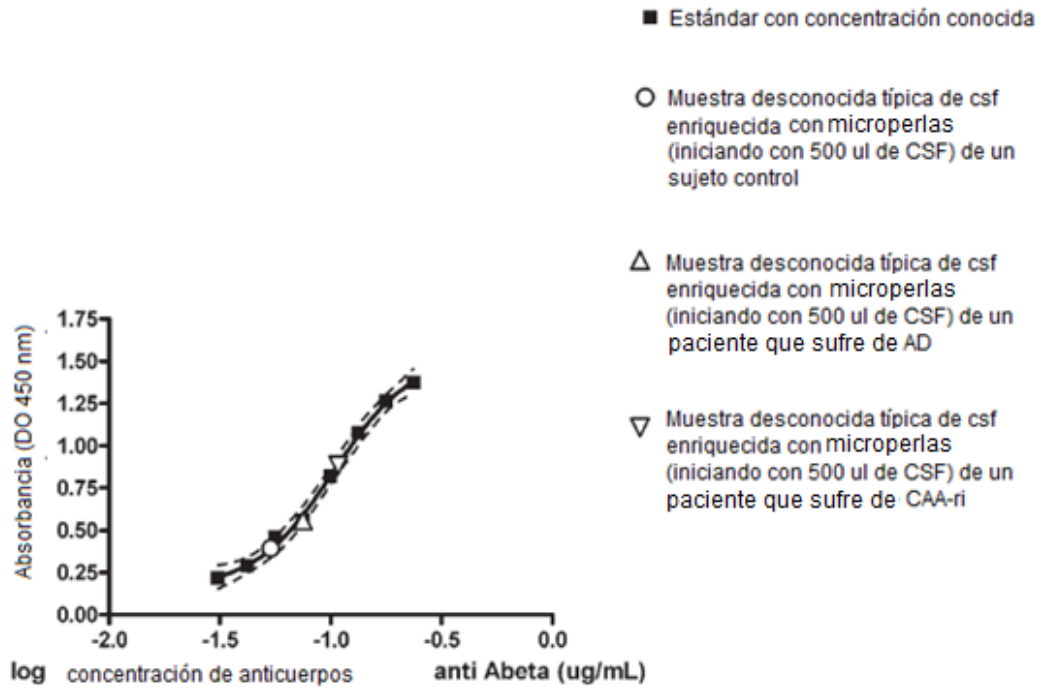


Figura 4 A

Curva de calibración obtenida con el método ELISA llevado a cabo por los inventores (4G8 + Prota-HRP) y tres valores típicos asequibles, después del enriquecimiento con perlas magnéticas, CSF



Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza del 95% de la curva de regresión

Figura 4 B

Concentración típica de los estándares de calibración y sus valores de absorbancia obtenidos con:

1) Procedimiento ELISA descrito en el estado de la técnica (G2-11 + anti IgG-HRP humana, Conti et al., 2010)

Estándar ug/mL	DO (450nm)
0,422	0,751
0,316	0,457
0,237	0,315
0,178	0,219
0,134	0,142
0,100	0,078
0,075	0,053
0,056	0,059
BLANCO	0,108

Valores de DO indistinguibles del blanco

2) Procedimiento ELISA llevado a cabo por los inventores (4G8 + Proteína A-HRP)

Estándar ug/mL	DO (450nm)
0,237	1,371
0,178	1,263
0,134	1,072
0,100	0,817
0,075	0,558
0,056	0,456
0,042	0,288
0,031	0,214
BLANCO	0,077

Figura 4 C

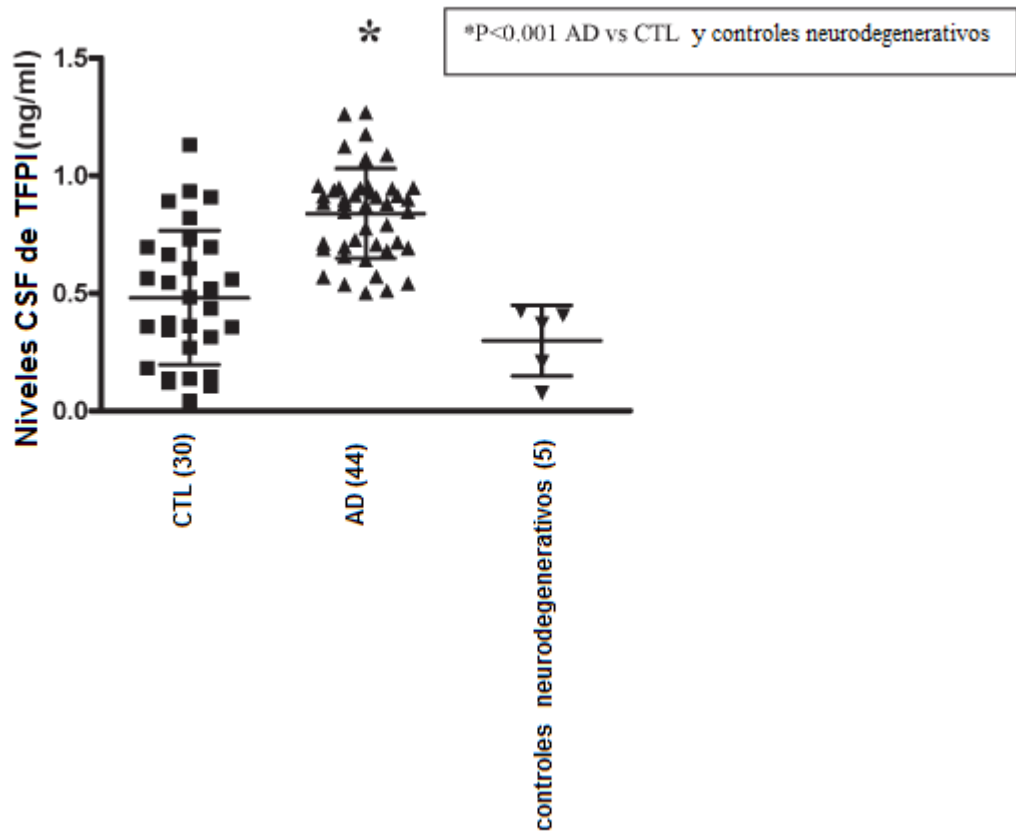


Figura 5

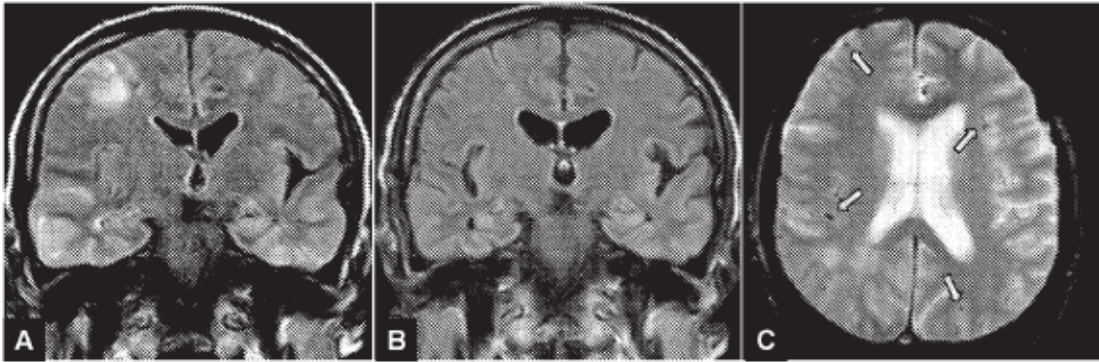


Figura 6

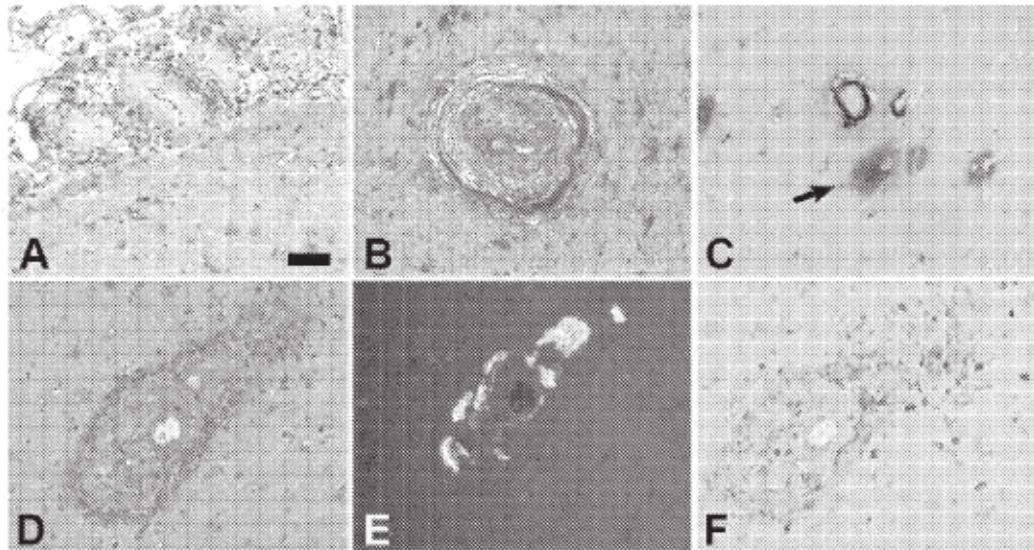


Figura 7

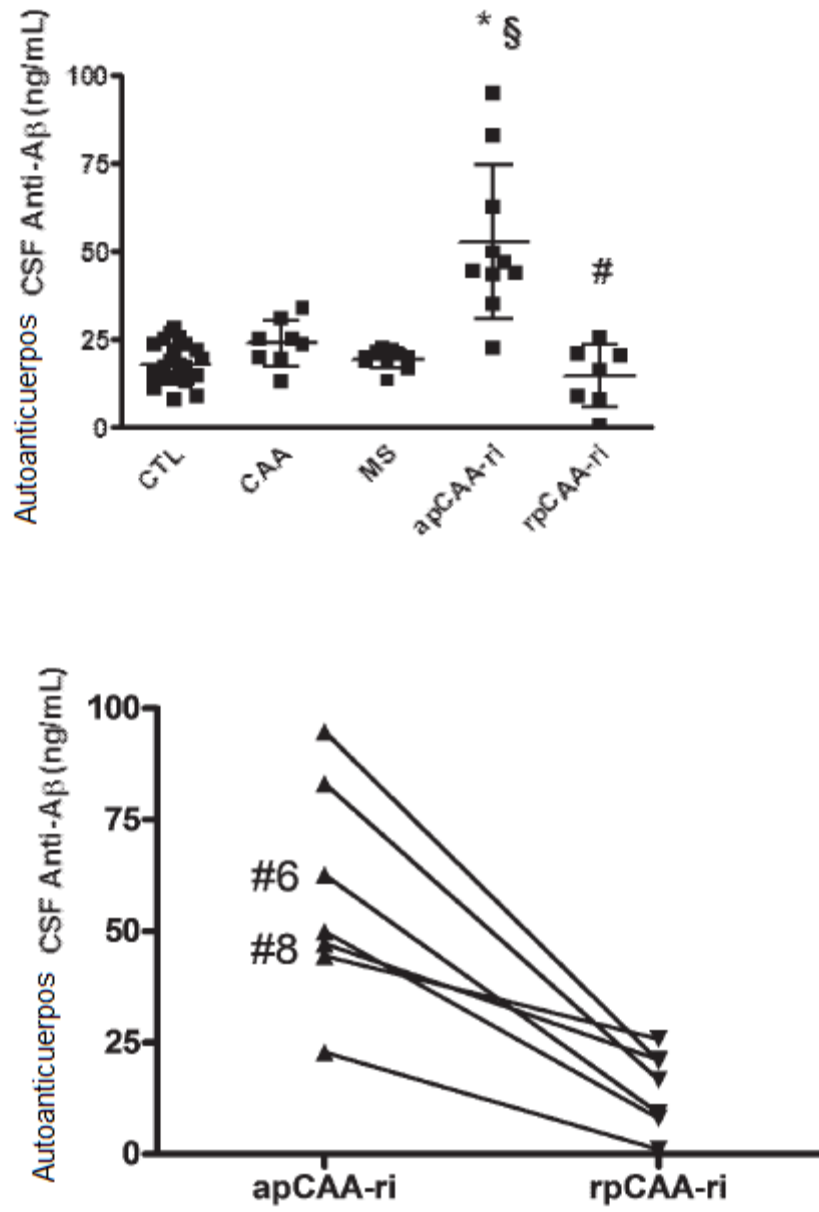


Figura 8

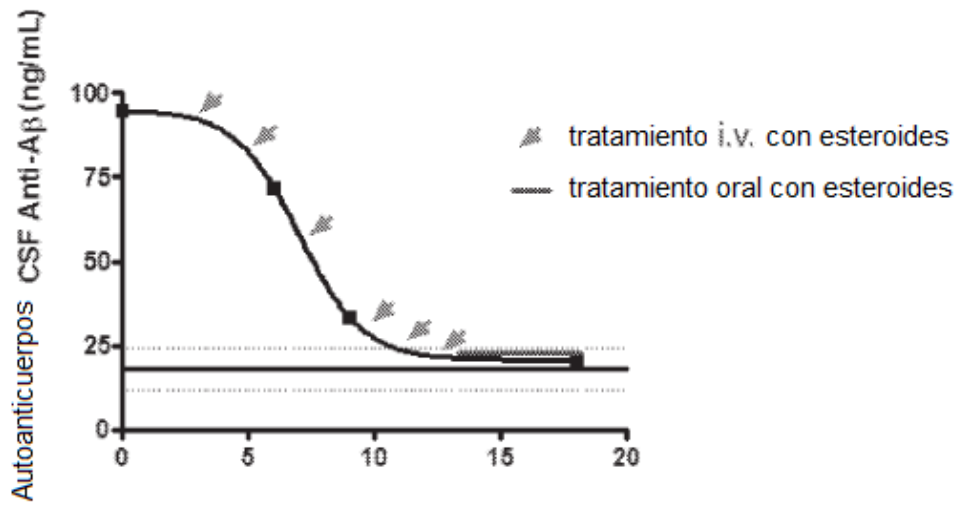


Figura 9

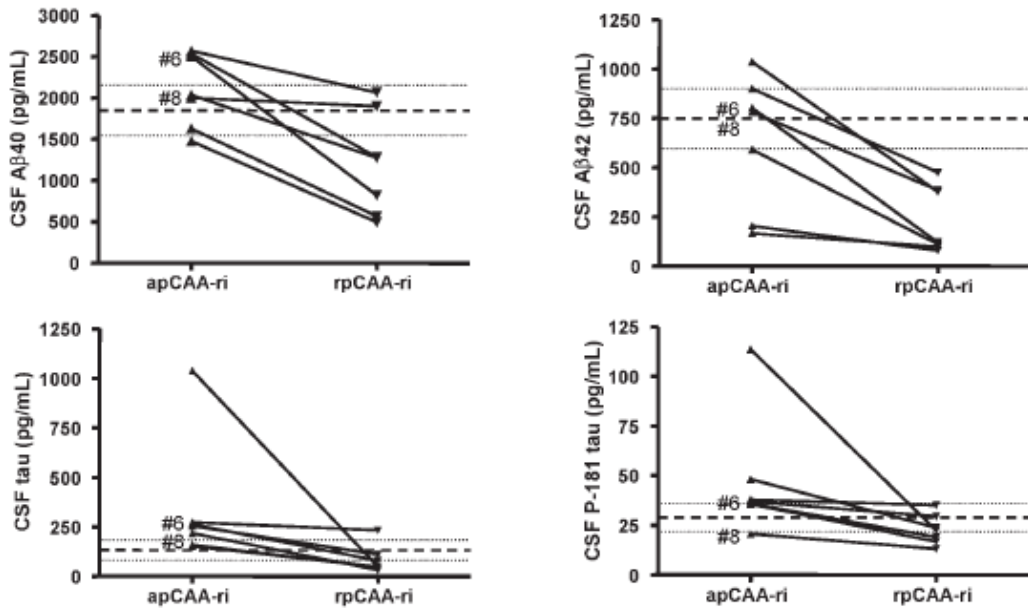


Figura 10

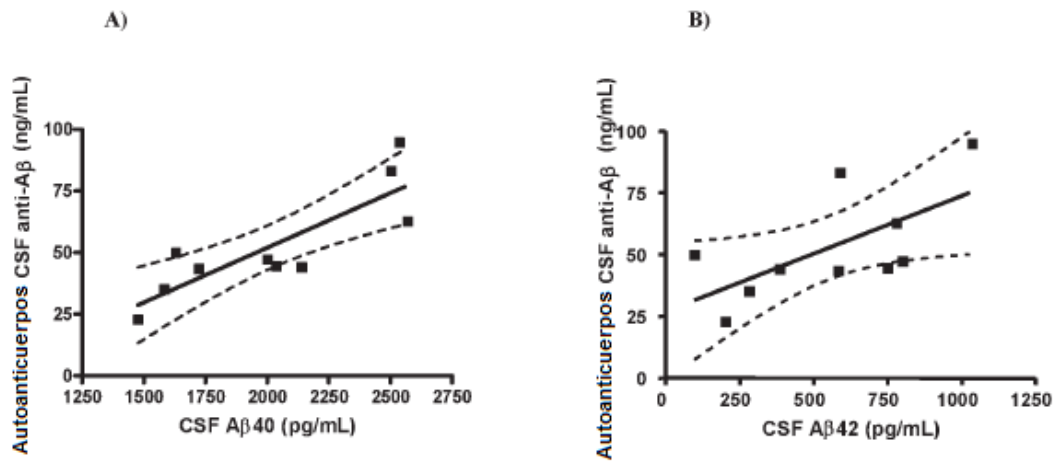


Figura 11

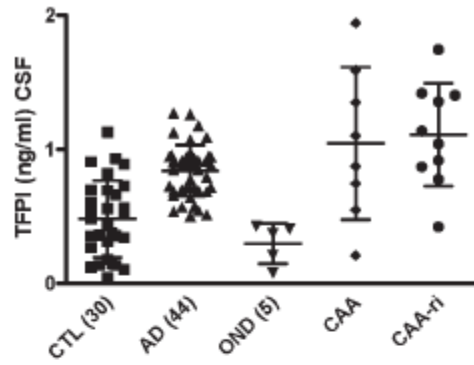


Figura 12

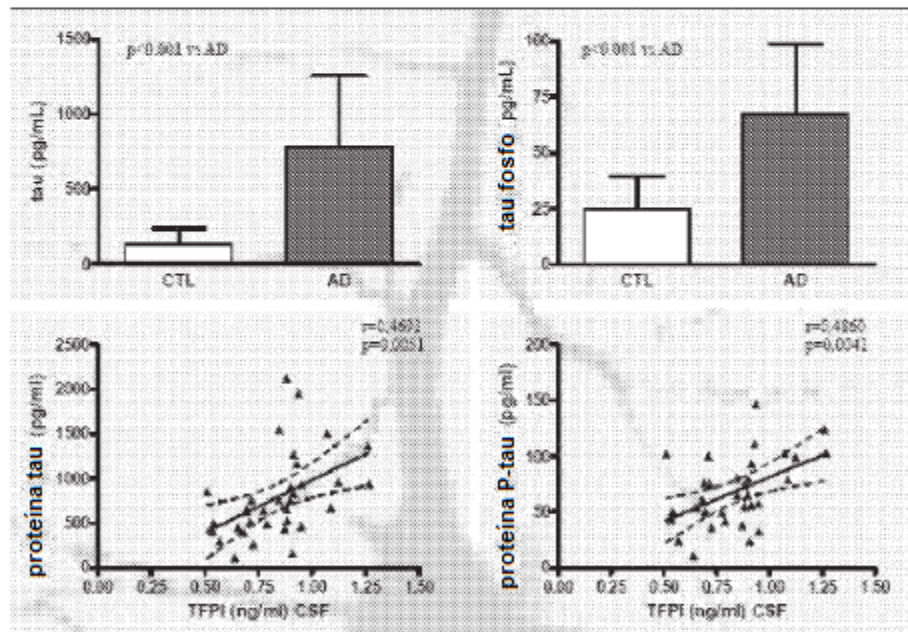


Figura 13

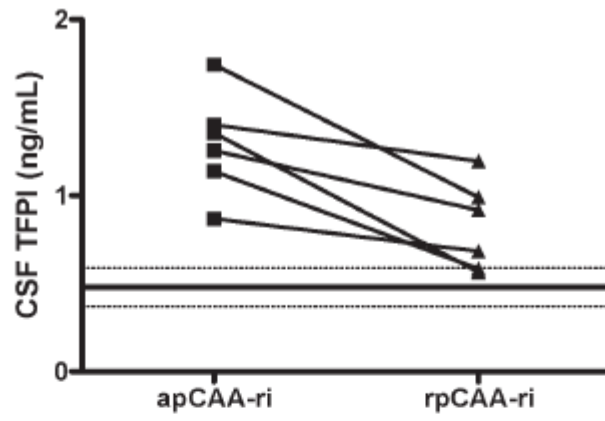


Figura 14

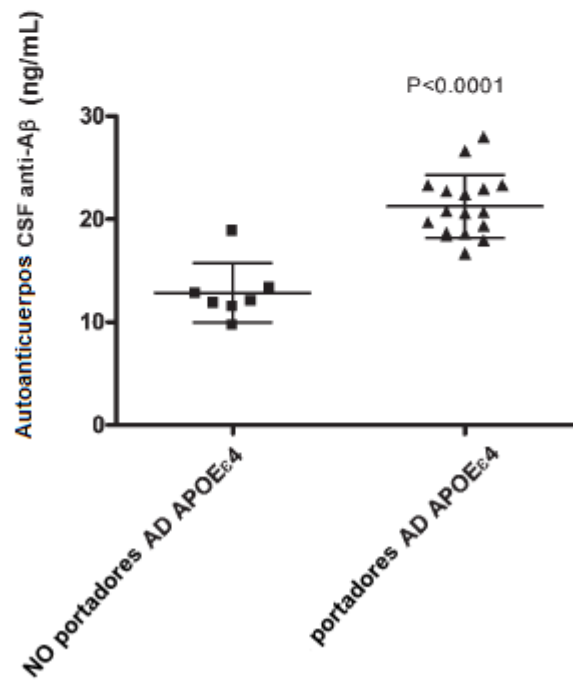


Figura 15