

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 526**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2014** **PCT/EP2014/054185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014** **WO14135546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2014** **E 14726887 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2965090**

54 Título: **Métodos y composiciones para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

05.03.2013 GB 201303936

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

02.07.2018

73 Titular/es:

RANOX TEORANTA (100.0%)
Meenmore
Dungloe, Co. Donegal, IE

72 Inventor/es:

FITZGERALD, PETER;
MCCONNELL, IVAN;
LAMONT, JOHN y
RICHARDSON, CIARAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica identificada actualmente por el deterioro cognitivo progresivo y la pérdida de memoria que conduce a una demencia grave. La EA es típicamente una enfermedad de ancianos, más prevalente en personas mayores de 65 años. Es la principal causa de demencia en los ancianos y con una esperanza de vida cada vez mayor, la prevalencia en la población solo irá en aumento. La EA generalmente no es mortal, sin embargo, a medida que progresa la enfermedad hasta una demencia grave, los pacientes son incapaces de cuidarse a sí mismos y generalmente requieren atención profesional a tiempo completo.

Actualmente la EA no tiene curación, pero existen tratamientos que pueden ralentizar la progresión de la enfermedad. Por tanto, un método que pueda identificar a los pacientes con EA y potencialmente monitorizar su respuesta al tratamiento sería un ensayo inestimable (una herramienta para los médicos clínicos).

Los métodos actuales de diagnóstico de EA implican una evaluación mental (tal como un minexamen cognoscitivo, MEC), tomografía computarizada/imágenes por resonancia magnética (TC/IRM), medición del líquido cefalorraquídeo para isoformas *tau* o *beta*-amiloides específicas conocidas en la técnica porque se asocian con EA o genotipificación de los factores de riesgo genéticos, tal como apolipoproteína E4 (variante ApoE4); actualmente no hay biomarcadores sanguíneos clínicamente validados de EA. Las deficiencias de estos métodos pueden incluir una falta de especificidad, pueden estar expuestos a errores de interpretación y pueden ser altamente invasivos; en general, un verdadero diagnóstico solo se puede hacer *post mortem*. Actualmente, no hay métodos de biomarcadores usados habitualmente para ayudar al diagnóstico positivo de la EA.

La patogénesis de la EA no se comprende completamente, pero las investigaciones patológicas de pacientes revelaron la presencia de ovillos neurofibrilares (causados por la acumulación de proteína *tau*) y placas *beta*-amiloides. También hay una pérdida neuronal y sináptica generalizada, que se cree que es la base de la función cognitiva y nemotécnica reducida. Se ha demostrado que la formación de placas causa neurodegeneración, sin embargo, se desconocen las causas de la formación de placas. Los ensayos diagnósticos que identifican isoformas específicas de estas proteínas han sido el foco principal en el desarrollo de las pruebas diagnósticas. Sin embargo, la presencia de estas proteínas puede indicar que la enfermedad ha progresado más allá de una etapa terapéuticamente viable y por tanto pueden ser más beneficiosos los marcadores de riesgo más tempranos.

Se han realizado varias invenciones que describen métodos para diagnosticar la EA usando biomarcadores sanguíneos, estas incluyen los documentos de patentes: EP2293075 A2 y WO 2011/143597 A1. El documento EP2293075 identificaba varios marcadores expresados en plaquetas sanguíneas usando electroforesis en gel bidimensional, que se expresaban diferentemente entre los pacientes con EA y de control. Estos incluían variantes de proteínas que pueden corresponder a una susceptibilidad genética a la EA. Estos inventores describieron una invención adicional (documento EP2507638) en la que los biomarcadores proteínicos se combinaban en un algoritmo junto con la genotipificación para mejorar el modelo de diagnóstico. En este algoritmo, los pacientes que eran positivos a ApoE4 tenían más probabilidades de tener la EA, así como los pacientes que eran negativos a ApoE4, pero expresaban dos copias del gen de glutatión-S-transferasa-1-omega de tipo natural (wtGSTO). En el contexto de esta invención anterior, wtGSTO se definió como cualquier gen GSTO que no contuviera la mutación rs4825 (que codifica un ácido aspártico en lugar de una alanina en el residuo 140 [A140D]). Esta invención destaca la eficacia de combinar biomarcadores basados en la sangre y la genotipificación para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad. El documento WO 2011/143597 A1 identificó múltiples biomarcadores que se expresaban diferentemente entre el suero de paciente con EA y de control usando ensayos múltiples. En esta invención, se observa mayor precisión de diagnóstico cuando se usan combinaciones múltiples de biomarcadores combinados con mediciones clínicas y variables demográficas que usan bosques aleatorios para desarrollar un algoritmo de clasificación. Sin embargo, estos métodos no han encontrado utilidad clínica y existe una necesidad urgente de un método que se pueda usar de forma habitual para ayudar al diagnóstico de la EA.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención identifica y describe proteínas que se expresan diferencialmente en el estado de la enfermedad de Alzheimer con relación a su expresión en estado normal.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar o monitorizar a una persona en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende medir la concentración o los niveles relativos de afamina y alfa-1-antiquimotripsina, y opcionalmente al menos un biomarcador adicional seleccionado de alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B100, complemento C3, serina/treonina quinasa TBK-1, proteína de unión a la vitamina D, alfa-1-B-glicoproteína, hemopexina, seroalbúmina, ceruloplasmina, alfa-2-antiplasmina, apolipoproteína A1, factor H del complemento, IgG, proteína de unión a Fc de IgG, hornerina, fibrinógeno o complemento C5 en una muestra de fluido obtenida de una persona que se sospecha que tiene o al menos está en riesgo de tener

EA, y establecer la importancia de las concentraciones o niveles relativos. Preferiblemente, la muestra es suero o plasma.

En otra realización, los niveles relativos de las proteínas expresadas diferentemente se usan junto con al menos uno del genotipo o fenotipo ApoE o GSTO1 de un sujeto por identificación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína en el genoma o por determinación de la forma de proteína producida en una muestra de fluido tomada del sujeto. Esto puede aumentar la capacidad de diferenciar entre pacientes con riesgo de desarrollar o tener EA y los que no tienen riesgo o no tienen EA.

En algunas realizaciones, el método para predecir la probabilidad de que un sujeto se pueda definir como que padece o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, puede comprender un modelo de predicción inequívoca que usa modelos estadísticos o métodos de aprendizaje automático. Dichos métodos pueden incluir, aunque sin limitación, redes neuronales de perceptrones, máquinas de vectores de soporte, regresión logística, árboles de decisión y bosques aleatorios.

Descripción de los dibujos

Figuras 1-9, diagramas de cajas que comparan los niveles relativos de afamina (BSI0268), afamina (BSI0223), afamina (BSI0220), alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221), complemento C5 (BSI0782), desconocido (BSI0183), desconocido (BSI0279), complemento C3 (BSI0243) y alfa-1-B-glicoproteína (BSI0182) en pacientes de control y con EA.

Figura 10, curva de las características operativas del receptor (abreviadamente ROC, por la expresión inglesa *Receiver Operating Characteristic*) para uso de afamina (BSI0268) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 11, curva ROC para uso de alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 12, curva ROC para uso de un modelo que comprende afamina (BSI0268) y alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 13, curva ROC para uso de la relación entre afamina (BSI0268) y alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 14, curva ROC para uso de un modelo que comprende la relación afamina (BSI0268)/alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) y el complemento C3 (BSI0217) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 15, curva ROC para uso de un modelo que comprende la relación afamina (BSI0268)/alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) y alfa-2-macroglobulina (BSI0195) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 16, curva ROC para uso de un modelo que comprende la relación afamina (BSI0268)/alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) y serina/treonina proteína quinasa TBK1 (BSI0112) para discriminar entre los pacientes de control y con EA.

Figura 17, curva ROC para uso de un modelo que comprende la relación afamina (BSI0268)/alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) y el complemento C5 (BSI0792) para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 18, curva ROC para uso de un modelo que comprende la relación afamina (BSI0268)/alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) y el estado con ApoE4 para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 19, curva ROC para determinar la capacidad del estado con ApoE4 para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 20, curva ROC para uso de un modelo que comprende la relación afamina (BSI0268)/alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221), el complemento C5 (BSI0792) y el estado con ApoE4 para discriminar entre pacientes de control y con EA.

Figura 21, árbol de decisión para uso de la relación afamina/alfa-1-antiquimotripsina y el estado con ApoE para distinguir entre pacientes de control y con EA.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un método basado en biomarcadores para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA). Específicamente, se realiza la medición de los niveles relativos o la concentración de biomarcadores dentro de una muestra de fluido tomada de un paciente del que se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. La descripción también se puede usar para monitorizar la progresión de la EA y para diagnosticar y monitorizar otras formas de demencia y trastornos cognitivos, incluyendo estos, aunque sin limitación: demencia de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, demencia vascular, deterioro cognitivo leve, demencia frontotemporal. El término 'biomarcador', en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula presente en una muestra biológica de un paciente, cuyos niveles en dicho fluido biológico pueden ser indicativos de la enfermedad de Alzheimer. Dichas moléculas pueden incluir péptidos/proteínas o ácidos nucleicos y sus derivados; el término 'niveles relativos', en el contexto de la presente invención se refiere a la lectura de la intensidad de la luz o de la absorbancia (sin embargo, la invención no está restringida a la medición que usa estas técnicas, los ex-

pertos conocerán otros métodos para medir moléculas biológicas que no utilizan la medición de las propiedades de la luz visible para determinar una medición) a partir de un ensayo biológico que da como resultado la comparación de los niveles del biomarcador en una muestra biológica dada con un material de referencia con una concentración conocida (esta concentración puede ser cero) del biomarcador o nivel por el que el biomarcador dentro de una muestra biológica compite directamente con un material de referencia que se sabe que contiene dicho biomarcador que se une a una sonda específica para dicho biomarcador, generando este último método un nivel relacionado inversamente con la concentración del biomarcador; el término 'sonda' en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula sintética o biológica que se une específicamente a una región de un biomarcador. El término 'en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer', en el contexto de la presente invención, se refiere a un paciente que muestra signos clínicos tempranos; tal como deterioro cognitivo leve (DCL) o demencia vascular determinado por métodos conocidos en la técnica (como MEC), tiene antecedentes familiares de enfermedad de Alzheimer, tiene prevalencia genética para la enfermedad de Alzheimer o está clasificado como 'en riesgo' debido a su estilo de vida (por ejemplo, edad, dieta, salud general, ocupación, ubicación geográfica). El término 'prevalencia genética' en el contexto de la presente invención, puede implicar que el genoma del paciente contenga genotipos específicos para ciertas proteínas que se sabe en la técnica que están alterados en pacientes que desarrollan EA, incluyendo dichas proteínas, aunque sin limitación, apolipoproteína E (ApoE) y glutatión-S-transferasa-omega-1 (GSTO). El genotipo se puede determinar por genotipificación o identificación de la forma de proteína relevante de la enfermedad expresada en un fluido biológico del paciente. Más específicamente, se determinará el número de alelos que codifican las variantes de ApoE4 y GSTO de tipo natural (wtGSTO). El término wtGSTO, en el contexto de la presente invención, se refiere a cualquier variante de GSTO que no contenga la mutación rs4825 en la secuencia genómica, ni una sustitución de alanina por ácido aspártico en el residuo 140 de la secuencia proteínica. La invención describe diversos biomarcadores para uso en el diagnóstico de EA, ya sea solo o en combinación con otros métodos de diagnóstico o como biomarcadores complementarios. Un biomarcador complementario en el contexto actual implica un biomarcador que se puede usar junto con otros biomarcadores para la EA.

Un primer aspecto de la invención describe un método para diagnosticar la EA en un sujeto que se sospecha que está en riesgo de desarrollar o tener la EA, que comprende medir en una muestra *in vitro* obtenida del sujeto, el nivel relativo o la concentración de los biomarcadores afamina y alfa-1-antiquimotripsina y opcionalmente uno o más biomarcadores adicionales seleccionados de la Tabla 1, y establecer la importancia del nivel o niveles relativos o de las concentraciones de dichos biomarcadores. La importancia del nivel relativo o de la concentración se mide comparando dicho nivel relativo o concentración con un valor de control para el biomarcador específico. El valor de control se obtiene determinando el nivel relativo o la concentración de dicho biomarcador en una muestra biológica tomada de uno o varios individuos que no tienen EA, según se ha determinado por evaluación clínica. Para la afamina, el nivel relativo o la concentración en un paciente con EA está reducido en comparación con un valor de control. La invención utiliza un método que emplea una combinación de afamina y alfa-1-antiquimotripsina, y opcionalmente al menos un biomarcador adicional seleccionado de alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B100, complemento C3, serina/treonina quinasa TANK de unión a quinasa-1 (TBK1), proteína de unión a la vitamina D, alfa-1-B-glicoproteína, hemopexina, seroalbúmina, ceruloplasmina, alfa-2-antiplasmina, apolipoproteína A1, factor H del complemento, IgG, proteína de unión a Fc de IgG, hornerina, fibrinógeno o complemento C5. En algunas realizaciones, la invención usa un método por el que el nivel relativo o la concentración de afamina se divide por el nivel relativo o la concentración de alfa-1-antiquimotripsina obteniendo una relación afamina/alfa-1-antiquimotripsina. El término 'relación' en el contexto de la realización actual de la invención, se refiere a dividir el valor de un biomarcador por el de otro, este valor debe ser el mismo para ambos biomarcadores y se puede representar como un peso o moles de biomarcador en un volumen dado (concentración) o por un nivel de intensidad de luz o de absorbancia generado por medio de un ensayo (nivel relativo). Una realización adicional de la invención utiliza el valor de la relación afamina/alfa-1-antiquimotripsina en combinación con niveles relativos o concentración de uno o más biomarcadores elegidos entre alfa-1-antiquimotripsina, alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B100, complemento C3, serina/treonina quinasa TBK-1, proteína de unión a la vitamina D, alfa-1-B-glicoproteína, hemopexina, seroalbúmina, ceruloplasmina, alfa-2-antiplasmina, apolipoproteína A1, factor H del complemento, IgG, proteína de unión a Fc de IgG, hornerina, fibrinógeno o complemento C5. Por ejemplo, una combinación preferida es la relación afamina/alfa-1-antiquimotripsina en combinación con el nivel relativo o la concentración del complemento C3. Otra combinación preferida de la invención es la relación afamina/alfa-1-antiquimotripsina en combinación con el nivel relativo o concentración de serina/treonina quinasa TBK-1.

En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de afamina y alfa-1-antiquimotripsina y opcionalmente al menos un biomarcador adicional seleccionado de alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B100, complemento C3, serina/treonina quinasa TBK-1, proteína de unión a la vitamina D, alfa-1-B-glicoproteína, hemopexina, seroalbúmina, ceruloplasmina, alfa-2-antiplasmina, apolipoproteína A1, factor H del complemento, IgG, proteína de unión a Fc de IgG, hornerina, fibrinógeno o complemento C5 como biomarcadores complementarios de la EA. Como biomarcadores complementarios se pueden utilizar para el diagnóstico de EA junto con otras pruebas clínicas, tales como evaluación del estado mental (MEC), obtención de imágenes neurológicas, péptidos beta-amiloides, proteína *tau* fosforilada, genotipo ApoE y genotipo GSTO 1 de tipo natural (wtGSTO). Estas pruebas clínicas se puede añadir al modelo predictivo, basado en la medición del resultado. Por ejemplo, el estado de ApoE de un paciente se puede determinar por genotipificación, identificando la forma de la proteína relevante de la enfermedad que se expresa a nivel genético (DNA y/o RNA) o detectando la presencia de la forma de la proteína expresada específica a partir de una muestra de fluido tomada del paciente. Este resultado se puede expresar como un valor dicotomizado, en el que el paciente es

positivo para el gen o proteína ApoE4 o no; o como un resultado ordinal para el número de alelos de ApoE4 presentes en el DNA genómico del paciente (0-2), que se puede calcular usando niveles relativos del gen o de la proteína dentro de una muestra tomada al paciente.

Los niveles relativos o concentraciones de biomarcadores se pueden determinar poniendo en contacto la muestra con sondas, preferiblemente inmovilizadas sobre un sustrato, específicas para cada uno de los biomarcadores incluidos en la combinación de biomarcadores. Las interacciones entre el biomarcador y su sonda respectiva se pueden monitorizar y cuantificar usando diversos métodos que son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de un método adecuado es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La realización de un ELISA implica al menos un anticuerpo con especificidad para un antígeno particular. La muestra con una cantidad desconocida de antígeno se inmoviliza en un soporte sólido (generalmente una placa para microtitulación de poliestireno), ya sea no específicamente (por adsorción a la superficie) o específicamente (por captura por otro anticuerpo específico para el mismo antígeno, en un ELISA de tipo "sándwich"). Después de que el antígeno ha sido inmovilizado, se añade el anticuerpo de detección, formando un complejo con el antígeno. El anticuerpo de detección puede estar unido covalentemente a una enzima, o puede ser detectado él mismo por un anticuerpo secundario que está unido a una enzima por bioconjugación. Entre cada etapa, la placa se lava típicamente para eliminar cualquier proteína o anticuerpo que no esté unido específicamente. Después de la etapa de lavado final, la placa se desarrolla añadiendo un sustrato enzimático para producir una señal visible, que indica la cantidad de antígeno en la muestra.

En una realización preferida de la presente invención, la 'muestra' como se hace referencia en la presente memoria es suero o plasma, sin embargo, puede ser cualquier muestra de un paciente a partir de la cual se pueden determinar los niveles o concentraciones de biomarcadores. Estos incluyen, aunque sin limitación, sangre completa, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo y plaquetas.

El sustrato comprenderá sondas específicas para los biomarcadores afamina y alfa-1-antitripsina. Como se usa en la presente memoria, el término 'específico' significa que la sonda se une solo a uno de los biomarcadores de la invención, uniéndose insignificamente a otros biomarcadores de la invención o a otros analitos de la muestra biológica que se analiza. Esto garantiza que la integridad del ensayo de diagnóstico y su resultado usando los biomarcadores de la invención no se ve comprometida por episodios de unión adicionales.

El sustrato puede ser cualquier superficie capaz de soportar una o más sondas, pero preferiblemente es un biochip. Un "biochip" es un término general para una plataforma de reacción que aloja ensayos químicos, bioquímicos, proteómicos o moleculares, que pueden ser necesarios para diagnóstico médico, detección de drogas, etc. Típicamente, un biochip comprende un sustrato inerte, tal como silicio, vidrio o cerámica (con frecuencia con una superficie del orden de aproximadamente 1 cm² o menor), que está provisto de uno o una pluralidad de sitios de reacción. Los sitios llevan generalmente uno o más ligandos, por ejemplo, uno o más anticuerpos, seleccionados para que se realice el ensayo (o "prueba"), adsorbidos a la superficie del chip para activación por combinación con una muestra aplicada al chip (por ejemplo, una muestra de sangre) y/o un reactivo. Las reacciones se pueden detectar usando varias técnicas alternativas, que incluyen la detección de la quimioluminiscencia generada por la reacción. Algunos biochips llevan un gran número (cientos o miles) de dichos sitios de ensayo, generalmente dispuestos en una rejilla o matriz, permitiendo realizar numerosos ensayos simultáneamente y utilizando la misma muestra. Cuando se identifican los diversos biomarcadores/proteínas de la invención, será evidente para los expertos en la técnica que, además de identificar la proteína de longitud completa, es posible la identificación de un fragmento o varios fragmentos de una proteína, siempre que esto permita una identificación precisa de la proteína. Igualmente, aunque una sonda preferida de la invención es un anticuerpo monoclonal, pueden usarse otras sondas tales como aptámeros, polímeros de impresión molecular, fagos, fragmentos de anticuerpos de cadena corta y otras sondas basadas en anticuerpos. La invención también permite sondas de secuencias de ácidos nucleicos.

Preferiblemente, en los métodos de la presente invención se usa un dispositivo de estado sólido, preferiblemente el sistema *Biochip Array Technology* (BAT) (disponible de Randox Laboratories Limited). Más preferiblemente, se puede usar el aparato *Evidence Evolution and Evidence Investigator* (disponible de Randox Laboratories) para determinar los niveles de biomarcadores en la muestra.

La exactitud de los métodos estadísticos usados de acuerdo con la presente invención se puede describir mejor por sus características operativas del receptor (ROC). La curva ROC aborda tanto la sensibilidad, el número de verdaderos positivos, como la especificidad, el número de verdaderos negativos, del ensayo. Por tanto, los valores de sensibilidad y especificidad para una combinación dada de biomarcadores son una indicación de la exactitud de la prueba. Por ejemplo, si una combinación de biomarcadores tiene un valor de sensibilidad y especificidad del 80%, por cada 100 pacientes, 80 serán correctamente identificados a partir de la determinación de la presencia de la combinación particular de biomarcadores como positivos para la enfermedad, mientras que de cada 100 pacientes que no tienen la enfermedad 80 darán exactamente negativo para la enfermedad.

Si se van a utilizar dos o más biomarcadores en el método de diagnóstico, se puede obtener un modelo adecuado de clasificación matemática o de aprendizaje automático, tal como la ecuación de regresión logística. La ecuación de regresión logística podría incluir otras variables, tales como la edad y el género del paciente. La curva ROC se puede utilizar para evaluar la exactitud del modelo de regresión logística. La ecuación de regresión logística se puede usar independientemente o en un algoritmo para ayudar en la toma de decisiones clínicas. Aunque una ecuación de regresión logística es un procedimiento matemático/estadístico común utilizado en dichos casos y se prefiere en el

contexto de la presente invención, también se pueden usar otros procedimientos matemáticos/estadísticos, árboles de decisión o de aprendizaje automático.

A modo de ejemplo, una ecuación de regresión logística aplicable a la presente invención (a un valor de corte de clasificación de 0,5) para la combinación de biomarcadores para la indicación de la EA frente a sin EA (control) en un paciente que se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar EA, se calcula como sigue;

$$\text{Probabilidad de EA} = \frac{1}{1 + e^{-(2,1+9,4\left[\frac{\alpha\text{famina}}{\alpha\text{f}\alpha-1-\text{antiquinotripsina}}\right]-23,6[\text{complemento C5}])}}$$

Como ejemplo adicional, se puede crear un árbol de decisión en el que sale una rama de decisión desde cada nodo (subpoblación) para dividir la población en grupos de clasificación. La Figura 19 representa un ejemplo de un árbol que se creó usando los datos descritos en esta invención, que podría clasificar correctamente a todos los pacientes con EA con un error relativamente pequeño.

Métodos

1. Plasma normalizado/Quantiplasma™

La normalización del plasma se realizó según el documento US 2009/0136966. En resumen, se normalizó plasma humano eliminando proteínas muy abundantes utilizando el método apropiado. En primer lugar, las proteínas muy abundantes se eliminaron utilizando la tecnología del sistema de eliminación de afinidad múltiple (abreviadamente MARS, por su expresión inglesa *Multiple Affinity Removal System*). El plasma resultante se cargó luego en una columna de normalización de multi-inmunoafinidad (abreviadamente MIAN, por su expresión inglesa *Multi-ImmunoAffinity Normalisation*), donde la rigurosidad de normalización se ajustó alterando el caudal. Se reunieron las muestras de flujo pasante y de lavado para obtener una muestra diferencialmente normalizada. Parte de este plasma normalizado se biotinilizó de forma ubicua para proporcionar una sustancia trazadora, conocida como Quantiplasma™.

2. Generación de anticuerpos

Se produjeron anticuerpos monoclonales según el documento US 2009/0136966. Se usó plasma normalizado como inmunógeno para generar anticuerpos policlonales. A continuación, se aislaron los linfocitos B y se generaron hibridomas monoclonales. La selección inicial de hibridomas se realizó usando un ELISA. Las placas se recubrieron con GAM específico de Ig gamma-Fc de ratón, y luego se incubaron con el líquido sobrenadante del hibridoma de mAb, después de una etapa de lavado, este complejo se incubó con Quantiplasma™ y finalmente se indujo una reacción enzima-sustrato para detectar la unión del plasma biotinilado (Quantiplasma™) al mAb. Esta selección identificó más de 1000 mAb. Para identificar las dianas proteínicas de los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio, se emplearon técnicas de transferencia Western, inmunoprecipitación y espectrometría de masas. Sin embargo, hay algunos antígenos que no pudieron identificarse en ese momento, pero como se sabe que están presentes en el proteoma del plasma humano, se incluyeron.

3. Identificación de biomarcadores clínicos usando Quantiplasma™

Se obtuvieron muestras de suero de 19 pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) clínicamente confirmada y 19 participantes de control emparejados por edad/género con función cognitiva normal. Estas muestras se congelaron poco después de la recolección y se conservaron a -80°C hasta que se realizó el análisis. Se recopiló la información clínica adicional de estos sujetos, que incluía el historial médico personal y familiar básico. Además de esto, se determinaron el genotipo ApoE y GSTO por métodos conocidos en la técnica. Para cada paciente, se aisló el DNA genómico y se determinó la presencia de DNA que codifica cada una de las 3 isoformas de ApoE (E2, E3, E4) o GSTO (tipo natural, mutante A140 [rs4825]) utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otros análisis permitieron que se determinara la frecuencia alélica de cada una de las isoformas por métodos conocidos en la técnica.

Se seleccionó un panel de 69 anticuerpos mAb (Tabla 1) de un catálogo de >1000 generado como en el apartado 2. Los anticuerpos se evaluaron a continuación por inmunoensayo competitivo. Primero se inmovilizaron en una plataforma de biochip (9 mm x 9 mm), que era el sustrato para las inmunorreacciones. Se utilizó el analizador de mesa semiautomático *Evidence Investigator* (EV3602, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, Reino Unido, patentes EP98307706, EP98307732, EP0902394, EP1227311, EP1434995 y EP1354623). El principio del ensayo se basa en la competencia por los sitios de unión del anticuerpo monoclonal entre el antígeno libre (la muestra del paciente) y el plasma trazador marcado (Quantiplasma™).

La muestra y los reactivos se añaden al biochip y se incuban bajo condiciones controladas. Después de la adición del sustrato, se genera una señal de luz que luego se detecta usando tecnología de imagen digital. El sistema incorpora un programa informático específico para procesar, informar y archivar automáticamente los datos generados. El nivel de una proteína específica en la muestra del paciente se determina comparando la diferencia entre la señal luminosa (URL, unidades relativas de luz) en la posición del anticuerpo respectivo en un biochip que contiene la

muestra y el trazador (ensayo) y un biochip que contiene solo el trazador (blanco). La relación entre las muestras de ensayo y de control se determina como:

$$\text{nivel relativo del biomarcador} = 1 - \frac{URL(\text{ensayo})}{URL(\text{blanco})}$$

indicando una relación alta un nivel relativamente alto de la proteína específica para su mAb respectivo presente en la muestra, e indicando una relación baja relativamente poca o ninguna proteína presente en la muestra. Se determinaron las relaciones para los pacientes con EA y los pacientes de control para todos los mAb (Ejemplo, Figuras 1-9) y se realizó un análisis no paramétrico para identificar los mAb que podrían distinguir entre pacientes con EA y de control (Tabla 2). Las áreas bajo la curva (AUC) de las curvas características operativas del receptor (ROC) se calcularon para todos los mAb, que se detallan en la Tabla 3.

4. Modelo de clasificación de la enfermedad

Como ejemplo de cómo múltiples marcadores identificados por este estudio se pueden combinar para proporcionar un modelo para clasificar a un paciente cuyo estado de enfermedad se desconoce, los inventores hemos utilizado la regresión logística como un método de determinación del modelo. La investigación inicial mostró que usando los niveles relativos de afamina (BSI0268) combinados con los de alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) se generó un modelo con una AUC de 0,906 (Fig. 10-13), una mejora significativa del poder predictivo de las mediciones individuales. Con el fin de añadir más analitos al modelo, sin aumentar las dimensiones, se utilizó una función de afamina (BSI0268) como una proporción de alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221) como una sola variante (AUC = 0,875) y se analizó el efecto de añadir sistemáticamente todos los demás analitos al modelo. La adición del complemento C3 (BSI0217), alfa-2-macroglobulina (BSI0195), serina/treonina proteína quinasa TBK1 (BSI0112) o complemento C5 (BSI0782) al modelo mejoró el modelo, AUC de 0,889, 0,906, 0,892 y 0,920 respectivamente (Fig. 14-17). Además, se identificaron mejoras al considerar el genotipo ApoE de los pacientes. Se añadió al análisis una variable inequívoca, con la que se identificó que cada paciente no tenía alelos de ApoE4 (0) o tenía uno o más (1). Esto se afinó aún más identificando el número de alelos de ApoE4 que tenía cada paciente (0, 1 o 2). En este estudio, el 63% de los pacientes con EA tenía al menos un alelo de ApoE4, en el que solo uno de los 19 sujetos de control (5%) era positivo al ApoE4. El genotipo ApoE4 en combinación con la relación afamina/alfa-1-antiquimotripsina produce una AUC de 0,925, que aumenta hasta 0,953 cuando se tiene en consideración el número de alelos de ApoE4. Además, la AUC aumenta hasta 0,964 con la adición del complemento C5. Estos datos sugieren que se puede generar un modelo muy exacto usando la presente invención. Estos datos se resumen en la Tabla 4. La dimensionalidad limita el número de variables que se pueden usar para desarrollar un modelo utilizando este conjunto de datos preliminares, pero se predice que se pueden combinar varios marcadores incluidos en este estudio para proporcionar un modelo óptimo. Además de la regresión logística, se generaron otros modelos de aprendizaje supervisado utilizando estos datos, tales como: redes neuronales de perceptrones multicapa, bosques aleatorios, máquinas de vectores de soporte y árboles de decisión (Figura 21). Todos ellos proporcionan modelos con exactitud similar a la regresión logística y se pueden preferir a medida que se añaden nuevos analitos al modelo.

Tabla 1 Números de ID de los mAb y de la proteína respectiva a la que se ha encontrado que se unen

ID de la sonda	ID de la proteína
BSI0183	Desconocido
BSI0185	Proteína de unión a la vitamina D
BSI0189	Complemento C3b (forma más corta)
BSI0198	Alfa-1-B-glicoproteína
BSI0200	Alfa-2-macroglobulina
BSI0203	Ceruloplasmina
BSI0208	Apo B100
BSI0220	Afamina
BSI0221	Alfa-1-antiquimotripsina
BSI0197	Alfa-2-macroglobulina
BSI0201	Desconocido
BSI0214	Apo B100
BSI0190	Complemento C3

ID de la sonda	ID de la proteína
BSI0191	Desconocido
BSI0195	Alfa-2-macroglobulina
BSI0223	Afamina
BSI0186	Alfa-1-antiquimotripsina
BSI0196	Alfa-1-B-glicoproteína
BSI0279	Desconocido
BSI0281	Desconocido
BSI0217	Complemento C3
BSI0289	Apo B100
BSI0311	Desconocido
BSI0144	Alfa-1-antiquimotripsina
BSI0112	Serina/treonina proteína quinasa TBK1
BSI0022	Desconocido
BSI0002	Hemopexina
BSI0032	Proteína de unión a Fc de IgG
BSI0038	Alfa-2-macroglobulina
BSI0023	Desconocido
BSI0051	Proteína de unión a la vitamina D
BSI0095	Alfa-2-macroglobulina
BSI0097	Seroalbúmina
BSI0116	Alfa-1-B-glicoproteína
BSI0099	Ceruloplasmina
BSI0136	Apo B100
BSI0172	Alfa-2-macroglobulina
BSI0177	Desconocido
BSI0142	Alfa-2-antiplasmina
BSI0173	Alfa-2-macroglobulina
BSI0179	Apolipoproteína A1
BSI0180	Desconocido
BSI0181	Desconocido
BSI0100	Serina/treonina proteína quinasa TBK1
BSI0182	Alfa-1-B-glicoproteína
BSI0040	Apo B100
BSI0314	Desconocido
BSI0243	Complemento C3
BSI0348	Desconocido
BSI0257	Proteína de unión a la vitamina D
BSI0263	Complemento C3
BSI0268	Afamina
BSI0355	Desconocido
BSI0660	Desconocido

ID de la sonda	ID de la proteína
BSI0670	Apo B100
BSI0747	Factor H
BSI0765	Complemento C5
BSI0782	Complemento C5
BSI0225	Desconocido (IgG)
BSI0239	Apolipoproteína A1
BSI0242	Complemento C3
BSI0246	Desconocido
BSI0248	IgG
BSI0255	Hornerina
BSI0259	Desconocido
BSI0266	Apo B100
BSI0323	Apo B100
BSI0115	Alfa-2-antiplasmina
BSI0251	Fibrinógeno

Tabla 2 Estadística general de los 69 mAb tanto para los grupos de control (19) como con EA (19), representando el valor de p la diferencia significativa entre cada grupo como ha sido determinado por Mann-Whitney

ID de las proteínas (ID de mAb)	Control			EA			Valor de p
	Mediana	Min.	Max.	Mediana	Min.	Ma.	
Afamina (BSI0268)	0,674	0,441	0,735	0,532	0,402	0,683	0,00021
Afamina (BSI0223)	0,508	0,319	0,599	0,405	0,230	0,477	0,00384
Afamina (BSI0220)	0,796	0,485	0,863	0,690	0,422	0,826	0,00506
Alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221)	0,613	0,468	0,722	0,668	0,388	0,777	0,01734
Complemento C5 (BSI0782)	0,592	0,497	0,656	0,559	0,429	0,656	0,02648
Desconocido (BSI0183)	0,571	0,240	0,699	0,475	0,231	0,614	0,02853
Desconocido (BSI0279)	0,484	0,132	0,702	0,409	0,210	0,621	0,03304
Complemento C3 (BSI0243)	0,625	0,474	0,826	0,698	0,336	0,852	0,04245
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0182)	0,504	0,265	0,737	0,475	0,238	0,681	0,05396
Alfa-1-antiquimotripsina (BSI0144)	0,605	0,342	0,724	0,652	0,511	0,744	0,05584
Apo B100 (BSI0289)	0,025	-1,623	0,779	0,291	-1,089	0,819	0,05969
Alfa-2-antiplasmina (BSI0115)	0,302	-0,298	0,710	0,209	-0,131	0,562	0,07488
Factor H (BSI0747)	0,409	0,179	0,535	0,336	0,083	0,600	0,08493
Seroalbúmina (BSI0097)	0,725	0,643	0,756	0,701	0,583	0,772	0,08766
Apolipoproteína A1 (BSI0239)	0,411	0,275	0,522	0,382	0,250	0,478	0,11827
Complemento C3 (BSI0263)	0,545	-0,166	0,915	0,143	-0,826	0,850	0,12534
Alfa-2-macroglobulina (BSI0197)	0,544	0,168	0,670	0,444	0,101	0,660	0,15249
Complemento C5 (BSI0765)	0,309	0,131	0,947	0,263	-0,144	0,865	0,15254
Apo B100 (BSI0040)	0,155	-0,125	0,560	0,261	-0,136	0,697	0,15666
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0116)	0,259	0,109	0,348	0,227	0,092	0,335	0,15679
Desconocido (BSI0023)	0,481	0,202	0,825	0,400	0,028	0,884	0,16104

ID de las proteínas (ID de mAb)	Control			EA			Valor de p
	Mediana	Min.	Max.	Mediana	Min.	Ma.	
Apo B100 (BSI0670)	0,644	0,420	0,776	0,626	0,408	0,735	0,16995
Serina/treonina proteína quinasa TBK1 (BSI0112)	0,576	-0,207	0,691	0,464	-0,275	0,660	0,17460
Desconocido (BSI0246)	0,184	0,031	0,316	0,136	-0,006	0,295	0,17460
Desconocido (BSI0348)	0,687	0,416	0,806	0,646	0,350	0,781	0,17924
Alfa-1-antiquimotripsina (BSI0186)	0,478	-0,195	0,868	0,365	-0,691	0,736	0,18406
Complemento C3 (BSI0217)	0,141	-1,116	0,788	0,056	-0,361	0,716	0,19389
Apo B100 (BSI0323)	0,446	0,236	0,685	0,394	0,139	0,607	0,20409
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0196)	0,431	0,239	0,549	0,453	0,255	0,569	0,21469
Alfa-2-antiplasmina (BSI0142)	0,643	0,454	0,712	0,663	0,585	0,728	0,21469
Ceruloplasmina (BSI0203)	0,367	-0,951	0,865	0,278	-1,956	0,727	0,22567
Fibrinógeno (BSI0251)	0,457	0,222	0,717	0,426	0,211	0,608	0,24281
Desconocido (BSI0022)	0,530	0,331	0,895	0,492	0,256	0,898	0,26718
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0198)	0,723	0,611	0,791	0,697	0,376	0,771	0,29317
Alfa-2-macroglobulina (BSI0172)	0,759	0,642	0,865	0,737	0,678	0,887	0,30001
Proteína de unión a la vitamina D (BSI0257)	0,614	0,014	0,788	0,601	0,448	0,722	0,32087
Complemento C3 (BSI0190)	0,454	0,268	0,621	0,513	0,294	0,646	0,34271
Alfa-2-macroglobulina (BSI0038)	0,636	0,331	0,738	0,575	0,246	0,748	0,35016
Desconocido (BSI0201)	0,711	0,495	0,818	0,688	0,490	0,867	0,35776
Alfa-2-macroglobulina (BSI0195)	0,940	0,796	0,974	0,924	0,423	0,982	0,37323
Apolipoproteína A1 (BSI0179)	0,794	0,328	0,917	0,761	0,110	0,937	0,37323
Apo B100 (BSI0136)	0,483	0,155	0,670	0,522	0,206	0,637	0,38910
Complemento C3b (forma más corta) (BSI0189)	0,607	0,487	0,839	0,585	0,495	0,747	0,39711
Desconocido (BSI0660)	0,945	-0,223	0,975	0,947	-2,124	0,968	0,40535
Apo B100 (BSI0208)	0,572	0,202	0,694	0,595	-0,250	0,911	0,40538
IgG (BSI0248)	0,638	0,400	0,781	0,556	0,253	0,699	0,44774
Hemopexina (BSI0002)	0,567	-2,587	0,830	0,708	-1,046	0,890	0,49266
Alfa-2-macroglobulina (BSI0095)	0,761	0,592	0,924	0,689	0,645	0,871	0,49266
Desconocido (BSI0281)	0,744	0,511	0,799	0,740	0,502	0,837	0,50189
Desconocido (BSI0355)	0,423	0,254	0,686	0,431	0,097	0,602	0,51126
Desconocido (más candidatos) (BSI0177)	0,108	-0,076	0,216	0,114	-0,051	0,296	0,55927
Hornerina (BSI0255)	0,513	0,255	0,824	0,487	0,146	0,920	0,61962
Alfa-2-macroglobulina (BSI0173)	0,692	0,482	0,836	0,661	0,567	0,833	0,63001
Proteína de unión a la vitamina D (BSI0185)	0,613	0,294	0,743	0,606	0,381	0,782	0,65090
Desconocido (IgG) (BSI0225)	0,390	0,080	0,651	0,402	0,054	0,577	0,65090
Desconocido (BSI0314)	0,633	0,014	0,830	0,625	0,446	0,764	0,67206
Apo B100 (BSI0214)	0,401	0,073	0,675	0,386	-0,090	0,666	0,69349
Desconocido (BSI0259)	0,342	0,047	0,619	0,307	0,133	0,507	0,69349
Ceruloplasmina (BSI0099)	0,590	0,472	0,734	0,593	0,321	0,721	0,77029
Desconocido (BSI0311)	0,344	0,020	0,506	0,351	-0,031	0,601	0,82668

ID de las proteínas (ID de mAb)	Control			EA			Valor de p
	Mediana	Min.	Max.	Mediana	Min.	Ma.	
Complemento C3 (BSI0242)	0,446	0,148	0,653	0,409	0,277	0,568	0,82668
Desconocido (BSI0180)	0,237	0,032	0,443	0,210	0,085	0,521	0,84949
Apo B100 (BSI0266)	0,528	0,303	0,704	0,516	0,216	0,648	0,84949
Proteína de unión a la vitamina D (BSI0051)	0,450	0,035	0,602	0,472	0,324	0,629	0,89548
Desconocido (BSI0181)	0,502	0,350	0,708	0,556	0,227	0,926	0,90702
Proteína de unión a Fc de IgG (BSI0032)	0,432	-1,988	0,826	0,431	-2,053	0,928	0,94182
Alfa-2-macroglobulina (BSI0200)	0,577	0,338	0,660	0,544	0,309	0,703	0,96507
Serina/treonina proteína quinasa TBK1 (BSI0100)	0,767	0,174	0,839	0,768	0,680	0,815	0,96507
Desconocido (BSI0191)	0,542	0,328	0,898	0,583	0,285	0,902	1,00000

Tabla 3 AUC para la curva ROC de cada uno de los 69 mAb para distinguir los paciente de control de los con EA

ID de las proteínas (sonda)	AUC
Afamina (BSI0268)	0,852
Afamina (BSI0223)	0,774
Afamina (BSI0220)	0,766
Alfa-1-antiquimotripsina (BSI0221)	0,726
Complemento C5 (BSI0782)	0,711
Desconocido (BSI0183)	0,708
Desconocido (BSI0279)	0,702
Complemento C3 (BSI0243)	0,693
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0182)	0,683
Alfa-1-antiquimotripsina (BSI0144)	0,681
Apo B100 (BSI0289)	0,679
Alfa-2-antiplasmina (BSI0115)	0,669
Factor H (BSI0747)	0,663
Seroalbúmina (BSI0097)	0,662
Apolipoproteína A1 (BSI0239)	0,648
Complemento C3 (BSI0263)	0,645
Alfa-2-macroglobulina (BSI0197)	0,636
Complemento C5 (BSI0765)	0,636
Apo B100 (BSI0040)	0,634
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0116)	0,634
Desconocido (BSI0023)	0,633
Apo B100 (BSI0670)	0,630
Serina/treonina proteína quinasa TBK1 (BSI0112)	0,629
Desconocido (BSI0246)	0,629
Desconocido (BSI0348)	0,627
Alfa-1-antiquimotripsina (BSI0186)	0,626
Complemento C3 (BSI0217)	0,623

ID de las proteínas (sonda)	AUC
Apo B100 (BSI0323)	0,620
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0196)	0,618
Alfa-2-antiplasmina (BSI0142)	0,618
Ceruloplasmina (BSI0203)	0,615
Fibrinógeno (BSI0251)	0,611
Desconocido (BSI0022)	0,605
Alfa-1-B-glicoproteína (BSI0198)	0,600
Alfa-2-macroglobulina (BSI0172)	0,598
Proteína de unión a la vitamina D (BSI0257)	0,594
Complemento C3 (BSI0190)	0,590
Alfa-2-macroglobulina (BSI0038)	0,589
Desconocido (BSI0201)	0,587
Alfa-2-macroglobulina (BSI0195)	0,584
Apolipoproteína A1 (BSI0179)	0,584
Apo B100 (BSI0136)	0,582
Complemento C3b (forma más corta) (BSI0189)	0,580
Desconocido (BSI0660)	0,579
Apo B100 (BSI0208)	0,579
IgG (BSI0248)	0,572
Hemopexina (BSI0002)	0,565
Alfa-2-macroglobulina (BSI0095)	0,565
Desconocido (BSI0281)	0,564
Desconocido (BSI0355)	0,562
Desconocido (BSI0177)	0,555
Hornerina (BSI0255)	0,547
Alfa-2-macroglobulina (BSI0173)	0,546
Proteína de unión a la vitamina D (BSI0185)	0,543
Desconocido (IgG) (BSI0225)	0,543
Desconocido (BSI0314)	0,540
Apo B100 (BSI0214)	0,537
Desconocido (BSI0259)	0,537
Ceruloplasmina (BSI0099)	0,528
Desconocido (BSI0311)	0,521
Complemento C3 (BSI0242)	0,521
Desconocido (BSI0180)	0,518
Apo B100 (BSI0266)	0,518
Proteína de unión a la vitamina D (BSI0051)	0,512
Desconocido (BSI0181)	0,511
Proteína de unión a Fc de IgG (BSI0032)	0,507
Alfa-2-macroglobulina (BSI0200)	0,504
Serina/treonina proteína quinasa TBK1 (BSI0100)	0,504

ID de las proteínas (sonda)	AUC
Desconocido (BSI0191)	0,500

Tabla 4 AUC para combinaciones de biomarcadores

Combinación de biomarcadores	Área	Error estándar	Intervalo de confianza del 95%	
			Inferior	Superior
Afamina (BSI0268) y alfa-1-antitripsina (BSI0221)	0,906	0,052	0,804	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina*	0,875	0,063	0,752	0,998
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, complemento C5 (BSI0782)	0,920	0,052	0,819	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, complemento C3 (BSI0243)	0,889	0,060	0,771	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina (BSI0195)	0,906	0,052	0,805	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, serina/treonina quinasa TBK1 (BSI0112)	0,892	0,057	0,779	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, ApoE4 (presencia/ausencia)	0,925	0,042	0,844	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, ApoE4 (0, 1 o 2 alelos)	0,953	0,032	0,891	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, Apo B100 (BSI0289)	0,875	0,063	0,752	0,998
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, desconocido (BSI0183)	0,881	0,064	0,756	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, desconocido (BSI0279)	0,878	0,064	0,753	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, complemento C5 (BSI0782), ApoE4 (presencia/ausencia)	0,958	0,028	0,903	1,000
Relación afamina/alfa-1-antitripsina, complemento C5 (BSI0782), ApoE4 (0, 1 o 2 alelos)	0,964	0,028	0,910	1,000

*Para todas las relaciones afamina/alfa-1-antitripsina se usaron combinaciones con las sondas BSI0268 y BSI0221

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar o monitorizar a una persona con riesgo de desarrollar o tener la enfermedad de Alzheimer (EA), que comprende medir la concentración o el nivel relativo de los biomarcadores afamina y alfa-1-antiquimotripsina y opcionalmente al menos un biomarcador adicional seleccionado de alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B100, complemento C3, serina/treonina quinasa TBK-1, proteína de unión a la vitamina D, alfa-1-B-glicoproteína, hemopexina, seroalbúmina, ceruloplasmina, alfa-2-antiplasmina, apolipoproteína A1, factor H del complemento, IgG, proteína de unión a Fc de IgG, hornerina, fibrinógeno y complemento C5 en una muestra de fluido obtenida de una persona que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener la EA; y establecer la importancia de las concentraciones o niveles relativos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que se calcula la relación entre afamina y alfa-1-antiquimotripsina.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se calcula la relación entre afamina y alfa-1-antiquimotripsina y también se mide la concentración o nivel relativo de al menos un biomarcador adicional seleccionado de serina/treonina proteína quinasa TBK1, alfa-2-macroglobulina, apolipoproteína B100, complemento C3, proteína de unión a la vitamina D, alfa-1-B-glicoproteína, hemopexina, seroalbúmina, ceruloplasmina, alfa-2-antiplasmina, apolipoproteína A1, factor H del complemento, IgG, proteína de unión a Fc de IgG, hornerina, fibrinógeno y complemento C5.
4. El método de la reivindicación 3, en el que un biomarcador adicional es serina/treonina proteína quinasa TBK1.
5. El método de la reivindicación 3, en el que un biomarcador adicional es complemento C5.
6. El método de la reivindicación 3, en el que un biomarcador adicional es alfa-2-macroglobulina.
7. El método de la reivindicación 3, en el que un biomarcador adicional es apolipoproteína B100.
8. El método de la reivindicación 3, en el que un biomarcador adicional es complemento C3.
9. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además determinar el genotipo de al menos uno de apolipoproteína E y glutatión-S-transferasa-1-omega de una persona por identificación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína en el genoma o por determinación de la forma de proteína producida en una muestra de fluido tomada de dicha persona.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además usar las mediciones obtenidas en un método de clasificación para calcular la probabilidad de que esa persona tenga o esté en riesgo de desarrollar la EA.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el método de clasificación es al menos uno de redes neuronales artificiales, regresión logística, árboles de decisión, bosque aleatorio y máquinas de vectores de soporte.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra de fluido es plasma o suero.

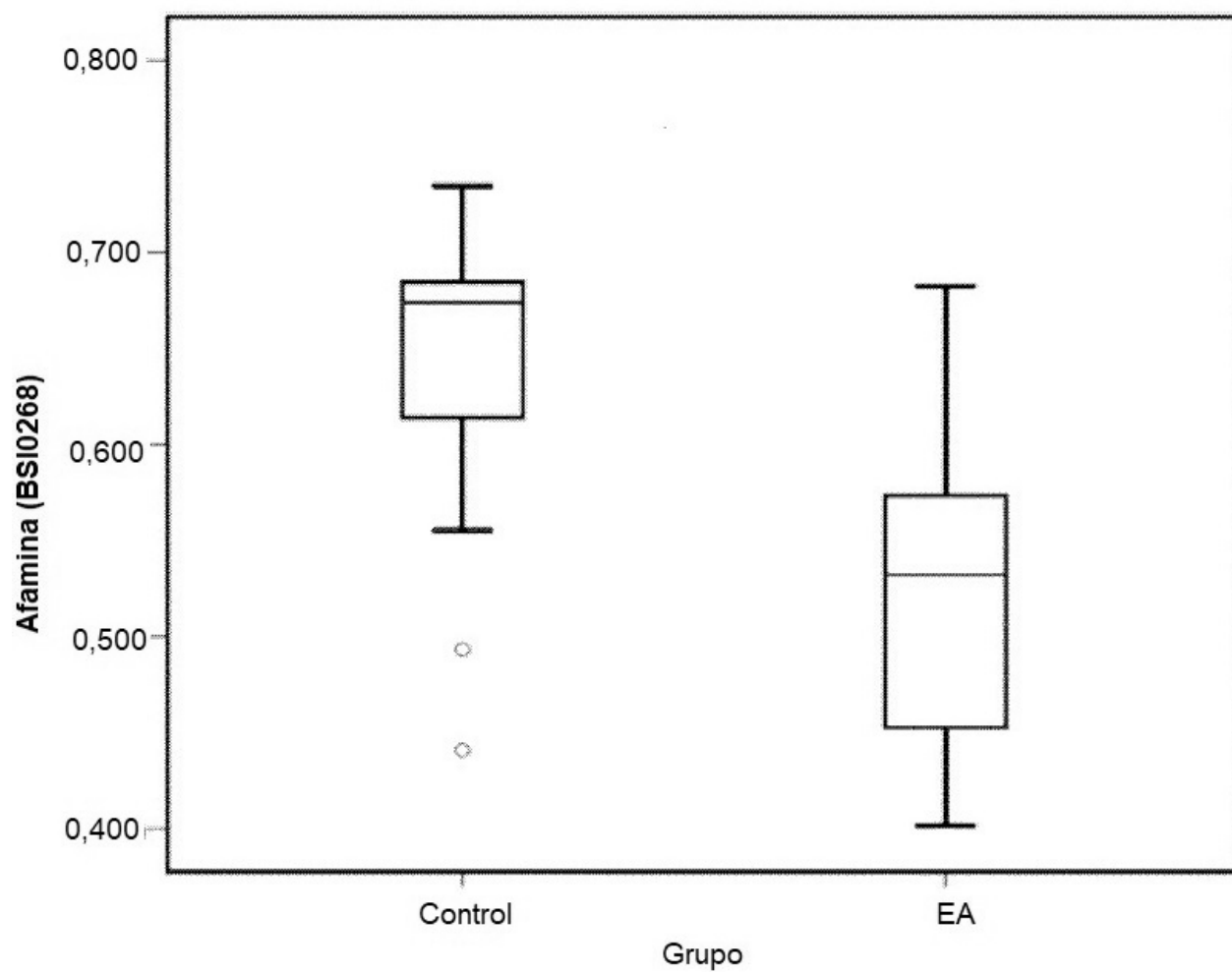


Figura 1

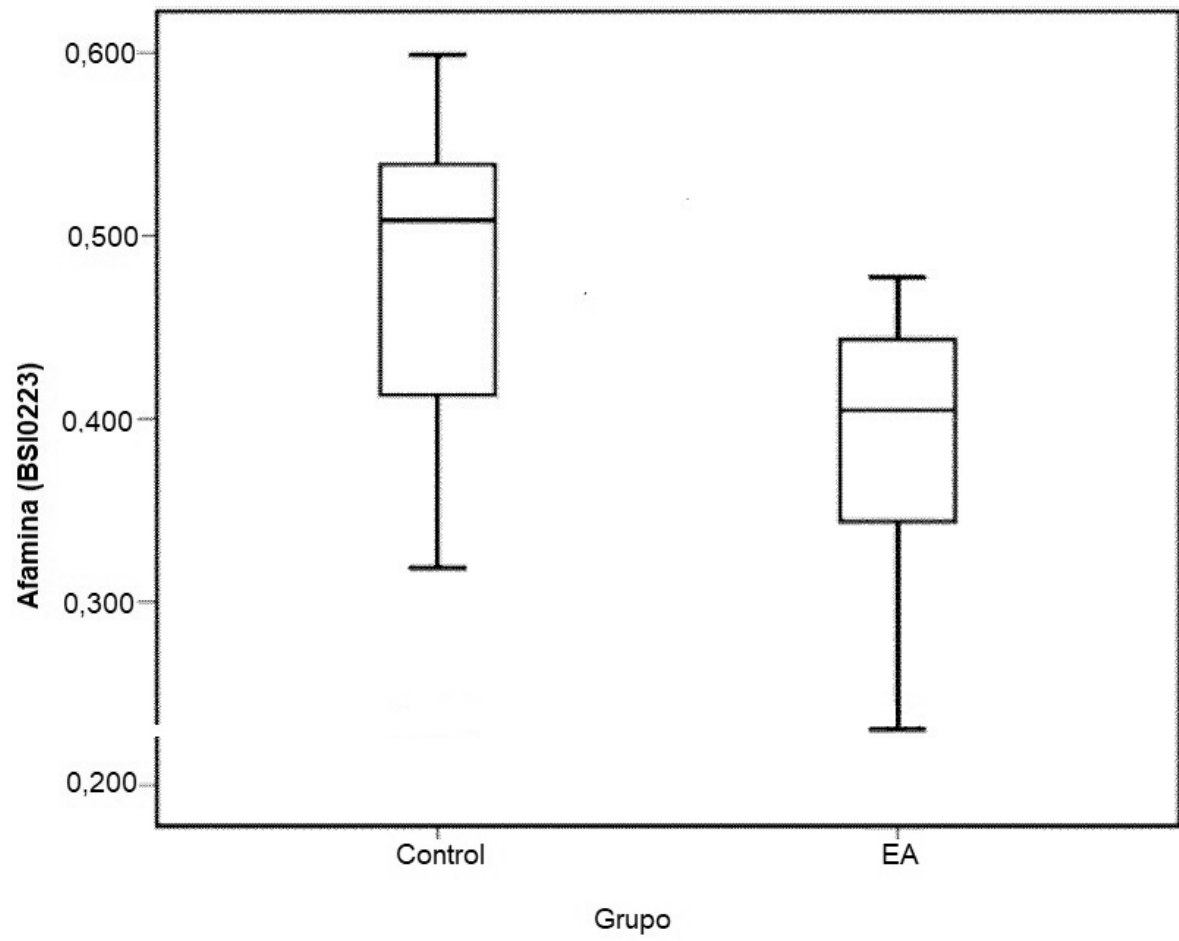


Figura 2

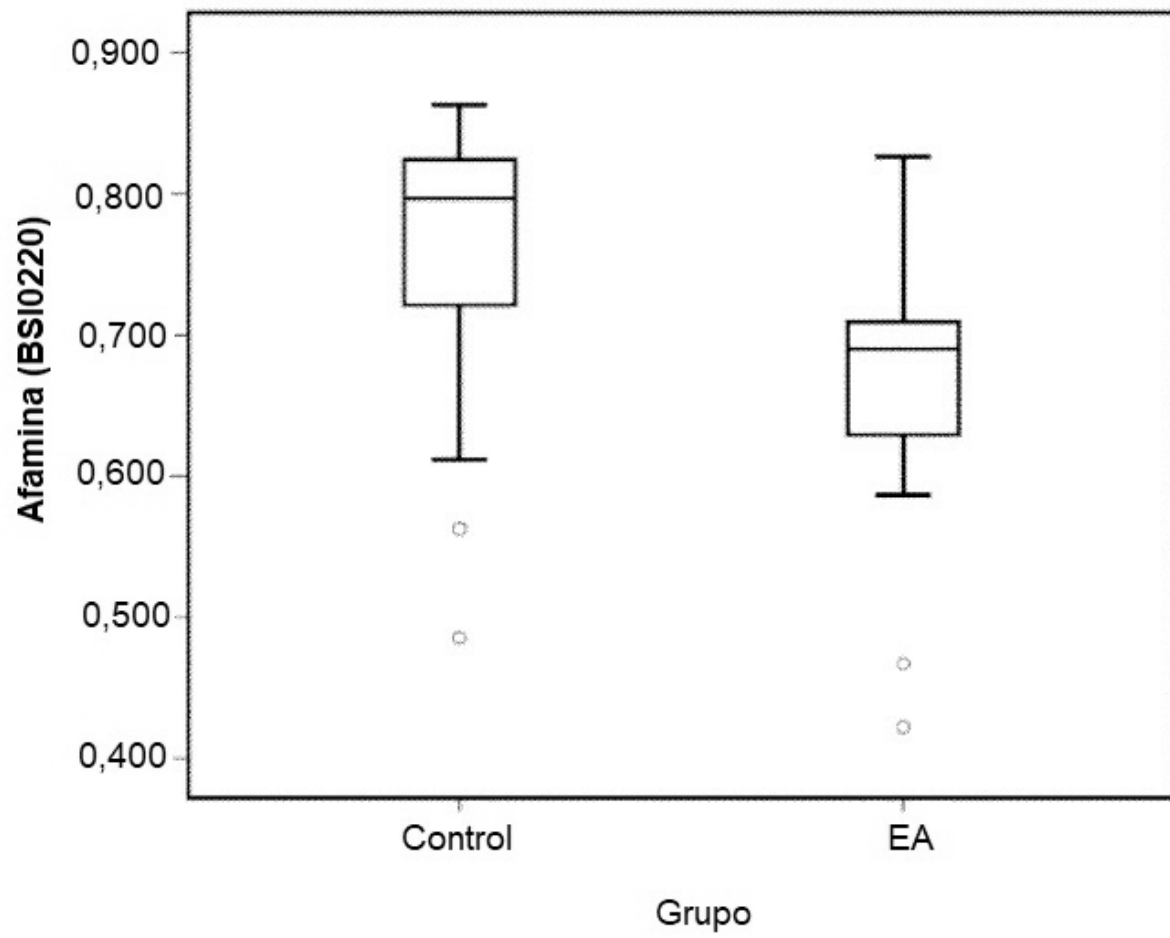


Figura 3

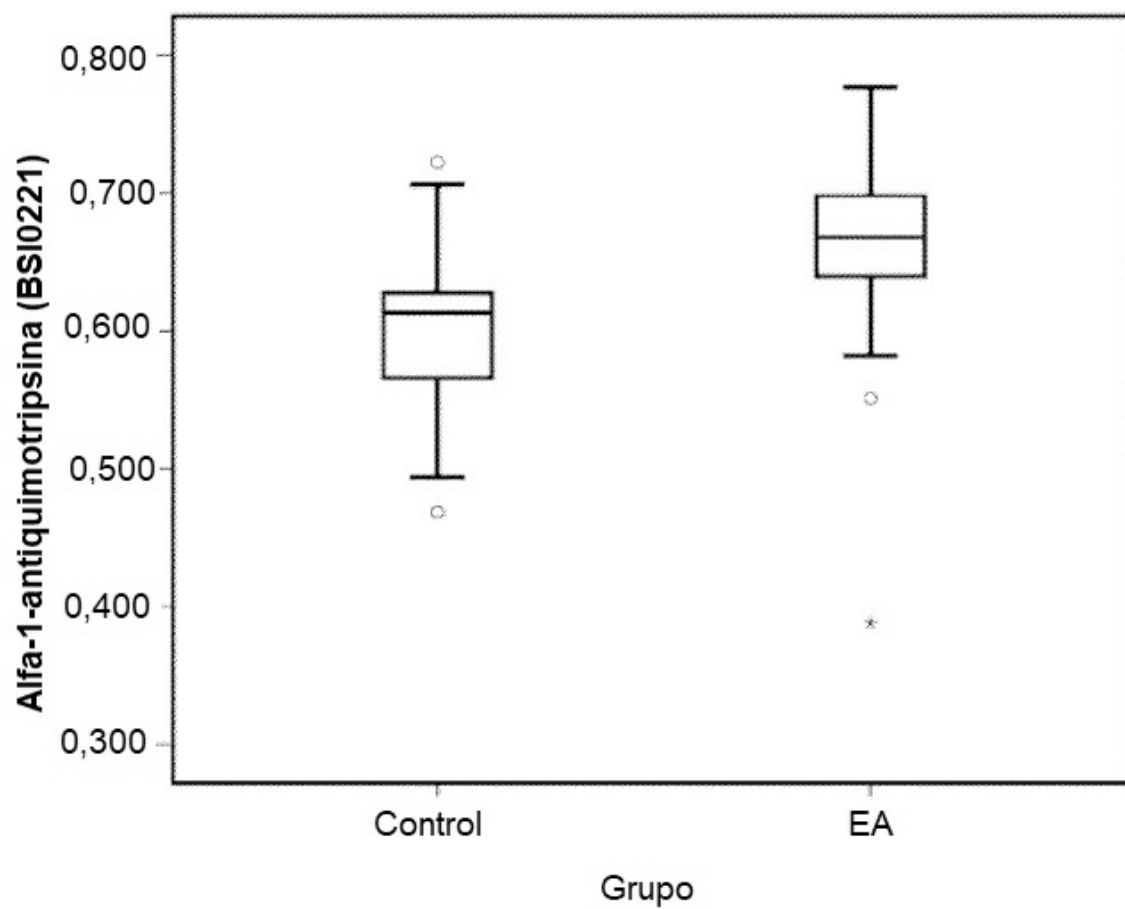


Figura 4

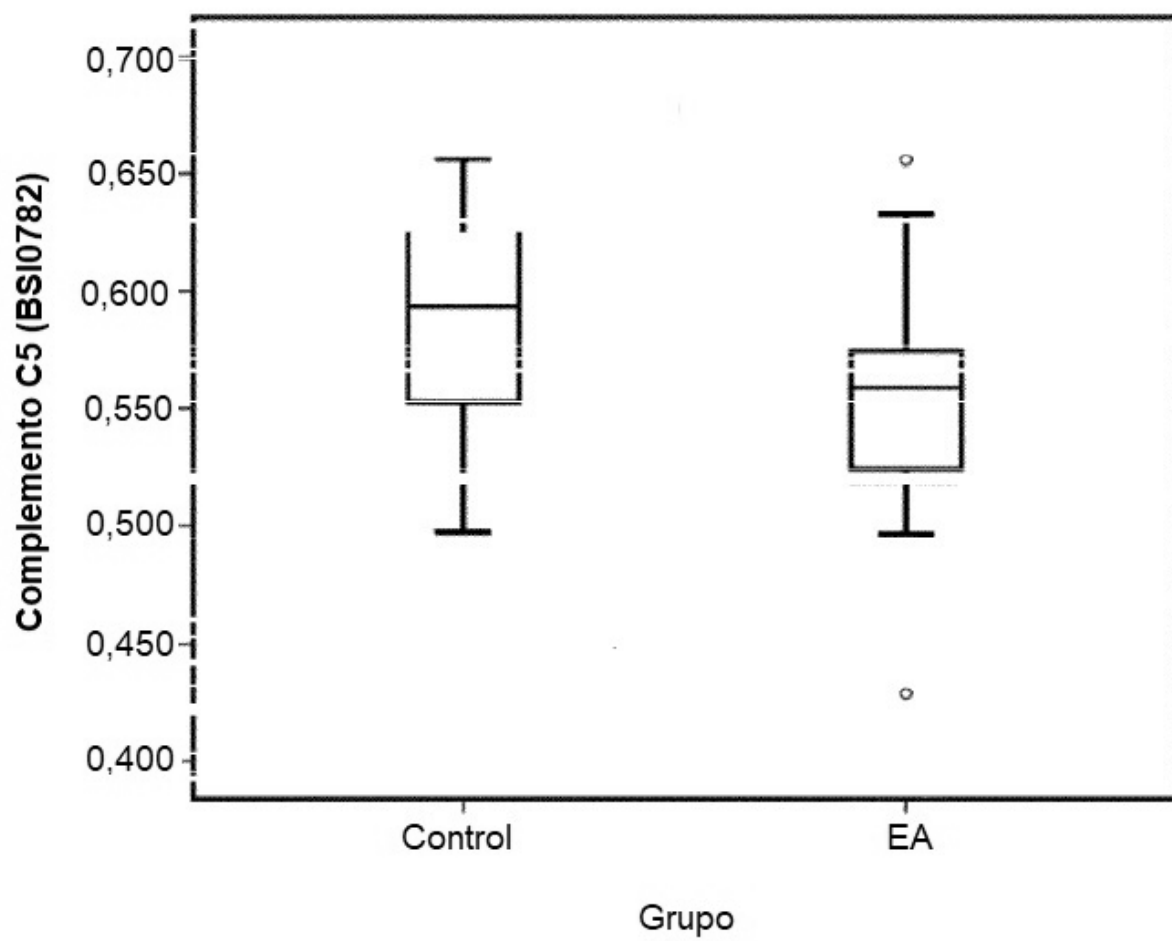


Figura 5

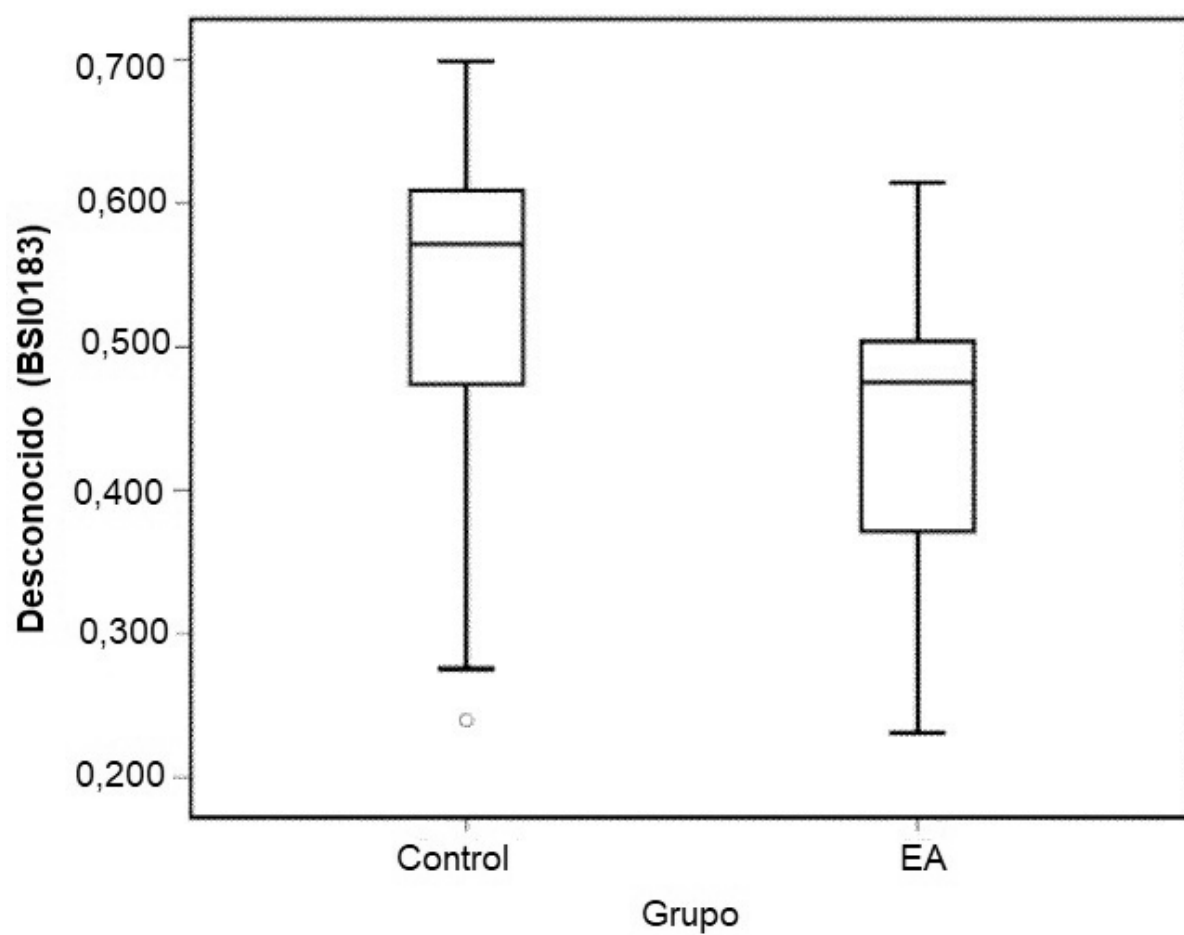


Figura 6

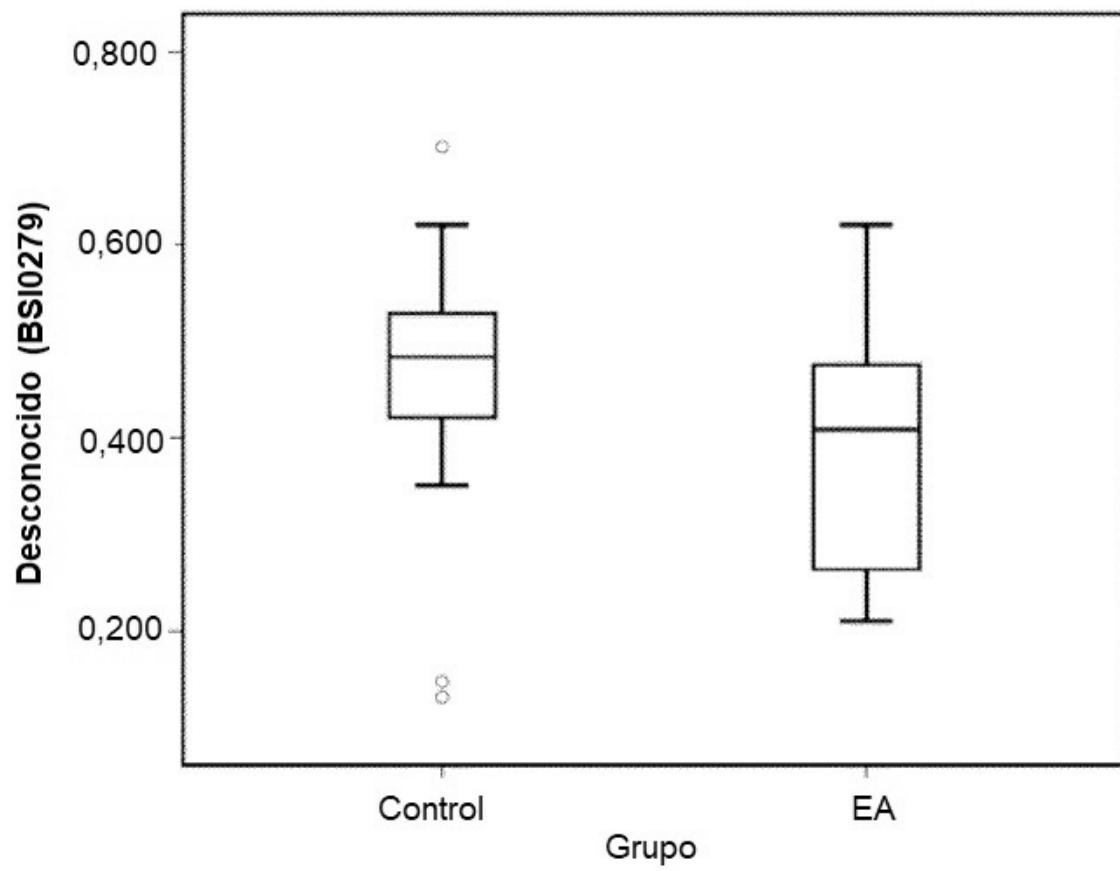


Figura 7

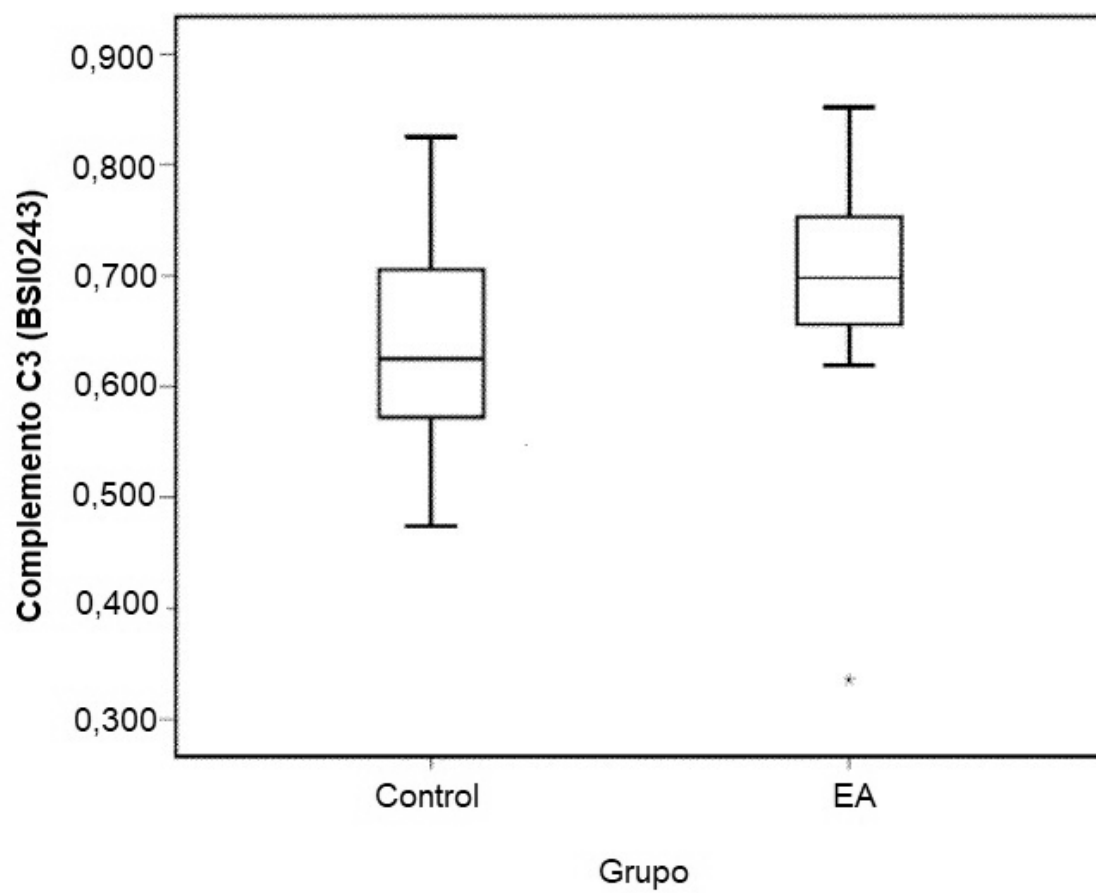


Figura 8

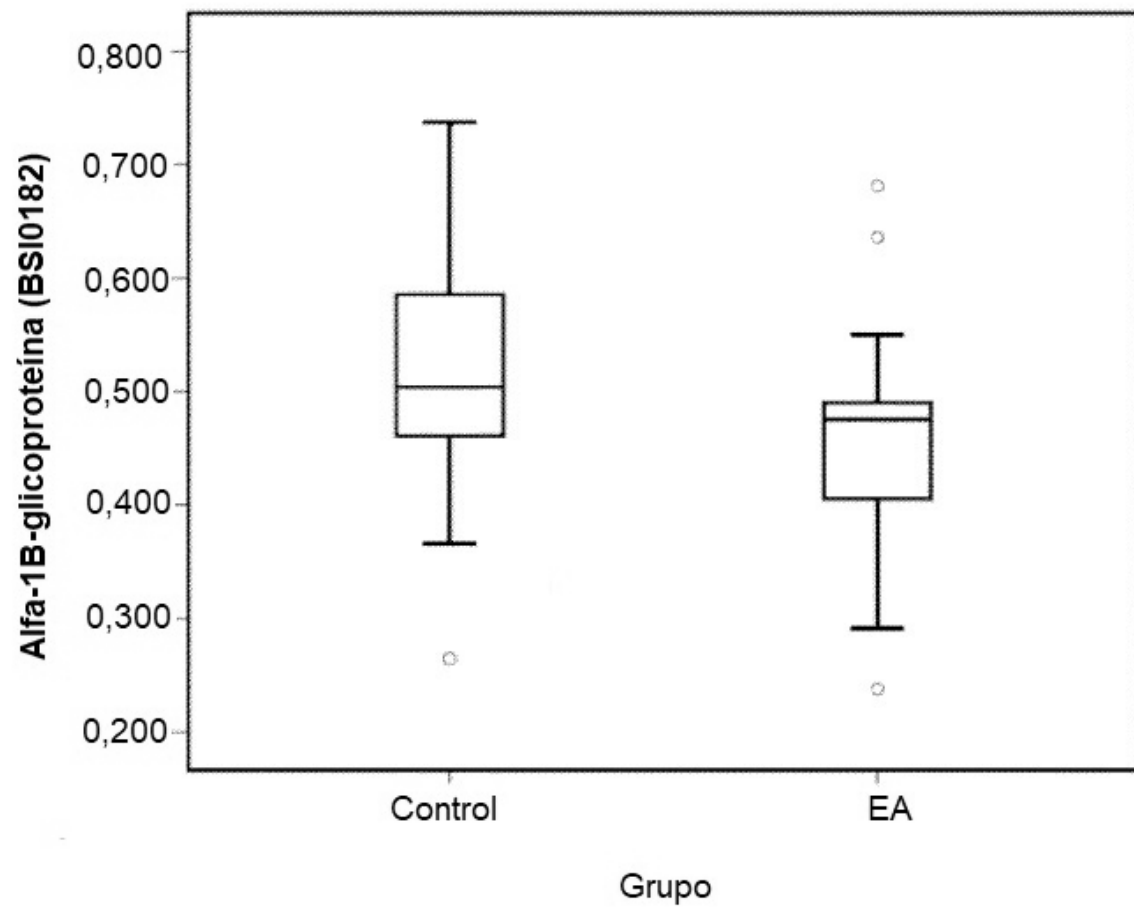


Figura 9

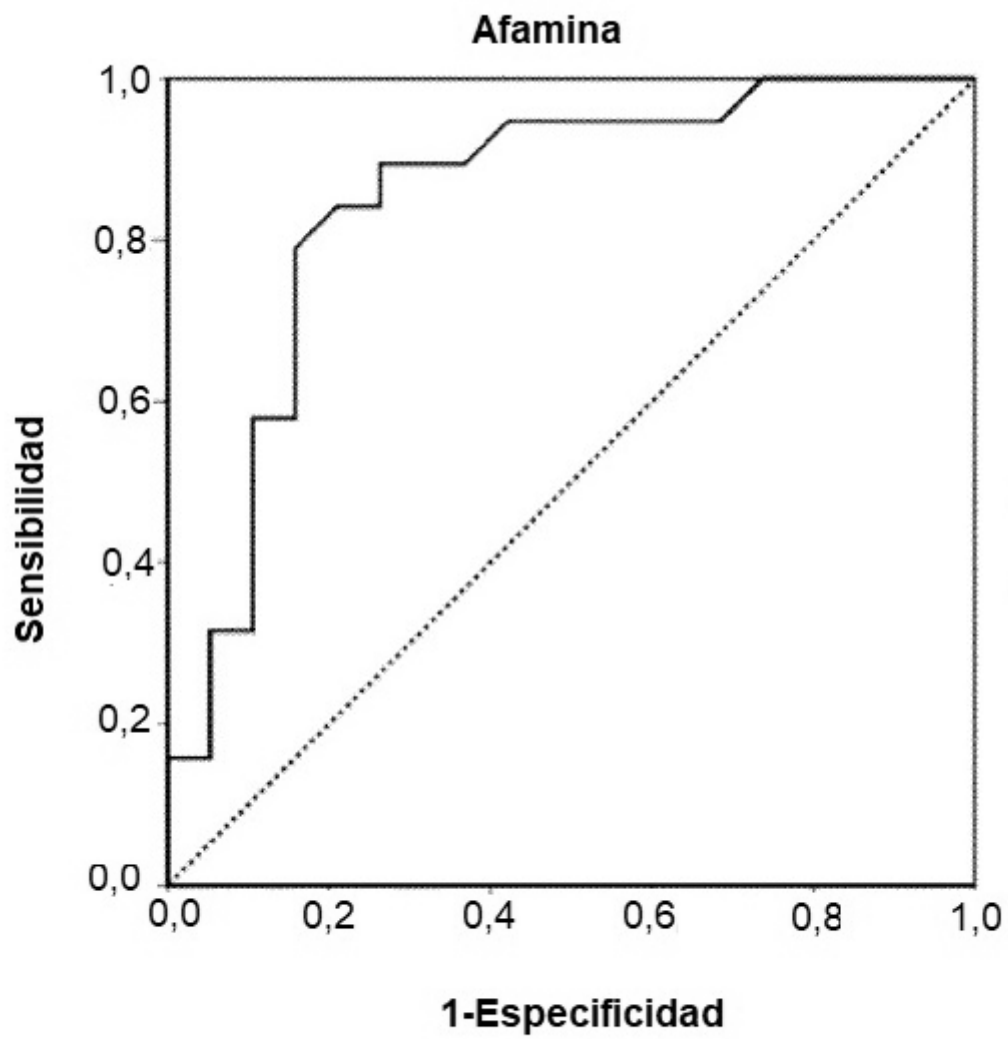
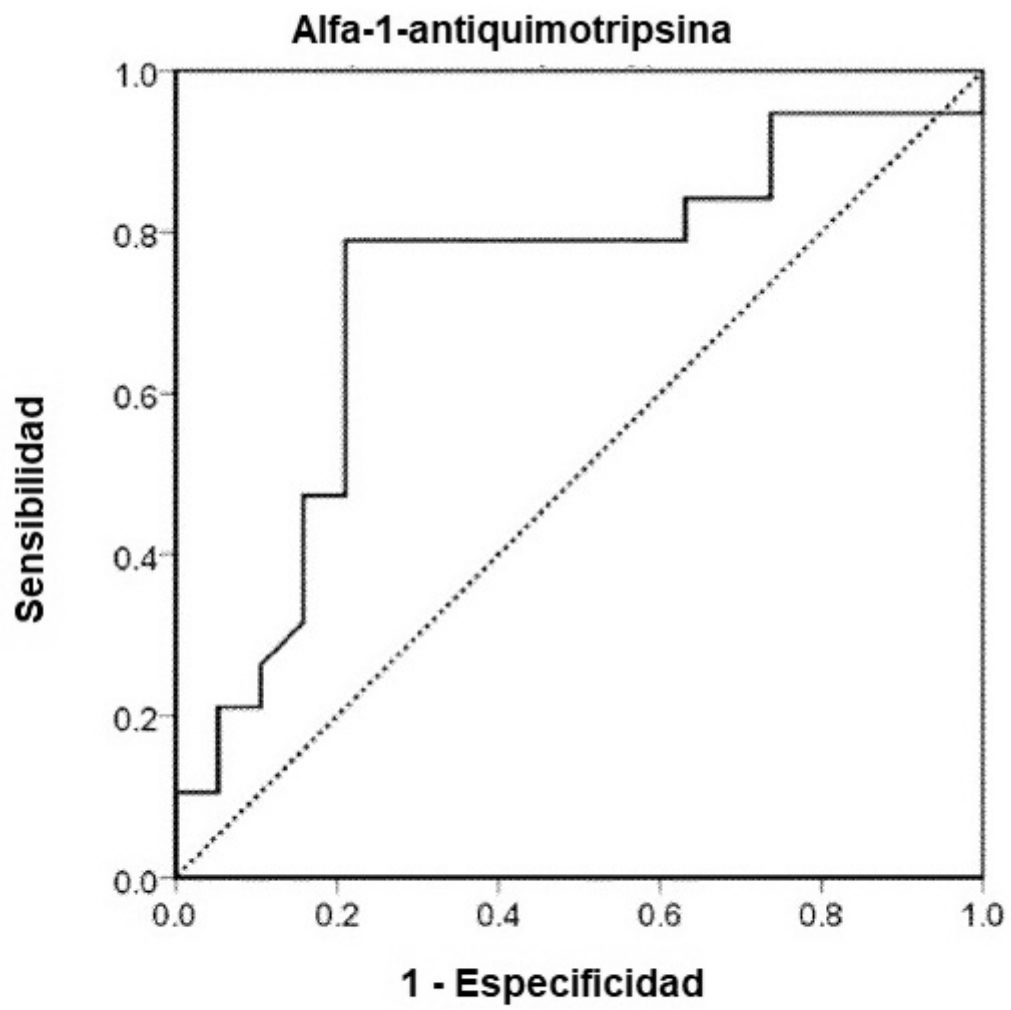


Figura 10



- Figura 11

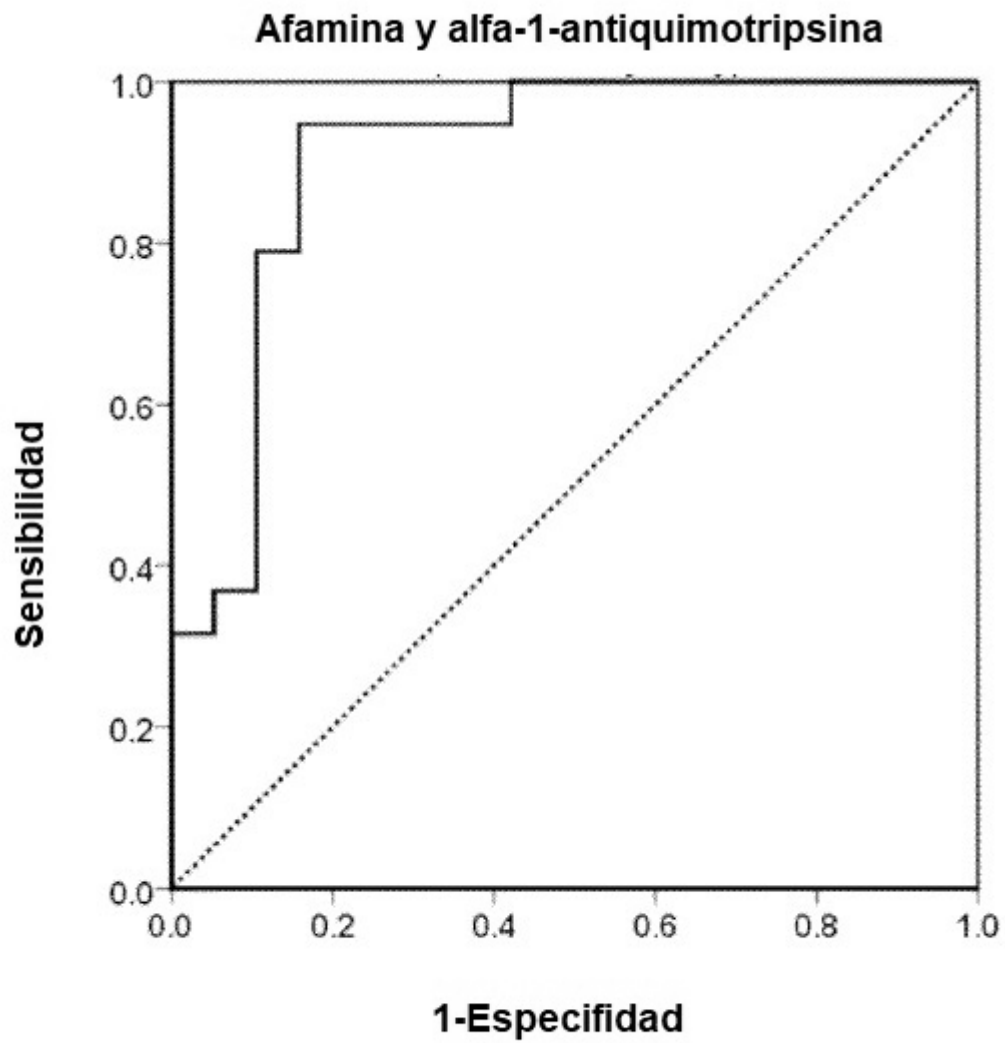


Figura 12

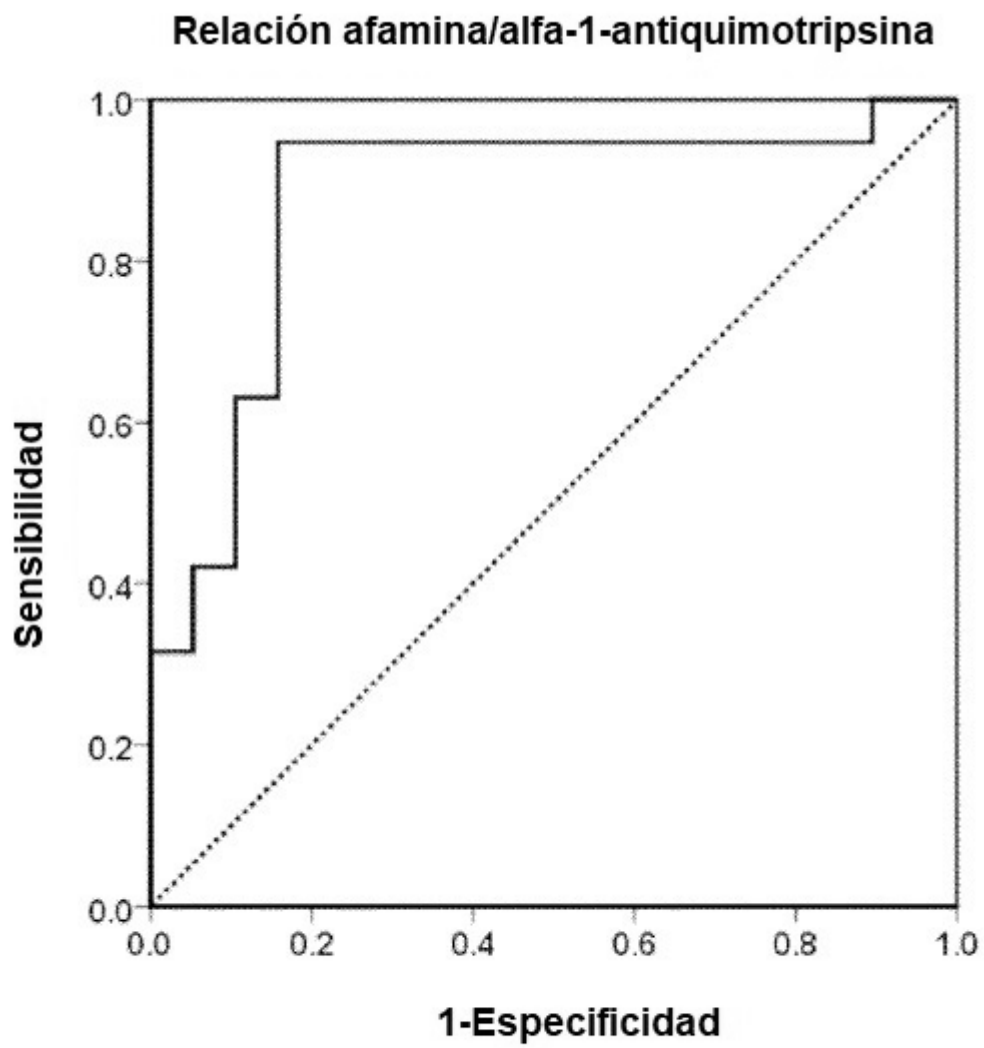


Figura 13

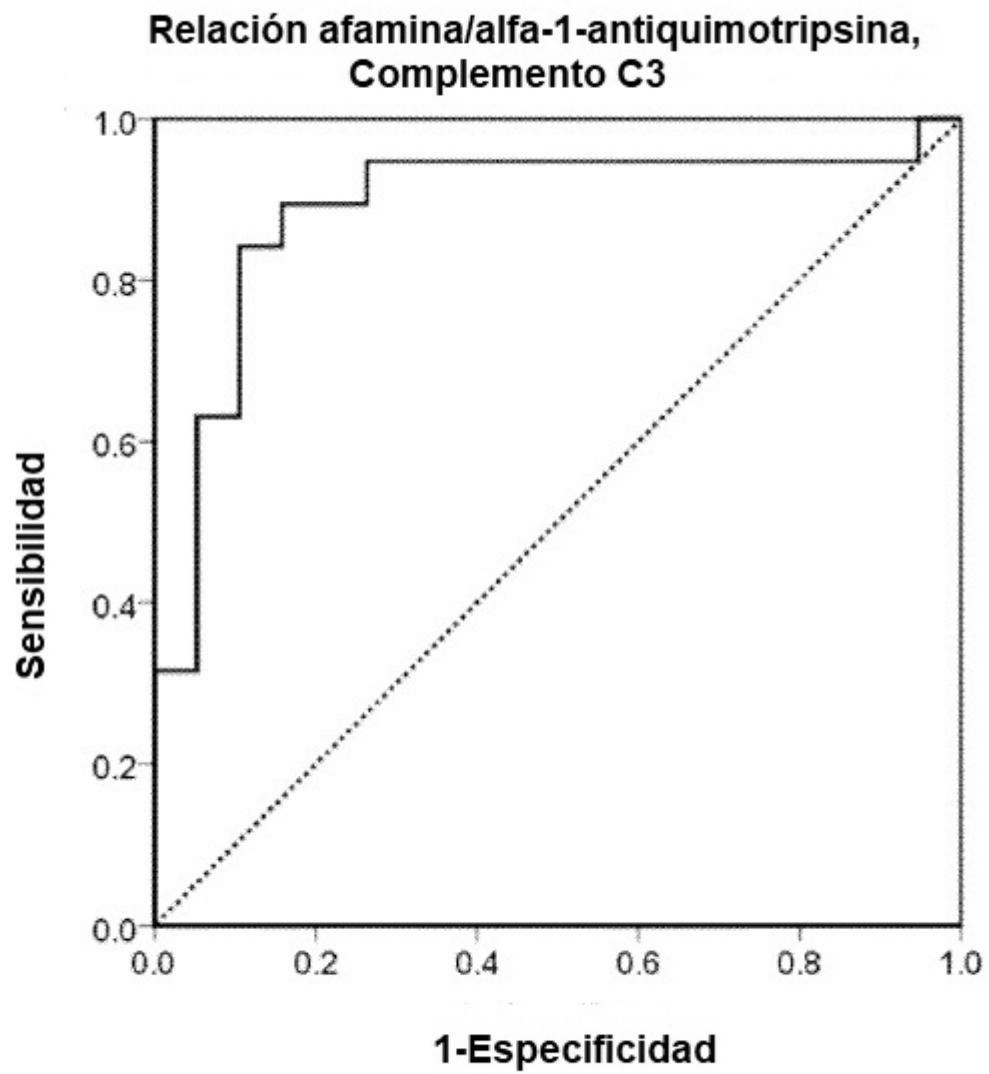


Figura 14

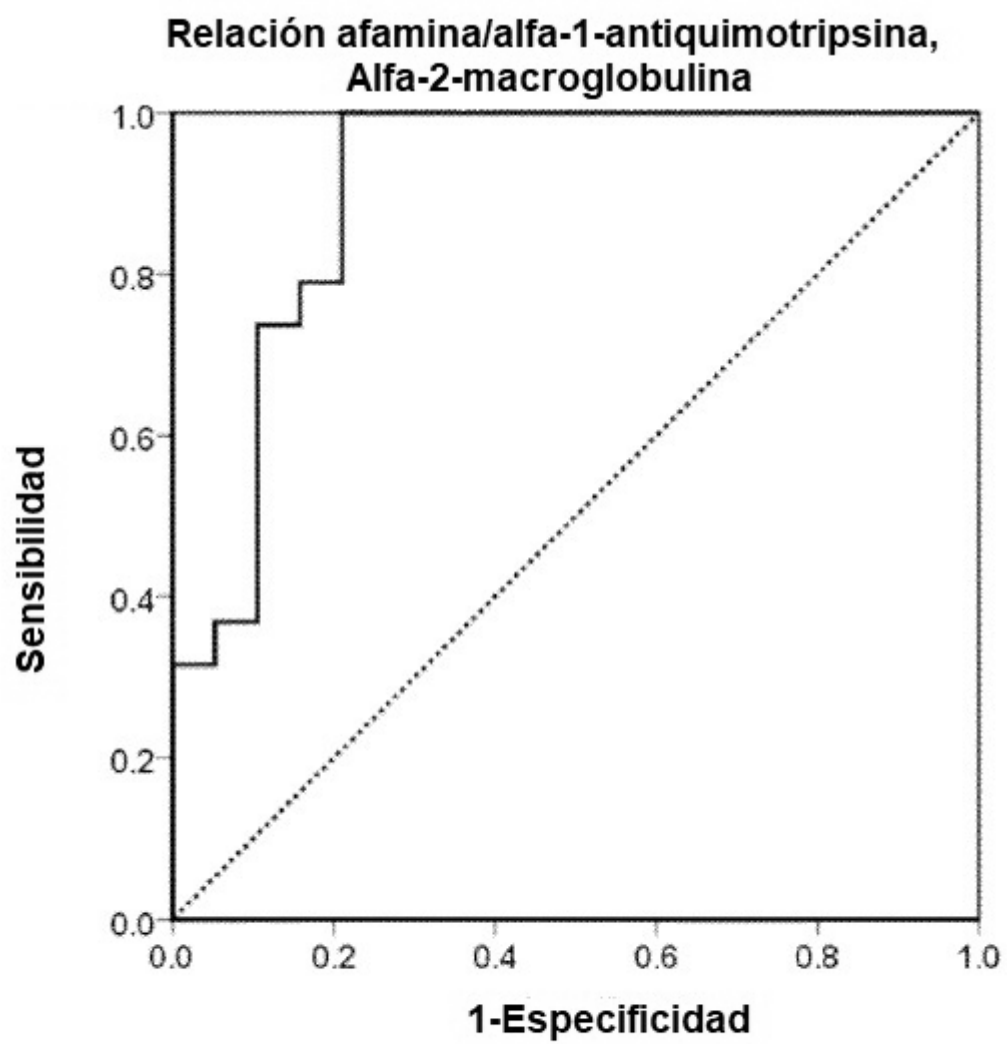


Figura 15

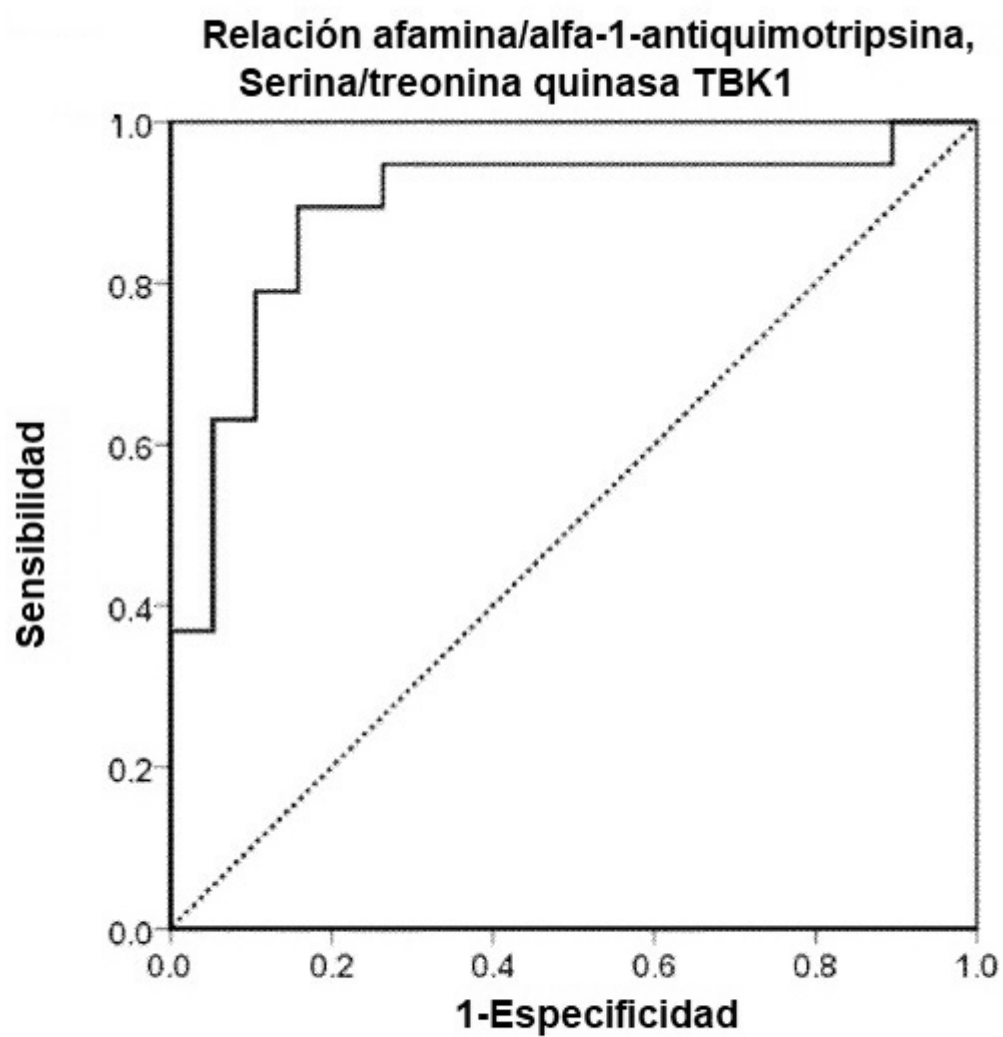


Figura 16

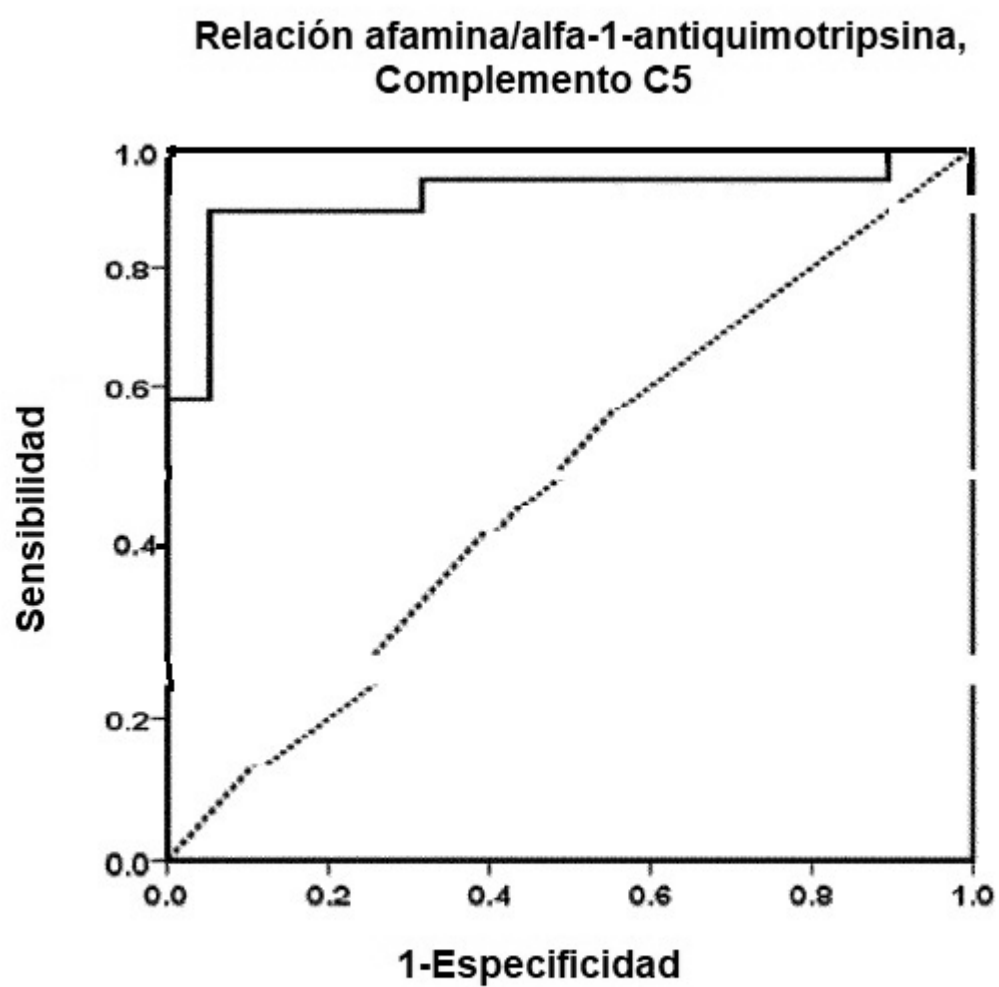


Figura 17

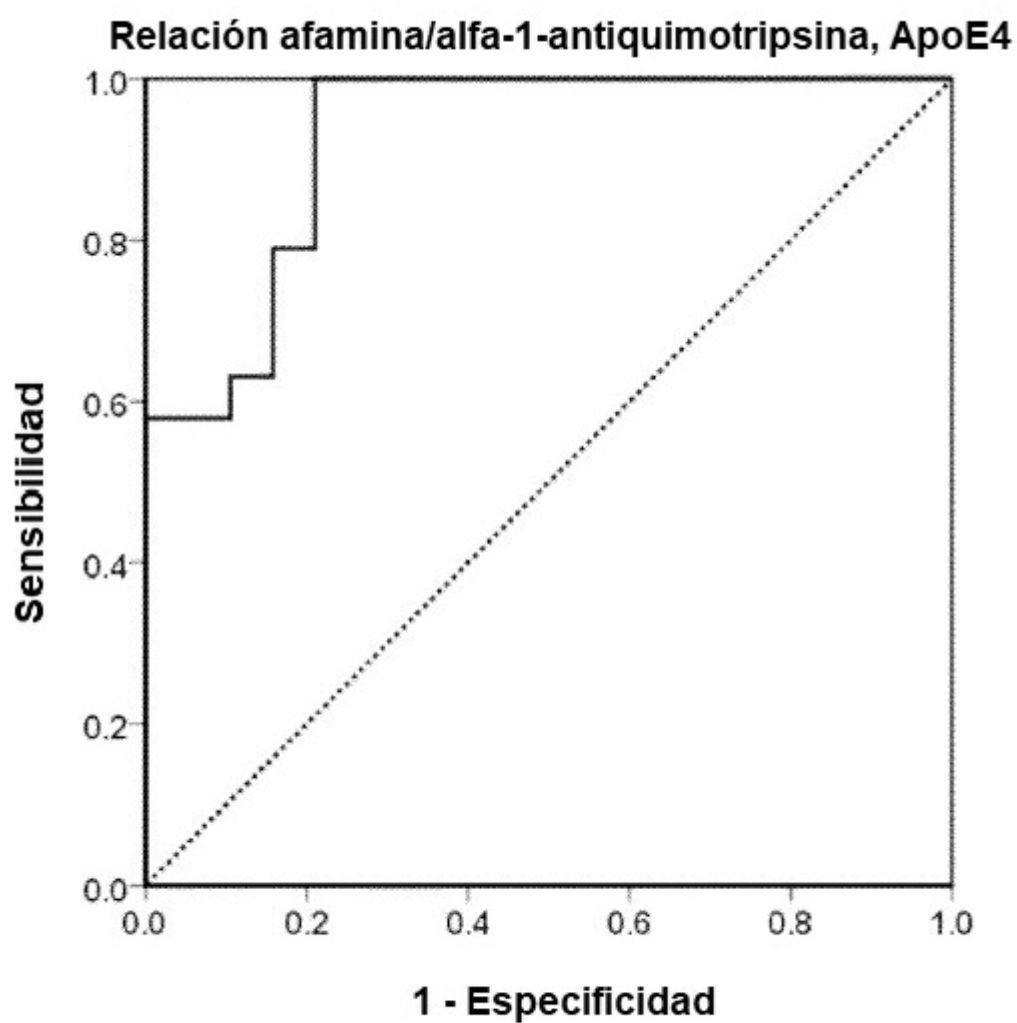


Figura 18

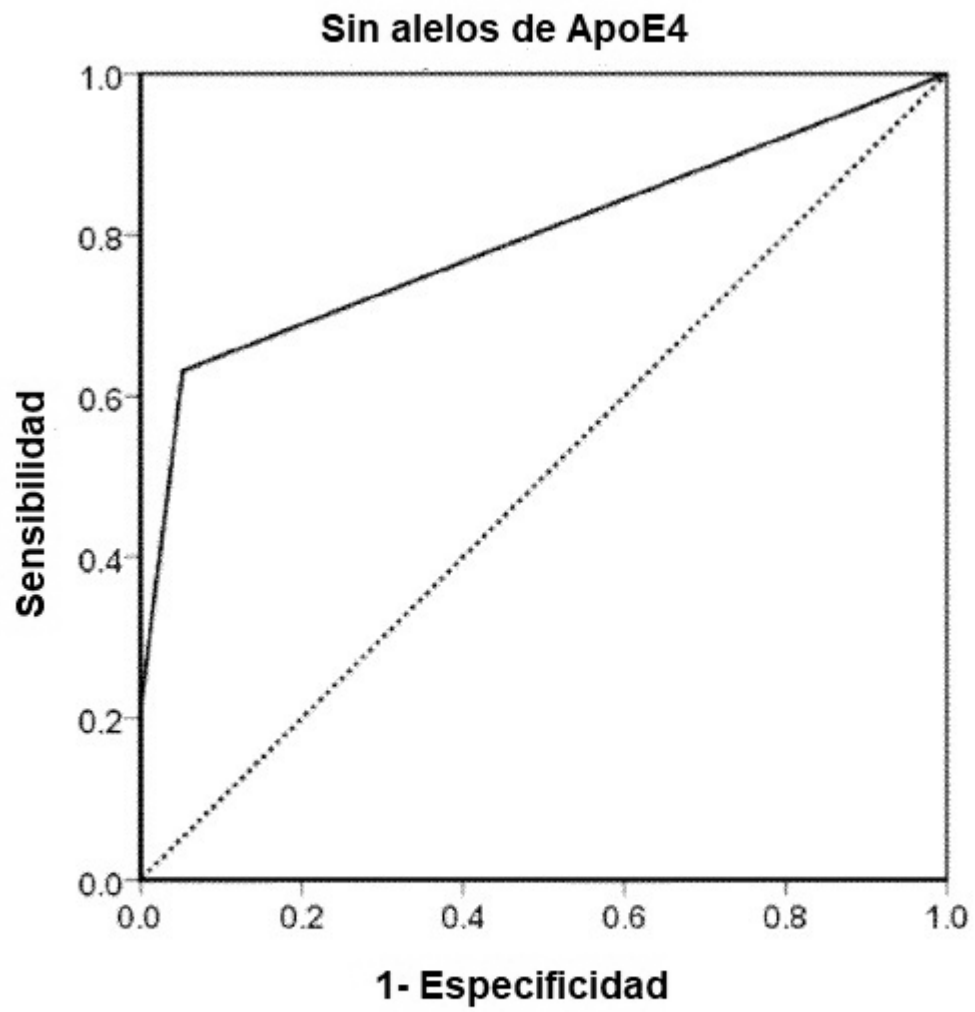


Figura 19

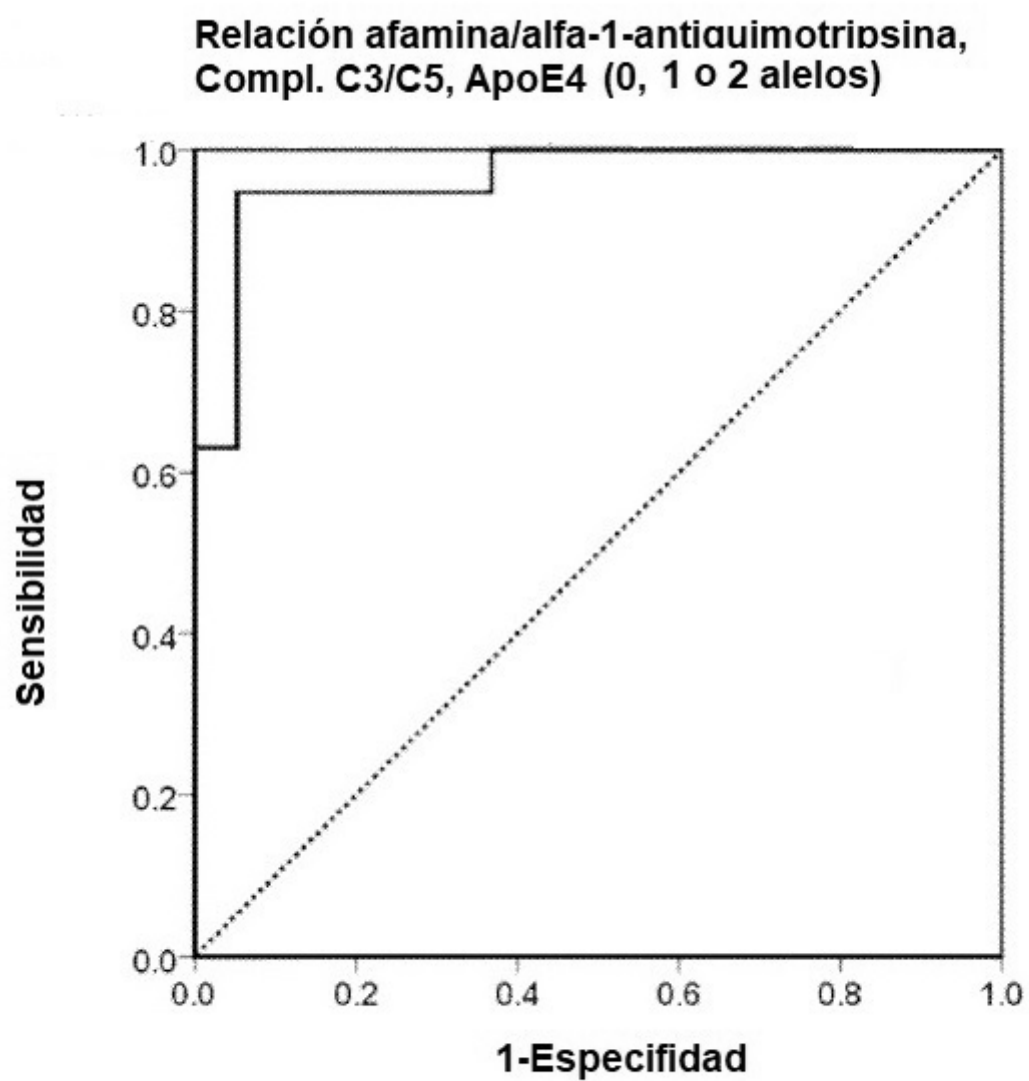


Figura 20

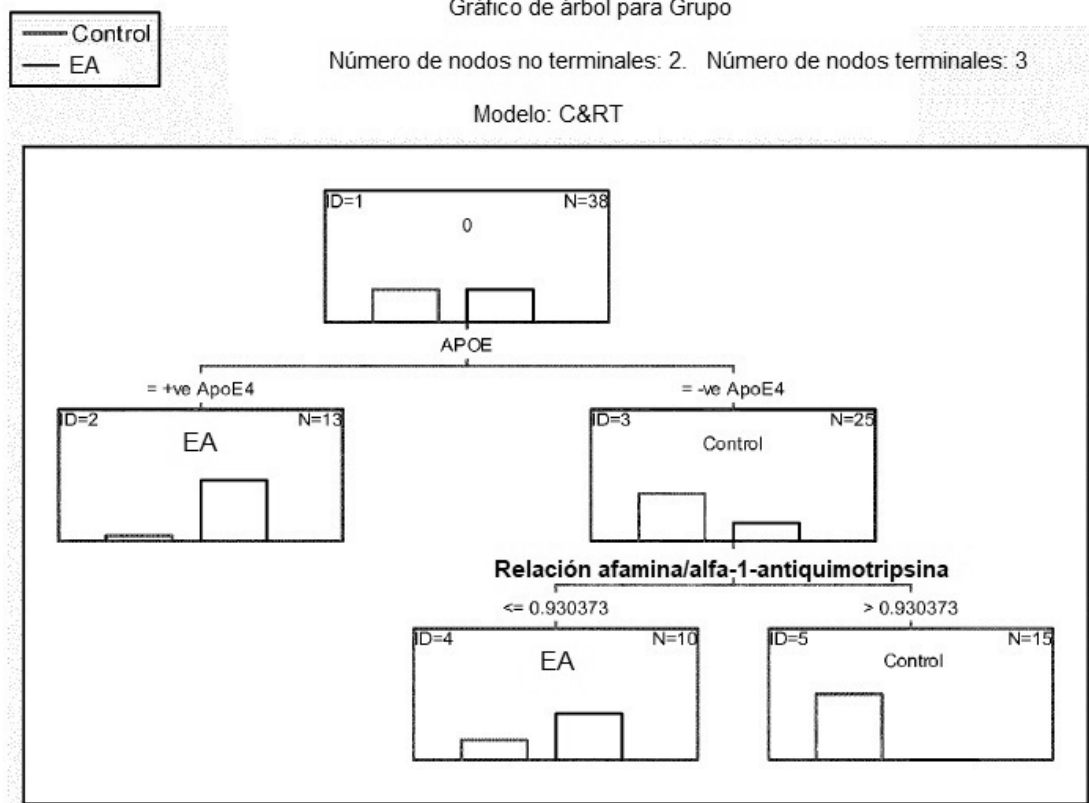


Figura 21