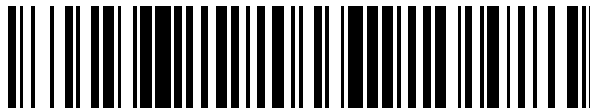


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 378**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2015 PCT/EP2015/051677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15113995**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2015 E 15703516 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3102950**

54 Título: **Biomarcador y procedimientos para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

28.01.2014 EP 14152770
28.01.2014 US 201461932307 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2019

73 Titular/es:

PREDEMTEC AG (100.0%)
c/o Switzerland Innovation Park, Basel Area AG,
Gewerbestraße 24
4123 Allschwil, CH

72 Inventor/es:

FEUERHELM-HEIDL, ANNEGRET

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 718 378 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).

BIOMARCADOR Y PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere en un primer aspecto a un procedimiento para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o para determinar la presencia de la enfermedad de Alzheimer avanzada en un sujeto, por lo que se mide una combinación de al menos cinco biomarcadores específicos. Además, se proporciona el uso de un kit, así como el uso de un conjunto, que comprende medios de detección, en particular, anticuerpos, para al menos cuatro biomarcadores específicos. Además, se proporciona un producto de programa informático y un procedimiento implementado por ordenador para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o para determinar la presencia de la enfermedad de Alzheimer avanzada.

Técnica anterior

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una encefalopatía progresiva con un enorme coste para la vidas humanas. El impacto de la enfermedad también es una preocupación creciente para los gobiernos de los países en desarrollo, en particular, debido al número cada vez más alto de ciudadanos ancianos en riesgo. La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia, un término común para la amnesia y otros deterioros cognitivos. En general, la demencia incluye la forma de demencia vascular y demencia degenerativa, incluyendo la enfermedad de Alzheimer o demencia de Alzheimer. Se describen tipos diferentes de demencia, como amiloidopatía (demencia de Alzheimer), tauopatía (enfermedad por cuerpos de Lewy, enfermedad de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Pick) y sinucleinopatía (enfermedad de Parkinson).

25 El mayor factor de riesgo para la demencia es la edad. Las personas por encima de los 85 años tienen más probabilidad de experimentar la afección, aunque se producen algunas formas de demencia en personas por debajo de los 50 años. Algunos individuos son genéticamente más susceptibles a desarrollar determinadas formas de demencia, tales como enfermedad de Alzheimer y corea de Huntington. Adicionalmente, varios factores pueden provocar demencia temporal o permanente, tales como lesiones cerebrales (incluyendo el daño provocado por accidente cerebrovascular), desnutrición, infecciones, reacción a medicamentos, envenenamiento, tumor o lesión cerebral.

35 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa progresiva crónica y es el tipo más frecuente de demencia. Los medios de diagnóstico actuales, incluyendo los procedimientos de neurodiagnóstico por la imagen, están mejorando continuamente. No obstante, todavía es una tarea complicada incrementar la sensibilidad y especificidad de un diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Dos áreas de diagnóstico son especialmente complicadas: en primer lugar, la diferenciación de las fases precoces de la enfermedad de Alzheimer del deterioro cognitivo leve y el envejecimiento normal; y, en segundo lugar, el incremento de la especificidad del diagnóstico, especialmente cuando se comparten síntomas clínicos similares por diversos tipos de demencia. Hasta la fecha, el análisis del amiloide beta(1-42), tau total y fosfo-tau-181 del líquido cefalorraquídeo (LCR) son los mejores marcadores biológicos para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer y diferenciarla de otras formas de demencia con una fiabilidad y validez altas. Marksteiner J. *et al.* (Drugs Today 43(6):423-31, 2007) revisan el uso de biomarcadores en el LCR y de posibles marcadores relacionados con la sangre. Se sugiere que el riesgo de deterioro cognitivo leve está influido por las variaciones génicas de la proteína tau y que el deterioro cognitivo leve comparte un trasfondo genético común con la enfermedad de Alzheimer. Esto puede ayudar a explicar el riesgo genético de deterioro cognitivo y a diseñar ensayos clínicos eficaces. Welge V. *et al.* (J. Neural. Transm. 116(2):203-12, 2009) informaron de que, para las concentraciones de líquido cefalorraquídeo (LCR), la proporción Abeta1-42/Abeta1-38/p-tau discrimina poderosamente la enfermedad de Alzheimer (EA) de los pacientes con demencia sin Alzheimer y cumple los requisitos de precisión para un biomarcador de la EA para el cribado y el diagnóstico diferencial aplicable.

50 La Alzheimer's Association proporciona siete fases durante el curso de la enfermedad, a saber, 1: sin deterioro, 2 deterioro muy leve (fase precoz), 3 deterioro leve, 4 deterioro moderado, 5 deterioro moderadamente grave, 6 deterioro grave y 7 deterioro muy grave.

55 La detección precoz de los trastornos neurodegenerativos posibilitaría un tratamiento más eficaz de los pacientes. Los estudios recientes han demostrado que los trastornos como la enfermedad de Alzheimer se caracterizan por una fase presintomática, que probablemente dure años, durante la cual se produce la degeneración neuronal, pero antes de que aparezcan los síntomas clínicos. Esto presenta tanto una complicación —cómo identificar a los individuos durante este periodo preclínico— como una oportunidad. El tratamiento preventivo se podría iniciar durante el periodo preclínico antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, un propósito principal de la investigación clínica es mejorar la detección precoz de estas enfermedades desarrollando herramientas para adelantar el diagnóstico en el curso temporal de la neurodegeneración. Además, la identificación precoz de individuos que tienen riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer es altamente deseable. En la técnica se describe que la profilaxis y el tratamiento de la EA son más eficaces en los pacientes con detección precoz de dicho trastorno neurodegenerativo, así como del retraso de dicha progresión final de la EA.

65

El péptido amiloide beta (Abeta) agregado está implicado en la patología de la enfermedad de Alzheimer. *In vitro* e *in vivo*, estos agregados se encuentran en una variedad de morfologías, incluyendo oligómeros globulares y fibrillas lineales, que poseen distintas actividades biológicas. El diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica han dependido durante mucho tiempo del examen clínico de individuos con enfermedad terminal. Sin embargo, los próximos tratamientos anti-EA se inician de forma óptima cuando los individuos muestran signos muy leves de neurodegeneración. Existe un consenso en desarrollo en cuanto al amiloide beta (Abeta) en el líquido cefalorraquídeo como un biomarcador central para la fase de deterioro cognitivo leve de la EA. El Abeta está implicado directamente en la patogenia de la EA o estrechamente correlacionado con otros factores patógenos primarios. Se produce a partir de la proteína precursora de amiloide (APP) mediante un procesamiento proteolítico que depende del complejo enzima de escisión de APP en el sitio beta 1 y gamma-secretasa, y se degrada mediante una amplia gama de proteasas.

Se han propuesto las formas de 40 y 42 residuos de aminoácido del amiloide beta (Abeta(1-40) y Abeta(1-42)) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como biomarcadores potenciales de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los análisis cuantitativos de los péptidos Abeta en el LCR se han fundamentado casi exclusivamente en el uso de inmunoanálisis de adsorción, tales como el procedimiento de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Sin embargo, debido a la propiedad de los péptidos Abeta para autoagregarse fácilmente o unirse a otras proteínas y artículos de vidrio, dichos análisis son extremadamente complicados. Los análisis se complican adicionalmente por el potencial de los péptidos para sufrir modificaciones postraduccionales y la posibilidad de reacción cruzada en los ensayos ELISA con componentes endógenos del LCR. Los recientes hallazgos sugieren que Abeta(1-42) disminuido en plasma con respecto a Abeta(1-40) podría incrementar el riesgo de EA (Hampel H. *et al.*, *Alzheimers Dement.* 4(1):38-48, 2008).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) es una citocina proinflamatoria multifuncional que pertenece a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF). Esta citocina se segrega principalmente por macrófagos. Está implicada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, incluyendo la proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y coagulación celulares. Esta citocina ha estado implicada en una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, resistencia a la insulina y cáncer. Los estudios de genes inactivados en ratones también sugirieron la función neuroprotectora de esta citocina.

El concepto de inflamación como un principal factor en la enfermedad de Alzheimer (EA) se ha basado hasta ahora en los hallazgos *post mortem* de cambios autodestructivos asociados con las lesiones, junto con la evidencia epidemiológica de un efecto protector de los agentes antiinflamatorios. Ahora existe evidencia de que el riesgo de EA está sustancialmente influido por un total de 10 polimorfismos en los agentes inflamatorios interleucina 1 alfa, interleucina 1 beta, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa, alfa-(2)-macroglobulina y alfa-(1)-antiquimotripsina. Todos los polimorfismos son comunes.

Los documentos WO 2005/052292 y WO 2006/133423 describen procedimientos y composiciones para el diagnóstico, estratificación y seguimiento de la EA y otros trastornos neurológicos en los líquidos corporales. Por ejemplo, el documento EP 2 211 183 B1, que procede de la solicitud WO anterior, identifica procedimientos para diagnosticar y realizar un seguimiento de la EA en los que se mide como biomarcador la proteína de unión 2 al factor insulínico de crecimiento (EGFBP-2). La solicitud de patente a la que se hace referencia proporciona un gran número de biomarcadores posibles que supuestamente deberían ser adecuados para diagnosticar trastornos neurológicos, incluyendo la EA. Sin embargo, no se divulga un conjunto específico de biomarcadores que permitan el diagnóstico y la predicción de la EA con precisión alta. Además, Thambisetty, N., *et al.*, *biomarkers and medicine, future medicine*, London, volumen 4, n.º 1, páginas 65 a 79, divulgan biomarcadores de la EA basados en la sangre: Complicado, pero factible. WO 2009/149185 identifica inmunoglobulinas de dominio variable doble y usos de las mismas.

Los recientes hallazgos han sugerido una implicación del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC) en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer (EA). El FNDC es una proteína endógena implicada en el mantenimiento de la función neuronal, la plasticidad sináptica y la integridad estructural en el cerebro adulto. Se evaluaron las concentraciones de FNDC en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante un ELISA sensible en 27 pacientes con EA en comparación con 9 pacientes con hidrocefalia normotensiva (HNT) y 28 controles sanos de la misma edad. Se descubrió una disminución significativa de la concentración de FNDC en suero en pacientes con EA (18,6 ng/ml) y con HNT (18,1 ng/ml) en comparación con los controles sanos (21,3 ng/ml; $p=0,041/p=0,017$). Las concentraciones de FNDC en suero no se correlacionaron con las concentraciones de LCR, la edad o las puntuaciones del mini-examen cognoscitivo (MEC) en pacientes con EA y HNT. La disminución de las concentraciones de FNDC en suero en la EA y HNT puede reflejar una falta de apoyo trófico y, por tanto, contribuir a la degeneración progresiva en ambas enfermedades.

La inflamación crónica es una característica de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha informado de una interacción asociada con el riesgo de EA entre los polimorfismos en las regiones reguladoras de los genes para la citocina proinflamatoria, interleucina-6 (IL-6), y la citocina antiinflamatoria, interleucina-10 (IL-10). Una regulación errónea tanto de IL-6 como IL-10 en algunas personas ancianas, debida, en parte, a las variaciones genéticas en los dos genes, puede contribuir al desarrollo de la EA (Cambarros O. *et al.*, *J. Neuroinflammation* 23(6):22, 2009).

La IL-6 (también llamada interferón beta 2) está muy elevada en la enfermedad de Alzheimer (EA) y tiene una fuerte correlación con otras enfermedades, tales como diabetes. La IL-6 también tiene correlaciones con otras enfermedades neurodegenerativas y depresión. También se sospecha de un papel en la enfermedad de Alzheimer (EA) de las interleucinas IL-10, IL-18 y el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF). Malaguera L. *et al.* (Neuropathology 26(4):307-12, 2006) determinaron que las concentraciones de IL-18 estaban significativamente elevadas en pacientes con EA y demencia vascular en comparación con los sujetos sin demencia de la misma edad.

Mateo *et al.* (Acta Neurol. Scand. 116(1):56-8, 2007) describieron que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) determina importantes acciones neurotróficas y neuroprotectoras. Las concentraciones de VEGF bajas en suero se asocian con la enfermedad de Alzheimer.

La integridad de la neuroprotección es un componente importante frente al desarrollo de los trastornos cognitivos y la EA. Un grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer demostró en el valor de referencia una fuerte reducción del factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1) ($3,7 \pm 1,2$ pg/ml), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (63 ± 18 pg/ml) y TGF-beta 1 (33 ± 10 pg/ml) en comparación con sujetos ancianos sanos (IGF-1, $9,5 \pm 2,4$ pg/ml; VEGF, 105 ± 31 pg/ml; y TGF-beta 1, 68 ± 18 pg/ml). Se encontraron correlaciones positivas significativas entre las concentraciones de IGF-1 y VEGF tanto en sujetos sanos ($r=0,87$, $p<0,001$) como en sujetos con EA (Luppi C. *et al.*, Arch. Gerontol. Geriatr. 49(Suppl. 1):173-84, 2009).

Las elevaciones de la homocisteína en plasma se asocian con problemas comunes observados con el envejecimiento, tales como deterioro cognitivo, demencia, depresión, fracturas osteoporóticas y deterioro funcional. Se sabe que las concentraciones de homocisteína son más altas en pacientes con demencia vascular que en los controles o pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA). Las concentraciones elevadas de homocisteína en plasma y las concentraciones bajas de folato en suero son factores predisponentes independientes del desarrollo de demencia y EA. El intervalo normal de concentración de homocisteína en plasma es de 5-15 $\mu\text{mol/l}$, para pacientes con EA por encima de 15 $\mu\text{mol/l}$.

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) está altamente inducida en una variedad de enfermedades que presentan infiltrados celulares ricos en monocitos, tales como aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca congestiva y artritis reumatoide.

La detección de concentraciones elevadas de proteína C-reactiva (PCR) en suero no es específica para ninguna enfermedad particular. Es un indicador útil de los procesos inflamatorios. La PCR en plasma se asocia con un deterioro cognitivo leve (DCL) prevalente y con un DCL no amnésico en personas ancianas sin demencia en un entorno poblacional. Estos hallazgos sugieren la implicación de la inflamación en la patogenia del DCL. La concentración de PCR alta en plasma se asocia con un deterioro cognitivo acelerado y un riesgo incrementado de demencia en pacientes con DCL. Los pacientes con EA tenían concentraciones más altas de PCR que los pacientes con demencia vascular ($4,2 \pm 0,6$ frente a $1,7 \pm 0,2$, $p < 0,001$, respectivamente). El análisis de regresión logística múltiple gradual mostró que la demencia (razón de posibilidades = OR = 4,965, intervalo de confianza de un 95 % = IC = 1,402-13,23, $p=0,004$), el fibrinógeno (OR = 1,011, IC = 1,007-1,015, $p<0,001$) y la edad (OR = 1,158, IC = 1,063-1,261, $p<0,001$) se correlacionan independientemente con concentraciones altas de PCR. El estudio sugiere que la inflamación puede tener un papel patogénico en la EA (Mancinella A. *et al.*, Arch. Gerontol. Geriatr. 49(Suppl 1):185-94, 2009).

No existe una cura actual para la enfermedad de Alzheimer, pero existen enfoques farmacológicos y no farmacológicos para su tratamiento. En general, los tratamientos farmacológicos se dirigen a ralentizar la progresión de los síntomas. Diversos biomarcadores han demostrado ser muy eficaces en un grupo grande de pacientes, pero el éxito se correlaciona directamente con la identificación de los portadores de la enfermedad en sus fases precoces. Esto justifica la necesidad de obtener formas oportunas y precisas de diagnóstico por medio de medios moleculares, Ray S. *et al.*, Nat. Med. 13(11):1359-62, 2007.

El documento WO 2005/017203 A2 se refiere a una micromatriz que tiene una pluralidad de genes diferentes, entre otros, VEGF, IGF-1, IL-18 y FNDC.

Morimoto K., *et al.*, JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE: 25 (2011), 59 - 76 divulgan los perfiles de expresión de las citocinas en los cerebros de los pacientes con EA en comparación con los cerebros de los pacientes de control. TGF β 1 es uno de los marcadores analizados.

El documento WO 2011/063453 A1 identifica un procedimiento de diagnóstico, ayuda en el diagnóstico, estratificación de un individuo en una o más clases o seguimiento de la progresión de un trastorno neurológico, incluyendo la EA, que comprende medir, entre otros, el VEGF.

Kuang-Den C. *et al.*, 2011, Neurobiology of Disease, 43(3), 698-705 divulgan un perfil de expresión génica de los leucocitos de la sangre periférica e identifican biomarcadores para la EA, incluyendo TGF β 1.

Anisman, H., *et al.*, Progress in Neurobiology, 2008, 85(1) 1-74 se refieren al papel de IGF1 en la EA.

El documento WO 2011/039366 A1 se refiere a un dispositivo de diagnóstico que comprende secuencias de marcadores novedosas para diagnosticar la EA.

5 Blasko, I. *et al.*, Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 2006, 21(1), 9-15, divulgan la medición de trece marcadores biológicos y la EA. Entre esos marcadores están VEGF, FNDC, TGFβ1 y MCP1.

10 Por último, un cribado-diagnóstico mejorado para la enfermedad de Alzheimer incipiente tiene una serie de beneficios. El diagnóstico precoz permite que las personas en las fases precoces de la enfermedad contribuyan al proceso de toma de decisiones sobre los medicamentos. Los medicamentos existentes funcionan mejor, si es que en modo alguno funcionan, en las fases precoces de la enfermedad. La detección precoz permite una intervención precoz. A medida que se desarrollan medicamentos, podría ser concebible que en el futuro la detección precoz previniera el daño irreversible al cerebro que se produce a medida que la enfermedad de Alzheimer progresa. Por tanto, existe una necesidad continua de obtener procedimientos y sistemas de prueba que permitan diagnosticar la EA en una fase precoz con especificidad alta. Además, para permitir la diferenciación de EA de otros tipos de demencia, se requieren nuevos procedimientos y ensayos. Es decir, identificar las etapas posteriores de la EA es útil para permitir la determinación del régimen de tratamiento.

Breve descripción de la presente invención

20 La presente invención se refiere en un primer aspecto a un procedimiento para diagnosticar o predecir el riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (EA) de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

25 a) medir la concentración o cantidad de biomarcador de la EA en el que el biomarcador está en forma de una proteína o péptido en una muestra biológica de un sujeto; y

b) determinar o diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollar la EA con especificidad alta en base a la concentración o cantidad de dicho biomarcador,

30 por lo que los biomarcadores de la EA son al menos cinco biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y por lo que un incremento de IL-18 y MCP-1 y la disminución de FNDC, IGF-1, VEGF y TGF-beta 1 en comparación con una concentración o cantidad de referencia de dicho biomarcador es indicativo de la presencia o riesgo de desarrollo de la EA.

35 Además, se puede usar homocisteína como otro biomarcador para la verificación del diagnóstico. En pacientes con EA, la concentración o cantidades de homocisteína están disminuidas.

40 Además, un procedimiento para determinar el estado de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 2 como se describe, que comprende

a) medir la concentración o cantidad de biomarcador de la EA en una muestra biológica en el que el biomarcador está en forma de una proteína o péptido de un sujeto; y

45 b) determinar la presencia o el estado de la EA con especificidad alta en base a la concentración o cantidad de dicho biomarcador,

50 por lo que los biomarcadores de la EA son al menos cinco biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y por lo que un incremento de IL-18 y VEGF y la disminución de FNDC, IGF-1, MCP-1 y TGF-beta 1 en comparación con una concentración o cantidad de referencia de dicho biomarcador es indicativo de la presencia de la EA avanzada.

55 Es decir, en otro modo de realización, la verificación del padecimiento de las fases tardías de la EA a partir de la EA avanzada en pacientes con demencia se caracteriza por un incremento de IL-18 y VEGF y una disminución de FNDC, IGF-1, MCP-1 y TGF-beta 1.

60 La combinación de al menos 5 de los marcadores de referencia permite, por un lado, el diagnóstico y detección precoces del riesgo de desarrollar la EA con una especificidad alta de al menos un 90 % y, por otro lado, determinar la presencia de la EA avanzada con una especificidad alta de al menos un 90 %.

65 Es preferente que se midan al menos cinco o todos los biomarcadores de entre los biomarcadores FNDC, IGF-1, TGF-beta 1, VEGF, IL-18 y MCP-1.

La firma molecular del biomarcador que comprende al menos cuatro de los biomarcadores identificados anteriormente logra, en promedio, un 90 %, como un 95 %, en particular, un 96 % de precisión, como sensibilidad, en la predicción de la EA clínica. Al menos, la firma molecular del biomarcador permite la detección precoz del riesgo de enfermedad de Alzheimer en un inicio temprano de un tratamiento adecuado, así como para la determinación de la presencia de la EA avanzada.

Además, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit como se define en la reivindicación 8 en el diagnóstico o pronóstico del riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer, así como para determinar la presencia de la EA avanzada, que comprende medios de detección para al menos cuatro de los biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y, opcionalmente, homocisteína, para su uso en el diagnóstico o determinación del riesgo de desarrollo de la EA, opcionalmente, que contiene instrucciones sobre cómo usar el kit en un procedimiento de acuerdo con la presente invención para diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollo de la EA, así como para determinar la presencia de la EA avanzada.

Además, la presente invención se refiere al uso *in vitro* de al menos cinco de los biomarcadores como se define en el presente documento para su uso en el diagnóstico, evaluación del riesgo o control del tratamiento de la EA determinando la concentración o cantidad de dicho biomarcador en una muestra biológica de un individuo y determinando un incremento o disminución de al menos cinco de dichos biomarcadores en comparación con la concentración o cantidades de referencia de dicho biomarcador. El biomarcador es indicativo de la EA cuando la concentración o cantidad está por encima o por debajo, respectivamente, de un valor de corte para dicho biomarcador específico. Además, la presente invención se refiere al uso de un conjunto que comprende medios para detectar al menos cuatro de los biomarcadores de acuerdo con la presente invención, en particular, un conjunto o kit en el que los medios de detección son anticuerpos y la detección de dichos biomarcadores se lleva a cabo de forma inmunológica.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento implementado por ordenador como se define en la reivindicación 13 de diagnóstico o determinación del riesgo de desarrollar la EA que comprende las etapas de:

- a) obtener datos de la concentración o cantidad medida de al menos cuatro de los biomarcadores de la EA de acuerdo con la presente invención en una muestra biológica de un sujeto;
- b) computar los datos de la etapa a) comparando la concentración o cantidad del biomarcador de la EA en dicha muestra con un valor de corte obtenido de una base de datos u obtenido como una concentración o cantidad medida de un control de valor de corte.
- c) analizar e identificar en el biomarcador qué concentración o cantidad se incrementa o disminuye por encima o por debajo de una concentración de valor de corte.

Por último, la presente invención se refiere a un medio informático o producto de programa informático que tiene instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1, se proporciona un esquema de una placa de microvaloración que muestra la asignación de cada sonda. Cada muestra se mide por duplicado. Además, está presente un control positivo, un control negativo y un control de valor de corte, lo que permite tener controles internos en la placa. En el presente caso, se analizan 5 muestras de pacientes.

En la figura 2, se muestra la especificidad de las combinaciones de marcadores mostradas en la tabla 5. Como se demuestra, usando al menos cinco marcadores de entre los seis marcadores permite una especificidad de más de un 90 %.

Descripción detallada de la presente invención

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad de Alzheimer" significa una encefalopatía degenerativa que destruye las neuronas en la corteza cerebral hasta su atrofia o reduce las circunvoluciones (pliegues en la corteza cerebral) en los lóbulos frontal y temporal del cerebro, en particular, como se define por los criterios de NINCDS-ARDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association).

Como se usa en el presente documento, el término "diagnóstico" significa identificar la presencia o características de los estados patológicos. Con respecto a los objetivos de la presente invención, "diagnóstico" significa la determinación del riesgo de contraer la enfermedad de Alzheimer en base a al análisis *ex vivo* de líquidos corporales.

Como se usa en el presente documento, el término "biomarcador" significa una sustancia que puede indicar un estado de enfermedad. En el contexto de la presente invención dirigida al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, "biomarcador" significa una sustancia que indica si las células cerebrales están en un estado normal o atacadas por la enfermedad de Alzheimer. "Biomarcador" incluye polipéptidos y glucoproteínas, cuyas cantidades se incrementan o disminuyen en pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer o son propensos a padecer la enfermedad de Alzheimer en comparación con sujetos sanos normales.

Como se usa en el presente documento, el término "sangre" incluye sangre entera, suero y plasma.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" significa una inmunoglobulina que se une específicamente a una región antigénica de una biomolécula. Con respecto al objetivo de la presente invención, el anticuerpo se une específicamente a un biomarcador e incluye un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo recombinante. Además, el anticuerpo de la presente invención incluye fragmentos funcionales de moléculas de anticuerpo, así como formas completas que tienen dos cadenas ligeras de longitud completa y dos cadenas pesadas de longitud completa. El fragmento funcional de las moléculas de anticuerpo significa un fragmento que retiene al menos la función de unión a antígeno e incluye Fab, F(ab')₂, Fv y fragmentos similares.

Como se usa en el presente documento, el término "complejo antígeno-anticuerpo" significa un producto de unión de un biomarcador a un anticuerpo que lo reconoce.

Como se usa en el presente documento, los términos "comprende" o "que comprende" y los términos "contiene" o "que contiene" incluyen los modos de realización de "consiste" y "que consiste en".

El término "concentración de valor de corte" como se usa en el presente documento se refiere a la concentración relativa o absoluta determinada para permitir distinguir entre individuos que padecen la EA o que tienen riesgo de desarrollar la EA. La concentración de valor de corte se da como una diferencia múltiplo en el caso de concentraciones relativas o como un valor específico en el caso de concentraciones absolutas, por ejemplo, en el caso de la concentración de proteínas expresada como ng o pg/ml. Se considera que los valores que están por debajo o por encima de la concentración de valor de corte, respectivamente, como se indica en el presente documento, permiten el diagnóstico de la EA o determinan el riesgo de desarrollar la EA, o permiten determinar la presencia de la EA avanzada y, finalmente, el control del tratamiento en los pacientes con EA.

Como se usa en el presente documento, el término "biomarcador de la EA" se refiere a un biomarcador que es un biomarcador de diagnóstico de la EA.

Como se usa en el presente documento, el término "predicción" se refiere a realizar un hallazgo de que un individuo tiene una probabilidad significativamente potenciada de desarrollar una enfermedad biológica.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra biológica" engloba una variedad de tipos de muestras obtenidos de un individuo y se puede usar en un ensayo de diagnóstico o seguimiento. La muestra de líquido biológico engloba sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina y otras muestras líquidas de origen biológico. Si se requiriera, se pueden tratar las muestras por adelantado, por ejemplo, para su enriquecimiento o separación.

Un "individuo" es un mamífero, más preferentemente un ser humano; los términos individuo o sujeto se usan en el presente documento de manera intercambiable.

Como se usa en el presente documento, un "valor de referencia" puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tenga un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, una mediana del valor, un valor medio o un valor en comparación con un valor de control o de referencia particular. Un valor de referencia se puede basar en un valor de muestra de un individuo, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del individuo que se va a someter a prueba en un punto temporal anterior o un valor obtenido de una muestra de un paciente con EA distinto del individuo que se somete a prueba o un individuo normal, es decir, un individuo al que no se le ha diagnosticado la EA. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tales como las de pacientes con EA o individuos normales o basar en un grupo de muestras, incluyendo la muestra que se va a someter a prueba.

Como se usa en el presente documento, "un", "una", y "el/la" pueden significar singular o plural a menos que se indique de otro modo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "diferencia múltiplo" se refiere a una representación numérica de la diferencia de magnitud entre un valor medido y un valor de referencia para un biomarcador de la EA. La diferencia múltiplo se calcula matemáticamente mediante la división del valor numérico medido entre el valor numérico de referencia. Por ejemplo, si un valor medido para un biomarcador de la EA es 20 nanogramos/mililitro (ng/ml) y el valor de referencia es 10 ng/ml, la diferencia múltiplo es dos. De forma alternativa, si un valor medido para un biomarcador de la EA es 10 ng/ml y el valor de referencia es 20 ng/ml, la diferencia múltiplo es de un 50 %.

Los autores de la presente invención reconocieron que cuando se mide la concentración o cantidad de una combinación de al menos cinco biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y, opcionalmente, homocisteína y, en un primer modo de realización, por lo que se determina un incremento de IL-18, MCP-1 y homocisteína y la disminución de FNDC, IGF-1, VEGF y TGF-beta 1 en una muestra biológica de un sujeto, es posible diagnosticar la EA incipiente o determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer con especificidad más alta que usando solo una combinación de 1, 2 o 3 marcadores. En particular, se ha identificado que la enfermedad de Alzheimer o el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer se relaciona con cambios en el nivel de expresión de los seis marcadores especificados en el presente documento, a saber, un incremento de IL-18, MCP-1 y homocisteína, así como una disminución de FNDC, IGF-1, VEGF y TGF-beta 1. Además, se ha reconocido que cuando se combinan al menos cinco, como los seis biomarcadores de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), la especificidad y sensibilidad son lo suficientemente altas para posibilitar el diagnóstico o pronóstico de la EA, mientras que cada uno de los biomarcadores en solitario puede estar alterado en diferentes enfermedades y afecciones distintas de la EA. Además, se puede usar la cantidad o concentración de homocisteína para confirmar los resultados.

En otro aspecto, el procedimiento de acuerdo con la presente invención permite diferenciar la EA de otras formas de demencia establecida y determinar las fases tardías, a saber, la fase avanzada y la fase muy avanzada de la EA. Es decir, la EA establecida se caracteriza por una disminución de FNDC, IGF-1, MCP-1 y TGF-beta 1 y un incremento de VEGF e IL-18. La tabla 2 muestra la cantidad medida de dicha proteína en muestras de suero del grupo de control sano normal y del grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer avanzada. A este respecto, cabe señalar que los términos "avanzada" y "establecida" se usan en el presente documento de manera intercambiable.

Tabla 2

Proteína biomarcadora	Grupo de control sano normal	Grupo con enfermedad de Alzheimer	Incremento o disminución en la EA
FNDC	22,8 +/- 1,6 ng/ml	2-12 ng/ml	disminución
IGF-1	70-200 ng/ml	30-60 ng/ml	disminución
VEGF	314 +/- 15 pg/ml	400-2000 pg/ml	incremento, EA vascular
TGF-beta 1	70 - 200 pg/ml	3-30 pg/ml	disminución
MCP-1	160 pg/ml	60 pg/ml	disminución
IL-18	100-200 pg/ml	320 pg/ml	incremento

En particular, cuando al menos cinco biomarcadores de los seis biomarcadores como se define en el presente documento se incrementan o disminuyen, respectivamente, la precisión del diagnóstico de la EA o determinación del riesgo de desarrollar la EA, así como para determinar la presencia de la EA avanzada, es muy alta y es posible realizar un seguimiento del tratamiento. En particular, la precisión es de al menos un 90 %, por ejemplo, de al menos un 95 % y, en algunos casos, de al menos un 96 %. Por ejemplo, la sensibilidad del procedimiento está en el intervalo de al menos un 90 %, como de al menos un 95 %, por ejemplo, de al menos un 96 %. Además, la especificidad del procedimiento de acuerdo con la presente invención es de al menos un 85 %, como de al menos un 90 %, por ejemplo, de al menos un 92 % o de al menos un 95 %. De ahí que la combinación específica de los biomarcadores de acuerdo con la presente invención permita diagnosticar o determinar la EA con precisión alta, en particular, con precisión alta en comparación con la técnica anterior.

Si se desea, se puede combinar el biomarcador de acuerdo con la presente invención con otro biomarcador conocido en la técnica y descrito como que es un biomarcador de la EA adecuado. El experto en la técnica está al tanto de los biomarcadores adecuados que se pueden combinar con los biomarcadores como se define en el presente documento.

En la técnica se ha descrito una serie de biomarcadores como que están alterado en su concentración o cantidad en sujetos que padecen la EA en comparación con grupos de control. Sin embargo, ni la especificidad ni la sensibilidad, es decir, la precisión, de los mismos es suficiente ni satisfactoria para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la EA en un sujeto, en particular, en vista del hecho de que el único biomarcador también puede estar alterado con respecto a sus niveles de expresión o cantidades en otras enfermedades.

Por el contrario, el conjunto de biomarcadores de acuerdo con la presente invención, a saber, el biomarcador que es al menos cinco de los biomarcadores de acuerdo con la presente invención permite diagnosticar la EA de forma precoz, así como determinar la presencia de la EA avanzada con precisión y especificidad altas.

Además, cabe señalar que el término medir, determinar o diagnosticar incluye la etapa de medir físicamente, determinar físicamente o diagnosticar físicamente la concentración o cantidad del biomarcador de la EA. Es decir, el procedimiento incluye la etapa de medir una concentración o cantidad del biomarcador de la EA con procedimientos conocidos útiles para medir una concentración o cantidad y usar dicha concentración o cantidades medidas para la determinación o para el diagnóstico en consecuencia.

Los biomarcadores se determinan en forma de su péptido o proteína. De acuerdo con la presente invención, el procedimiento divulgado en el presente documento se refiere a procedimientos *in vitro* y/o *in vivo*, respectivamente. Preferentemente, los procedimientos son procedimientos *in vitro* basados en muestras obtenidas de individuos y proporcionadas *in vitro*.

Los autores de la presente invención se propusieron demostrar que medir y determinar la concentración o cantidad de biomarcadores de la EA específicos, a saber, de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) permite diagnosticar o predecir el riesgo de desarrollar la EA, así como que permite la diferenciación de la EA de otro tipo de demencia y la determinación de las fases tardías de la EA.

En un modo de realización preferente, se mide la combinación de biomarcadores como se identifica a continuación:

- a) FNDC, IGF-1, VEGF, IL-18 y MCP-1;
- b) FNDC, VEGF, TGF-beta 1, IL-18 y MCP-1;
- c) IGF-1, VEGF, TGF-beta 1, IL-18, MCP-1.

Otro modo de realización preferente incluye las siguientes combinaciones:

- d) FNDC, IGF-1, VEGF, TGF-beta 1, MCP-1.

En un modo de realización de la presente invención, el procedimiento incluye medir la concentración o cantidad de todos los biomarcadores como se define en el presente documento. Además, también se determina la concentración o cantidad de homocisteína.

Como se menciona, la firma del biomarcador, a saber, la concentración o cantidad del biomarcador de acuerdo con la presente invención permite, en promedio, un 96 % de precisión en la predicción de la enfermedad de Alzheimer clínica. Esto se puede usar para confirmar que un paciente con signos evidentes de una demencia se refleja por la EA y, además, se puede usar para diagnosticar a un paciente síndromes poco claros o deterioro cognitivo leve, de tal manera que dicho paciente tiene un riesgo sustancial o incluso más alto de contraer la EA. En comparación con el estado de la técnica de diagnóstico de la EA, el biomarcador actualmente reivindicado tiene ventajas sustanciales. Por ejemplo, todos los biomarcadores están presentes en la sangre. Se pueden medir de forma fácil y fiable en muestras de sangre o suero con un equipo estándar y no existe la necesidad de analizar tejido o líquido cefalorraquídeo.

En un modo de realización de la presente invención, la muestra biológica se selecciona de sangre, tejido o líquido corporal. En un modo de realización preferente, la muestra biológica es sangre, en particular, suero sanguíneo.

Como se menciona, en un modo de realización, el biomarcador IL-18 y MCP-1, así como de homocisteína, se incrementan en la muestra de pacientes con EA, en particular, en la fase precoz de la enfermedad, como en la sangre del grupo de pacientes con EA, en comparación con la concentración o cantidad de dicho biomarcador en un grupo de seres humanos no enfermos usados como sujetos de control. Con EA establecida (avanzada), se incrementan los biomarcadores IL-18 y VEGF.

Además, FNDC, IGF-1, TGF-beta 1 y VEGF están presentes en una cantidad más baja en la muestra de grupos de pacientes con EA, en particular, en la fase precoz de la enfermedad, en comparación con la cantidad en la muestra de un grupo de seres humanos no enfermos. Con la EA establecida (avanzada), se incrementan los biomarcadores FNDC, IGF-1, TGF-beta 1 y MCP-1.

Es decir, mientras que para el único biomarcador un cambio de la cantidad o concentración en comparación con el grupo de control o un grupo de referencia está en el intervalo de hasta un 70 % en el grupo con EA, la combinación de los biomarcadores como se define en el presente documento, a saber, determinar el cambio o alteración de la concentración o cantidad de al menos cinco biomarcadores, permite incrementar la precisión del diagnóstico o la determinación del riesgo de desarrollar la EA en un 90 % o más.

Por ejemplo, el FNDC se reduce en casi un 70 % en la sangre de pacientes con EA en relación con los sujetos de control. La citocina muestra una alta relación significativa con la edad.

La tabla 1 muestra la proteína biomarcadora y la cantidad medida de dicha proteína en muestras de suero del grupo de control sano normal y del grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer incipiente.

Tabla 1

Proteína biomarcadora	Grupo de control sano normal	Grupo de pacientes con enfermedad de Alzheimer	Incremento o disminución en la EA
FNDC	21,3 ng/ml	2-10 ng/ml	disminuido
IGF-1	70-200 ng/ml	60 ng/ml	disminuido
VEGF	309 pg/ml	210 pg/ml	disminuido
TGF-beta1	370 pg/ml	10-80 pg/ml	disminuido
MCP-1	160 pg/ml	400-700 pg/ml	incrementada
IL-18	100-200 pg/ml	320 pg/ml	incrementada

La medición de la concentración o cantidad de acuerdo con el biomarcador de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo mediante procedimientos conocidos. Por ejemplo, en el caso de determinar la concentración o cantidad en la concentración de proteínas, se lleva a cabo un inmunoensayo, por ejemplo, ELISA, RIA, radioinmunodifusión, inmunolectrotransferencia, inmunodifusión de Ouchterlony, inmunolectroforesis en cohete, inmunohistotinción, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de fijación del complemento, FACS, y ensayo con micromatrices proteínicas, así como ensayo de inmunofluorescencia, inmunoensayo múltiple, ensayo por líneas o inmunotransferencia por puntos.

En un modo de realización preferente, se lleva a cabo un ELISA. Los ejemplos típicos de medios de medición para medir la concentración o cantidad del biomarcador incluyen anticuerpos específicos de proteína. Los anticuerpos moleculares específicos son conocidos en la técnica o se pueden preparar fácilmente en base a los procedimientos descritos en la técnica. Medir la concentración de proteínas significa medir la cantidad de proteínas usando medios de medición que se unen específicamente a las proteínas, tales como un anticuerpo. Dicho procedimiento de medición se puede definir por uno cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Típicamente, dicho procedimiento incluye la formación de un complejo antígeno-anticuerpo y la determinación del complejo mediante procedimientos conocidos.

La cantidad de formación de un complejo antígeno-anticuerpo se puede determinar midiendo el tamaño de la señal de un marcador de detección o el marcador de expresión de una proteína biomarcadora. Es decir, se puede marcar el anticuerpo con un marcador de detección conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse al grupo de una enzima, un marcador de fluorescencia, un ligando, un material luminiscente, una micropartícula y una molécula de oxidorreducción. Los ejemplos de la enzima disponible como marcador de detección incluyen, pero no se limitan a, D-glucosidasa, ureasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa, hexocinasa, GDPasa, RNasa, luciferasa, fosfofructocinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y fosfoenolpiruvato descarboxilasa. Los ejemplos de marcadores de fluorescencia incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina y fluorescamina. Los ejemplos de ligando incluyen, pero no se limitan a, biotina, avidina y derivados de biotina y de avidina.

Como se describe anteriormente, para medir las concentraciones de las clases de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en los biomarcadores proteicos mencionados, la presente invención proporciona una composición que comprende un agente específico para las proteínas biomarcadoras, tal como un anticuerpo, preferentemente en forma de un anticuerpo monoclonal, anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de comparar la concentración o cantidad del biomarcador de la EA medido en dicha muestra biológica con una concentración o cantidad de referencia del biomarcador. El marcador de referencia es

a) un marcador promedio obtenido de una población que no padece la EA; y/o

b) una concentración media o intermedia de un grupo de individuos, incluyendo pacientes con EA.

En particular, se determina si la concentración o cantidad del biomarcador está por encima o por debajo, respectivamente, de una concentración de valor de corte.

Por ejemplo, las tablas 3 y 4 proporcionan una concentración de valor de corte cuando se mide la concentración o cantidad de la proteína biomarcadora en una muestra de sangre, como una muestra de suero sanguíneo en el caso del diagnóstico precoz (tabla 3).

Tabla 3

Proteína biomarcadora	Incremento o disminución en la EA	Valor de corte con respecto a la patogenia de la EA
FNDC	disminuido	< 10 ng/ml
IGF-1	disminuido	< 60 ng/ml
VEGF	disminuido	< 250 pg/ml
TGF-beta1	disminuido	< 300 pg/ml
MCP-1	incrementada	> 300 pg/ml
IL-18	incrementada	> 200 pg/ml

5 Por ejemplo, para FNDC, la cantidad disminuye al menos un 50 %, por ejemplo, de 20 ng/ml en un grupo de control sano normal a aproximadamente 10 ng/ml o por debajo en el grupo de pacientes con EA. Para IGF-1, el cambio es aproximadamente una disminución de más de un 40 %, por ejemplo, de por encima de 70 ng/ml a 60 ng/ml o por debajo. VEGF, la disminución es de aproximadamente un 18 % o más, por ejemplo, de 309 pg/ml a 250 pg/ml o por debajo. Para TGF-beta 1, la disminución es de al menos un 20 %, por ejemplo, de 370 pg/ml a 300 pg/ml o por debajo. Para MCP-1, el incremento es de un 40 % o más, por ejemplo, de 160 pg/ml a 300 pg/ml o más. Para IL-18, el incremento es de al menos un 15 %, por ejemplo, hasta 200 pg/ml o más. Además, se puede determinar la concentración o cantidad de homocisteína para verificar o confirmar los resultados obtenidos usando el biomarcador como se define en el presente documento.

10 Además, la tabla 4 muestra la concentración de valor de corte en el caso de pacientes con EA avanzada.

15

Tabla 4

Biomarcador	Incremento o disminución en la EA	Valor de corte con respecto a la patogenia de la EA
FNDC	disminuido	< 20 ng/ml
IGF-1	disminuido	< 90 ng/ml
VEGF	incrementado	> 400 ng/ml
TGF- beta 1	disminuido	< 50 pg/ml
MCP-1	disminuida	< 100 pg/ml
IL - 18	incrementada	> 300 pg/ml

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un kit que comprende medios de detección para al menos cinco de los biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) para diagnosticar o determinar el riesgo de desarrollo de la EA, como así para determinar la presencia de la EA avanzada, opcionalmente, que contiene instrucciones sobre cómo usar el kit en un procedimiento de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la presente invención para diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollo de la EA, así como para determinar la presencia de la EA avanzada.

25 El kit de la invención para su uso en la detección de biomarcadores de diagnóstico comprende anticuerpos específicos para las proteínas anteriores y puede comprender además un anticuerpo secundario conjugado con un marcador, por ejemplo, una enzima, útil para una reacción cromogénica con un sustrato; una solución de sustrato cromogénico para inducir la reacción cromogénica con el marcador; una solución de lavado; y una solución de detección de la reacción enzimática. Puede contener además microplacas adecuadas, soluciones patrón y protocolos. En lugar de un anticuerpo secundario conjugado con un marcador, los propios anticuerpos (primarios) específicos para los biomarcadores descritos anteriormente y a continuación se pueden conjugar con un marcador.

30 El kit de la invención para su uso en la detección de biomarcadores de diagnóstico puede diagnosticar la enfermedad de Alzheimer analizando cuantitativa o cualitativamente un antígeno a través de una reacción de unión antígeno-anticuerpo, y se puede medir la reacción de unión antígeno-anticuerpo mediante un procedimiento convencional, tal como un ensayo ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción) o de tipo sándwich. Por ejemplo, se puede proporcionar el kit para detectar biomarcadores de diagnóstico como se describe anteriormente o a continuación de tal manera que se lleve a cabo un ELISA para la reacción con una proteína anticuerpo monoclonal recombinante usando una superficie de placa de microvaloración de 96 pocillos recubierta con un analito y un control. Como un receptor de la reacción de

unión antígeno-anticuerpo, se puede usar una placa de pocillos de una resina de polivinilo o poliestireno, una membrana de nitrocelulosa o un portaobjetos.

5 Se puede usar preferentemente un marcador convencional que lleve a cabo una reacción cromogénica, tal como HRP (peroxidasa de rábano picante), fosfatasa alcalina, oro coloidal, un marcador fluorescente, tal como fluoresceína, FITC (poli-L-lisina-isotiocianato de fluoresceína) o RITC (rodamina-isocianato B) o un colorante como marcador del conjugado de anticuerpo secundario o como marcador del conjugado de anticuerpo primario.

10 El sustrato que produce la reacción cromogénica se elige dependiendo del marcador. Los sustratos preferentes en particular son los que se van a usar con una peroxidasa, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, y son, por ejemplo, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) u OPD (o-fenilendiamina). Preferentemente, se prepara el sustrato cromogénico en un estado disuelto en una solución tampón (por ejemplo, acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5). La HRP (peroxidasa de rábano picante) usada como marcador del conjugado de anticuerpo descompone el sustrato cromogénico, tal como TMB, para producir un precipitado cromogénico en presencia de peróxido de hidrógeno. Al comprobar a simple vista el grado de precipitación del precipitado cromogénico, se detecta la presencia o ausencia del biomarcador proteico. El color de TMB se mide a 450 nm, el color de ABTS a 420 nm y el color de OPD a 492 nm. Se puede usar preferentemente una solución de ácido sulfúrico (H₂SO₄) como la solución de detección de la enzima peroxidasa.

20 De forma alternativa, se pueden usar fosfatasa alcalina como marcador enzimático y PNPP (para-nitrofenilfosfato) como sustrato cromogénico. El color amarillo del nitrofenol se puede medir a 405 nm. Esta reacción se detiene añadiendo hidróxido de sodio.

25 La solución de lavado comprende preferentemente una solución de tampón fosfato, NaCl y Tween 20, y, más preferentemente, es una solución tampón que comprende solución de tampón fosfato 0,02 M, NaCl 0,13 M y Tween 20 al 0,05 %. Después de que se realiza la reacción de unión antígeno-anticuerpo para formar un complejo antígeno-anticuerpo, el complejo antígeno-anticuerpo se hace reaccionar con el conjugado de anticuerpo secundario y, a continuación, se lava de 3 a 6 veces añadiendo una cantidad apropiada de solución de lavado al reactor.

30 También se consideran otros procedimientos de determinación de la cantidad de biomarcadores, en particular, RIA (radioinmunoensayo), inmunolectrotransferencia en gel de poliacrilamida, inmunotransferencia y tinción inmunohistoquímica. Los kits se adaptan al procedimiento particular considerado para la determinación cuantitativa de los biomarcadores, como es bien conocido en la técnica.

35 En un modo de realización preferente de la presente invención, se mide la cantidad de una proteína biomarcadora mediante ELISA con peroxidasa de rábano picante y un sustrato cromogénico seleccionado de TMB, ABTS y OPD.

40 Como se identifica anteriormente, los medios de detección son, por ejemplo, anticuerpos en el caso de determinar la concentración o cantidad del biomarcador en la concentración de proteínas.

Por ejemplo, el kit es un ELISA u otro inmunoensayo adecuado conocido por el experto en la técnica.

45 Además, la presente invención proporciona el uso de un conjunto, que comprende medios para detectar al menos cuatro de los biomarcadores como se define en el presente documento, por ejemplo, detectar al menos cinco de dichos biomarcadores, en particular, al menos seis de los biomarcadores como se define en el presente documento.

50 El uso de un kit o un conjunto de acuerdo con la presente invención es útil, en particular, para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización del kit o conjunto, los medios de detección son anticuerpos, como anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a los biomarcadores como se define en el presente documento.

Por ejemplo, un conjunto para su uso de acuerdo con la presente invención puede ser una placa de microvaloración.

55 Dicha placa de microvaloración puede permitir determinar la concentración o cantidad del biomarcador conjuntamente con la determinación de la concentración o cantidad del control positivo, un control negativo y/o un control de valor de corte. De ahí que dicho conjunto permita determinar un incremento o disminución de dicho biomarcador, en particular, un incremento o disminución de dicho biomarcador por debajo o por encima de una concentración de valor de corte, lo que permite determinar o diagnosticar fácilmente la presencia de o el riesgo de desarrollo de la EA, así como determinar la presencia de la EA avanzada en base a la concentración o cantidad de dicho biomarcador. En la figura 60 1 se proporciona un esquema que muestra una placa de microvaloración adecuada. Como se identifica, se analizan las muestras de pacientes 1 a 5 con seis analitos, a saber, los analitos 1 a 6 que se seleccionan de los siete biomarcadores de acuerdo con la presente invención. Además, se proporciona un control positivo y un control negativo. Además, para determinar si la concentración o cantidad del biomarcador en la muestra es adecuada para permitir la determinación o diagnóstico de la EA, se proporciona un control de valor de corte. De ahí que este control en el mismo conjunto permita determinar fácilmente si la concentración o cantidad medida del biomarcador de la EA es adecuada o no para el diagnóstico. Esto es valioso, en particular, para un procedimiento o sistema implementado por ordenador.

Es decir, la presente invención se refiere en otro aspecto al uso *in vitro* de al menos cinco, por ejemplo, seis o todos los biomarcadores como se define en el presente documento para su uso en el diagnóstico, evaluación del riesgo o control del tratamiento de la enfermedad de Alzheimer determinando una concentración o cantidad de dicho biomarcador en una muestra biológica de un individuo y determinando un incremento o disminución de dichos al menos cinco, como seis o todos de dichos biomarcadores en comparación con una concentración o cantidad de referencia de dicho biomarcador, por lo que la concentración de referencia es una concentración promedio obtenida de una población que no está afectada con EA; y/o concentración intermedia de un grupo de individuos, incluyendo pacientes con EA, por lo que se usa una concentración de valor de corte de dicho biomarcador individual para permitir, en consecuencia, la identificación de un incremento o disminución. En un modo de realización de la presente invención, se refleja la concentración de valor de corte mediante un control de valor de corte adecuado presente como un control en el procedimiento de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, como se describe en un conjunto de acuerdo con la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento implementado por ordenador de acuerdo con las reivindicaciones de diagnóstico o determinación del riesgo de desarrollar la EA que comprende las etapas de

a) obtener datos de la concentración medida o cantidad medida de al menos cinco de los biomarcadores de la EA de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra biológica de un sujeto; computar los datos de la etapa a) comparando la concentración o cantidad del biomarcador de la EA en dicha muestra con un valor de corte obtenido de una base de datos u obtenido como una concentración o cantidad medida de un control de valor de corte;

b) analizar e identificar en el biomarcador de la EA qué concentración o cantidad se incrementa o disminuye por encima o por debajo de una concentración de valor de corte.

Opcionalmente, el procedimiento comprende además la etapa de presentar el resultado para cada uno de los biomarcadores o, simplemente, de un diagnóstico positivo o negativo o evaluación del riesgo en una unidad de salida, por ejemplo, en forma de una presentación coloreada y resaltada.

Por ejemplo, el análisis se lleva a cabo mediante el análisis de componentes principales. El análisis puede estar acompañado de un análisis de errores.

Por último, la presente invención se refiere a un medio informático o producto de programa informático que tiene instrucciones ejecutables por ordenador para realizar las etapas del procedimiento de acuerdo con la presente invención.

En algunos modos de realización, la comparación del valor medido y el valor de referencia incluye calcular una diferencia múltiplo entre el valor medido y el valor de referencia para permitir la identificación de si, en consecuencia, el valor medido está por encima o por debajo de la concentración de valor de corte.

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de proteínas cuantitativo de la sangre extraída de pacientes con encefalopatía degenerativa y de sujetos sanos normales

Se extraen muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Alzheimer y de un grupo de control de sujetos humanos sanos con el consentimiento de los pacientes y siguiendo las directrices éticas aplicables.

Se usa un tubo separador de suero y se deja que la muestra coagule durante 2 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C antes de su centrifugación durante 20 minutos a aproximadamente 1000 x g. El suero recién preparado inmediatamente se somete a ensayo o las muestras se almacenan en alícuotas a -20 o -80 °C. Se deberían evitar los ciclos de congelación/descongelación repetidos.

Se realizan ELISA (ELISA de tipo sándwich para detectar el antígeno en las muestras) usando un anticuerpo específico para el antígeno de las muestras obtenidas de la siguiente proteína marcadora, FNDC, IGF-1, TGF-beta 1, VEGF, MCP-1 e IL-18.

Ejemplo 2: ELISA para FNDC, IGF-1, TGF-beta 1, VEGF, IL-18 y MCP-1

Se prepara un diluyente patrón de 1,0 ml (1 µg/ml) en PBS, pH 7,4, de cada antígeno. Se mantiene durante 10 min a temperatura ambiente y se agita suavemente.

Los pocillos recubiertos previamente con anticuerpos para IL-18, TGF-beta 1, VEGF, FNDC, MCP-1 e IGF-1, respectivamente, se adquieren de B&D Biosciences, Bachem, Novagen, Invitrogen o GenScript u otros.

Se preparan 100 µl de cada 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16, 1:32 y 1:64 diluciones de las soluciones patrón de antígeno mencionadas de 1 µg/ml y se añaden a un pocillo. cada uno (7 pozos). El 8.º pocillo se reserva para un blanco. Los pocillos se sellan con el sellador de placas y se incuban durante 2 h a temperatura ambiente con agitación continua (700 rpm). Después de la incubación, la placa se aspira, se lava tres veces con 400 µl de solución de lavado y se aspira de nuevo. A continuación, se añaden 100 µl del anticuerpo conjugado anti-HRP respectivo a cada pocillo de la placa y se incuba durante 2 h a temperatura ambiente con agitación a 700 rpm. Se aspiran los contenidos de cada pocillo. La placa se lava de nuevo tres veces antes de la adición de 200 µl de solución de sustrato OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina). La solución de sustrato OPD se prepara añadiendo dos comprimidos de OPD de 10 mg al diluyente para OPD suministrado, seguido de la adición de 50 µl de H₂O₂ al 3 %. A continuación, se incuba la placa durante 20-25 minutos en la oscuridad mientras se desarrolla el color. El desarrollo del color se detiene con la adición de 100 µl de la solución de detección (ácido sulfúrico 3 N). La placa se lee en un lector de microplacas a 492 nm.

En lugar de OPD, se pueden usar ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) o DAB (3,3'-diaminobencidina) como sustratos cromogénicos.

De forma alternativa, se puede usar fosfatasa alcalina como enzima y PNPP (para-nitrofenilfosfato). El color amarillo del nitrofenol se puede medir a 405 nm después de 15 minutos a temperatura ambiente. Esta reacción se detiene añadiendo un volumen igual de NaOH 0,75 M.

Se crea una curva de calibración a partir de los patrones en la placa y se usa para calcular la concentración del valor de antígenos en las muestras.

Ejemplo 3: Muestras de prueba de pacientes con enfermedad de Alzheimer y sujetos sanos normales.

Se recubren previamente placas de inmunoensayo Stripwell de unión alta de 96 pocillos (Corning Life Sciences, NY o BD Bioscience) con los anticuerpos de cada IL-18, TGF-beta 1, VEGF, FNDC, MCP-1 e IGF-1 a una concentración de 10 µg/ml (20 µl de solución diluida 1:100 de los anticuerpos específicos adquiridos de B&D Biosciences, Genscript, Invitrogen, Genzyme, IBL internacional, Innogenetics o Calbiochem) y se bloquean. Se añaden 100 µl de las muestras de plasma diluidas con PBS en la proporción de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16; y 1:64 a cada pocillo recubierto previamente. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 2 h con rotación a 700 rpm. Los pocillos se bloquean durante la noche con seroalbúmina bovina al 3 % en PBS a 4 °C. Después de tres lavados con PBS/Tween 20 al 0,1 %, se aplican a cada pocillo 100 µl de anticuerpos específicos de FNDC, IGF-1, TGF-beta 1, VEGF, IL-18 y MCP-1 y se incuba durante la noche a 4 °C. Se añaden 50 µl de anticuerpo secundario unido a HRP, que es específico para el anticuerpo primario, y se incuba a temperatura ambiente durante 2 h con rotación a 700 rpm. La placa se lava tres veces con PBS 0,1 M (tampón bicarbonato de sodio, Sigma, pH 9,6) para eliminar los conjugados de enzimas y anticuerpos sin unión. Se añaden 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), que, mediante la enzima, adquiere un color amarillo en presencia de una solución al 3 % de H₂O₂ en metanol. La reacción se detiene con la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 3 N. La absorbancia de los pocillos de la placa se mide a 450 nm para determinar la presencia y cantidad de antígeno. La correlación de la absorbancia y la concentración son las curvas de calibración (de referencia) para las muestras de prueba.

Tabla 5: muestra la combinación de los biomarcadores como se define en el presente documento, por lo que la numeración es como sigue: 1=FNDC, 2 = IGF-1, 3 = VEGF, 4=TGF-beta 1, 5 = MCP-1, 6 = IL-18

Símbolo	Combinación de analitos
A	1 & 2
B	1 y 3
C	1 y 4
D	1 y 5
E	1 y 6
F	2 y 3
G	2 y 4
H	2 y 5
I	2 y 6
J	1 y 2 y 3
K	1 y 2 y 4
L	1 y 2 y 5
M	1 y 2 y 6

Símbolo	Combinación de analitos
N	1 y 2 y 3 y 5
O	1 y 2 y 4 y 5
P	1 y 2 y 3 y 4 y 5

Ejemplo 4: Determinación de la homocisteína

5 La homocisteína se mide mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con detección de fluorescencia siguiendo el procedimiento de Araki A. y Sako Y., J. Chromatogr. 422:43-52, 1987.

Resultados:

10 En la figura 2 se muestra la pertinencia de combinar al menos 4 de entre los 6 biomarcadores como se define en el presente documento sobre la especificidad. Como se demuestra, se obtiene una especificidad de al menos un 90 % solo cuando se combinan al menos 4 marcadores que, sin embargo, son suficientes para obtener una especificidad de al menos un 90 %.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA) en un sujeto, que comprende

a) medir la concentración o cantidad de biomarcador de la EA en el que el biomarcador está en forma de una proteína o péptido en una muestra biológica de un sujeto; y

b) determinar o diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollar la EA con especificidad alta en base a la concentración o cantidad de dicho biomarcador,

por lo que los biomarcadores de la EA son al menos cinco biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y por lo que un incremento de IL-18 y MCP-1 y la disminución de FNDC, IGF-1, VEGF y TGF-beta 1 en comparación con una concentración o cantidad de referencia de dicho biomarcador es indicativo de la presencia o riesgo de desarrollo de la EA.

2. Un procedimiento para determinar el estado de la enfermedad de Alzheimer (EA) en un sujeto, que comprende

a) medir la concentración o cantidad de biomarcador de la EA en una muestra biológica en el que el biomarcador está en forma de una proteína o péptido de un sujeto; y

b) determinar la presencia o el estado de la EA con especificidad alta en base a la concentración o cantidad de dicho biomarcador,

por lo que los biomarcadores de la EA son al menos cinco biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y por lo que un incremento de IL-18 y VEGF y la disminución de FNDC, IGF-1, MCP-1 y TGF-beta 1 en comparación con una concentración o cantidad de referencia de dicho biomarcador es indicativo de la presencia de la EA avanzada.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 a 2, en el que se mide la medición de la concentración o cantidad de todos los biomarcadores como se define en la reivindicación 1.

4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se mide la combinación de los biomarcadores

a) FNDC, IGF-1, VEGF, IL-18 y MCP-1;

b) FNDC, VEGF, TGF-beta 1, IL-18 y MCP-1;

c) IGF-1, VEGF, TGF-beta 1, IL-18, MCP-1 o

d) FNDC, IGF-1, VEGF, TGF-beta 1, MCP-1.

5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la especificidad del diagnóstico o predicción del riesgo de EA, así como la determinación de la presencia de la EA avanzada, tiene una precisión de al menos un 90 %.

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra biológica se selecciona de tejido o líquido corporal, incluyendo sangre, y/o está **caracterizado por que** la medición se realiza usando un inmunoensayo.

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración o cantidad del biomarcador de la EA en dicha muestra se compara con una concentración o cantidad de referencia de dicho biomarcador, por lo que dicha concentración de referencia es

a) una concentración promedio obtenida de una población que no padece la EA; y/o

b) una concentración media o intermedia de un grupo de individuos, incluyendo pacientes con EA y

por lo que por encima o por debajo de una cantidad o concentración de valor de corte relativa o absoluta predeterminada, respectivamente, la concentración o cantidad de dicho biomarcador es indicativa de la presencia o riesgo de desarrollo de la EA o de la presencia de la EA avanzada.

- 5 **8.** El uso de un kit que comprende medios de detección para al menos cinco de los biomarcadores seleccionados de factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC), factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1), factor de crecimiento y transformación beta 1 (TGF-beta 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 18 (IL-18) y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), en el diagnóstico o determinación del riesgo de desarrollo de la EA, o para determinar la presencia de la EA avanzada, en un sujeto, opcionalmente, que contiene instrucciones sobre cómo usar el kit en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para diagnosticar la presencia o el riesgo de desarrollo de la EA, así como para determinar la presencia de la EA avanzada.
- 10 **9.** Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 8 en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15 **10.** El uso de un conjunto que comprende medios para detectar al menos cinco de los biomarcadores como se define en la reivindicación 1, en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 11.** El uso de un kit o conjunto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, por lo que dichos medios de detección son anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, dirigidos específicamente al biomarcador de la EA como se define en la reivindicación 1.
- 20 **12.** El uso *in vitro* de una combinación de al menos cinco de los biomarcadores de la EA como se define en la reivindicación 1 en el diagnóstico, evaluación del riesgo o control del tratamiento de la EA determinando la concentración o cantidad de dicho biomarcador en una muestra biológica de un individuo y determinando un incremento o disminución de al menos cinco de dichos biomarcadores en comparación con la concentración o cantidades de referencia de dicho biomarcador de la EA, por lo que la concentración de referencia es
- 25 a) una concentración promedio obtenida de una población que no padece la EA; y/o
- b) una concentración media o intermedia de un grupo de individuos, incluyendo pacientes con EA, y por encima o por debajo de una cantidad o concentración de valor de corte relativa o absoluta predeterminada, respectivamente, la concentración o cantidad de dicho biomarcador es indicativa de la presencia o riesgo de desarrollo de la EA.
- 30 **13.** Un procedimiento implementado por ordenador de diagnóstico o determinación del riesgo de desarrollar la EA que comprende las etapas de
- 35 a) obtener datos de la concentración medida o cantidad medida de al menos cinco de los biomarcadores de la EA de acuerdo con la reivindicación 1 en una muestra biológica de un sujeto;
- 40 b) computar los datos de la etapa a) comparando la concentración o cantidad del biomarcador de la EA en dicha muestra con un valor de corte obtenido de una base de datos u obtenido como una concentración o cantidad medida de un control de valor de corte.
- 45 c) analizar e identificar en el biomarcador de la EA qué concentración o cantidad se incrementa o disminuye por encima o por debajo de una concentración de valor de corte.
- 14.** El procedimiento implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además la etapa de
- 50 d) mostrar los datos de análisis e identificar el marcador de la EA en una unidad de salida, en particular, mostrar los resultados del diagnóstico o del riesgo de EA.
- 15.** Medio legible por ordenador o producto de programa informático que tiene instrucciones ejecutables por ordenador para realizar las etapas como se identifica en las reivindicaciones 13 a 14.

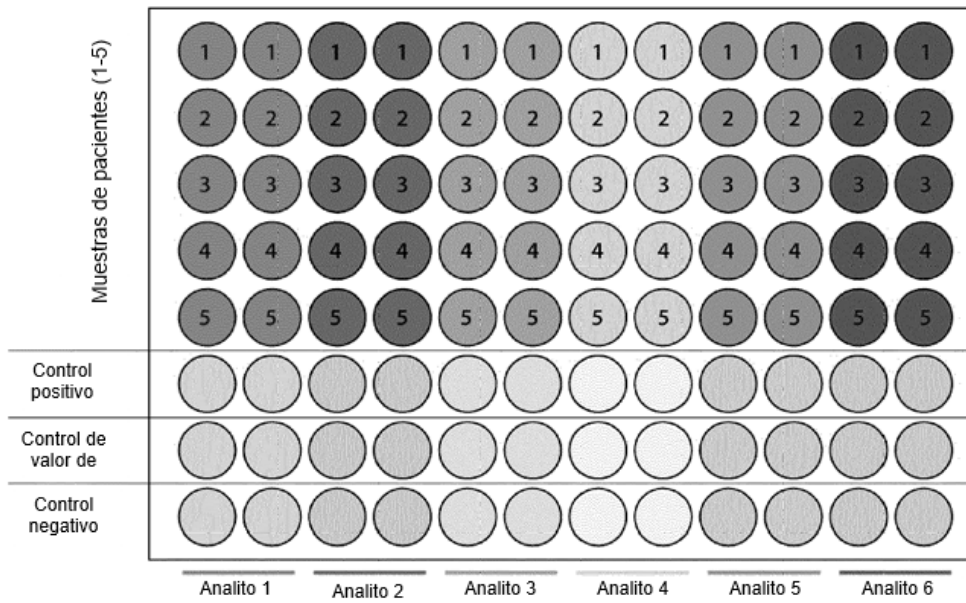


Figura 1

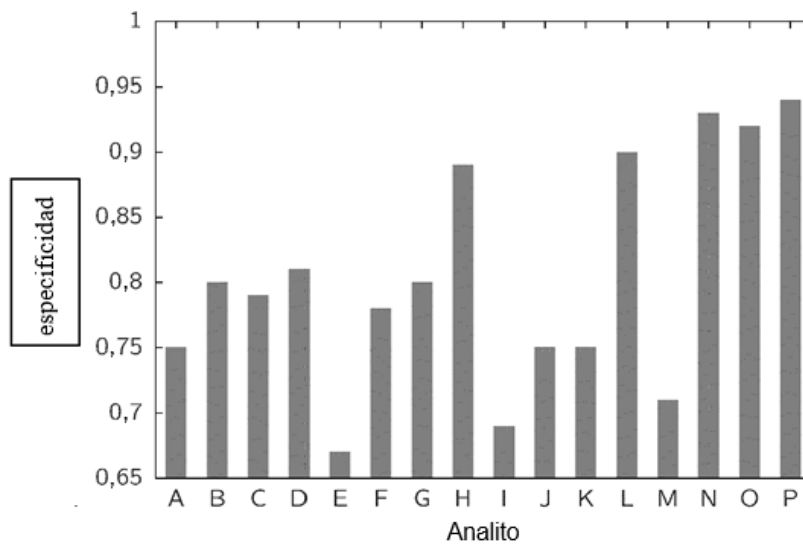


Figura 2