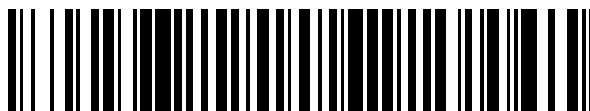


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 268**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2016 PCT/EP2016/076457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2016 E 16794966 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3274725**

54 Título: **Métodos para la detección de apolipoproteínas**

30 Prioridad:

02.11.2015 EP 15382537

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

**BIOCROSS, S.L. (33.3%)
Avda. Francisco Vallés, 8
47151 Boecillo, Valladolid, ES;
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (33.3%) y
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS CIBERNED (33.3%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ MARTÍN, ANDRÉS;
CALERO LARA, MIGUEL;
CALERO RUEDA, OLGA y
GARCÍA ALBERT, LUIS**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

ES 2 728 268 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 para la detección de apolipoproteínas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos para la detección y cuantificación de apolipoproteínas e isoformas de las mismas en una muestra, así como a métodos de predicción para estimar la probabilidad de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas basándose en los niveles de apolipoproteína tal como se determina mediante los métodos de detección de la invención.

Antecedentes de la técnica

La apolipoproteína E (apoE) es una glicoproteína de 34 kDa implicada en el metabolismo de lípidos. El gen *APOE* humano que codifica para esta proteína es polimórfico y está ubicado en el cromosoma 19. Existen tres alelos codominantes comunes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) que codifican para tres isoformas de proteína apoE: E2, E3 y E4. Estas isoformas difieren en los residuos de aminoácido 112 y 158. La isoforma E2 tiene residuos de cisteína en ambos sitios, E4 tiene residuos de arginina en ambos sitios, mientras que E3, la forma más común, tiene una cisteína en la posición 112 y una arginina en la posición 158. Estas diferencias tienen efectos profundos sobre las funciones biológicas de apoE. La actividad de unión a lípidos de estas isoformas es diferente: E2 y E3 se unen de manera preferente a lipoproteínas de alta densidad (HDL), mientras que E4 prefiere lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Estas diferencias bioquímicas pueden ser responsables de la asociación de las isoformas con diferentes procesos patológicos. La isoforma E4 está asociada con mayores niveles de colesterol y un riesgo aumentado de cardiopatía coronaria y enfermedad de Alzheimer. En cambio, la isoforma E2 muestra un efecto protector contra la enfermedad de Alzheimer, pero está asociada con hiperlipoproteinemia de tipo III familiar. Por tanto, el interés en genotipos de *APOE* o isoformas de apoE es alto para la investigación epidemiológica, estratificación de pacientes e identificación de aquellos con riesgo aumentado de para ensayos clínicos y prevención.

Varios métodos se usan comúnmente para genotipar los tres haplotipos de *APOE* principales. Los métodos usados de manera más frecuente son: PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), electroforesis capilar, PCR más secuenciación o espectrometría de masas, ARMS-PCR (sistema de mutación refractario a la amplificación-PCR) y SSP-PCR (cebador específico de secuencia simple-PCR), detección por PCR en tiempo real mediante curvas de fusión de fluorescencia, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), RT-PCR específica de alelo y sondas TaqMan®. Sin embargo, todos estos métodos basados en el gen *APOE* requieren un consentimiento informado para la extracción de ADN y análisis de la información genética, y no pueden implementarse fácilmente en la rutina de análisis clínicos.

Principalmente para propósitos de investigación, varios métodos bioquímicos (no genéticos) alternativos están en uso para la caracterización sensible de isoformas de apoE. Los más comúnmente usados son enfoque isoeléctrico (IEF) y ELISA de tipo sándwich, que se basan en la caracterización de apoE a partir de fluidos biológicos tales como plasma o LCR. Para el IEF analítico de apoE, el isoelectroenfoque de proteínas en gradientes de pH inmovilizados va seguido por la inmunodetección de las isoformas separadas usando un anticuerpo anti-apoE. El patrón de bandas de apoE específico permite la detección de las diferentes isoformas de apoE presentes en la muestra. Esta técnica tiene la ventaja de que podría detectar variantes de apoE raras, distintas de las isoformas apoE E2, E3 y E4; sin embargo, es técnicamente exigente y requiere mucho tiempo.

Las técnicas de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) usan anticuerpos para capturar la proteína diana. Puede usarse ELISA de tipo sándwich para verificar la presencia de la isoforma de apoE E4, y se basa en el uso de dos anticuerpos (anticuerpos indicador y de captura), de los cuales uno ellos tiene que ser específico para la isoforma E4. Existen varios kits de ELISA comercialmente disponibles para la detección de apoE E4 (por ejemplo kit de ELISA de ApoE4/pan-ApoE, MBL n.º 7635); sin embargo, debido probablemente a las limitaciones técnicas inherentes, esta metodología no se ha implementado en entornos clínicos de rutina.

Se han descrito en la técnica métodos para predecir el desarrollo de enfermedades basándose en los niveles de apolipoproteína. El documento US5945289A se refiere a métodos para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar cáncer de próstata basándose en el genotipado de alelos de ApoE por medio de PCR.

El documento WO 00/55635 divulga métodos y kits para la detección de apoA y apoB en saliva.

El documento WO2011/109246 divulga anticuerpos específicos de apolipoproteína E y métodos de uso de estos.

Sin embargo, aún existe la necesidad en el estado de la técnica de desarrollar métodos fiables y precisos para la detección de apolipoproteínas y la determinación de isoformas de apolipoproteínas que permitan una determinación rápida y fiable de apolipoproteínas en una muestra. Dichos métodos serían de interés para predecir el desarrollo de alguna enfermedad relacionada con la presencia o ausencia de apolipoproteínas, o isoformas particulares de las mismas.

Breve resumen de la invención

5 Los autores de la presente invención han desarrollado una metodología para la detección, cuantificación y análisis de apolipoproteínas e isoformas de las mismas. Esta metodología se basa en las propiedades de unión particulares de apolipoproteínas a una superficie, particularmente una superficie de poliestireno, que evitan la necesidad de usar un anticuerpo de captura o de procedimientos de aislamiento previos para la detección o cuantificación. Los autores han mostrado que las apolipoproteínas, particularmente apoE, se capturan específicamente mediante superficies de poliestireno (incluyendo placas de ELISA, perlas Luminex o perlas turbidimétricas). Puede detectarse una isoforma particular de apolipoproteína, tal como apoE E4, una vez que se une a la superficie, mediante un anticuerpo anti-apoE4, de modo que se logra la detección y cuantificación de la isoforma apoE4 en una muestra. Esta cuantificación puede correlacionarse con la presencia del genotipo *APOE* ϵ 4, o bien en heterocigosidad (ϵ 2/ ϵ 4, ϵ 3/ ϵ 4) o bien en homocigosidad (ϵ 4/ ϵ 4). Teniendo en cuenta que estas propiedades de unión son comunes a otras apolipoproteínas, esta metodología puede aplicarse también a otras apolipoproteínas, incluyendo apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII y apoJ (clusterina).

20 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de una apolipoproteína seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ en una muestra que comprende:

(i) poner en contacto la muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la interacción electrostática y/o hidrófoba directa entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno,

25 (ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con un anticuerpo específico para dicha apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la apolipoproteína, y

(iii) detectar los complejos formados en la etapa (ii)

30 en el que la superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto de la muestra con un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: albúmina, caseína, gelatina o un detergente.

35 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la cantidad relativa de una isoforma de una apolipoproteína dada seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ con respecto al contenido total de dicha apolipoproteína en una muestra que comprende:

(i) poner en contacto la muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la interacción electrostática y/o hidrófoba directa entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno

40 (ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con un primer anticuerpo específico para dicha isoforma de apolipoproteína y con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína presente en la muestra, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína,

(iii) detectar los complejos primero y segundo formados en la etapa (ii) y

50 (iv) determinar las cantidades relativas de la isoforma con respecto al contenido de apolipoproteína total basándose en los niveles del primer y segundo complejo obtenidos en la etapa (iii)

en el que la superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto de la muestra con un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: albúmina, caseína, gelatina o detergente.

55 Se describe en el presente documento un método para determinar la dosificación alélica de haplotipos asociados con la expresión de una isoforma de apolipoproteína de una apolipoproteína seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ (clusterina) en un sujeto que comprende,

60 (i) poner en contacto una muestra que contiene proteínas de dicho sujeto derivada de un tejido en el que se expresa la isoforma de apolipoproteína con una superficie de poliestireno o policarbonato en condiciones adecuadas para la unión de la isoforma de apolipoproteína a la superficie, en el que la superficie no contiene anticuerpos específicos para dicha isoforma de apolipoproteína unidos a la misma,

65 (ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína, formada en la etapa (i) con al menos un anticuerpo específico para la isoforma de apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína,

(iii) determinar la dosificación alélica de la isoforma de apolipoproteína correlacionando la cantidad de complejo formado en la etapa (ii) con el número de alelos que codifican para dicha variante genética

5 en el que la superficie de poliestireno o la superficie de policarbonato no se trata antes del contacto con la muestra ni se bloquea con albúmina antes del contacto con la muestra.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad neurodegenerativa que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de isoforma de apoE E4 mediante un método según el primer aspecto de la invención, en el que si los niveles de apoE E4 están por encima de un valor de referencia, entonces es indicativo de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa.

15 Se describe en el presente documento un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad neurodegenerativa que comprende determinar en dicho sujeto la dosificación alélica del haplotipo que codifica para la isoforma apoE4 mediante un método según esta divulgación, en el que la presencia de uno o dos alelos de apoE4 en el genoma del sujeto es indicativa de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa, y en el que la no presencia de alelos de apoE4 en el genoma del sujeto es indicativa de que el sujeto tiene una baja probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa.

20 Se describe en el presente documento un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad cardiovascular que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de una isoforma de apolipoproteína mediante un método según esta divulgación, en el que si dichos niveles de isoforma de apolipoproteína están por encima de un valor de referencia, esto es indicativo de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular.

25 Se describe en el presente documento un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad cardiovascular que comprende determinar en dicho sujeto la dosificación alélica del haplotipo que codifica para una isoforma de apolipoproteína mediante un método según esta divulgación, en el que la presencia de uno o dos alelos de dicha isoforma de apolipoproteína en el genoma del sujeto es indicativa de que dicho sujeto tiene una probabilidad más alta de padecer una enfermedad cardiovascular, y en el que la no presencia de alelos de dicha isoforma de apolipoproteína en el genoma del sujeto es indicativa de que dicho sujeto tiene una probabilidad más baja de padecer una enfermedad cardiovascular.

30 Se describe un kit que comprende una superficie de poliestireno o policarbonato y un anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma, en el que el kit no comprende un segundo anticuerpo específico para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma.

35 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende i) una superficie de poliestireno bloqueada con albúmina, y ii) un anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma, para la detección y/o cuantificación de una apolipoproteína según el método del primer aspecto de la invención.

Breve descripción de las figuras

40 La figura 1 muestra el análisis de la presencia de la isoforma de apoE E4 en 157 muestras de plasma que no contienen isoforma apoE4 y 73 muestras que contienen apoE4.

45 La figura 2 muestra las lecturas de ELISA de absorbancia de 73 muestras que contienen apoE E4 (de la figura 1) distribuidas según su genotipo.

50 La figura 3 muestra las lecturas de absorbancia media de las 230 muestras analizadas, distribuidas según el genotipo de APOE. Las barras de erros representan el error estándar de la media.

55 La figura 4 muestra la razón de absorbancias de apoE E4 / apoE total (4E4/pan-apoE) a diferentes diluciones de plasma en no portadores de APOE e4 (E3/E3), y portadores de APOE e4 heterocigotos (E3/E4) y homocigotos (E4/E4).

60 La figura 5 muestra la unión de apolipoproteínas de muestras de plasma (1:200) a una superficie de poliestireno en un formato de placa de ELISA.

65 La figura 6 muestra el efecto de diferentes tampones que contienen sal (NaCl 0-2,4 M) o detergente (polisorbato 20 - Tween 20 - o Triton X-100 desde el 0-0,5%) sobre la unión de ApoE a la placa de ELISA. Las barras gris oscuro y claro representan muestras analizadas en pocillos bloqueados con disoluciones de boqueo basadas en BSA o de Superblock, respectivamente.

La figura 7 muestra el efecto del pH (2-10) sobre la unión de ApoE a la placa de ELISA. Las barras gris claro y

oscuro representan muestras analizadas en pocillos bloqueados con disoluciones de bloqueo basadas en BSA o de Superblock, respectivamente.

La figura 8 muestra el efecto de condiciones rigurosas sobre la unión de ApoE a la placa de ELISA.

La figura 9 muestra un análisis preliminar de muestras de apoE e3/e3 y apoE e4/e4 mediante LEIT a diferentes tiempos.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado que las apolipoproteínas de fluidos biológicos, particularmente apolipoproteína apoE y, más en particular, isoforma 4 de apoE (apoE E4), tienen una capacidad de unión de alta afinidad estable a superficies de poliestireno. Basándose en esta propiedad, los inventores han desarrollado métodos para detectar y cuantificar apolipoproteínas que no requieren isoelectroenfoque o anticuerpos de captura. La invención describe un método simple, fiable y económico que puede implementarse fácilmente en laboratorios de investigación así como en un entorno de análisis clínico. Ya que las apolipoproteínas se han relacionado con riesgo neurovascular y con neurodegeneración, los métodos proporcionados en el presente documento proporcionan información valiosa para estratificación de pacientes e identificación de aquellos en riesgo aumentado de enfermedad de Alzheimer (AD). Esta metodología también puede aprovecharse para la caracterización de otras apolipoproteínas como biomarcadores de proteínas, concretamente apoCI, apoCII, apoCIII, apoAI y clusterina, y es relevante para el análisis de fluidos biológicos fácilmente accesibles tales como sangre u orina.

Definiciones

El término "alelo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una de dos o más formas de un gen, locus o polimorfismo genético. A veces, diferentes alelos pueden dar como resultado diferentes caracteres; sin embargo, otras veces, diferentes alelos tendrán el mismo resultado en la expresión de un gen. La mayoría de organismos multicelulares tienen dos conjuntos de cromosomas, es decir, son diploides. Estos cromosomas se denominan cromosomas homólogos. Los organismos diploides tienen una copia de cada gen (y un alelo) en cada cromosoma. Si ambos alelos son el mismo, son homocigotos. Si los alelos son diferentes, son heterocigotos.

El término "dosificación alélica", tal como se usa en el presente documento, se refiere al número de copias de una variante de alelo específica, que oscila entre 0 y 2 en un organismo diploide.

El término "enfermedad de Alzheimer" o "AD", tal como se usa en el presente documento, se refiere a deterioro mental asociado con encefalopatía degenerativa específica que se caracteriza por placas seniles, ovillos neuríticos y pérdida neuronal progresiva que se manifiesta clínicamente en déficits de memoria progresivos, confusión, problemas de conducta, incapacidad para cuidar de uno mismo, deterioro físico gradual y, finalmente, la muerte. Tal como se usa en el presente documento, este término pretende incluir todas las fases de la enfermedad.

Los términos "anticuerpo", "inmunoglobulina" y términos similares se refieren a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a y reconocen un analito (antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican o bien como kappa o bien como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) a modo de ejemplo está compuesta por dos pares de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente. Los extremos C-terminales de cada cadena pesada se unen entre sí mediante disulfuros, y forman la región constante del anticuerpo. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse anticuerpos a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estas pueden dividirse adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) comprenden una región variable de aproximadamente 1-10 aminoácidos en el extremo NH2-terminal y una región constante kappa o lambda en el extremo COOH-terminal. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (de aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos) comprenden de manera similar una región variable (de aproximadamente 116 aminoácidos) y una de las clases o regiones constantes de cadena pesada anteriormente mencionadas, por ejemplo, gamma (de aproximadamente 330 aminoácidos). Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

El término "apolipoproteína", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que se une a lípidos para formar una lipoproteína. Esta proteína puede funcionar como cofactor de enzimas, ligando de receptores

5 y portador de transferencia de lípidos que regula el metabolismo de proteínas y su captación en tejidos. Este término abarca varias clases de apolipoproteínas tal como sigue apoA (incluyendo isoformas apoA-I, apoA-II, apoA-IV y apoA-V), apoB (incluyendo isoformas apoB48 y apoB100), apoC (incluyendo isoformas apoC-I, apoC-II, apoC-III y apoC-IV), apoD, apoE (incluyendo isoformas apoE2, apoE3 y apoE4), apoH y apoJ (clusterina), así como apoF, apoG, apoL, apoM, apoN y apoO. En una realización particular, la apolipoproteína es apoE.

10 El término “apolipoproteína A-I” o “Apo A-I” o “ApoAI” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que es el componente principal de proteínas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma. ApoAI es un cofactor para lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) que es responsable de la formación de la mayoría de los ésteres de colesterilo en plasma. En humanos, apoAI está codificada por el gen *APOAI*. La apoA-I puede ser a partir de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la apo A-I es la proteína humana con el número de registro de UniProt P026547 (edición del 16 de mayo de 2014).

15 El término “apolipoproteína A-IV” o “Apo A-IV” o “ApoAIV” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína obtenida tras la proteólisis de un producto de traducción primario de proproteína de 306 residuos. La apo A-IV puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la Apo A-IV es la proteína humana con el número de registro de UniProt P06727 (edición del 16 de mayo de 2014). Las isoformas de apoA-IV humana incluyen apoA-IV-1a (T347S) y apoA-IV-2 (Q360H).

20 El término “apolipoproteína C-I” o “Apo C-I” o “ApoCI”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína normalmente encontrada en plasma y responsable de la activación de lecitina colesterol esterificado con un importante papel en el intercambio de colesterol esterificado entre lipoproteínas y en la retirada de colesterol de tejidos. En humanos, apoC-I está codificada por el gen *APOC1*. La Apo C-I puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la apoC-I es la proteína humana con el número de registro de UniProt P02654 (edición del 16 de mayo de 2014). Las isoformas de ApoC-I incluyen ácida (apoC-IA) y básica (apoC-IB), basándose en sus puntos isoelectrónicos calculados.

30 El término “apolipoproteína C-II” o “Apo C-II” o “Apo CII”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína normalmente encontrada en plasma en el que es un componente de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones. En humanos, apoC-II está codificada por el gen *APOC2*. La apoC-II puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la apoC-II es la proteína humana con el número de registro de UniProt P02655 (edición del 16 de mayo de 2014).

35 El término “apolipoproteína C-III” o “Apo C-III” o “Apo CIII”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína encontrada como componente de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). ApoCIII es una proteína relativamente pequeña que contiene 79 aminoácidos que puede glicosilarse en treonina-74. Inhibe la lipoproteína lipasa y la lipasa hepática. En humanos, apo C-III está codificada por el gen *APOC3*. La Apo C-III puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la apo C-III es la proteína humana con el número de registro de UniProt P02656 (edición del 16 de mayo de 2014). ApoC-III está presente en tres isoformas que se denominan apoC-III₀, apoC-III₁ y apoC-III₂, dependiendo del número de moléculas de ácido siálico (de 0 a 2) en las que terminan las porciones oligosacáridas de la proteína. Cada isoforma se ha demostrado que contribuye, respectivamente, a aproximadamente el 10, 55 y 35% de los niveles de apoC-III total en circulación.

45 El término “apolipoproteína E” o “Apo-E” o “ApoE” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína encontrada en quilomicrones y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) que es esencial para el catabolismo normal de constituyentes de lipoproteínas ricos en triglicéridos. En humanos, apolipoproteína E está codificada por el gen *APOE*, que es un gen polimórfico con tres alelos principales, ε2, ε3, y ε4, que codifican para las isoformas ApoE2 (cys112, cys158), ApoE3 (cys112, arg158) y ApoE4 (arg112, arg158). La apolipoproteína E puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la Apo E es la proteína humana con el número de registro de UniProt P02649 (16 de mayo de 2014).

55 El término “isoforma de tipo 2 de la apolipoproteína E” o “apo E2”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la isoforma E2 de la apolipoproteína E de la proteína, que se define por la presencia de la cisteína residual en las posiciones 112 y 158 de la secuencia de aminoácidos.

60 El término “isoforma de tipo 3 de la apolipoproteína E” o “apo E3”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la isoforma E3 de la apolipoproteína E de la proteína, que se define por la presencia de la cisteína residual en la posición 112 y de la arginina residual en la posición 158 de la secuencia de aminoácidos.

El término “isoforma de tipo 4 de la apolipoproteína E” o “apo E cod. variable” o “apo E4”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la isoforma E4 de la apolipoproteína E de la proteína, que se define por la presencia de la arginina residual en las posiciones 112 y 158 de la secuencia de aminoácidos.

65 El término “apolipoproteína-J” o “Apo-J”, o “ApoJ” o “clusterina”, o “inhibidor de la lisis del complemento” o “CLI” o “glicoproteína 2 sulfatada” o “SGP2” o “SP-40,40” o “mensaje 2 prostático reprimido por la testosterona” o “TRPM2”,

tal como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína heterodimérica secretora que influye en la regulación inmunitaria, la adhesión celular, la transformación, el transporte de lípidos, la remodelación de tejidos, el reciclaje de la membrana e interacciones célula-célula. La clusterina se sintetiza como un polipéptido de 449 aminoácidos que se escinde de manera postraducciona en un enlace interno entre Arg 227 y Ser 228. La apolipoproteína J puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc. En una realización particular, la ApoJ es la proteína humana con el número de registro de UniProt P10909 (16 de mayo de 2014).

El término “enfermedad cardiovascular” o “trastorno cardiovascular”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades que afectan al corazón o vasos sanguíneos o ambas o asociada con los sistemas cardiopulmonar y circulatorio incluyendo pero sin limitarse a isquemia, angina, estados edematosos, arterioesclerosis, arteriopatía coronaria, oxidación de LDL, adhesión de monocitos a células endoteliales, formación de células espumosas, desarrollo de estría grasas, adherencia de las plaquetas y agregación, proliferación de células de músculo liso, lesión por reperfusión, hipertensión arterial, enfermedad trombótica, arritmia (auricular o ventricular o ambas); alteraciones del ritmo cardíaco; isquemia miocárdica; infarto de miocardio; aneurisma cardíaco o vascular; vasculitis, accidente cerebrovascular; arteriopatía obstructiva periférica de una extremidad, un órgano o un tejido; lesión por reperfusión tras isquemia del cerebro, corazón u otro órgano o tejido, choque endotóxico, quirúrgico o traumático; hipertensión, valvulopatía, insuficiencia cardíaca, tensión arterial anómala; choque; vasoconstricción (incluyendo la asociada con migrañas); anomalía vascular, inflamación e insuficiencia limitada a un único órgano o tejido.

El término “detergente”, tal como se usa en el presente documento, también conocido como “tensioactivo”, se refiere a agentes tensioactivos anfipáticos que, cuando se añaden a un líquido, reducen la tensión superficial del líquido en comparación al mismo líquido en la ausencia del detergente. Los detergentes son capaces también de impedir la agregación de proteínas y de impedir la interacción o unión no específica de contaminantes a una proteína de interés. Los detergentes según la presente invención incluyen, sin limitación, detergentes no iónicos (neutros), aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos.

Los ejemplos de detergentes no iónicos o neutros incluyen, sin limitación, detergentes de la serie Tween (polisorbato), tal como Tween® 20 (polisorbato 20), Tween® 21 (polisorbato 21), Tween® 40 (polisorbato 40), Tween® 60 (polisorbato 60), Tween® 61 (polisorbato 61), Tween® 65 (polisorbato 65), Tween® 80 (polisorbato 80), Tween® 81 (polisorbato 81), Tween® 85 (polisorbato 85), detergentes de la serie Span®, tales como Span® 20; detergentes de la serie Tergitol, tales como Tergitol tipo 15-S-12; detergentes de la serie Brij®, tales como Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P; detergentes de la serie Tween, tales como Tween® 20, Tween® 21, Tween® 40, Tween® 60, Tween® 61, Tween® 65, Tween® 80, Tween® 81, Tween® 85; detergentes de la serie Triton®, tales como Triton® X-100, Triton® X-114, Triton® CF-21, Triton® CF-32, Triton® DF-12, Triton® DF-16, Triton® GR-5M, Triton® X-102, Triton® X-15, Triton® X-151, Triton® X-207, Triton® X-165, Triton® X-305, Triton® X-405, Triton® X-45, Triton® X-705-70, o un variante conservativa no iónica de al menos uno de dichos detergentes.

Los ejemplos de detergentes aniónicos incluyen, sin limitación, ácido cólico y derivados del mismo, ácido taurocólico, Triton X-200, Triton W-30, Triton-30, Triton-770, sulfosuccinato de dioctilo, N-óxido de N₅N-dimetildodecilamina, 1-alkylsulfonatos de sodio, N-lauroilsarcosina o sales de ácidos grasos.

Los ejemplos de detergentes catiónicos incluyen, sin limitación, mono y dimetilaminas grasas, sales de alquiltrimetilamonio, sales de dialquildimetilamonio, acetatos de alquilamina, acetatos de trialquilamonio, sales de alquildimetilbencilamonio, sales de dialquilmethylbencilamonio, sales de haluro de alquilpiridinio y alquil(sustituido con alquilo)piridinio, sales de alquiltiometilpiridinio, sales de alquilamidometilpiridinio, sales de alquilquinolinio, sales de alquiliisoquinolinio, sales de N,N-alquilmethylpiperidonio, sales de 1,1-dialquilmethylpiperidinio, sales de 4,4-dialquiltiamorfolinio, sales de 4,4-dialquiltiamorfolinio-1-óxido, sulfato de metil-his(alquiletil)-2-alquilmidazolínio-metilo (y otras sales), sulfato de metil-bis(alquilamidometil)-2-hidroxiethylamonio-metilo (y otras sales), sales de alquilamidopropil-dimetilbencilamonio, sales de carboxialquil-alquildimetilamonio, óxidos de alquilamina, óxidos de alquildimetilamina, sales de poli(vinilmethylpiridinio), sales de poli(vinilpiridina), polietileniminas, bicarbonatos de trialquilsulfonio (y otras sales), sales de trialquilmethylfosfonio, sales de alquiletilmethylsulfonio y sales de alquildimetilsulfoxonio.

Los ejemplos de detergentes zwitteriónicos incluyen, sin limitación, 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPS); 2-hidroxi-1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPSO); N-(alquil C10-C16)-N,N-dimetilglicinbetaína (EMPIGEN BB); caprilsulfobetaína (SB3-10); propanosulfonato de 3-[N,N-dimetil(3-miristoilaminopropil)amonio] (amidossulfobetaína-14; ASB-14); 1-propanosulfonato de N-tetradecil-N,N-dimetil-3-amonio (detergente 3-14; ZWITTERGENT); 1-propanosulfonato de N-dodecil-N,N'-dimetil-3-amonio; 1-propanosulfonato de N-octadecil-N,N-dimetil-3-amonio; 1-propanosulfonato de N-decil-N,N-dimetil-3-amonio; Mirataine CB; Mirataine BB; Mirataine CBR; Mirataine ACS; Miracare 2MHT y Miracare 2MCA.

La expresión “que determina la probabilidad” o “predicción de la probabilidad”, o similar, tal como se usa en el

presente documento, es sinónimo de la “que evalúa la probabilidad” o “evaluación de la probabilidad”, y significa que la presente invención hace posible predecir, estimar o evaluar la probabilidad de un paciente de desarrollar una enfermedad, particularmente una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad cardiovascular. La predicción de la probabilidad implica generalmente que la probabilidad o bien se aumenta o bien se reduce. Tal como
 5 entenderán los expertos en la técnica, la predicción, aunque se prefiere, no es necesario que sea correcta para el 100% de los sujetos que van a evaluarse. El término, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los pacientes pueda identificarse como que tienen una probabilidad aumentada de tener una enfermedad, particularmente una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad cardiovascular. El experto en la
 10 técnica puede determinar, sin más dilación, si un sujeto es estadísticamente significativo mediante el uso de diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Pueden encontrarse detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son, preferiblemente 0,05, 0,025, 0,001, 0,0001 o inferior.

15 El término “haplotipo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo específico de genes que una progenie hereda de un antecesor. Particularmente, el haplotipo abarca la colección de alelos particulares en un cromosoma, que probablemente se heredarán juntos. Un haplotipo puede comprender dos o más alelos.

20 El término “inmunoturbidimetría”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una técnica para la detección de un analito en una muestra basándose en la reacción del analito con un anticuerpo, lo que conduce a la formación de un complejo inmunitario anticuerpo-antígeno entre el analito y el anticuerpo que precipita, aumentando la turbidez de la muestra. Como resultado, cuando se hace pasar luz a través de la disolución de reacción, la muestra dispersa algo de luz, la muestra absorbe algo de luz y el resto pasa a través de la muestra. La cantidad de
 25 luz absorbida es directamente proporcional a la concentración del analito o, en otras palabras, la señal luminosa transmitida es directamente proporcional a la concentración del analito. Según la presente invención, el analito que va a detectarse mediante inmunoturbidimetría es una apolipoproteína o isoforma de la misma, particularmente una apolipoproteína seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ (clusterina) e isoformas de las mismas, más particularmente apoE y/o isoformas de apoE apoE2, apoE3 y apoE4, más preferiblemente apoE4. En una realización particular de la invención, el ensayo de inmunoturbidimetría es LEIT (tecnología de inmunoturbidimetría potenciada con látex).

35 El término “enfermedad neurodegenerativa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades que resultan de la degeneración o deterioro de tejido nervioso, particularmente de neuronas, que conduce a lo largo del tiempo a una disfunción o a una incapacidad; el término degeneración incluye pérdida de viabilidad celular, pérdida de función celular y/o pérdida del número de células (neuronas u otras). Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de enfermedades neurodegenerativas incluyen enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple, etc. En una
 40 realización particular, dicha enfermedad neurodegenerativa es AD.

45 El término “agente oxidante”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una especie química que retira un electrón de otra especie en una reacción redox (oxidación-reducción).

El término “policarbonato”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de polímeros termoplásticos que contienen grupos carbonato (-O-(C=O)-O-) en sus estructuras químicas.

El término “poliestireno”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero sintético, aromático, termoplástico fabricado a partir del monómero estireno. El poliestireno puede ser sólido o expandido.

50 El término “proteasa”, tal como se usa en el presente documento, también conocida como “peptidasa”, se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de proteasas incluyen serina peptidasas, treonina peptidasas, cisteína peptidasas, aspartil peptidasas, metalopeptidasas y glutamil peptidasas. En una realización particular, la proteasa es pepsina, tripsina o quimotripsina. Tal como se usa en la presente descripción, el término “pepsina” se refiere a una proteasa que
 55 cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos entre aminoácidos hidrófobos y preferiblemente aminoácidos aromáticos, tales como fenilalanina, triptófano y tirosina.

60 El término “agente reductor”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que cede un electrón a otra especie química (el agente oxidante) en una reacción química redox (oxidación-reducción). La cesión de electrones por el agente reductor da como resultado su oxidación.

65 El término “valor de referencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un criterio predeterminado usado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; una mediana de valores; un valor medio; o un valor en comparación con un valor de nivel inicial o control particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de

muestra individual, tal como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que va a someterse a prueba, pero en un punto de tiempo anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o basándose en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a prueba.

5 El término “sal”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier forma de un compuesto en forma iónica, o cargado y acoplado a un contraión (un catión o anión), o en disolución. La definición incluye en particular sales farmacéuticamente aceptables.

10 El término “muestra”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material biológico aislado de un sujeto y por tanto incluye muestras biológicas. Dichas muestra pueden contener cualquier material biológico adecuado para detectar el marcador deseado y pueden comprender células y/o material no celular del sujeto. En general, una muestra puede aislarse de cualquier fluido o tejido biológico adecuado. Las muestras preferidas particulares según la invención incluyen, sin limitación, de sangre, plasma, suero, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR). En una realización de la invención, la muestra es una muestra de plasma.

15 El término “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” incluye cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoo o de compañía tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, y así sucesivamente. En una realización particular, el sujeto es un humano.

Método de detección y cuantificación de apolipoproteínas de la invención

25 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de una apolipoproteína en una muestra (*primer método de la invención*) que comprende:

(i) poner en contacto la muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la interacción electrostática y/o hidrófoba directa entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno,

30 (ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con un anticuerpo específico para dicha apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la apolipoproteína y

35 (iii) detectar los complejos formados en la etapa (ii),

en el que la superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto de la muestra con un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: albúmina, caseína, gelatina o un detergente.

40 La invención se refiere a un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de una apolipoproteína seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ.

45 Las apolipoproteínas que van a detectarse y/o cuantificarse según el primer método de la invención incluyen apoAI, apoATV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ. Las isoformas de apolipoproteínas que van a detectarse y/o cuantificarse incluyen isoformas de apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ. En una realización particular, la apolipoproteína que va a detectarse y/o cuantificarse según el primer método de la invención es apoE. En una realización particular, las isoformas de apolipoproteínas que van a detectarse y/o cuantificarse según el primer método de la invención son isoformas de apoE seleccionadas del grupo que consiste en apoE2, apoE3 y apoE4. En una realización más particular, la apolipoproteína es apoE, y más particularmente, la isoforma de apolipoproteína es apoE4.

50 Por tanto, en una primera etapa del primer método de la invención, una muestra se pone en contacto con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la unión de la apolipoproteína en la muestra a dicha superficie de poliestireno, en el que dicha superficie no contiene anticuerpos específicos para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma unida a ella.

55 El contacto entre la muestra y la superficie de poliestireno o una superficie de policarbonato puede realizarse mediante contacto directo en condiciones adecuadas para la unión de la apolipoproteína en la muestra a la superficie de poliestireno. Tal como entenderá el experto en la técnica, dichas condiciones serán condiciones adecuadas para interacciones entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno, es decir condiciones adecuadas para interacciones electrostáticas y/o hidrófobas entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno. Por el presente documento, la superficie es una superficie de poliestireno. Las condiciones adecuadas para la unión puede determinarlas el experto en la técnica e incluyen temperatura, tiempos de incubación, pH, concentración de la muestra apropiados, etc. En una realización particular, la temperatura oscila entre 4 y 40°C, en particular entre 10 y 35°C, más particularmente entre 15 y 30°C, preferiblemente entre 20 y 25°C (temperatura ambiente). En una realización particular, el pH durante dicha etapa de contacto oscila entre pH 2 y pH 10, preferiblemente entre pH 4 y pH 10. En una realización particular, la muestra se incuba en contacto con la superficie, es decir la superficie de

- poliestireno, durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente durante al menos 60 minutos. Las muestras que contienen apolipoproteínas según la invención pueden ponerse en contacto con la superficie, es decir la superficie de poliestireno, sin estar previamente diluida o diluida, en las que la dilución es al menos 1:2, preferiblemente al menos 1:5, más preferiblemente al menos 1:10, incluso más preferiblemente al menos 1:100, incluso más preferiblemente al menos 1:200. Tal como entenderá el experto en la técnica, diferentes tampones son adecuados para la dilución de la muestra. En una muestra particular, la dilución de la muestra se realiza en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en tampón de carbonato/bicarbonato, más preferiblemente en PBS.
- En una realización particular, la unión de la apolipoproteína y la superficie de poliestireno no está mediada por ningún péptido, ningún polipéptido, ningún lípido o ningún agente de reticulación. En particular, dicho péptido que no media en la unión es un péptido capaz de unirse a una apolipoproteína e incluye, sin limitación, péptidos amiloides. Los péptidos amiloides incluyen, sin limitación, proteína precursora amiloide (APP), péptidos β -amiloides [péptidos de 36-43 aminoácidos que están implicados de manera crucial en la enfermedad de Alzheimer como componente principal de las placas amiloides encontradas en los cerebros de pacientes de Alzheimer, incluyendo $A\beta(1-5)$, $A\beta(1-6)$, $A\beta(1-12)$, $A\beta(1-40)$, $A\beta(1-42)$, $A\beta(12-28)$, $A\beta(13-28)$, $A\beta(25-35)$, $A\beta(35-42)$, $A\beta(33-42)$ y $A\beta(33-40)$, en el que la expresión $A\beta(X-Y)$ se refiere a un péptido derivado del péptido beta-amiloide constituido por aminoácidos en la posición X al aminoácido en la posición Y), $A\beta 40$, y $A\beta 42$]. Los lípidos que no median en la unión incluyen, sin limitación, fosfolípidos y ácidos grasos.
- En una realización particular, la muestra que contiene la apolipoproteína o isoforma de la misma que va a determinarse y/o cuantificarse es una muestra biológica. Las muestras biológicas según la invención incluyen, sin limitación, fluidos biológicos tales como sangre, plasma, suero, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR). Los métodos para aislar muestras los conocen bien los expertos en la técnica. En una realización particular, la muestra es una muestra de plasma. Las diluciones adecuadas de una muestra de plasma según el primer método de la invención oscilan entre 1:10 y 1:100000, preferiblemente entre 1:100 y 1:1000, más preferiblemente la dilución de la muestra de plasma es de 1:200.
- La superficie de poliestireno, según la invención no contiene ningún anticuerpo específico para la apolipoproteína o isoforma de la misma unida a ella y para la cual se realiza la detección y/o la cuantificación. Las superficies de poliestireno según la invención incluyen cualquier superficie de poliestireno susceptible de ponerse en contacto con una muestra, particularmente una muestra biológica, e incluyen, sin limitación, placas, tubos, perlas y matrices, todas ellas comercialmente disponibles y, en general, cualquier superficie de poliestireno adecuada para ensayos de base microfluídica. En una realización particular, la superficie de poliestireno está comprendida por una placa de ELISA, perlas turbidimétricas, perlas Luminex o, en general, de cualquier superficie de poliestireno adecuada para ensayos de base microfluídica. Las superficies de policarbonato tal como se describen en el presente documento incluyen cualquier superficie de poliestireno susceptible de ponerse en contacto con una muestra, particularmente una muestra biológica, e incluyen, sin limitación, placas, tubos, perlas y matrices, todas ellas comercialmente disponibles. En cualquier caso, dicha superficie de poliestireno o superficie de policarbonato no contiene anticuerpos que sean específicos para la apolipoproteína o isoforma de la misma que va a unirse a dicha superficie.
- Las placas de poliestireno según la invención incluyen placas de ELISA de poliestireno comercialmente disponibles de Nunc, Fisher Scientific, VWR, Greiner y Corning, a modo de ejemplo.
- Las perlas de poliestireno según la invención incluyen, sin limitación, perlas comercialmente disponibles de Sigma Aldrich. En una realización particular, las perlas de poliestireno tienen un tamaño de partícula medio que oscila entre 50 nm y 1 μ m, preferiblemente entre 100 nm y 500 nm, más preferiblemente entre 150 nm y 400 nm, incluso más preferiblemente entre 200 y 300 nm. En una realización particular, las perlas de poliestireno son perlas de poliestireno modificadas con amina. En una realización particular alternativa, las perlas de poliestireno son perlas de poliestireno modificadas con carboxilato. Las perlas de poliestireno según la invención incluyen, sin limitación, perlas Luminex® y perlas turbidimétricas. Las perlas Luminex son microesferas comercialmente disponibles de Luminex.
- La superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto con la muestra, es decir, la superficie de poliestireno se bloquea antes de la etapa de unión (i) del primer método de la invención. En una realización particular, la superficie de poliestireno se bloquea antes de la etapa de unión mediante una proteína distinta de una apolipoproteína y/o mediante un detergente. Las proteínas adecuadas para bloquear la superficie, preferiblemente una superficie de poliestireno, antes de la etapa de unión incluyen, sin limitación, albúmina tal como albúmina sérica bovina (BSA), caseína y gelatina. Se describen en el presente documento disoluciones de bloqueo comercialmente disponibles tales como Superblock (Pierce). Proteínas particularmente preferidas para el bloqueo son BSA, caseína y gelatina, más preferiblemente, BSA, incluso más preferiblemente, BSA que oscila entre el 1% y el 3%, más preferiblemente el BSA al 1%. En una realización particular, la superficie de poliestireno se bloquea con albúmina antes del contacto con la muestra, más preferiblemente la albúmina es BSA. En una realización particular, la superficie se bloquea mediante BSA al 1%. Adicional o alternativamente a la proteína distinta de una apolipoproteína, la superficie de poliestireno, se bloquea antes de la etapa de unión mediante un detergente. Los detergentes adecuados para bloquear la superficie de poliestireno antes de la etapa de unión incluyen, sin limitación, polivinilpirrolidona-40 (PVP-

40), polisorbato 20 (Tween 20), Nonidet-P40 y Triton X-100. En una realización particular, el detergente es polisorbato 20. En una realización particular, la superficie se bloquea mediante polisorbato 20.

5 En una realización de la invención, la superficie de poliestireno se trata con una disolución de lavado tras el contacto con una muestra, es decir, la superficie se trata con una disolución de lavado después de la etapa de unión (i) del primer método de la invención. Preferiblemente, el tratamiento de la superficie con la disolución de lavado se realiza después de la etapa de unión (i) y antes de la etapa (ii) del primer método de la invención. En una realización particular, la disolución de lavado contiene una o más sales. Preferiblemente, la sal contenida por la disolución de lavado es NaCl, comprendida por un tampón Tris (TBS) o por un tampón fosfato (PBS). Adicional o alternativamente, 10 la disolución de lavado contiene al menos un detergente. Preferiblemente, el detergente se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (Tween 20) y Triton X-100. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un ácido. Preferiblemente, el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl y ácido fórmico. Más preferiblemente, el ácido se selecciona de HCl 2 M y ácido fórmico al 70%. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene una base. Preferiblemente, la base es NaOH, más preferiblemente NaOH 2 M. 15 Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un agente reductor. Preferiblemente, el agente reductor es 2-mercaptoetanol. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado no contiene un detergente enzimático (tal como una proteasa), un reactivo oxidante (tal como hipoclorito de sodio) o la combinación de los mismos.

20 En una segunda etapa del primer método de la invención, la superficie de poliestireno a la que se une la apolipoproteína, como resultado de la primera etapa del método, se pone en contacto con un anticuerpo específico para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma unida a la superficie de poliestireno. Esta etapa se realiza en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la apolipoproteína o isoforma de la misma unida a la superficie de poliestireno.

25 El experto en la técnica conoce anticuerpos específicos de apolipoproteínas y están comercialmente disponibles. Los anticuerpos a modo de ejemplo, no limitativos, que pueden usarse en el contexto de la invención incluyen los siguientes:

30 - Para la detección y/o cuantificación de apoAI: anticuerpo policlonal de conejo para apoAI de Santa Cruz Biotechnology (FL-267, número de catálogo sc-30089), anticuerpo anti-apoAI monoclonal de ratón de Santa Cruz Biotechnology (069-01, número de catálogo sc-58230), anticuerpo anti-apoAI monoclonal de ratón de Santa Cruz Biotechnology (B10, número de catálogo sc-376818), anticuerpo anti-apoAI policlonal de conejo de Abcam (número de catálogo ab64308) y anticuerpo anti-apoAI policlonal de cabra de Abcam (número de catálogo ab7613).

35 - Para la detección y/o cuantificación de apoAII: anticuerpo anti-apoAII monoclonal de ratón de LifeSpan Biosciences (número de catálogo LS-B4281) y anticuerpo anti-apoAII policlonal de conejo de OriGene (número de catálogo TA328111).

40 - Para la detección y/o cuantificación de apoAIV: anti-apoAIV humana policlonal de cabra de Abcam (número de catálogo ab59036) y anti-apoAIV humana policlonal de conejo de Sigma-Aldrich (número de catálogo HPA001352).

45 - Para la detección y/o cuantificación de apoCI: anticuerpo anti-apoCI policlonal de conejo de Abcam (número de catálogo ab20793) y anticuerpo anti-apoCI policlonal de cabra de Abcam (número de catálogo ab104446).

- Para la detección y/o cuantificación de apoCII: anticuerpo anti-apoCII policlonal de conejo de Abcam (número de catálogo ab76452), anticuerpo anti-apoCII policlonal de conejo de Sigma-Aldrich (número de catálogo SAB1300917) y anticuerpo anti-apoCII monoclonal de ratón de Novus-Biologicals (3E4, número de catálogo H00000344-M01).

50 - Para la detección y/o cuantificación de apoCIII: anticuerpo anti-apoCIII policlonal de cabra de Abcam (número de catálogo ab7619) y anticuerpo anti-apoCIII policlonal de conejo de Sigma-Aldrich (número de catálogo A0734).

55 - Para la detección y/o cuantificación de apoE: anticuerpo policlonal de conejo para apoE total (SantaCruz Biotechnology, Inc., n.º sc-98573) e IgG de conejo anti-apoE humana de TaKaRa Clontech (números de catálogo 18171A y 18171B) y anticuerpo anti-apoE humana policlonal de conejo de Abcam (número de catálogo ab72398).

- Para la detección y/o cuantificación de la isoforma apoE2: anti-apoE2 humana monoclonal de ratón de Biolegend (clon 3C2, número de catálogo 815001; clon 8G3, número de catálogo 812701).

60 - Para la detección y/o cuantificación de la isoforma apoE3: anti-apoE3 humana policlonal de conejo de Preprotech (número de catálogo 350-02).

65 - Para la detección y/o cuantificación de la isoforma apoE4: anti-apoE4 humana monoclonal de ratón de Merck Millipore (clon 4E4, número de catálogo MABN43), anti-apoE4 humana monoclonal de ratón de BioLegend (clon 5B5, número de catálogo 811601), anticuerpo monoclonal de ratón específico para apoE E4, clon 4E4 (Novus Biologicals, n.º NBP1-49529), anticuerpo monoclonal de ratón específico para apoE E4, clon 5B5 (IBL n.º 10025),

anticuerpo monoclonal de ratón específico para apoE E4, clon 1F9 (MBL, n.º M067-3) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-apoE4, clon 4E4 de Thermo Scientific (número de catálogo MA5-16146).

- 5 - Para la detección y/o cuantificación de apoJ: anticuerpo anti-apoJ monoclonal de ratón de Abcam (CLI-9, número de catálogo ab16077) y anticuerpo anti-apoJ policlonal de cabra de Sigma-Aldrich (número de catálogo SAB2500251).

10 El contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína como resultado de la etapa (i) con un anticuerpo específico para dicha apolipoproteína se realiza en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la apolipoproteína o isoforma de la misma. Las condiciones adecuadas para la formación de dicho complejo puede determinarlas el experto en la técnica e incluyen temperatura, tiempo de incubación y pH apropiados. En una realización particular, la temperatura oscila entre 4 y 40°C, en particular entre 10 y 35°C, más particularmente entre 15 y 30°C, preferiblemente entre 20 y 25°C (temperatura ambiente). En una realización preferida, la temperatura en las etapas (i) y (ii) del primer método de la invención es sustancialmente la misma. En una realización particular, el pH oscila entre pH 2 y pH 10, preferiblemente entre pH 4 y pH 10. En una realización preferida, el pH en las etapas (i) y (ii) del primer método de la invención es sustancialmente el mismo. En una realización particular, el anticuerpo se incubaba con la apolipoproteína o isoforma de la misma unida a la superficie durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente durante al menos 60 minutos.

20 En una tercera etapa del primero método de la invención, se detectan complejos entre la apolipoproteína unida a la superficie de poliestireno y el anticuerpo específico para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma, como resultado de la segunda etapa del método.

25 Ya que la apolipoproteína no es una molécula detectable por sí misma, se realiza la etapa de detección, en una realización particular, por medio de una molécula o un complejo detectable. El complejo de apolipoproteína-anticuerpo o isoforma de apolipoproteína-anticuerpo puede detectarse mediante diferentes métodos conocidos por el experto en la técnica. En una realización particular de la invención, la detección del complejo de apolipoproteína-anticuerpo o el complejo de isoforma de apolipoproteína-anticuerpo se realiza por medio de un reactivo detectable que se une específicamente al complejo de apolipoproteína-anticuerpo o al complejo de isoforma de apolipoproteína-anticuerpo, en el que el reactivo detectable facilita la detección del complejo generando una señal que puede medirse. Los métodos para marcar moléculas biológicas, tales como polipéptidos y anticuerpos, se conocen bien en la técnica.

35 Cualquiera de una amplia variedad de reactivos detectables pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los reactivos detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a: diversos ligandos, radionúclidos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas (tales como, por ejemplo, puntos cuánticos, nanocristales, sustancias fosforescentes y similares), enzimas (tales como, por ejemplo, las usadas en un ensayo ELISA, es decir, peroxidasa del rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y biotina, dioxigenina u otros haptenos y proteínas para los que están disponibles antiseros o anticuerpos monoclonales.

45 Los reactivos detectables para la obtención óptica de imágenes incluyen, por ejemplo, fluoresceína, un derivado de fluoresceína, verde de indocianina, verde Oregón, un derivado de verde Oregón, rodamina verde, un derivado de rodamina verde, una eosina, una eritrosina, rojo Texas, un derivado de rojo Texas, verde malaquita, éster de sulfosuccinimidilo Nanogold, azul cascada, un derivado de cumarina, un naftaleno, un derivado de piridiloxazol, colorante amarillo cascada, colorante de dapoxilo, y otros diversos compuestos fluorescentes, tales como Cy3, Cy2, Cy5, la familia de marcadores fluorescentes Alexa Fluor® (Molecular Probes, Inc.), carboxifluoresceína (FAM) y isotiocianato de fluoresceína (FITC).

50 En una realización particular, el reactivo detectable es una proteína. El término "proteína", en el contexto de la presente invención, se refiere a macromoléculas que consisten en una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas son responsables de llevar a cabo un grupo diverso de funciones celulares basándose en su capacidad para unirse específicamente a otras moléculas. Las proteínas pueden unirse a otras proteínas así como a moléculas de sustrato pequeñas. Los ejemplos no limitativos de proteínas adecuadas como reactivos detectables incluyen, sin limitación, enzimas, proteínas fluorescentes, proteínas luminiscentes y antígenos.

60 En una realización preferida, la proteína es una enzima. El término "enzima", en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína que funciona como catalizador altamente selectivo, acelerando tanto la velocidad como la especificidad de la reacción metabólica para la cual es específica. Los ejemplos no limitativos de enzimas adecuadas para la invención incluyen, sin limitación, peroxidasa del rábano (HRP) y fosfatasa alcalina. Tal como el experto en la técnica entenderá, las enzimas adecuadas para su uso en la presente invención son indirectamente detectables como resultado de su capacidad de catalizar la modificación de un sustrato en un compuesto detectable mediante colorimetría, quimioluminiscencia o fluorimetría. Los ejemplos de sustratos adecuados incluyen, sin limitación, fosfato de p-nitrofenilo (PNPP), ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) o-fenilendiamina (OPD) y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

Las proteínas bioluminiscentes o fotoproteínas son un caso particular de enzimas oxidativas capaces de llevar a cabo una reacción química de sus grupos prostéticos específicos, dando como resultado emisión de luz sin requerir antes excitación. Los ejemplos no limitativos de proteínas bioluminiscentes incluyen luciferasa de luciérnaga, luciferasa de *Renilla* y aequorina.

En otra realización, la proteína es una proteína fluorescente. El término "proteína fluorescente", en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína con la capacidad de emitir luz cuando se excita a una longitud de onda adecuada para la excitación. Los ejemplos no limitativos de proteínas fluorescentes que pueden usarse en el complejo de la invención incluyen, sin limitación, GFP, GFPuv, BFP, CFP, YFP, EBFP2, mCerulean, mCerulean3, mVenus, mTurquoise, T-Sapphire, citrina, amFP486, zFP506, zFP538, drFP, DsRed, mCherry, dTomate, mTFP1, TagRFP-T, mKO2, mRuby, mKate, mAmetrine, REACh, R-ficoeritrina (R-PE) y alofococianina (APC).

En otra realización, la proteína es una proteína luminiscente. El término "proteína luminiscente", en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína capaz de emitir luz cuando se excita a una longitud de onda adecuada para la excitación.

En otra realización, la proteína es un antígeno. El término "antígeno", en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula que induce una respuesta inmunitaria en el cuerpo. Por tanto, puede usarse un antígeno para generar un anticuerpo que lo reconoce y se une específicamente a él. Los ejemplos no limitativos de antígenos incluyen, entre otros, antígenos tumorales, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), HER2, antígeno prostático específico (PSA) y activador de plasminógeno tisular y sus variantes recombinantes, tales como Activase®, así como antígenos bacterianos, alérgenos, etc. Tal como entenderá el experto en la técnica, los antígenos adecuados para su uso en la presente invención son indirectamente detectables como resultado de su capacidad de ser específicamente reconocidos por un anticuerpo.

En otra realización, el reactivo detectable es un hapteno. El término "hapteno", en el contexto de la presente invención, se refiere a un grupo de compuestos químicos que tienen un tamaño molecular pequeño (< 10.000 Da) que son antigénicos pero no son capaces de inducir por sí mismos una reacción inmunitaria específica. El acoplamiento químico de un hapteno a una proteína inmunogénica grande, denominada portador, genera un conjugado de hapteno-portador inmunogénico que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica. Los ejemplos no limitativos de vitaminas incluyen biotina (vitamina B7), digoxigenina, dinitrofenol (DNP) y nitro-yodofenol (NIP). En una realización particular, la vitamina es biotina. El término "biotina", en el contexto de la presente invención, se refiere a una vitamina termoestable e hidrosoluble y soluble en alcohol, también denominada vitamina H y vitamina B7, caracterizada por unirse específicamente a avidina con la afinidad más alta descrita hasta la fecha de $K_d = 10^{-15}$ M. Tal como entenderá el experto en la técnica, la biotina es indirectamente detectable como resultado de su capacidad de ser específicamente reconocida por la avidina o variantes de la misma, tales como estreptavidina y neutravidina.

La detección del reactivo detectable puede realizarse por medio de fluorimetría o colorimetría usando aparatos adecuados para el tipo de reactivos y el tipo de muestra, que conoce el experto en la técnica.

A modo de ejemplo, el complejo de apolipoproteína-anticuerpo, en el que la apolipoproteína del complejo se une a la superficie de poliestireno, se incuba con un segundo anticuerpo (anticuerpo indicador) que es específico para el anticuerpo anti-apolipoproteína previamente complejado con la apolipoproteína. Por tanto, en una realización particular del primer método de la invención, la detección de complejos de apolipoproteína-anticuerpo formados en la etapa (ii) del método se detectan por medio de un anticuerpo indicador que es específico para el anticuerpo anti-apolipoproteína. En una realización particular, el anticuerpo anti-apolipoproteína y el anticuerpo indicador son el mismo anticuerpo. En una realización preferida, el segundo anticuerpo (anticuerpo indicador) se conjuga con una enzima, en condiciones similares a las condiciones de incubación de la superficie con la apolipoproteína y/o de incubación del anticuerpo específico para la apolipoproteína con la apolipoproteína unida a la superficie. Los complejos de anticuerpo-apolipoproteína unidos a la superficie se detectan con la adición de un sustrato que se convierte mediante la enzima en un producto detectable, por ejemplo, por medio de fluorimetría en un microscopio de fluorescencia o mediante colorimetría en un espectrofotómetro. En una realización alternativa, la detección puede realizarse de una manera análoga por medio del uso de una sonda específica para la apolipoproteína marcada de manera adecuada con un reactivo detectable.

Por tanto, según la presente invención, el complejo de apolipoproteína-anticuerpo, o el complejo de isoforma de apolipoproteína-anticuerpo, puede detectarse por medio de una molécula o un complejo detectable, tal como se describió anteriormente. En una realización alternativa de la invención, el complejo de apolipoproteína-anticuerpo o isoforma de apolipoproteína-anticuerpo se detecta mediante turbidimetría, particularmente por medio de un ensayo inmunoturbidimétrico. La formación de un complejo de apolipoproteína-anticuerpo o un complejo de isoforma de apolipoproteína-anticuerpo, cuando dicha apolipoproteína o isoforma de apolipoproteína está presente en la muestra que va a analizarse, da como resultado un aumento de turbidez en comparación con la turbidez en una muestra que carece de la apolipoproteína o isoforma de apolipoproteína, en la que dicha variación de turbidez puede medirse (por ejemplo, por medio de un espectrofotómetro). En una realización preferida de la invención, el ensayo

inmunoturbidimétrico es LEIT (tecnología de inmunoturbidimetría potenciada con látex).

En una realización particular, la detección del complejo se realiza mediante ELISA. En una realización alternativa, la detección del complejo se realiza mediante un ensayo inmunoturbidimétrico.

5

Método para la determinación de las cantidades relativa de una isoforma de apolipoproteína

Los inventores de la presente invención han desarrollado un método para determinar si una isoforma particular de apolipoproteína está presente o no en un sujeto basándose en un ensayo ELISA doble para una muestra de plasma del sujeto, en el que un ensayo determina los niveles de la isoforma de apolipoproteína particular y el otro ensayo determina los niveles de apolipoproteína total. Después se calcula la razón isoforma de apolipoproteína/apolipoproteína total. Véase el ejemplo 1, "Discriminación de los portadores de APOE ϵ 4 homocigotos/heterocigotos en muestras de plasma" y la figura 4. También se ha determinado el contenido de isoforma de apolipoproteína de apoE mediante un ensayo inmunoturbidimétrico. Véase el ejemplo 2, "Detección de ApoE4 mediante un ensayo turbidimétrico".

10

15

Por tanto, en otra realización, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la cantidad relativa de una isoforma de una apolipoproteína dada con respecto al contenido total de dicha apolipoproteína en una muestra (*segundo método de la invención*) que comprende:

20

(i) poner en contacto la muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la interacción electrostática y/o hidrófoba directa entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno,

25

(ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con un primer anticuerpo específico para dicha isoforma de apolipoproteína y con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína presente en la muestra, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína,

30

(iii) detectar los complejos primero y segundo formados en la etapa (ii) y

35

(iv) determinar las cantidades relativas de la isoforma con respecto al contenido de apolipoproteína total basándose en los niveles del primer y segundo complejo obtenido en la etapa (iii),

en el que la superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto de la muestra con un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: albúmina, caseína, gelatina o un detergente.

40

La invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la cantidad relativa de una isoforma de una apolipoproteína dada seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ.

45

Las isoformas de apolipoproteínas que van a determinarse según el segundo método de la invención incluyen isoformas de apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ. En una realización particular, las isoformas de apolipoproteínas que van a determinarse son isoformas de apoE seleccionadas del grupo que consiste en apoE2, apoE3 y apoE4, preferiblemente apoE4. En una realización más particular, la apolipoproteína es apoE y la isoforma de apolipoproteína es apoE4.

50

En una primera etapa del segundo método de la invención, se pone en contacto una muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la unión de la apolipoproteína o la isoforma de la misma en la muestra a la superficie, en el que dicha superficie no contiene anticuerpos específicos para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma unida a ella.

55

Las condiciones adecuadas para la unión de una apolipoproteína o isoforma de la misma en una muestra a una superficie de poliestireno se han descrito previamente en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento.

60

En una realización particular, la muestra que contiene la apolipoproteína o isoforma de la misma que va a determinarse es una muestra biológica. Las muestras biológicas adecuadas se han mencionado en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento. Las muestras preferidas incluyen fluidos biológicos tales como sangre, plasma, suero, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR). En una realización particular, la muestra es una muestra de plasma. Las diluciones adecuadas de una muestra de plasma oscilan entre 1:10 y 1:100000, preferiblemente entre 1:100 y 1:1000, más preferiblemente la dilución de la muestra de plasma es de 1:200.

65

La superficie de poliestireno o policarbonato según la invención no contiene ningún anticuerpo específico para la apolipoproteína o isoforma de la misma unida a ella y para la cual se realiza la detección. Las superficies de

poliestireno según la invención se han mencionado anteriormente y se incorporan en el presente documento. En una realización particular, la superficie de poliestireno está comprendida por una placa para ELISA, perlas Luminex o perlas turbidimétricas. En cualquier caso, dicha superficie de poliestireno no contiene anticuerpos que sean específicos para la apolipoproteína o isoforma de la misma que va a unirse a dicha superficie.

En una realización particular, la superficie de poliestireno según el segundo método de la invención está formada por una sola entidad, de modo que dicha sola entidad proporciona la superficie necesaria para la unión de la apolipoproteína, por ejemplo una sola placa tal como una sola placa de ELISA o un solo pocillo en una placa de ELISA. Se entenderá que esta realización puede usarse en tales casos en los que los anticuerpos primero y segundo se detectan usando diferentes marcadores detectables, de modo que la señal resultante de cada anticuerpo puede determinarse de manera precisa sin interferencias mediante la señal proporcionada por el segundo anticuerpo. En una realización alternativa, la superficie de poliestireno según el segundo método de la invención está formada por una pluralidad de entidades, es decir, por al menos dos unidades de la entidad que proporciona la superficie disponible para la unión de la apolipoproteína a dicha superficie, por ejemplo una pluralidad de perlas tales como perlas Luminex o perlas turbidimétricas. En una realización particular del segundo método de la invención, la superficie de poliestireno que va a ponerse en contacto con una muestra en condiciones adecuadas para la unión de la apolipoproteína en dicha muestra a la superficie está formada por una pluralidad de entidades. Preferiblemente, dicha superficie está formada por perlas Luminex o por perlas turbidimétricas. Esta realización es útil cuando los complejos formados en la etapa (i) no se tratan adicionalmente con reactivos detectables que permiten distinguir ambos anticuerpos mediante la señal proporcionada por cada reactivo detectable. Por ejemplo, en el caso de la detección turbidimétrica, la formación del complejo entre la apolipoproteína y el anticuerpo se detecta mediante un aumento en la turbidez de la muestra. En este caso, no es posible determinar si el aumento en la turbidez se debe a la formación de complejos de la isoforma de apolipoproteína y el primer anticuerpo o a los complejos de la apolipoproteína total y el segundo anticuerpo. En este caso, el contacto tiene que hacerse usando una superficie que está formada por una pluralidad de entidades (por ejemplo en forma de micropartículas), de modo que las entidades en contacto con cada tipo de anticuerpo pueden detectarse por separado colocándolas en diferentes envases.

La superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto con la muestra, es decir, la superficie se bloquea antes de la etapa de unión (i) del segundo método de la invención. En una realización particular, la superficie de poliestireno se bloquea antes de la etapa de unión mediante una proteína distinta de una apolipoproteína y/o mediante un detergente. Las proteínas y los detergentes adecuados para bloquear la superficie según la invención se han descrito anteriormente y se incorporan en el presente documento como referencia. Las proteínas particularmente preferidas para el bloqueo son BSA, caseína y gelatina, más preferiblemente, BSA, incluso más preferiblemente, BSA que oscila entre el 1% y el 3%, más preferiblemente BSA al 1%. Los detergentes adecuados para bloquear la superficie antes de la etapa de unión incluyen, sin limitación, polivinilpirrolidona-40 (PVP-40), polisorbato 20 (Tween 20), Nonidet-P40 y Triton X-100.

En una realización particular, la superficie de poliestireno se trata con una disolución de lavado tras el contacto con una muestra, es decir, la superficie de poliestireno se trata con una disolución de lavado tras la etapa de unión (i) del segundo método de la invención. Preferiblemente, el tratamiento de la superficie de poliestireno con la disolución de lavado se realiza después de la etapa de unión (i) y antes de la etapa (ii) del segundo método de la invención. Se han descrito previamente disoluciones de lavado adecuadas y se incorporan en el presente documento. En una realización particular, la disolución de lavado contiene una o más sales. Preferiblemente, la sal contenida por la disolución de lavado es NaCl. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene al menos un detergente. Preferiblemente, el detergente se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (Tween 20) y Triton X-100. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un ácido. Preferiblemente, el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl y ácido fórmico. Más preferiblemente, el ácido se selecciona de HCl 2 M y ácido fórmico al 70%. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene una base. Preferiblemente, la base es NaOH, más preferiblemente NaOH 2 M. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un agente reductor. Preferiblemente, el agente reductor es 2-mercaptoetanol. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado no contiene un detergente enzimático (tal como una proteasa), un reactivo oxidante (tal como hipoclorito de sodio) o la combinación de los mismos.

En una segunda etapa del segundo método de la invención, la superficie a la que la apolipoproteína se une formada en la etapa (i) se pone en contacto con un primer anticuerpo específico para dicha isoforma de apolipoproteína y con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína presente en la muestra, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y adecuadas para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína.

Se han mencionado anteriormente anticuerpos específicos para apolipoproteínas y anticuerpos específicos para isoformas de apolipoproteínas particulares en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento.

Según el segundo método de la invención, la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) se pone en contacto con un primer anticuerpo y con un segundo anticuerpo, en el que el primer anticuerpo es

específico para la isoforma de apolipoproteína que va a determinarse y en el que el segundo anticuerpo es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína. En una realización particular, la superficie a la que se une la apolipoproteína y que se pone en contacto con el primer anticuerpo es la misma superficie a la que se une la apolipoproteína y pone en contacto con el segundo anticuerpo, es decir, el contacto se realiza en un solo envase, por ejemplo, un solo pocillo en una placa tal como una placa de ELISA. Por tanto, el contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína y el primer anticuerpo se realiza en el mismo envase que aquel en el que se realiza el contacto con un segundo anticuerpo. En una realización alternativa, una primera superficie a la que se une la apolipoproteína se pone en contacto con el primer anticuerpo y una segunda superficie a la que se une la apolipoproteína se pone en contacto con el segundo anticuerpo, en el que dichas superficies primera y segunda son superficies diferentes, tal como a modo de ejemplo, pocillos diferentes en una placa (tal como una placa de ELISA), perlas diferentes (tales como perlas Luminex de perlas turbidimétricas) o partículas diferentes. Por tanto, el contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína y el primer anticuerpo se realiza en un envase diferente del envase en el que se realiza el contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína y el segundo anticuerpo, es decir, se usan envases separados. En una realización más particular, cuando se usan envases separados, cada uno de dichos envases comprende una pluralidad de entidades, por ejemplo dos conjuntos separados de perlas (tales como perlas Luminex de perlas turbidimétricas) o dos conjuntos separados de partículas.

En una realización preferida del segundo método de la invención, la superficie usada en la etapa (i) está formada por una pluralidad de entidades, y el contacto con el primer anticuerpo y con el segundo anticuerpo en la etapa (ii) se realiza en envases separados, conteniendo cada uno parte de la pluralidad de entidades que forman la superficie.

El contacto entre la superficie a la que se une la isoforma de apolipoproteína como resultado de la etapa (i) con un primer anticuerpo específico para dicha isoforma de apolipoproteína y con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína de la misma se realiza en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína. Las condiciones adecuadas para la formación de dichos complejos puede determinarlas el experto en la técnica e incluyen temperatura, tiempo de incubación y pH apropiados. En una realización particular, la temperatura oscila entre 4 y 40°C, en particular entre 10 y 35°C, más particularmente entre 15 y 30°C, preferiblemente entre 20 y 25°C (temperatura ambiente). En una realización preferida, la temperatura en las etapas (i) y (ii) del segundo método de la invención es sustancialmente la misma. En una realización particular, el pH oscila entre pH 2 y pH 10, preferiblemente entre pH 4 y pH 10. En una realización preferida, el pH en las etapas (i) y (ii) del segundo método de la invención es sustancialmente el mismo. En una realización particular, el primer anticuerpo se incuba con la isoforma de apolipoproteína que va a determinarse unida a la superficie durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente durante al menos 60 minutos. En una realización particular, el segundo anticuerpo se incuba con las isoformas de la apolipoproteína que va a determinarse unida a la superficie durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente durante al menos 60 minutos.

En una tercera etapa del segundo método de la invención, se detectan los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa del método.

Tal como se describió anteriormente, la superficie a la que se une la apolipoproteína y que se pone en contacto con el primer anticuerpo puede ser la misma que o diferente de la superficie a la que se une la apolipoproteína y se pone en contacto con el segundo anticuerpo. En una realización particular, cuando dichas superficies son superficies diferentes y el contacto se realiza en envases separados, la detección en la etapa (iii) del segundo método de la invención se realiza por separado en cada envase.

En una realización preferida del segundo método de la invención, la superficie usada en la etapa (i) está formada por una pluralidad de entidades, el contacto con el primer anticuerpo y con el segundo anticuerpo en la etapa (ii) se realiza en envases separados, que contienen cada parte de la pluralidad de entidades que forman la superficie, y la detección en la etapa (iii) se lleva a cabo por separado en cada envase. Esta realización se prefiere particularmente cuando las superficies de poliestireno están comprendidas por perlas, preferiblemente perlas Luminex o perlas turbidimétricas, y la detección se realiza por medio de inmunoturbidimetría. Por tanto, según esta realización de la invención, los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa de los métodos se detectan mediante turbidimetría, particularmente por medio de un ensayo inmunoturbidimétrico. La formación de un complejo de apolipoproteína (todas las isoformas de la misma)-anticuerpo o un complejo de isoforma de apolipoproteína-anticuerpo, cuando dicha apolipoproteína o isoforma de apolipoproteína está presente en la muestra que va a analizarse, da como resultado un aumento de la turbidez en comparación con la turbidez en una muestra que carece de la apolipoproteína o isoforma de apolipoproteína, en el que dicha variación de turbidez puede medirse (por ejemplo, por medio de un espectrofotómetro). En una realización preferida de la invención, el ensayo inmunoturbidimétrico es LEIT.

En una realización particular alternativa, los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa del método se detectan por medio de un reactivo detectable. En el contexto de la invención se han descrito anteriormente

reactivos detectables adecuados en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento. En una realización preferida, los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa del método se detectan por medio de un anticuerpo indicador, que es específico para el anticuerpo anti-apolipoproteína y/o el anticuerpo anti-isoforma de apolipoproteína. En una realización preferida, el segundo anticuerpo (anticuerpo indicador) está conjugado con una enzima, en condiciones similares a las condiciones de incubación de la superficie con la isoforma de apolipoproteína y/o de incubación del anticuerpo específico para la isoforma de apolipoproteína con la isoforma de apolipoproteína unida a la superficie. Esta realización se prefiere particularmente cuando el poliestireno de superficies de policarbonato está comprendido por una placa, preferiblemente una placa de ELISA, y cuando se realiza detección por medio de un ensayo ELISA.

En una cuarta etapa del segundo método de la invención, se determinan las cantidades relativas de la isoforma con respecto al contenido de apolipoproteína total basándose en los niveles del primer y segundo complejo obtenidos en la etapa (iii).

En una realización particular, se calcula la razón entre las señales derivadas de la detección de los complejos primero y segundo detectados en la etapa (iii) del segundo método de la invención. Como resultado, se determina la cantidad relativa de una isoforma de una apolipoproteína particular con respecto al contenido total de dicha apolipoproteína. Tal como conoce el experto, la razón puede oscilar entre 0 (cuando la isoforma particular de apolipoproteína está ausente en la muestra que va a analizarse) y 1 (cuando la isoforma particular de apolipoproteína es la única isoforma de dicha apolipoproteína presente en la muestra que va a analizarse).

Método de determinación de la dosificación alélica

Se describe un método para determinar si un sujeto es un portador homocigótico o heterocigótico para una isoforma particular de apolipoproteína basándose en un ensayo doble de una muestra del sujeto, en el que un ensayo determina los niveles de la isoforma particular de apolipoproteína y el otro ensayo determina los niveles de la apolipoproteína total. Entonces se calcula la razón de isoforma de apolipoproteína/apolipoproteína total y, a partir de esta razón, puede deducirse la dosificación alélica. Véase el ejemplo 1. También se ha determinado el contenido de isoforma de apolipoproteína mediante un ensayo inmunoturbidimétrico. Véase el ejemplo 2.

Se describe en el presente documento un método para determinar la dosificación alélica de haplotipos asociados con la expresión de una isoforma de apolipoproteína en un sujeto que comprende:

(i) poner en contacto una muestra que contiene proteínas de dicho sujeto derivada de un tejido en el que se expresa la isoforma de apolipoproteína con una superficie de poliestireno o policarbonato en condiciones adecuadas para la unión de la isoforma de apolipoproteína a la superficie, en el que la superficie no contiene anticuerpos específicos para dicha isoforma de apolipoproteína unidos a la misma,

(ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con al menos un anticuerpo específico para la isoforma de apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína,

(iii) determinar la dosificación alélica de la isoforma de apolipoproteína correlacionando la cantidad de complejo formado en la etapa (ii) con el número de alelos que codifican para dicha variante genética.

Se describe en el presente documento un método para determinar la dosificación alélica de haplotipos asociados con la expresión de una isoforma de apolipoproteína de una apolipoproteína seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ (clusterina) en un sujeto que comprende,

(i) poner en contacto una muestra que contiene proteínas de dicho sujeto derivada de un tejido en el que se expresa la isoforma de apolipoproteína con una superficie de poliestireno o policarbonato en condiciones adecuadas para la unión de la isoforma de apolipoproteína a la superficie, en el que la superficie no contiene anticuerpos específicos para dicha isoforma de apolipoproteína unidos a la misma,

(ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con al menos un anticuerpo específico para la isoforma de apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína,

(iii) determinar la dosificación alélica de la isoforma de apolipoproteína correlacionando la cantidad de complejo formado en la etapa (ii) con el número de alelos que codifican para dicha variante genética

en el que la superficie de poliestireno o la superficie de policarbonato no se trata antes del contacto con la muestra ni se bloquea con albúmina antes del contacto con la muestra.

Las isoformas de apolipoproteínas que van a determinarse según el método descrito incluyen las isoformas apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ (clusterina). Tal como se describe en el presente documento las

isoformas de apolipoproteínas que van a determinarse según el método son isoformas de apolipoproteínas apoE seleccionadas del grupo que consiste en apoE2, apoE3 y apoE4. La isoforma de apolipoproteína que va a determinarse según el método es apoE4.

5 En una primera etapa, una muestra que contiene proteínas de un sujeto derivada de un tejido en el que se expresa la isoforma de apolipoproteína se pone en contacto con una superficie de poliestireno o policarbonato en condiciones adecuadas para la unión de la apolipoproteína o la isoforma de la misma en la muestra a la superficie, en el que dicha superficie no contiene anticuerpos específicos para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma unidos a la misma.

10 Se han descrito anteriormente condiciones para la unión de una apolipoproteína o isoforma de la misma en una muestra a una superficie de poliestireno o policarbonato, preferiblemente poliestireno, en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento.

15 La muestra es una muestra que contiene proteínas derivada de un tejido en el que se expresa la isoforma de apolipoproteína. Las muestras adecuadas incluyen fluidos biológicos tales como sangre, plasma, suero, orina, saliva, orina y líquido cefalorraquídeo (LCR), tal como se describió anteriormente. En una realización particular, la muestra es una muestra de plasma. Las diluciones adecuadas de una muestra de plasma oscilan entre 1:10 y 1:100000, preferiblemente entre 1:100 y 1:1000, más preferiblemente la dilución de la muestra de plasma es de 1:200.

20 La superficie de poliestireno o policarbonato no contiene ningún anticuerpo específico para la apolipoproteína o isoforma de la misma unido a la misma y para el que se realiza detección. Las superficies de poliestireno o policarbonato se han mencionado anteriormente y se incorporan en el presente documento. En una realización particular, la superficie de poliestireno está comprendida por una placa de ELISA, perlas Luminex o perlas turbidimétricas. En cualquier caso, dicha superficie de poliestireno o policarbonato no contiene anticuerpos que sean específicos para la apolipoproteína o isoforma de la misma que van a unirse a dicha superficie.

25 La superficie de poliestireno o policarbonato está formada por una sola entidad, de modo que dicha sola entidad proporciona la superficie necesaria para la unión de la apolipoproteína, por ejemplo una sola placa tal como una sola placa de ELISA. Alternativamente, la superficie de poliestireno o policarbonato está formada por una pluralidad de entidades, es decir, por al menos dos unidades de la entidad que proporciona la superficie disponible para la unión de la apolipoproteína a dicha superficie, por ejemplo una pluralidad de perlas tales como perlas Luminex o perlas turbidimétricas. La superficie de poliestireno o policarbonato que va a ponerse en contacto con una muestra en condiciones adecuadas para la unión de la apolipoproteína en dicha muestra a la superficie está formada por una pluralidad de entidades. Preferiblemente, dicha superficie está formada por perlas Luminex o por perlas turbidimétricas.

30 La superficie de poliestireno o policarbonato no se trata antes del contacto con la muestra. La superficie de poliestireno o policarbonato se bloquea antes del contacto con la muestra, es decir, la superficie se bloquea antes de la etapa de unión (i) del método. La superficie de poliestireno o policarbonato se bloquea antes de la etapa de unión mediante una proteína distinta de una apolipoproteína y/o mediante un detergente. Se han descrito anteriormente proteínas y detergentes adecuados para bloquear la superficie según la invención y se incorporan en el presente documento. Proteínas particularmente preferidas para el bloqueo son BSA, caseína y gelatina, más preferiblemente, BSA, incluso más preferiblemente, BSA que oscila entre el 1% y el 3%, más preferiblemente BSA al 1%. Los detergentes adecuados para bloquear la superficie antes de la etapa de unión incluyen, sin limitación, polivinilpirrolidona-40 (PVP-40), polisorbato 20 (Tween 20), Nonidet-P40 y Triton X-100.

35 La superficie de poliestireno o policarbonato se trata con una disolución de lavado tras el contacto con una muestra, es decir, la superficie de poliestireno o policarbonato se trata con una disolución de lavado tras la etapa de unión (i) del método. Preferiblemente, el tratamiento de HCl 2 M y ácido fórmico al 70%. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado se realiza tras la etapa de unión (i) y antes de la etapa (ii) del método. Se han descrito anteriormente disoluciones de lavado adecuadas y se incorporan en el presente documento. La disolución de lavado contiene una o más sales. Preferiblemente, la sal contenida por la disolución de lavado es NaCl. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene al menos un detergente. Preferiblemente, el detergente se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (Tween 20) y Triton X-100. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un ácido. Preferiblemente, el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl y ácido fórmico. Más preferiblemente, el ácido se selecciona de HCl 2 M y ácido fórmico al 70%. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene una base. Preferiblemente, la base es NaOH, más preferiblemente NaOH 2 M. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un agente reductor. Preferiblemente, el agente reductor es 2-mercaptoetanol. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado no contiene un detergente enzimático (tal como una proteasa), un reactivo oxidante (tal como hipoclorito de sodio) o la combinación de los mismos.

40 La superficie de poliestireno o policarbonato se trata con una disolución de lavado tras el contacto con una muestra, es decir, la superficie de poliestireno o policarbonato se trata con una disolución de lavado tras la etapa de unión (i) del método. Preferiblemente, el tratamiento de HCl 2 M y ácido fórmico al 70%. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado se realiza tras la etapa de unión (i) y antes de la etapa (ii) del método. Se han descrito anteriormente disoluciones de lavado adecuadas y se incorporan en el presente documento. La disolución de lavado contiene una o más sales. Preferiblemente, la sal contenida por la disolución de lavado es NaCl. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene al menos un detergente. Preferiblemente, el detergente se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (Tween 20) y Triton X-100. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un ácido. Preferiblemente, el ácido se selecciona del grupo que consiste en HCl y ácido fórmico. Más preferiblemente, el ácido se selecciona de HCl 2 M y ácido fórmico al 70%. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene una base. Preferiblemente, la base es NaOH, más preferiblemente NaOH 2 M. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado contiene un agente reductor. Preferiblemente, el agente reductor es 2-mercaptoetanol. Adicional o alternativamente, la disolución de lavado no contiene un detergente enzimático (tal como una proteasa), un reactivo oxidante (tal como hipoclorito de sodio) o la combinación de los mismos.

45 En una segunda etapa del método, la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) se pone en contacto con al menos un anticuerpo específico para la isoforma de apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína.

El método comprende además poner en contacto la superficie con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína presente en la muestra, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína.

Los anticuerpos específicos para apolipoproteínas y anticuerpos específicos para isoformas de apolipoproteínas particulares se han mencionado anteriormente en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento.

El experto en la técnica puede determinar condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína e incluyen temperatura, tiempo de incubación y pH apropiados, tal como se describió anteriormente. En una realización particular, la temperatura oscila entre 4 y 40°C, en particular entre 10 y 35°C, más particularmente entre 15 y 30°C, preferiblemente entre 20 y 25°C (temperatura ambiente). En una realización preferida, la temperatura en las etapas (i) y (ii) del tercer método de la invención es sustancialmente la misma. En una realización particular, el pH oscila entre pH 2 y pH 10, preferiblemente entre pH 4 y pH 10. El pH en las etapas (i) y (ii) del método es sustancialmente el mismo. El primer anticuerpo se incuba con la isoforma de apolipoproteína que va a determinarse unida a la superficie durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente durante al menos 60 minutos. El segundo anticuerpo se incuba con las isoformas de la apolipoproteína que van a determinarse unidas a la superficie durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, incluso más preferiblemente durante al menos 60 minutos.

La superficie a la que se une la apolipoproteína y que se pone en contacto con el primer anticuerpo es la misma superficie a la que se une la apolipoproteína y se pone en contacto con el segundo anticuerpo, es decir, el contacto se realiza en un solo envase, por ejemplo, un solo pocillo en una placa tal como una placa de ELISA. Por tanto, el contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína y el primer anticuerpo se realiza en el mismo envase que aquel en el que se realiza el contacto con un segundo anticuerpo. Alternativamente, una primera superficie a la que se une la apolipoproteína se pone en contacto con el primer anticuerpo y una segunda superficie a la que se une la apolipoproteína se pone en contacto con el segundo anticuerpo, en el que dichas superficies primera y segunda son superficies diferentes, tal como a modo de ejemplo, pocillos diferentes en una placa (tal como una placa de ELISA), perlas diferentes (tales como perlas Luminex de perlas turbidimétricas) o partículas diferentes. Por tanto, el contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína y el primer anticuerpo se realiza en un envase diferente del envase en el que se realiza el contacto entre la superficie a la que se une la apolipoproteína y el segundo anticuerpo, es decir, se usan envases separados. Cuando se usan envases separados, cada uno de dichos envases comprende una pluralidad de entidades, por ejemplo dos conjuntos separados de perlas (tales como perlas Luminex de perlas turbidimétricas) o dos conjuntos separados de partículas.

La superficie usada en la etapa (i) está formada por una pluralidad de entidades, y el contacto con el primer anticuerpo y con el segundo anticuerpo en la etapa (ii) se realiza en envases separados, conteniendo cada uno parte de la pluralidad de entidades que forman la superficie.

La dosificación alélica de la isoforma de apolipoproteína se determina correlacionando la cantidad de complejo formado en la etapa (ii) con el número de alelos que codifican para dicha variante genética.

La determinación de las cantidades relativas de la isoforma con respecto al contenido de apolipoproteína total se lleva a cabo basándose en los niveles del primer y segundo complejo obtenidos en la etapa (ii) y en el que la dosificación alélica de haplotipos asociada con la expresión de una isoforma de apolipoproteína la isoforma de apolipoproteína se determina a partir de las cantidades relativas determinadas en (iii).

Se calcula la razón entre las señales derivadas de la detección de los complejos primero y segundo detectados en la etapa (ii). Como resultado, se determina la cantidad relativa de una isoforma de una apolipoproteína particular con respecto al contenido total de dicha apolipoproteína. Tal como conoce el experto en la técnica, la razón puede oscilar entre 0 (cuando la isoforma particular de apolipoproteína está ausente en la muestra que va a analizarse) y 1 (cuando la isoforma particular de apolipoproteína es la única isoforma de dicha apolipoproteína presente en la muestra que va a analizarse). Por tanto, una razón igual a cero se refiere a la ausencia de la isoforma de apolipoproteína en la muestra analizada. Una razón igual a 1, en la que 1 es un valor arbitrario en unidades arbitrarias, se refiere a un sujeto homocigoto para la isoforma de apolipoproteína. Una razón igual a 0,5, en la que 0,5 es un valor arbitrario en unidades arbitrarias, se refiere a un sujeto heterocigoto para la isoforma de apolipoproteína. Se han descrito anteriormente métodos para detectar los complejos y se incorporan en el presente documento.

La superficie usada en la etapa (i) está formada por una pluralidad de entidades, el contacto con el primer anticuerpo

y con el segundo anticuerpo en la etapa (ii) se realiza en envases separados, conteniendo cada uno parte de la pluralidad de entidades que forman la superficie, y la detección en la etapa (iii) se lleva a cabo por separado en cada envase. Esto se prefiere particularmente cuando las superficies de poliestireno están comprendidas por perlas, preferiblemente perlas Luminex o perlas turbidimétricas, y la detección se realiza por medio de inmunoturbidimetría. Por tanto, los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa del método se detectan mediante turbidimetría, particularmente por medio de un ensayo inmunoturbidimétrico. La formación de un complejo de apolipoproteína (todas las isoformas de la misma)-anticuerpo o un complejo de isoforma de apolipoproteína-anticuerpo, cuando dicha apolipoproteína o isoforma de apolipoproteína está presente en la muestra que va a analizarse, da como resultado un aumento de turbidez en comparación con la turbidez en una muestra que carece de la apolipoproteína o isoforma de apolipoproteína, en el que dicha variación de turbidez puede medirse (por ejemplo, por medio de un espectrofotómetro). El ensayo inmunoturbidimétrico es LEIT.

Los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa del método se detectan por medio de un reactivo detectable. Se han descrito anteriormente reactivos detectables adecuados y se incorporan en el presente documento. En una realización preferida, los complejos primero y segundo formados en la segunda etapa del método se detectan por medio de un anticuerpo indicador, que es específico para el anticuerpo anti-apolipoproteína y/o el anticuerpo anti-isoforma de apolipoproteína. El segundo anticuerpo (anticuerpo indicador) está conjugado con una enzima, en condiciones similares a las condiciones de incubación de la superficie con la isoforma de apolipoproteína y/o de incubación del anticuerpo específico para la isoforma de apolipoproteína con la isoforma de apolipoproteína unida a la superficie. Esto se prefiere particularmente cuando el poliestireno de superficies de policarbonato está comprendido por una placa, preferiblemente una placa de ELISA, y cuando se realiza detección por medio de un ensayo ELISA.

Como resultado, una razón igual a cero identifica la ausencia de una isoforma de apolipoproteína en la muestra analizada, es decir, la dosificación para un alelo particular que codifica para una variante genética es cero. Una razón igual a 1 se refiere a un sujeto homocigoto para la isoforma de apolipoproteína, es decir, la dosificación de un alelo particular que codifica para una variante genética es dos. Una razón igual a 0,5 se refiere a un sujeto heterocigoto para la isoforma de apolipoproteína, es decir, está presente una dosis de un alelo particular que codifica para una variante genética.

La superficie usada en la etapa (i) está formada por una pluralidad de entidades, la etapa (ii) comprende además poner en contacto la superficie con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína presentes en la muestra, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína, en el que el contacto con el primer y con el segundo anticuerpo se lleva a cabo en envases separados, conteniendo cada uno parte de la pluralidad de entidades que forman la superficie, en el que la determinación de las cantidades relativas de la isoforma con respecto al contenido de apolipoproteína total se lleva a cabo basándose en los niveles del primer y segundo complejo obtenidos en la etapa (ii), y la dosificación alélica de haplotipos asociados con la expresión de una isoforma de apolipoproteína la isoforma de apolipoproteína se determina a partir de las cantidades relativas determinadas en la etapa (iii).

Métodos para la predicción del desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa

Se sabe que presencia del gen de ApoE ϵ 4 en el cromosoma 19 en un sujeto aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad de Alzheimer (AD) en dicho sujeto. Por consiguiente, se ha determinado que la presencia de un alelo de apoE4 en un sujeto está relacionada con una probabilidad aumentada cuatro veces de desarrollo de AD que un sujeto que no porta alelos de apoE4, y la presencia de dos alelos de apoE4 en un sujeto está relacionada con una probabilidad aumentada 15-20 veces de desarrollo de AD que un sujeto que no porta alelos de apoE4. Por tanto, los métodos de la invención para determinar isoformas de apolipoproteínas, incluyendo apoE4, pueden aplicarse a la predicción del desarrollo de AD en un sujeto.

Por tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad neurodegenerativa que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de isoforma apoE4 mediante cualquiera de los métodos de la invención previamente descritos (métodos primero, segundo), en el que si los niveles de apoE4 están por encima de un valor de referencia, esto es indicativo de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa.

El valor de referencia según el método de la invención para determinar la probabilidad de desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa es el nivel de apoE4 tal como se determina en una muestra de un sujeto que no porta alelos de apoE4.

El valor de referencia o nivel de referencia según los métodos de la invención puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior y/o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; una mediana de valores, un valor medio o un valor en comparación con un valor de nivel inicial o control particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, tal como por ejemplo, un valor obtenido a partir de una

muestra del sujeto que está sometiéndose a prueba, pero en un punto de tiempo anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tal como a partir de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o basarse en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a prueba. Se tienen en cuenta diversas consideraciones cuando se determina el valor de referencia del marcador. Entre tales consideraciones están la edad, el peso, el sexo, el estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 5
10, de al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo según diversas categorías de edad.

Se produce una alta probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa en una situación en la que el sujeto muestra al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 100% de probabilidades de desarrollar o padecer dicha enfermedad a lo largo del tiempo. En una realización particular, una alta probabilidad es al menos el 100%. En otras realizaciones, una alta probabilidad es al menos el 200%, al menos el 300%, al menos el 400%, al menos el 500%, al menos el 700%, al menos el 800%, al menos el 900% y al menos el 1000%. Sin embargo, también se contemplan otros intervalos o cortes considerados adecuados por el experto en la técnica para caracterizar la invención, y están también dentro del alcance de la presente invención. Según el método de predicción de la invención, una alta probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa por un sujeto se refiere a la presencia de uno o dos alelos de apoE4 en el genoma de dicho sujeto, en el que la determinación de dichos alelos de apoE4 se realiza mediante cualquiera de los métodos primero, segundo o tercero de la invención tal como se describió anteriormente.

Se produce una baja probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa en una situación en la que el sujeto muestra al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 100% de probabilidades de no desarrollar ni padecer dicha enfermedad a lo largo del tiempo. En una realización particular, una baja probabilidad es al menos el 100%. En otras realizaciones, una baja probabilidad es al menos el 200%, al menos el 300%, al menos el 400%, al menos el 500%, al menos el 700%, al menos el 800%, al menos el 900% y al menos el 1000%. Sin embargo, también se contemplan otros intervalos o cortes considerados adecuados por el experto en la técnica para caracterizar la invención, y están también dentro del alcance de la presente invención. Según el método de predicción de la invención, una baja probabilidad de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa por un sujeto se refiere a la no presencia de alelos de apoE4 en el genoma de dicho sujeto, en el que la determinación de dichos alelos de apoE4 se realiza mediante cualquiera de los métodos primero, segundo o tercero de la invención tal como se describió anteriormente.

En una realización particular, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (AD), angiopatía amiloide cerebral (CAA), demencia asociada con síndrome de Down, demencia vascular, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. En una realización más particular, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer (AD).

Se describe además un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad neurodegenerativa que comprende determinar en dicho sujeto la dosificación alélica del haplotipo que codifica para la isoforma ApoE4, en el que la presencia de uno o dos alelos de apoE4 en el genoma del sujeto es indicativa de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa, y en el que la no presencia de alelos de apoE4 en el genoma del sujeto es indicativa de que el sujeto tiene una baja probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa.

La enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (AD), angiopatía amiloide cerebral (CAA), demencia asociada con síndrome de Down, demencia vascular, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. La enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer (AD).

Métodos para la predicción del desarrollo de enfermedad cardiovascular

Las deficiencias en apolipoproteínas se han asociado con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Por tanto, pueden aplicarse los métodos para determinar apolipoproteínas e isoformas de apolipoproteínas también a la predicción del riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Se describe un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad cardiovascular que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de una isoforma de apolipoproteína, en el que si los niveles de isoforma de apolipoproteína están por encima de un valor de referencia, esto es indicativo de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular.

Se describe un método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad cardiovascular que comprende determinar en dicho sujeto la dosificación alélica del haplotipo que codifica para una isoforma de apolipoproteína, en el que la presencia de uno o dos alelos de dicha isoforma de apolipoproteína en el genoma del

5 sujeto es indicativa de que dicho sujeto tiene una probabilidad más alta de padecer una enfermedad cardiovascular, y en el que la no presencia de alelos de dicha isoforma de apolipoproteína en el genoma del sujeto es indicativa de que dicho sujeto tiene una probabilidad más baja de padecer una enfermedad cardiovascular. La isoforma de apolipoproteína que va a determinarse es una isoforma de apoE, particularmente seleccionada del grupo que consiste en las isoformas de apoE apoE E2, apoE E3 y apoE E4, y la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en hiperlipoproteinemia de tipo III (también conocida como disbetalipoproteinemia o enfermedad beta amplia, un trastorno genético poco común caracterizado por un metabolismo inapropiado de lípidos, específicamente colesterol y triglicéridos, que da como resultado la acumulación anómala de lípidos en el cuerpo o hiperlipidemia), disbetalipoproteinemia debida a un defecto en la apolipoproteína e-d, hiperbetalipoproteinemia familiar (acumulación aumentada de lipoproteínas de baja densidad o beta-lipoproteínas en la sangre) y prebetalipoproteinemia (exceso de lipoproteínas de muy baja densidad o lipoproteínas pre-beta en la sangre), hipercolesterolemia familiar con hiperlipemia, hiperlipemia con xantomatosis hipercolesterolémica familiar (deposición de acumulaciones ricas en colesterol en el cuerpo), betalipoproteinemia amplia (un estado caracterizado por el desarrollo de áreas de grasa en exceso en diferentes partes del cuerpo, de modo que se almacena grasa en lugares anómalos por todo el cuerpo incluyendo la palma de las manos, los dedos, las rodillas, los codos y bajo los brazos), betalipoproteinemia flotante y arteriopatía coronaria (endurecimiento y estrechamiento de las arterias que suministran sangre al músculo cardíaco, dando como resultado aterosclerosis e incluso angina de pecho o ataque al corazón).

20 La apolipoproteína que va a determinarse es apoAI, y la enfermedad cardiovascular es hipoalfalipoproteinemia (una deficiencia de HDL, heredada de una manera autosómica dominante).

25 La apolipoproteína que va a determinarse es apoCII, y la enfermedad cardiovascular es hiperlipoproteinemia de tipo Ib (un estado heredado poco común que resulta de niveles de apoCII bajos que se caracteriza por altos niveles de quilomicrones).

La apolipoproteína que va a determinarse es apoCIII, y la enfermedad cardiovascular es deficiencia de apoCIII asociada con hipertriglicidemia (niveles en sangre aumentados de triglicéridos).

30 Kits y usos de los mismos

Se describe un kit que comprende una superficie de poliestireno y un anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma, en el que el kit no comprende un segundo anticuerpo específico para dicha apolipoproteína o isoforma de la misma.

35 Por tanto, un primer elemento del kit es una superficie de poliestireno. Se han descrito anteriormente superficies de poliestireno en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento. Preferiblemente, la superficie es una superficie de poliestireno. En una realización particular, la superficie de poliestireno está comprendida por una placa de ELISA, perlas Luminex, perlas turbidimétricas o un alineamiento de proteínas. Superficies preferidas particulares son superficies de poliestireno incluyendo, sin limitación, placas tales como placas de ELISA, perlas tales como perlas Luminex y perlas turbidimétricas, y partículas.

40 Un segundo elemento del kit es un anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma. Las apolipoproteínas según el kit incluyen apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ (clusterina). Las isoformas de apolipoproteínas según el kit incluyen las isoformas apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ. Se han descrito anteriormente anticuerpos específicos para una apolipoproteína o isoforma de la misma y se incorporan en el presente documento. La apolipoproteína es apoE y el anticuerpo es un anticuerpo anti-apoE. Las isoformas de apolipoproteínas son isoformas de apoE seleccionadas del grupo que consiste en apoE2, apoE3 y apoE4, y los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos anti-apoE2, anti-apoE3 y anti-apoE4.

50 El anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma del kit se une a la superficie de poliestireno.

55 El kit no comprende un segundo anticuerpo específico para la apolipoproteína particular o la isoforma particular de la misma para la que el anticuerpo comprendido por el kit es específico. Sin embargo, cuando el anticuerpo comprendido por el kit es un anticuerpo específico para una isoforma particular de apolipoproteína, entonces el kit puede comprender además un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína particular.

60 En una realización particular, el kit comprende además un anticuerpo indicador, en el que dicho anticuerpo indicador es específico para el anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma comprendida por dicho kit. El anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma del kit comprende un reactivo detectable. Se han descrito anteriormente reactivos detectables en el contexto del primer método de la invención y se incorporan en el presente documento.

65 En una realización adicional, la invención se refiere al uso *in vitro* del kit tal como se describió anteriormente para

detectar y/o cuantificar una apolipoproteína o isoforma de la misma en una muestra, para determinar la cantidad relativa de una isoforma de una apolipoproteína dada con respecto al contenido total de dicha apolipoproteína en una muestra, para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad neurodegenerativa.

5 La invención se refiere al uso *in vitro* de un kit tal como se describió anteriormente para detectar y/o cuantificar una apolipoproteína seleccionada del grupo que consiste en apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apoCIII, apoE y apoJ o una isoforma de la misma, en el que la superficie de poliestireno se bloquea con albúmina, incluso más preferiblemente en el que la albúmina es BSA. Se han descrito detalles particulares de estas determinaciones a lo largo de la presente descripción y se incorporan en el presente documento.

10 La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Detección de ApoE4 mediante ELISA

Materiales y equipo

20 • Pueden usarse placas de ELISA de alta unión (placa de 96 pocillos de fondo plano MaxiSorp® de Nunc. Pueden usarse marcas y tipos de placas de ELISA alternativos con resultados similares.

• Superblock en TBS (Thermo-Fisher, n.º PI-37535). Se han usado reactivos de bloqueo alternativos, incluyendo gelatina, BSA, caseína, Tween-20, entre otros, con resultados similares.

25 • Anticuerpo monoclonal de ratón específico para apoE E4, clon 4E4 (Novus Biologicals, n.º NBP1-49529).

Se han usado anticuerpos alternativos específicos para apoE E4 (anticuerpo monoclonal de ratón específico para apoE E4, clon 5B5 (IBL n.º 10025); anticuerpo monoclonal de ratón específico para apoE E4, clon 1F9 (MBL, n.º M067-3)).

30 • Anticuerpo policlonal de conejo para apoE total (SantaCruz Biotechnology, Inc., n.º sc-98573)

• Polisorbato-20 (Tween-20) de Sigma-Aldrich

35 • Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa.

• Sustrato de EIA peroxidasa TMB (Biorad)

40 • Estación de lavado de ELISA (TECAN)

• Espectrofotómetro de ELISA (TECAN)

Método de detección

45 • Bloquear las placas de ELISA añadiendo 200 µl de Superblock (SB) en solución salina tamponada con Tris (TBS) durante 16 a temperatura ambiente (TA)

50 • Lavar 2 veces con 300 µl de TBS Tween20 al 0,1% en la estación de lavado de ELISA.

• Incubar 100 µl de plasma diluido 1:200 en TBS + SB al 20% durante 1 hora a TA.

• Lavar 4 veces con 300 µl de TBS Tween20 al 0,1% en la estación de lavado de ELISA.

55 • Incubar con 50 µl de anticuerpo indicador: anticuerpo 4E4 diluido 1:2.000 en TBS + SB al 20% durante 45 min a TA.

• Lavar 4 veces con 300 µl de TBS Tween20 al 0,1% en la estación de lavado de ELISA.

60 • Incubar con 50 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón-peroxidasa (1:10.000) en TBS + SB al 20% durante 30 min.

• Lavar 4 veces con 300 µl de TBS Tween20 al 0,1% en la estación de lavado de ELISA.

65 • Revelar añadiendo 100 µl de TMB durante 10 minutos en condiciones de oscuridad.

- Detener añadiendo 100 µl de H2SO4 2,15 N.
- Leer la placa en el espectrofotometro a 450 nm con referencia a 750 nm.

5 Se han analizado diferentes diluciones de las muestras de plasma, que oscilan entre 1:20 y >1:80000. Los mejores resultados de discriminación se obtienen en el intervalo entre 1:100 y 1:1.000. Para el ensayo mostrado con el presente documento, la dilución de plasma usada es de 1:200, a menos que se establezca otra cosa.

10 Alternativamente, se usaron otros anticuerpos monoclonales específicos para apoE E4 tales como 5B5 y 1F9, pero los mejores resultados se obtuvieron con el clon 4E4.

Los tiempos de incubación pueden acortarse sin variaciones importantes en los resultados.

15 Pueden analizarse diferentes fluidos biológicos mediante el protocolo descrito con el presente documento, pero la dilución óptima de la muestra tiene que determinarse según la concentración de apoE de partida.

Resultados

Discriminación de la ausencia/presencia de apoE E4 en muestras de plasma

20 Se detectó la presencia/ausencia de ApoE4 usando el protocolo descrito anteriormente usando placas de poliestireno y un anticuerpo monoclonal específico para la isoforma E4. Se analizaron 230 muestras de plasma de individuos previamente genotipados mediante PCR en tiempo real (e2/e3, n=16; e2/e4, n=4; e3/e3, n=141; e3/e4, n=59; e4/e4, n=10). La validación del ensayo (73 portadores de ApoE4, 157 no portadores de ApoE4) reveló el 25 100% de concordancia con el genotipado de ApoE mediante PCR en tiempo real (véase la figura 1 y la tabla 1).

Tabla 1. Distribución de genotipos y lecturas de ELISA de 230 muestras de plasma analizadas para el isotipado de apoE4

Genotipo de ApoE	n	Media	Desv. est.	Mínimo	Máximo
2/3	16	0,0010	0,0025	-0,001	0,008
3/3	141	0,0020	0,0045	-0,004	0,036
2/4	4	3,087	0,2189	2,713	3,097
3/4	59	3,093	0,3787	1,322	3,471
4/4	10	3,226	0,2124	2,788	3,557

30 Según los resultados mostrados en la tabla 1 y la figura 2, las muestras de plasma de APOE e4/4 homocigota tienden a tener lecturas de absorbancia más altas que APOE e3/e4 y e2/e4 heterocigotas, lo que sugiere que es posible diferenciar e4 homocigota de heterocigota (véase la figura 3), aunque hay un cierto solapamiento entre los grupos.

Discriminación de los portadores APOE ε4 heterocigota/homocigota en muestras de plasma

40 Alternativamente, puede lograrse la discriminación adicional entre muestras heterocigotas y homocigotas realizando un ensayo de ELISA doble para cada muestra, uno específico para apoE E4 y el otro para determinar los niveles de apoE total (anticuerpo indicador: pan-apoE, por ejemplo pan-apo policlonal, SantaCruz Biotech., H-223, n.º sc-98573). Tal como se muestra en la figura 4, la razón apoE E4/apoE total es una buena aproximación de la dosificación de alelos de APOE ε4. La potencia de discriminación es buena para las tres diluciones estudiadas (figura 4).

Unión de diferentes apolipoproteínas a la superficie de poliestireno

50 Con el fin de explorar la unión de otras apolipoproteínas a la superficie de poliestireno, se realizó un protocolo de ELISA tal como se describió anteriormente, en el que se usaron diferentes anticuerpos indicadores específicos para determinadas apolipoproteínas. El análisis de los resultados indicó que apoCI, apoAI, apoCIII, apoE total y clusterina son capaces de unirse a la placa de un modo similar a apoE E4 (véase la figura 5).

Unión estable de apoE a la superficie de poliestireno

55 Con el fin de caracterizar adicionalmente la naturaleza de la unión apoE-poliestireno, se analizó la capacidad de diferentes tampones que contienen sal (NaCl 0-2,4 M) o detergente (polisorbato 20 o Triton X-100 desde 0-0,5%) para eliminar la apoE unida a la placa de poliestireno. Para este propósito, tras la unión de la apoE presente en plasma (dilución 1:200), se incubaron los pocillos durante 1 hora a TA con los diferentes tampones de interés, se lavaron y se continuó el ensayo tal como se describió previamente antes. Tal como se muestra en la figura 6, la presencia de una concentración creciente de o bien NaCl o bien detergentes potencia la detección de apoE en

comparación con el control sin sal o detergente. Estos resultados sugieren que la unión está mediada por una combinación de fuerzas tanto electrostáticas como hidrófobas (figura 6).

5 También se analizó la estabilidad la unión apoE-poliestireno en función del pH en el intervalo desde pH 2 hasta 10 en pocillos bloqueados con o bien una disolución de bloqueo a base de BSA o bien Superblock (figura 7). La unión de apoE a los pocillos de poliestireno bloqueados con BSA apenas se vio afectada por el pH en el intervalo estudiado. De manera interesante, la unión de apoE a los pocillos de poliestireno bloqueados con Superblock era inestable a pH por debajo de 5 (figura 7), lo que sugiere que la presencia de BSA puede ayudar a mantener un microentorno más estable debido a su propia capacidad de tamponamiento. Por tanto, se realizaron análisis de estabilidad adicionales en pocillos bloqueados con una disolución de BSA.

También se sometieron a ensayo condiciones más rigurosas (véase la figura 8) mediante tratamiento a 56°C durante 1 hora con:

- 15 - ácidos fuertes (HCl 2 M o ácido fórmico al 70%),
- bases fuertes (NaOH 2 M),
- 20 - una combinación de detergente aniónico y un agente reductor (SDS al 2% y 2-mercaptoetanol al 0,7%, “tampón de separación”),
- hipoclorito de sodio (20.000 ppm), y
- 25 - un detergente enzimático (agente de limpieza Coulter Clenz®, Beckman Coulter)

De manera interesante, los únicos reactivos que eran capaces de eliminar completamente la apoE unida a la placa son los que destruyen la proteína o bien mediante digestión (detergente enzimático) o bien mediante oxidación (hipoclorito de sodio) (figura 8).

30 Estos resultados indican que la interacción de unión apoE-poliestireno es altamente estable, siendo resistente a detergentes fuertes, lavados con ácidos y básicos. Estas propiedades pueden permitir que se emprendan inmunoensayos, análisis de microalineamientos de proteínas, ensayos turbidimétricos, etc. en condiciones altamente rigurosas y específicas, descartando la necesidad de procedimientos de purificación, fraccionamiento o concentración adicionales.

35 Se han observado resultados similares para la unión de otras apolipoproteínas a poliestireno; y por tanto, se trasladan conclusiones similares a otros procedimientos para diferentes apolipoproteínas.

40 Ejemplo 2. Detección de ApoE4 mediante un ensayo turbidimétrico

Materiales y equipo

- Muestras de plasma: 11 muestras de APOE e3/e3 y 6 de APOE e4/e4.
- 45 - Microesferas blancas de LEIT -NH2 recubiertas con Superblock, prot. 20141222143CM, n.º 143CM1
- Espectrofotometro, ref. UV-3100PC (VWR), código: PDX-1004
- 50 - Finnpipette F1 2-20 µl, ref. 4641060 (Thermoscientific, VWR), código: PDX-1009
- Finnpipette F1 20-200 µl, ref. 4641080 (Thermoscientific, VWR), código: PDX-1010
- MILI-Q ReferenceA+, ref. Z00QSV01
- 55 - Frigorífico combi Liebherr, ref. CN4056, código: PDM-1000
- Mezcladora de vórtex, ref. VX200 (Labnet, Era biotech), código: PDX-1013
- 60 - Baño de circulación calentado Optima, ref. TC120-ST12 (Grant, VWR), código: PDX-1028

Los ensayos turbidimétricos basados en tecnología de inmunoturbidimetría potenciada con látex (LEIT) se basan en el uso de perlas de poliestireno. Por tanto, los inventores usaron esta tecnología para el análisis de apoE E4 y otras apolipoproteínas aprovechando su interacción altamente estable y de alta afinidad con el poliestireno tal como se muestra para las placas de ELISA.

65 LEIT es menos sensible que ELISA, pero de manera interesante ofrece grandes ventajas para analitos concentrados

de manera relativamente alta tales como apolipoproteínas. LEIT permite realizar pruebas en 5-20 minutos y en un analizador de análisis clínicos común de acceso aleatorio completamente automatizado. El mayor coste de los materiales de partida usados por LEIT frente a ELISA se compensa completamente por el ahorro de tiempo, la facilidad y utilidad de la tecnología en los laboratorios clínicos. Entonces, se considera LEIT una técnica útil para la determinación de apoE.

El análisis preliminar de muestras de plasma con APOE e3/e3 y 6 APOE e4/e4 usando la tecnología LEIT y el 4E4 monoclonal indicó que el procedimiento es capaz de diferenciar portadores de APOE e4 de los no portadores (figura 9).

Método de detección (prueba 1)

Preparación de disoluciones de trabajo:

- 0,5 ml de disolución de anticuerpo monoclonal anti-apoE 4 0,176 mg/ml en PBS 10 mM pH 7,3.

- Disolver 88 µl de anticuerpo monoclonal en 412 µl.

Protocolo:

1. Transferir 14,6 µl de microesferas blancas de LEIT -NH2 a un tubo Eppendorf y añadir 131,4 µl de PBS con Tween20 al 0,01%. Homogeneizar con una micropipeta e incubar a 37°C durante 2 min.

2. Añadir 3,85 µl de disolución de muestra de apoE al mismo tubo Eppendorf, homogeneizar con una micropipeta e incubar de nuevo durante 2 min a 37°C.

3. Añadir 50 µl de disolución de anticuerpo monoclonal, homogeneizar con una micropipeta y transferir el volumen completo a una cubeta de cuarzo.

4. Leer la absorbancia durante un tiempo mínimo de 5 minutos y un tiempo máximo de 10 minutos.

Método de detección (prueba 2)

Preparación de disoluciones de trabajo:

- 0,5 ml de disolución de anticuerpo monoclonal anti-apoE 4 0,044 mg/ml en PBS 10 mM pH 7,3.

- Disolver 22 µl de anticuerpo monoclonal en 478 µl.

Protocolo:

1. Transferir 14,6 µl de microesferas blancas de LEIT -NH2 a un tubo Eppendorf y añadir 131,4 µl de PBS con Tween20 al 0,01% (n.º 144CM1). Homogeneizar con una micropipeta e incubar a 37°C durante 2 min.

2. Añadir 3,85 µl de disolución de muestra de apoE al mismo tubo Eppendorf, homogeneizar con una micropipeta e incubar de nuevo durante 2 min a 37°C.

3. Añadir 50 µl de disolución de anticuerpo monoclonal, homogeneizar con una micropipeta y transferir el volumen completo a una cubeta de cuarzo.

4. Leer la absorbancia durante un tiempo mínimo de 5 minutos y un tiempo máximo de 10 minutos.

Resultados

Prueba 1

Los resultados de las pruebas 1 y 2 para el análisis de apoE mediante LEIT a diferentes tiempos se muestran en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Análisis de 3 muestras de e4/e4, 3 de e3/e4 y 3 de e3/e3 mediante LEIT a diferentes tiempos mediante la prueba 1

Código de ID de genotipo	Absorbancia (u.a., λ = 540 nm)					
	4/4		3/4			
01-007	05-009	02-001	01-003	01-006	01-016	

ES 2 728 268 T3

t (min)	AcM	Sin AcM	AcM	AcM	AcM	AcM	AcM
0	0,935	0,921	0,954	0,960	0,907	0,916	0,887
1	0,941	0,917	0,956	0,963	0,905	0,916	0,886
2	0,952	0,916	0,963	0,970	0,904	0,918	0,888
3	0,963	0,915	0,972	0,980	0,905	0,921	0,892
4	0,971	0,915	0,983	0,990	0,905	0,924	0,897
5	0,978	0,915	0,992	0,999	0,905	0,927	0,902
$\Delta mAbs_{0-5}$	0,043	-0,006	0,038	0,039	-0,002	0,011	0,015

Absorbancia (u.a., $\lambda = 540$ nm)							
Código de ID de genotipo	3/3				CONTROLES		
	01-010		01-008	01-013	sin apoE	Suero de cabra	4/4 01-007
t (min)	AcM	Sin AcM	AcM	AcM	AcM	AcM	αM 0,176 mg/ml
0	0,970	0,903	0,924	0,932	0,888	0,884	0,882
1	0,967	0,900	0,920	0,929	0,887	0,881	0,878
2	0,966	0,899	0,918	0,928	0,888	0,880	0,877
3	0,966	-	0,918	0,928	0,888	0,880	0,876
4	0,967	0,898	0,920	0,928	0,891	0,880	0,875
5	0,969	0,898	0,921	0,928	0,895	0,881	0,875
$\Delta mAbs_{0-5}$	-0,001	-0,005	-0,003	-0,004	0,007	-0,003	-0,007

Tabla 3. Análisis de 6 muestras de e4/e4 y 11 de e3/e3 mediante LEIT a diferentes tiempos mediante la prueba 2

Absorbancia (u.a., $\lambda = 540$ nm)							
Código de ID de genotipo	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	01-121	01-122	01-123	01-124	01-116	01-117	01-118
t (min)	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml
0	1,026	0,978	0,944	0,898	0,990	0,992	0,967
1	1,020	0,976	0,927	0,893	0,988	0,986	0,964
2	1,018	0,976	0,926	0,890	0,986	0,984	0,962
3	1,018	0,976	0,925	0,889	0,986	0,983	0,962
4	1,018	0,978	0,925	0,889	0,986	0,984	0,962
5	1,018	0,980	0,926	0,889	0,987	0,984	0,963
$\Delta mAbs_{0-5}$	-0,008	0,002	-0,018	-0,009	-0,003	-0,008	-0,004

Código de ID de genotipo	3/3	3/3	3/3	3/3
	01-120	01-013	01-008	01-010
t (min)	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml
0	0,993	0,973	1,046	1,086
1	0,976	0,969	1,040	1,074
2	0,975	0,968	1,038	1,070
3	0,973	0,968	1,039	1,069
4	0,973	0,969	1,042	1,071
5	0,974	0,971	1,046	1,073
$\Delta mAbs_{0-5}$	-0,019	-0,002	0,000	-0,013

Absorbancia (u.a., $\lambda = 540$ nm)						
Código de ID de genotipo	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
	07-004	07-005	07-015	02-001	01-007	05-009
t (min)	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml	0,044 mg/ml
0	1,003	0,941	0,936	1,000	1,001	1,034
1	1,002	0,940	0,932	1,012	1,004	1,035
2	1,003	0,941	0,932	1,029	1,016	1,040
3	1,005	0,943	0,935	1,046	1,032	1,052
4	1,010	0,948	0,939	1,060	1,048	1,067
5	1,017	0,955	0,943	1,073	1,064	1,083
$\Delta mAbs_{0-5}$	0,014	0,014	0,007	0,073	0,063	0,049

A partir de los datos derivados de la prueba 1, los autores de la invención concluyeron que el ensayo de LEIT es capaz de distinguir entre las diferentes muestras de plasma con apoE, excepto para una muestra de plasma con 3/4

(véase la tabla 2). Por consiguiente, se han desarrollado condiciones experimentales óptimas para un ensayo turbidimétrico con látex de ApoE4 (véase la tabla 4):

- 5
- ° 2,75 µg de anti-ApoE4/prueba
 - ° 3,85 µl de muestra de plasma
 - ° Volumen de ensayo total de 200 µl.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de una apolipoproteína seleccionada de la lista que consiste en: apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apo CIII, apoE y apoJ, en una muestra que comprende:
- 5 (i) poner en contacto la muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la interacción electrostática y/o hidrófoba directa entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno,
- (ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con un anticuerpo específico para dicha apolipoproteína en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el anticuerpo y la apolipoproteína, y
- 10 (iii) detectar los complejos formados en la etapa (ii),
- 15 en el que la superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto de la muestra con un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: albúmina, caseína, gelatina o un detergente.
2. Método *in vitro* para determinar la cantidad relativa de isoforma de una apolipoproteína seleccionada de la lista que consiste en: apoE4, apoAI, apoAIV, apoCI, apoCII, apo CIII, apoE y apoJ, con respecto al contenido total de dicha apolipoproteína en una muestra que comprende:
- 20 (i) poner en contacto la muestra con una superficie de poliestireno en condiciones adecuadas para la interacción electrostática y/o hidrófoba directa entre la apolipoproteína y la superficie de poliestireno o policarbonato,
- 25 (ii) poner en contacto la superficie a la que se une la apolipoproteína formada en la etapa (i) con un primer anticuerpo específico para dicha isoforma de apolipoproteína y con un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína presente en la muestra, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la formación de un primer complejo que comprende el primer anticuerpo y la isoforma de apolipoproteína y para la formación de un segundo complejo que comprende el segundo anticuerpo y todas las isoformas de dicha apolipoproteína,
- 30 (iii) detectar los complejos primero y segundo formados en la etapa (ii) y
- 35 (iv) determinar las cantidades relativas de la isoforma con respecto al contenido de apolipoproteína total basándose en los niveles del primer y segundo complejo obtenidos en la etapa (iii),
- 40 en el que la superficie de poliestireno se bloquea antes del contacto de la muestra con un compuesto seleccionado de la lista que consiste en: albúmina, caseína, gelatina o un detergente.
3. Método, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la apolipoproteína es apoE4.
4. Método, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la albúmina es albúmina sérica bovina (BSA).
- 45 5. Método, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el detergente es un detergente seleccionado de la lista: polivinilpirrolidona-40 (PVP-40), polisorbato 20 (Tween 20), Nonidet-P40 o Triton X-100.
6. Método, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la apolipoproteína es apoE4 y la albúmina es albúmina sérica bovina (BSA).
- 50 7. Método según la reivindicación 2, en el que la superficie usada en la etapa (i) está formada por una pluralidad de entidades, en el que el contacto en la etapa (ii) con el primer anticuerpo y con el segundo anticuerpo se realiza en envases separados, conteniendo cada envase parte de la pluralidad de entidades que forman la superficie, y en el que la detección en la etapa (iii) se lleva cabo por separado en cada envase.
- 55 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la superficie de poliestireno se trata con una disolución de lavado después de la etapa de unión (i).
- 60 9. Método para determinar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una enfermedad neurodegenerativa que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de isoforma de apoE E4 mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que si los niveles de apoE E4 están por encima de un valor de referencia, entonces es indicativo de que el sujeto tiene una alta probabilidad de padecer una enfermedad neurodegenerativa.
- 65 10. Método según la reivindicación 9, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que

consiste en enfermedad de Alzheimer (AD), angiopatía amiloide cerebral (CAA), demencia asociada con síndrome de Down, demencia vascular, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

- 5 11. Uso *in vitro* de un kit que comprende i) una superficie de poliestireno bloqueada con albúmina y ii) un anticuerpo específico para una apolipoproteína o isoforma de la misma, para la detección y/o cuantificación de una apolipoproteína según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 10 12. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación anterior, en el que el kit comprende además un segundo anticuerpo que es capaz de unirse a todas las isoformas de dicha apolipoproteína.
13. Uso *in vitro* del kit según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que la albúmina es albúmina sérica bovina (BSA).

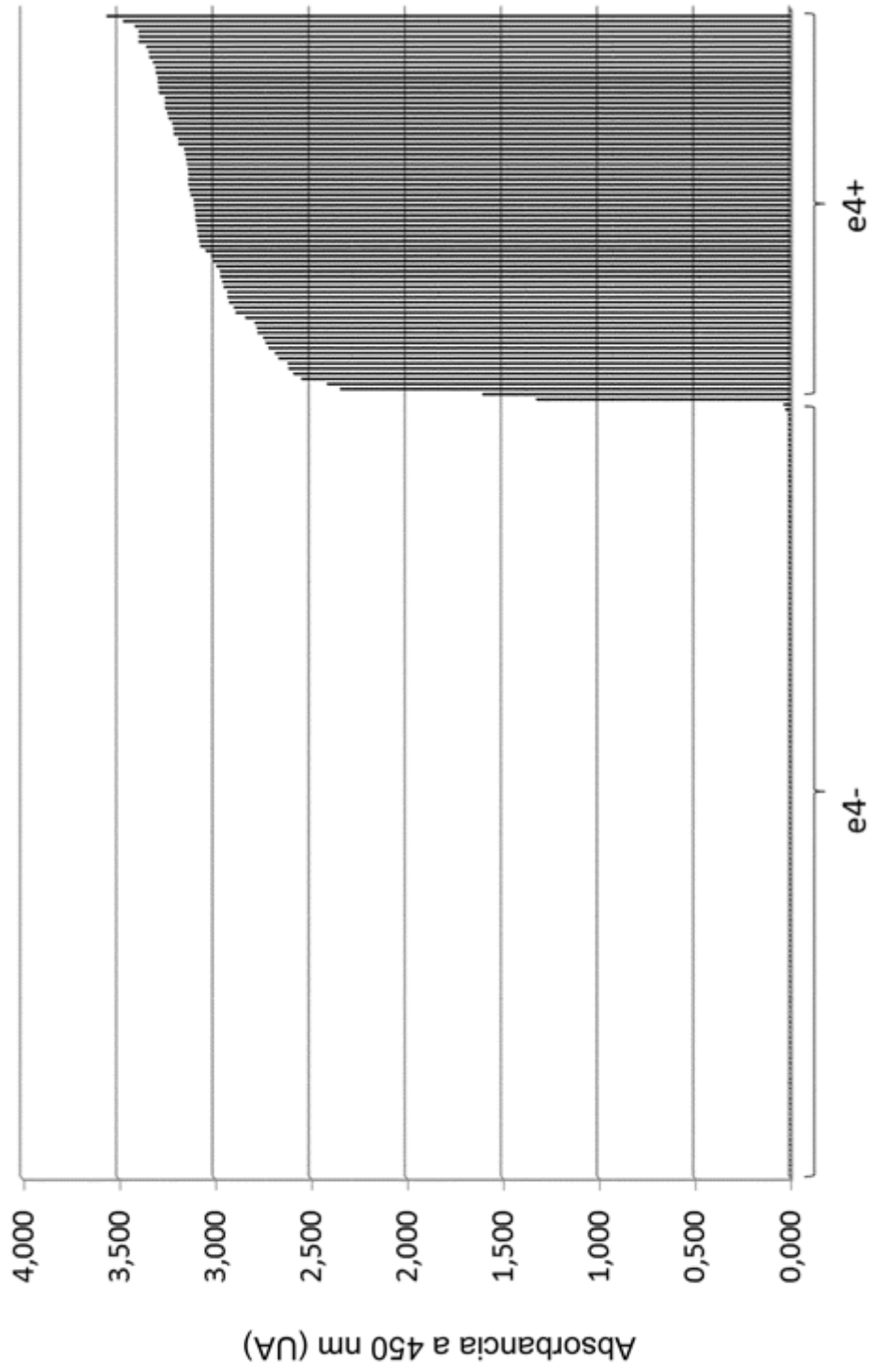


Fig. 1



Fig. 2

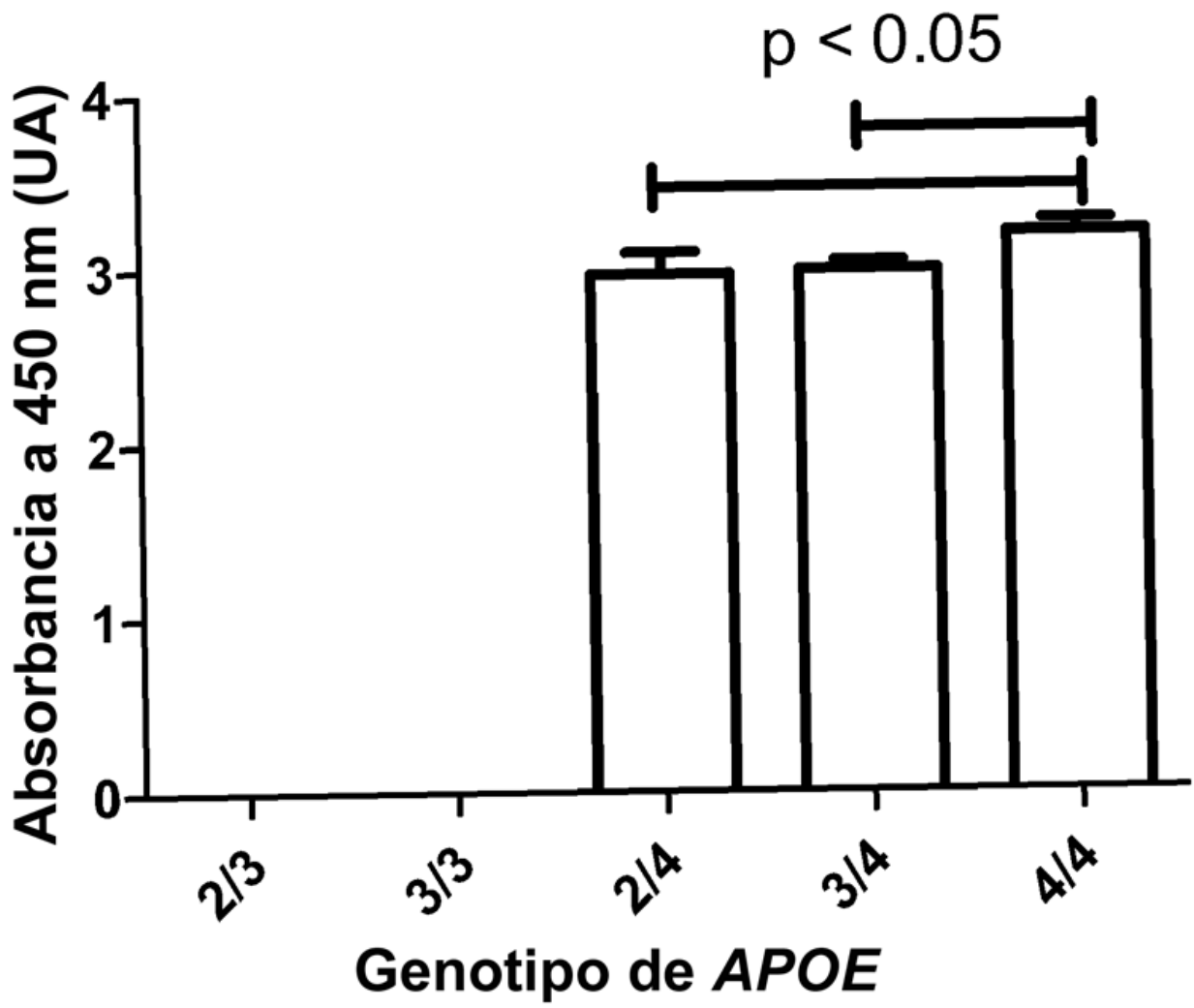


Fig. 3

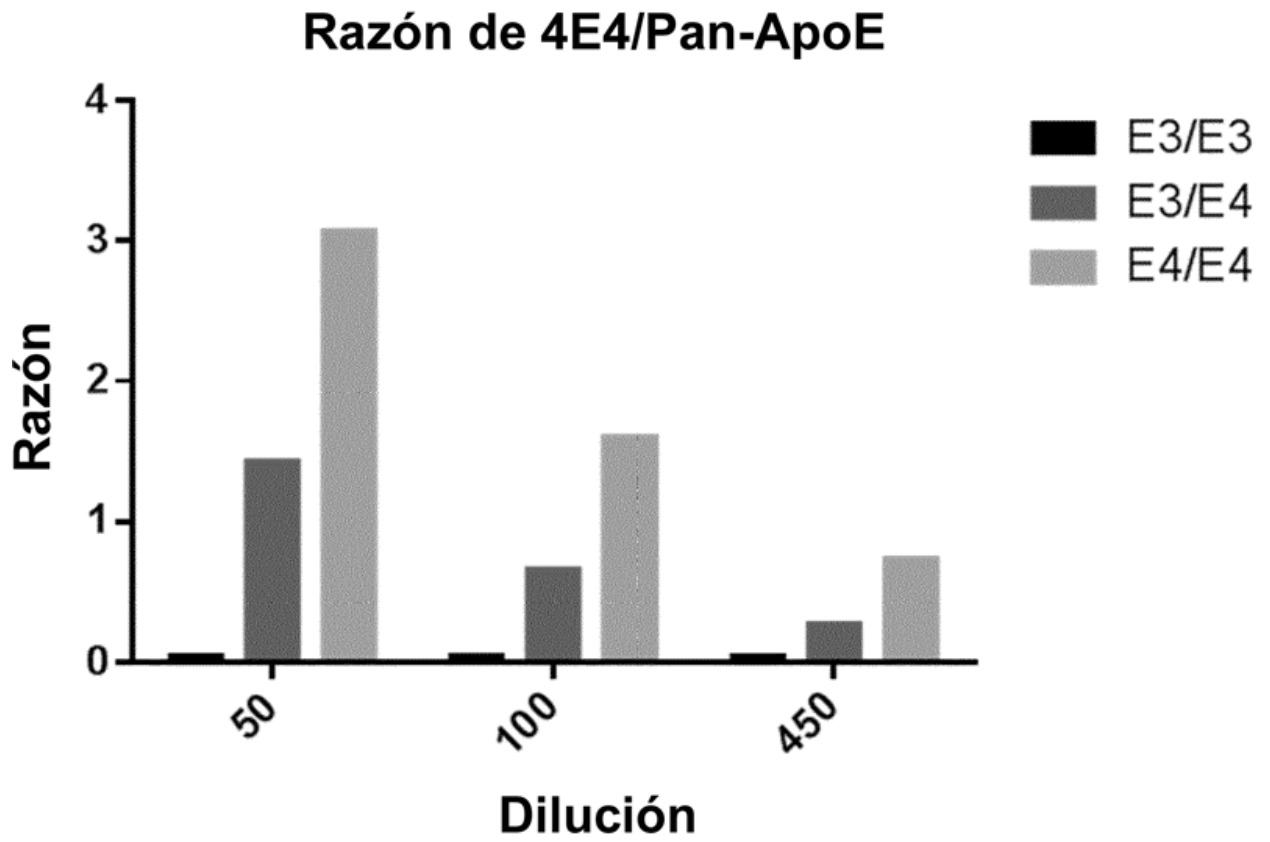


Fig. 4

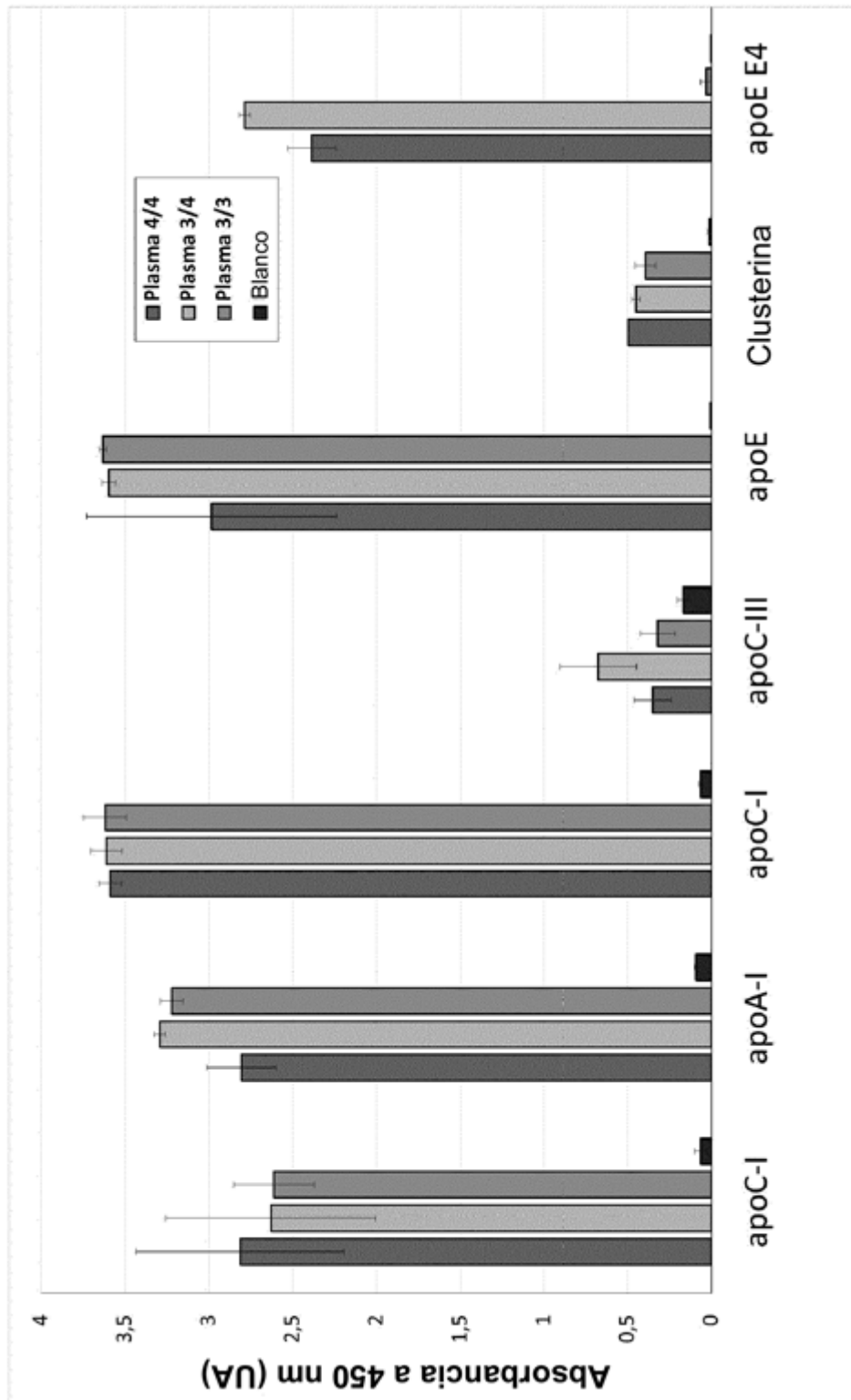


Fig. 5

Efecto de diferentes tampones sobre la unión de APOE a la placa de ELISA

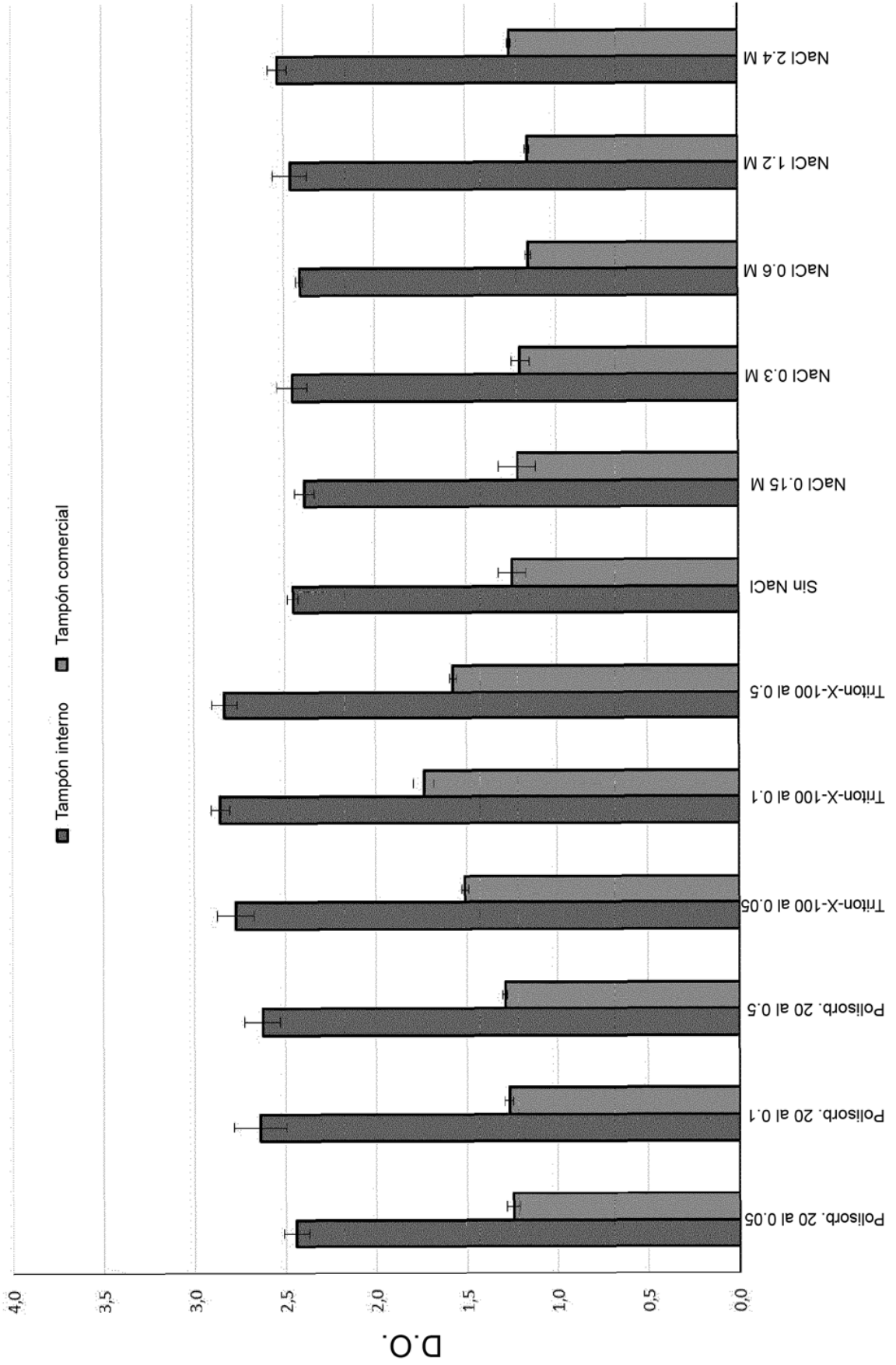


Fig. 6

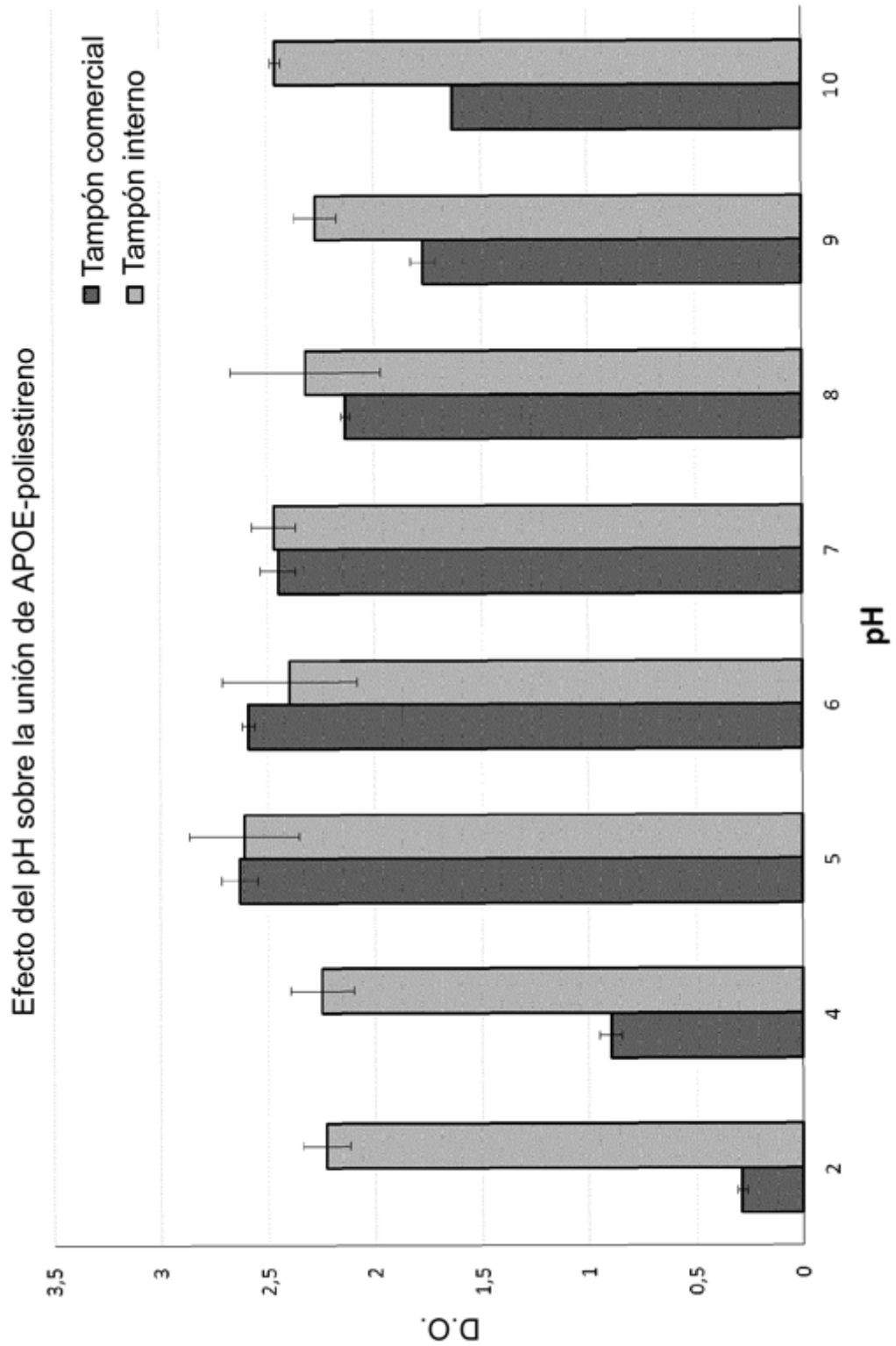


Fig. 7

