

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 678**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2014 PCT/EP2014/066414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2015 WO15014903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2014 E 14744599 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3028049**

54 Título: **Herramientas de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

**31.07.2013 EP 13178711**

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

**18.11.2019**

73 Titular/es:

**PHARNEXT (100.0%)  
11-13 Rue René Jacques  
92130 Issy-les-Moulineaux, FR**

72 Inventor/es:

**COHEN, DANIEL;  
CHUMAKOV, ILYA;  
NABIROTCHKIN, SERGUEI;  
GUEDJ, MICKAEL y  
HAJJ, RODOLPHE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 731 678 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

Herramientas de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a los campos de la biología y la medicina. La presente invención se refiere, en particular, a procedimientos de detección de la predisposición a, o de diagnóstico y/o de pronóstico de, la enfermedad de Alzheimer (EA) y trastornos relacionados. Más específicamente, la invención se refiere al desarrollo, a la validación y a la aplicación de nuevos biomarcadores, que pueden ser usados para detectar la presencia, el riesgo, o para predecir la gravedad, de la EA y trastornos relacionados. Los nuevos biomarcadores pueden medirse en fluidos corporales biológicos o extractos fácilmente disponibles a partir de biopsias, que pueden usarse para ayudar en la detección de la enfermedad, en la predicción de un tratamiento farmacológico y en el seguimiento de este tratamiento de trastornos neurodegenerativos, incluyendo la EA. La presente invención se refiere también a procedimientos para la identificación de la etapa de la enfermedad, evaluando la sensibilidad al tratamiento y la eficacia del tratamiento en sujetos que tienen EA o un trastorno relacionado.

### Antecedentes de la invención

15 La EA es, en la actualidad, la causa más común de demencia. Se caracteriza clínicamente por una disminución global de la función cognitiva que progresa lentamente y deja a los pacientes en fase terminal postrados en cama, padeciendo incontinencia y dependientes de atención supervisada. La muerte se produce, en promedio, 9 años después del diagnóstico [1]. La tasa de incidencia de la EA aumenta dramáticamente con la edad. Las proyecciones de población de las Naciones Unidas estiman que el número de personas mayores de 80 años se aproximará a 370 millones en el año 2050. En la actualidad, se estima que el 50% de las personas mayores de 85 años están afectadas por la EA. Por lo tanto, más de 100 millones de personas en todo el mundo padecerán de demencia en 50 años. El gran número de personas que requieren un cuidado constante y otros servicios afectará gravemente a los recursos médicos, monetarios y humanos [2].

25 En la actualidad, el diagnóstico clínico de la EA se basa en entrevistas estructuradas (historiales de pacientes), y exámenes neuropsicológicos, junto con imágenes o 2 exploraciones neurofisiológicas (CT, MRI, PET y/o exploraciones SPECT y EEG) para descartar otras explicaciones de la memoria, incluyendo estados de pérdida de memoria temporales (depresión o deficiencia de vitamina B12) o permanentes (accidente cerebrovascular) y se basa en los criterios del grupo de trabajo NINCDS-ADRDA [3] y la American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders [4].

30 Desafortunadamente, los procedimientos de diagnóstico clínico no son infalibles. La bibliografía actual basada en la evidencia muestra una precisión diagnóstica clínica del 65 al 90%. Las tasas de precisión más elevadas se asocian generalmente a centros especializados (clínicas de trastornos de memoria) que se centran en los trastornos de memoria, mientras que las tasas más bajas se asocian probablemente con médicos de atención primaria. Además, la precisión del diagnóstico clínico es probablemente más baja durante las etapas tempranas de la enfermedad, cuando los síntomas son difíciles de diferenciar de un deterioro cognitivo normal asociado a la edad. Más recientemente, los estudios sugieren que una afección denominada deterioro cognitivo leve (DCL) puede representar, en algunos casos, una EA en fase prodrómica y, si se diagnostica de manera temprana, representa la mejor oportunidad para la intervención farmacéutica. Los criterios clínicos usados para el diagnóstico del DCL son los de Petersen et al. [5] e incluyen: 1) quejas relacionadas con la memoria corroboradas por un informante, 2) deterioro de memoria objetivo para la edad y la educación, 3) función cognitiva general normal, 4) actividades de la vida cotidiana intactas, y 5) el sujeto no cumple los criterios para la demencia. Estos criterios clínicos para el DCL pueden ser implementados con la identificación de biomarcadores, tales como los descritos en Albert et al. [6] y que están implicados en la lesión neuronal (tal como tau) y/o en la deposición de A $\beta$  (tal como A $\beta$ <sub>42</sub> en el líquido cefalorraquídeo). Estos biomarcadores pueden ser cuantificados mediante obtención de imágenes médicas y en el LCR. Por ejemplo, Amyvid es un trazador radiactivo aprobado por la FDA que ayuda a diagnosticar la EA mediante la detección de placas amiloides con la tecnología de obtención de imágenes mediante tomografía por emisión de positrones. Sin embargo, este ensayo no permite ni predecir el desarrollo de la EA, ni medir la respuesta al tratamiento y sólo debería usarse como un complemento a otras evaluaciones de diagnóstico para este propósito (Comunicado de prensa de la FDA del 10 de abril de 2012).

45 La falta de un biomarcador fiable que identifique específicamente sujetos con EA y aquellos en riesgo de una conversión desde DCL a EA, particularmente de manera temprana en la fase prodrómica de la enfermedad (DCL), complica adicionalmente el diagnóstico y tratamiento de la EA. En vista de la magnitud del problema de salud pública planteado por la EA, se han realizado considerables esfuerzos de investigación para dilucidar la etiología de la EA, así como para identificar biomarcadores, proteínas o metabolitos característicos medidos de manera

objetiva como un indicador de procesos patogénicos, que puedan ser usados para diagnosticar y/o predecir si es probable o no que una persona desarrolle la EA.

La mayoría de los estudios de biomarcadores para la EA se han centrado en la medición en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Debido a su contacto íntimo con el cerebro, los cambios patógenos en el cerebro que resultan en alteraciones en las proteínas/péptidos probablemente se reflejarían en el LCR. Además de la proteína TAU, los derivados de la proteína precursora de amiloide, o la proteína de la cadena neuronal, algunos biomarcadores proteicos del LCR descritos en la literatura son alfa-(1)antiquimotripsina, chromogranin A,  $\beta$ -2-microglobulina, transtiretina, cistatina C, transferrina o protaglandin-D-sintasa; otros estudios midieron biomarcadores proteicos en muestras de fluidos biológicos, tales como la sangre (por ejemplo, el documento US2010124756), pero los intentos de reproducir los resultados de estos estudios fracasaron [7]. Por lo tanto, a partir de estos estudios no es posible derivar un conjunto común de biomarcadores que podrían ser considerados como una firma de la enfermedad, sin duda debido en parte a la heterogeneidad y a la complejidad de la enfermedad.

Se han identificado algunos biomarcadores genéticos; están localizados en loci genéticos que han sido identificados como responsables de la mayoría de los casos de EA autosómica dominante de aparición temprana familiar. Acerca de la EA esporádica, el factor de riesgo genético identificado más importante es el alelo ApoE  $\epsilon$ 4: el riesgo de desarrollar EA es 12 veces más importante en las personas homocigotas para ApoE  $\epsilon$ 4 [8].

Se han buscado también metabolitos como biomarcadores para la EA. Por ejemplo, se han encontrado niveles reducidos de glutamato en las células del hipocampo de pacientes enfermos usando espectroscopia de resonancia magnética, poniendo de manifiesto de esta manera esta molécula como un potencial biomarcador específico para la EA [9]. Se han sugerido pigmentos similares a lipofuscina, medibles directamente a partir de una muestra de sangre de los pacientes, como un posible marcador específico para la EA [10]. Se han considerado también análisis de sangre para detectar péptidos A $\beta$ ; sin embargo, hasta la fecha, los intentos de medir péptidos A $\beta$  en sangre han producido resultados contradictorios y desalentadores, principalmente debido a la naturaleza bioquímica de los péptidos A $\beta$ . De hecho, la A $\beta$  puede encontrarse libre en el plasma, unida a proteínas plasmáticas, a células sanguíneas, en forma soluble o intracelular, o en forma de depósitos, y puede ser generada también desde el exterior del SNC. Por lo tanto, el uso de los niveles plasmáticos de A $\beta$  como un biomarcador requiere investigaciones de desarrollo y clínicas adicionales [11-13].

El documento WO2010/066000 describe varios biomarcadores en sangre u orina identificados a partir de pacientes que padecen diversas enfermedades mentales, pero no EA. El documento WO2011/012672 describe algunos metabolitos a partir de rutas perturbadas en la EA. El documento WO2012/168561 describe especialmente algunos ácidos carboxílicos que contienen de 2 a 5 átomos de carbono, derivados de fosfatidilcolina y metabolitos en suero no identificados para predecir el riesgo de los sujetos de progresar a la EA.

Se han descrito también otros biomarcadores de fluido en la EA, biomarcadores de proteínas basados en sangre para el diagnóstico de la EA y marcadores bioquímicos para un diagnóstico precoz de la EA [14-16]. Muth et al. (2003. J. Chromatography B, 792, 269-277) describe el análisis de metabolitos urinarios quirales, tales como ácido 2-hidroxisebácico y ácido 3-hidroxisebácico, para el diagnóstico de enfermedades peroxisomales, por ejemplo, el síndrome de Zellweger.

La disponibilidad de marcadores biológicos detectables fiables permitiría un diagnóstico rápido de la EA y enfermedades relacionadas, la monitorización de los pacientes y ensayos clínicos eficientes para determinar la eficacia de los nuevos medicamentos gracias a una fácil monitorización de la respuesta individual de los pacientes al tratamiento farmacológico y a la gestión de la enfermedad.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados. La invención se deriva de la identificación de metabolitos que representan biomarcadores eficaces de la enfermedad. Los procedimientos son eficaces, fiables y fáciles de implementar. Son particularmente adecuados para el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados a partir de fluidos corporales.

El objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento según se define en las reivindicaciones. En la presente memoria se describe un procedimiento para el diagnóstico de la EA o un trastorno relacionado, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia, en una muestra tomada del sujeto, de uno o más biomarcadores seleccionados de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), triptófano, ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido

undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe, alcohol sulfobencílico, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la presencia, el riesgo, el subtipo, la progresión o la gravedad de dicha enfermedad.

5 En la presente memoria, se describe también el procedimiento que comprende la detección combinada (simultánea o secuencial) de diversos biomarcadores, tal como se ha indicado anteriormente, preferiblemente entre 2 a 10, para proporcionar el análisis más eficaz del paciente. En este sentido, en la presente memoria se describe el procedimiento que comprende determinar la presencia de una diferencia, en una muestra biológica tomada del sujeto, de:

10 (i) uno o más biomarcadores seleccionados de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), triptófano, ácido valérico, y

15 (ii) uno o más biomarcadores seleccionados de entre ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe, alcohol sulfobencílico.

Por ejemplo, los biomarcadores se seleccionan de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) y ácido valérico, incluso más preferiblemente PFAM (20:1), PFAM (22:1) y PFAM (22:2).

20 El procedimiento puede ser implementado con cualquier muestra biológica, típicamente un fluido biológico, tal como una muestra de sangre, plasma, suero, orina o LCR. La muestra puede ser tratada antes del análisis.

25 En la presente memoria, se describe un procedimiento para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento para la EA o un trastorno relacionado, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia, en una muestra de fluido biológico tomada del sujeto, de uno o más biomarcadores, tal como se ha definido anteriormente, después de la administración de dicho tratamiento, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de un sujeto que responde a un tratamiento para la EA o el trastorno relacionado.

30 En la presente memoria, se describe también un procedimiento para monitorizar el efecto de un tratamiento en un sujeto que padece EA o un trastorno relacionado, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia, en una muestra de fluido biológico tomada del sujeto, de uno o más biomarcadores, tal como se ha definido anteriormente, después de la administración de dicho tratamiento o en diferentes puntos temporales durante el curso del tratamiento, en el que una corrección de dicha presencia de una diferencia durante el tratamiento es indicativa de un tratamiento eficaz. El procedimiento es particularmente adecuado para determinar la respuesta de un sujeto que padece EA a un tratamiento con un inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE) (por ejemplo, donepezil, rivastigmina o galantamina) o un inhibidor de NMDA (tal como memantina), o para monitorizar la eficacia de dicho tratamiento.

35 En la presente memoria, se describe también un procedimiento para tratar un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene EA o un trastorno relacionado, en el que el procedimiento comprende (i) determinar la presencia, el riesgo, el subtipo, la progresión o la gravedad de dicha enfermedad en un sujeto usando un procedimiento según se ha definido anteriormente y, (ii) administrar al sujeto que lo necesita, un tratamiento contra la EA o dicho trastorno relacionado.

40 En la presente memoria, se describe también un kit que comprende un agente de captura/marcado específico para cualquiera de los biomarcadores definidos anteriormente, para su uso en el diagnóstico de la EA o de un trastorno relacionado en un sujeto.

45 La invención puede ser usada en cualquier mamífero, típicamente cualquier sujeto humano, en cualquier fase de la enfermedad.

### Breve descripción de las figuras

50 Fig. 1: Niveles en suero de ácido glicocólico y guanosina (unidad logarítmica arbitraria) en sujetos no enfermos (CTRL), pacientes con EA (EA-0) y pacientes con EA tratados con memantina (EA-1). El nivel de biomarcadores de los pacientes EA-1 tratados se mide entre los niveles CTRL y EA-0, mostrando de esta manera una corrección en la alteración del nivel de biomarcadores.

Fig. 2: Niveles en suero de guanosina, PFAM (20:1) y PFAM (22:2) (unidad arbitraria) en sujetos no enfermos (CTRL), pacientes con EA (EA-0) y pacientes con EA tratados con inhibidores de AchE (por ejemplo, donepezil, rivastigmina o galantamina) (EA-1). El nivel de biomarcadores de los pacientes EA-1 tratados se mide entre los niveles CTRL y EA-0, mostrando de esta manera una corrección en la alteración del nivel de biomarcadores.

5 Fig. 3: Nivel de las concentraciones de los biomarcadores en suero en pacientes con EA y sujetos no enfermos (media +SD). El nivel de ácido sebáico es significativamente mayor en los pacientes con EA con una media de 87,6 ng/ml, en comparación con 58,4 ng/ml. El nivel de ácido dodecanodioico es también significativamente mayor en comparación con el control (media de 13,1 frente a 8,2 ng/ml, respectivamente). El nivel de triptófano es significativamente menor en pacientes con EA, con una concentración media de 2.832 ng/ml, en comparación con los niveles de control de 3.606 ng/ml.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención describe la identificación de nuevos biomarcadores y procedimientos de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer (EA) y trastornos relacionados. La invención describe un uso novedoso de biomarcadores que pueden ser detectados en los tejidos y fluidos biológicos para los propósitos de diagnóstico de la EA y trastornos relacionados. Más particularmente, la presente invención se refiere a nuevos biomarcadores y combinaciones metabólicas de los mismos, que son útiles para el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados.

### Definiciones

En el contexto de la presente invención, "trastornos relacionados con la EA" incluye demencia senil de tipo EA (DSEA), EA en fase prodrómica, deterioro cognitivo leve (DCL), demencia frontotemporal (DFT), demencia vascular y pérdida de memoria asociada a la edad (PMAE).

Sin embargo, debería contemplarse que los biomarcadores de la invención, aunque particularmente dedicados a la EA y trastornos relacionados, podrían encontrar uso en el diagnóstico de otros trastornos neurológicos que comparten algunas características metabólicas con la EA o trastornos relacionados, estos son, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica.

25 En el contexto de la invención, el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados significa identificar o detectar o evaluar un riesgo, una presencia, un subtipo, una gravedad o una progresión de la afección patológica. Más particularmente, los procedimientos de diagnóstico de la invención pueden ser usados para realizar un pronóstico del desarrollo de la enfermedad, para detectar la presencia de la enfermedad, para identificar el subtipo de la enfermedad, para monitorizar la progresión de la enfermedad, para calificar la EA o trastornos relacionados, para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento, para mejorar la etapa de estratificación de los pacientes en ensayos clínicos, o para evaluar la eficacia de un tratamiento.

El término "biomarcador", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un metabolito que puede ser usado para el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, más preferiblemente en una muestra de fluido tomada de dicho sujeto.

35 Los metabolitos son los productos finales aguas debajo de la variabilidad del genoma, transcriptoma y proteoma de un sistema biológico. Por lo tanto, el término "metabolito" abarca cualquier sustancia producida por el metabolismo de un organismo o por un proceso metabólico en un organismo. Por ejemplo, los metabolitos son pequeñas moléculas, tales como azúcares, colesterol, nucleósidos, lípidos, aminoácidos o incluso péptidos que comprenden 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos.

40 Las expresiones "presente de manera diferencial", "presencia de una diferencia" o "nivel diferencial" se refieren a una alteración en la presencia, la cantidad y/o la frecuencia y/o la forma de un biomarcador en una muestra tomada de un sujeto enfermo en comparación con un control. Por lo tanto, la presencia de una diferencia refleja la presencia de un nivel (o frecuencia o forma) que es diferente de un nivel "normal". El control puede ser la cantidad y/o la frecuencia y/o la forma del biomarcador determinada en una muestra similar de un sujeto sano, o un valor de referencia (por ejemplo, valor de la mediana, valor promedio), y/o nivel o niveles del biomarcador en una muestra tomada del mismo sujeto antes del desarrollo de la enfermedad y/o en una fase anterior de tratamiento/enfermedad en el sujeto, y/o nivel o niveles del biomarcador en una muestra tomada de otro sujeto enfermo o de una población de sujetos enfermos como control.

"Nivel" y "cantidad" son términos intercambiables.

50 Los términos "alteración" o "desviación" o "diferencia" en la cantidad de un biomarcador diana pueden indicar un aumento o una disminución de la cantidad de biomarcador diana en una muestra biológica tomada del sujeto, en comparación con una muestra de control o un valor de referencia. Típicamente, el término "disminución", con

relación a un nivel de biomarcador, indica una reducción estadísticamente significativa de la concentración o del nivel del biomarcador en una muestra biológica tomada del sujeto. En una realización, dicha disminución es de al menos el 1% o el 3% o el 9% en comparación con una muestra de control o un valor de referencia o medio. La disminución puede ser más sustancial, tal como una reducción de al menos el 15% o incluso más. En una realización preferida, la disminución puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En una realización más preferida, la disminución puede ser del 20%, 50% o 60% o incluso más. De manera similar, el término "aumento", con relación al nivel de biomarcador, indica un aumento estadísticamente significativo de la concentración o del nivel del biomarcador en una muestra biológica tomada del sujeto. En una realización, dicho aumento es de al menos el 1% o el 3% o el 9% en comparación con una muestra de control o un valor de referencia o medio. Los aumentos pueden ser más sustanciales, tal como un aumento de al menos el 15% o incluso más. En una realización preferida, los aumentos pueden ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% (o incluso más). En una realización más preferida, los aumentos pueden ser del 20%, 50% o 60%. De manera alternativa, si no puede observarse una alteración en la frecuencia de un biomarcador. Dicho biomarcador o dichos biomarcadores pueden ser detectados a una frecuencia más alta o a una frecuencia más baja en muestras de pacientes en comparación con las muestras de sujetos de control. Un biomarcador puede estar presente de manera diferencial en términos de cantidad, frecuencia y/o forma, y es indicativo de EA o de un trastorno relacionado en el sujeto. El orden de magnitud de dicho aumento o disminución puede variar dependiendo del biomarcador, del paciente, del tipo o de la fase de la enfermedad. El orden de variación en el nivel de biomarcador (aumento o disminución), tal como se determina y se describe en la presente solicitud, es característico de la enfermedad.

"Sensibilidad", "especificidad" y "ABC" son términos estadísticos que se usan comúnmente cuando se habla de la capacidad predictiva de un kit de diagnóstico. "Sensibilidad" refleja la capacidad de un ensayo para dar un resultado positivo cuando se verifica la hipótesis, y "especificidad" la capacidad de proporcionar un resultado negativo cuando se rechaza la hipótesis. Por consiguiente, en la presente invención, una alta sensibilidad significa que la desviación del biomarcador es altamente indicativa de la aparición, la presencia o la progresión de la enfermedad; una alta especificidad significa que la ausencia de una desviación del biomarcador está altamente correlacionada con la ausencia de la aparición, la presencia o la progresión de la enfermedad. El área bajo la curva (ABC) de la característica operativa del receptor (COR) es la sensibilidad promedio del biomarcador en el intervalo de especificidades. Se usa frecuentemente como un resumen estadístico que representa el rendimiento global del biomarcador. Un biomarcador sin valor predictivo tendría una ABC de 0,5. Tal como se ejemplifica en la sección experimental, los biomarcadores que han sido identificados ahora por los presentes inventores son característicos de la EA y de trastornos relacionados. Más particularmente, aunque pueden ser analizados en el LCR, los biomarcadores de la invención son metabolitos que pueden ser ensayados también partir de fluidos corporales que son más fáciles de obtener del sujeto en comparación con el LCR.

La minería de datos acerca de la EA y los trastornos relacionados, nuevos análisis de los datos funcionales y experimentaciones permitieron primero a los inventores identificar las rutas implicadas en la enfermedad. Estas unidades funcionales se combinaron a continuación y sirvieron como punto de partida para construir redes funcionales de mayor tamaño de las rutas interactuantes. En base a estas redes, los metabolitos, como biomarcadores candidatos, podrían ser identificados y seleccionados por los presentes inventores. Se dio prioridad a dichos biomarcadores según diferentes criterios, incluyendo:

- su participación en una ruta de señalización asociada con la aparición y el desarrollo de la EA, y
- su participación en la red funcional representada de manera convincente por las rutas asociadas con la EA.

Esto condujo a la identificación de los metabolitos implicados en, o que interfieren con, diversas rutas que se ha encontrado de esta manera que están alteradas en pacientes con EA.

Estudios de validación adicionales permitieron la selección de biomarcadores de metabolitos valiosos que pueden ser usados individualmente, mezclados entre sí, o en combinación con otros marcadores ya conocidos para diagnosticar la EA o trastornos relacionados. Los metabolitos se caracterizan por su masa monoisotópica (Tabla 1) y el valor m/z de su ion dominante obtenido mediante un análisis de espectrometría de masas (Tabla 2), tal como se explica en la sección experimental. Los metabolitos enumerados en la Tabla 1 son aquellos para los cuales la identidad se ha confirmado adicionalmente usando el patrón interno correspondiente (cuando está disponible comercialmente). La unidad de masa atómica (uma) y m/z se expresan con una desviación estándar de 15 ppm que corresponde a la precisión del procedimiento de medición. Estos biomarcadores de metabolito se ensayaron adicionalmente para confirmar su relevancia para la EA, tal como se muestra en la sección experimental.

Los metabolitos se describen en las Tablas 1 y 2 a continuación, con su nombre, la masa monoisotópica y, cuando esté disponible, el número CAS de algunas de sus sales conocidas.

Tabla 1

Nombre del metabolito	Fórmula molecular	Masa monoisotópica (Da)	Número CAS ilustrativo
Ácido azelaico	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	188,10486	123-99-9
Ácido sebácico	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	202,12051	111-20-6
Ácido dodecanodioico	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	230,15181	693-23-2
Triptófano	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,089878	73-22-3
PFAM (22:1)	C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> ON	338,31848	n/a
Ácido hipúrico	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	179,058244	495-69-2
Tirosina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181,073894	60-18-4
Cafeína	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	194,080376	58-08-2
L-citrulina	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	175,095691	372-75-8
Fenilacetilglutamina	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	264,111007	28047-15-6
Ácido aminoisobutírico	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	103,063329	62-57-7 (2-) o 144-90-1 (3-)
Aspartato	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,037509	617-45-8 o 56-84-8 o 1783-96-6
Aspartil fenilalanina (Asp- Phe)	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	280,105922	13433-09-5
Ácido glicocólico	C <sub>26</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>6</sub>	465,309039	475-31-0
Guanosina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	283,09167	118-00-3
Inosina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	268,080771	58-63-9
Ácido L-treónico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	136,037175	7306-96-9
Ácido undecanodioico	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	216,13616	1852-04-6

N/a: no disponible

Tabla 2

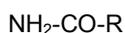
Nombre del metabolito correspondiente	M/z ((M+H) o (MH))	Modo de ionización	Tiempo de retención (min)	Fórmula molecular	Masa mono-isotópica (Da)	Número CAS ilustrativo
1-monopalmitina	331,28362	+	12,13149	C19H38O4	330,27701	73299-28-2
Ácido 4-metil-2-oxovalérico	129,05427	-	4,41515	C6H10O3	130,062995	816-66-0
Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico	229,14282	+	7,166546	C12H20O4	228,13616	51551-01-0
Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico	227,12787	-	7,14630			
Ácido caproico	115,07516	-	4,69762	C6H12O2	116,08373	142-62-1
Ácido isovalérico	101,05930	-	3,44798	C5H10O2	102,06808	503-74-2
Ácido nonenedioico	187,09584	+	5,19255	C9H14O4	186,08921	n/a
Ácido nonenedioico	185,08082	-	5,17398			
Octadecadienoil-glicero-3-fosfato	433,23620	-	10,69926	C21H41O7P	436,258993	n/a
PFAM (20:1)	310,30909	+	13,01947	NH39OC20	272,013639	n/a
PFAM (22:2)	336,32463	+	13,17333	NH41OC22	296,013639	n/a
Seril-fenilalanina (Ser-Phe)	253,11788	+	1,79742	C12H16N2O4	252,111008	16875-28-8
	251,10285	-	1,73240			
Alcohol sulfobencílico	187,00591	-	5,31783	C7H7O4S	187,006507	n/a
Teofilina y/o paraxantina*	181,07141	+	3,67416	C7H8N4O2	180,064726	58-55-9, 611-59-6 respectivamente
Ácido valérico	101,05930	-	4,41422	C5H10O2	102,06808	109-52-4

\* Biomarcador que corresponde a la teofilina o paraxantina o una mezcla de las mismos; n/a: no disponible

5 Los metabolitos anteriores representan biomarcadores valiosos que pueden ser usados, individualmente o en diversas combinaciones, para el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados. La capacidad para detectar y monitorizar los niveles de estos biomarcadores proporciona una capacidad de diagnóstico mejorada, al permitir a los médicos detectar el riesgo de desarrollar la enfermedad en una fase temprana, para determinar el nivel de la gravedad de la enfermedad, para monitorizar los efectos de la terapia por medio de un examen de estos biomarcadores en muestras de pacientes, o sub-clasificar con precisión un paciente, por ejemplo, con el fin de adaptar el tratamiento o de predecir la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento. En comparación

con los productos existentes en la actualidad, la invención proporciona diversas ventajas y beneficios. Los biomarcadores descritos en la presente memoria proporcionan un diagnóstico más rápido, objetivo y preciso de la enfermedad o de su progresión que los protocolos de diagnóstico existentes. Por ejemplo, los ensayos neuropsicológicos (tales como MMSE, Mini-Mental State Examination o Mini Examen del Estado Mental) son sólo  
 5 indicativos de un deterioro cognitivo y o de demencia; sus resultados pueden variar en función de factores socioculturales y, generalmente, se consideran sólo como indicativos, cuando se consideran individualmente, de la presencia o de la ausencia de la EA o una enfermedad relacionada. Además, las herramientas tales como Amyvid, incluso si son aprobadas por la FDA, no pueden ser usadas ni como una herramienta predictiva ni para apreciar la respuesta a un tratamiento, tal como ha indicado esta administración.

10 Los presentes inventores han descubierto que varias amidas de ácidos grasos primarios (PFAM) representan biomarcadores valiosos. Las PFAM preferidas son PFAM (22:1), PFAM (20:1) y PFAM (22:2). En este sentido, las PFAM de la presente invención tienen la fórmula siguiente:



, en la que R es o bien i) en el caso de PFAM (20:1), un alqueno de 19 átomos de carbono con un doble enlace cis o trans o ii) en el caso de PFAM (22:1), un alqueno de 21 átomos de carbono con un doble enlace cis o trans o iii) en el caso de PFAM (22:2), un alqueno de 21 átomos de carbono con dos dobles enlaces que son independientemente cis o trans.  
 15

Por consiguiente, en el contexto de la invención, PFAM (20:1) indica un único isómero o una mezcla de isómeros PFAM (20:1), PFAM (22:1) indica un único isómero o una mezcla de isómeros PFAM (22:1), y PFAM (22:2) indica un único isómero o una mezcla de isómeros PFAM (22:2).  
 20

En el contexto de la invención, "C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>" indica teofilina sola, o paraxantina sola, o una mezcla de las mismas.

La invención puede ser usada adicionalmente para predecir el inicio de la EA y trastornos relacionados antes de la aparición de cualquier síntoma usado convencionalmente en el diagnóstico de la enfermedad. De esta manera, la invención puede ser usada en el ensayo y la monitorización de personas que se considere que tienen riesgo de  
 25 desarrollar EA o un trastorno relacionado, por ejemplo, individuos con antecedentes familiares de la enfermedad, con el fin de permitir una intervención temprana para prevenir la aparición o el desarrollo de los síntomas. Este tipo de ensayos y de monitorización puede ser usado para identificar o predecir el desarrollo de la EA y de trastornos relacionados meses o años antes de la aparición de la enfermedad.

En otros aspectos, los procedimientos de la presente invención comprenden además la etapa de gestionar el tratamiento individual. Por ejemplo, la gestión del tratamiento comprende administrar un fármaco determinado o una combinación de fármacos para ralentizar, detener o revertir la progresión de la enfermedad. En otro aspecto de la invención, el procedimiento comprende además medir el nivel de biomarcador una vez comenzado el  
 30 tratamiento, la monitorización de la progresión de la enfermedad, la respuesta al tratamiento o incluso la eficacia de dicho tratamiento seleccionado. En una realización particular, la monitorización de la respuesta al tratamiento comprende determinar la presencia de una diferencia, en una muestra de fluido biológico tomada del sujeto, de uno o más de los biomarcadores anteriores, después de la administración de dicho tratamiento o en diferentes puntos temporales durante el curso del tratamiento; en el que una presencia de una diferencia significativa (independientemente del orden de la variación) en comparación con el valor de referencia es indicativa de una respuesta al tratamiento.  
 35

40 En lo que se refiere a enfermedades crónicas, en una realización particular, la monitorización de la respuesta al tratamiento comprende determinar la presencia de una diferencia, en un fluido biológico tomado del sujeto, de uno o más de los biomarcadores anteriores en diferentes puntos temporales durante el curso del tratamiento.

En otra realización particular, la monitorización de la progresión de la enfermedad comprende determinar la presencia de una diferencia, en un fluido biológico tomado del sujeto, de uno o más de los biomarcadores  
 45 anteriores en diferentes puntos temporales durante el curso del tratamiento.

En otra realización particular, la monitorización de la eficacia del tratamiento comprende determinar la presencia de una diferencia, en una muestra de fluido biológico tomada del sujeto, de uno o más de los biomarcadores anteriores, después de la administración de dicho tratamiento o en diferentes puntos temporales durante el curso del tratamiento; en el que una corrección de dicha presencia de una diferencia (es decir, una evolución hacia un nivel de "estado normal") durante el tratamiento es indicativa de un tratamiento eficaz.  
 50

En la presente memoria, se describe también un procedimiento para diagnosticar la EA o trastornos relacionados, que comprende detectar o medir la presencia de una diferencia de al menos un biomarcador, seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebáico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-

5 oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina,  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicerol-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico, en una muestra derivada de un mamífero, más preferiblemente en una muestra derivada de un ser humano, tal como la presencia de una diferencia indicativa de la enfermedad.

10 Más particularmente, un objeto de la presente invención es un procedimiento para el diagnóstico de la EA o un trastorno relacionado en un mamífero, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia de ácido sebácico en una muestra del sujeto, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la enfermedad.

La muestra puede ser, o puede derivarse de, cualquier muestra que contiene metabolitos obtenida de un sujeto, tal como un fluido biológico, un gas, aliento exhalado y/o aerosoles, una biopsia, extracto de tejido, heces, etc. Preferiblemente, la muestra es, o se deriva de, un fluido biológico, más preferiblemente de sangre (o plasma y/o suero derivado del mismo), orina, LCR, etc.

15 En este sentido, en la presente memoria se describe el procedimiento que comprende determinar la presencia de una diferencia de al menos un biomarcador, seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina,  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicerol-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico en un fluido biológico tomado del sujeto, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la enfermedad.

25 En la presente memoria, se describe también el procedimiento que comprende determinar la presencia de una diferencia de al menos un biomarcador, seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina,  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicerol-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico en sangre, plasma y/o suero tomados del sujeto, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la enfermedad.

35 En la presente memoria, se describe también un procedimiento para diagnosticar la EA o un trastorno relacionado en un mamífero, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia de al menos un biomarcador, seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina,  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, en sangre, plasma y/o suero tomados del sujeto, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la enfermedad.

40 En la presente memoria, se describe también un procedimiento para diagnosticar la EA o un trastorno relacionado en un mamífero, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia de al menos un biomarcador, seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina,  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicerol-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico en el aliento exhalado y/o en aerosoles tomados desde el sujeto, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la enfermedad.

50 Por ejemplo, el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados comprende la determinación de la presencia de una diferencia, en una muestra de fluido biológico del mamífero, de uno o más metabolitos seleccionados de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina,  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicerol-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico.

55 En la presente memoria, se describe también un procedimiento in vitro para diagnosticar la EA o trastornos relacionados, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia de una diferencia de al menos un

5 biomarcador, seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico, en una muestra de fluido biológico tomada del sujeto, en el que dicha presencia de una diferencia es indicativa de la presencia, del riesgo, de la progresión o de la gravedad de dicha enfermedad.

10 Por ejemplo, se describe el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados que comprende la medición, en una muestra de fluido biológico del mamífero, de un aumento de al menos un biomarcador seleccionado de entre aspartato, Asp-Phe, ácido azelaico, ácido dodecanodioico, fenilacetilglutamina, ácido sebácico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxododecanoico, ácido caproico, ácido iso-valérico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato o alcohol sulfobencílico, y/o una disminución de al menos un biomarcador seleccionado de entre cafeína, ácido glicocólico, guanosina, ácido hipúrico, inosina, L-citrulina, ácido L-treónico, PFAM (22:1), triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, PFAM (20:1), PFAM (22:2), Ser-Phe, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico.

15 En la presente memoria, se describe también el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados que comprende la medición, en una muestra de fluido biológico del mamífero, de un aumento de al menos un biomarcador seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, fenilacetilglutamina, ácido sebácico, ácido caproico, iso-valérico y/o una disminución de al menos un biomarcador seleccionado de entre cafeína, ácido hipúrico, L-citrulina, PFAM (22:1), triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, PFAM (20:1), PFAM (22:2), C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico.

20 En una realización particular, la invención se refiere a un procedimiento in vitro para diagnosticar una enfermedad neurológica seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA, EA en fase prodrómica, deterioro cognitivo leve, pérdida de memoria asociada con la edad, demencia vascular o demencia frontotemporal, en el que el procedimiento comprende las etapas siguientes:

- 25 – recoger sangre, suero o muestra de plasma desde un sujeto que padece, o que se sospecha que padece o que tiene riesgo de padecer dicha enfermedad,
- tratar las muestras para su análisis posterior mediante LC/MS y/o GC/MS,
- 30 – medir mediante LC/MS y/o GC/MS un aumento, en comparación con un valor de control, de ácido sebácico y/o una disminución, en comparación con un valor de control, de al menos un biomarcador seleccionado de entre cafeína, ácido glicocólico, guanosina, ácido hipúrico, inosina, L-citrulina, ácido L-treónico, PFAM (22:1), triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, PFAM (20:1), PFAM (22:2), Ser-Phe, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico.
- 35 – a partir de la etapa anterior, deducir la presencia, el riesgo, el subtipo, la progresión o la gravedad de dicha enfermedad.

40 En una realización todavía más preferida, los procedimientos para el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados de la presente invención comprenden determinar la presencia de una diferencia de una combinación de varios biomarcadores de la presente invención, denominada conjunto de biomarcadores. Un conjunto contiene preferiblemente 2, 3, 4 o 5 (o incluso más) biomarcadores de entre los biomarcadores enumerados anteriormente, que pueden ser determinados de manera simultánea o secuencial en la muestra.

45 En la presente memoria, se describe un conjunto de biomarcadores constituido por al menos dos metabolitos seleccionados de entre el grupo que comprende ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe o alcohol sulfobencílico.

50 En la presente memoria, se describe también un conjunto de biomarcadores constituido por al menos dos metabolitos seleccionados de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico.

En la presente memoria, se describe también el conjunto de biomarcadores constituido por al menos tres metabolitos seleccionados de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico.

- 5 En la presente memoria, se describe también un conjunto de biomarcadores que contienen al menos un dipéptido seleccionado de entre Ser-Phe y Asp-Phe.

10 En la presente memoria, se describe también un conjunto de biomarcadores que contienen al menos un ácido carboxílico seleccionado de entre ácido azelaico, ácido sebácico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido valérico, ácido iso-valérico, ácido 4-metil-2-oxovalérico, ácido caproico, L-citrulina, fenilacetilglutamina, ácido aminoisobutírico, aspartato, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato o alcohol sulfobencílico, más preferiblemente el ácido carboxílico es un ácido dicarboxílico seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido sebácico, ácido undecanodioico, ácido nonenedioico.

15 En la presente memoria, se describe también un conjunto de biomarcadores que comprenden al menos un ácido dicarboxílico seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido sebácico, ácido undecanodioico, ácido nonenedioico, incluso más preferiblemente, dicho al menos un ácido dicarboxílico se selecciona de entre ácido sebácico o ácido azelaico.

En la presente memoria, se describe también un conjunto de biomarcadores que contienen al menos una PFAM seleccionada de entre PFAM (20:1), PFAM (22:1) y PFAM (22:2).

20 En la presente memoria, se describe también el conjunto de biomarcadores constituido por al menos una PFAM seleccionada de entre PFAM (20:1), PFAM (22:1) o PFAM (22:2), usada en combinación con al menos un metabolito seleccionado de entre ácido azelaico, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido sebácico, triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe y alcohol sulfobencílico.

25 En la presente memoria, se describe también el conjunto de biomarcadores que comprenden al menos dos biomarcadores seleccionados de entre ácido sebácico, ácido dodecanodioico y triptófano.

En una realización, el conjunto de biomarcadores comprende ácido sebácico, ácido dodecanodioico y triptófano.

30 En una realización particular, la concentración de ácido sebácico aumenta del 10 al 90%, preferiblemente del 30% al 70%, y más preferiblemente un 50%, en sujetos enfermos en comparación con un nivel de concentración en una muestra de control o en una situación de referencia.

35 En una realización particular, la concentración de ácido dodecanodioico aumenta del 10 al 90%, preferiblemente del 40% al 80%, y más preferiblemente un 60%, en sujetos enfermos en comparación con un nivel de concentración en una muestra de control o en una situación de referencia.

En una realización particular, la concentración de triptófano disminuye del 10 al 90%, preferiblemente del 10% al 50%, y más preferiblemente un 20%, en sujetos enfermos en comparación con un nivel de concentración en una muestra de control o en una situación de referencia.

40 En otra realización, el conjunto de biomarcadores comprende ácido sebácico, ácido dodecanodioico y triptófano, en combinación con al menos un metabolito seleccionado de entre PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), ácido azelaico, ácido hipúrico, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido iso-valérico, L-citrulina, fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe y alcohol sulfobencílico.

45 En la presente memoria, se describe también el conjunto de biomarcadores constituido por al menos dos compuestos seleccionados de entre 1-monopalmitina, ácido dodecanodioico, ácido hipúrico, ácido iso-valérico, ácido sebácico, triptófano, tirosina y ácido undecanodioico.

50 En la presente memoria se describen también conjuntos de biomarcadores seleccionados a partir de conjuntos que comprenden:

- PFAM (20:1) y PFAM (22:1),
- PFAM (20:1) y PFAM (22:2),
- PFAM (22:1) y PFAM (22:2),
- PFAM (20:1) y PFAM (22:1) y PFAM (22:2),
- 5 – Asp-Phe y Ser-Phe,
- Asp-Phe y triptófano y ácido caproico,
- Asp-Phe y ácido azelaico y ácido L-treónico,
- Asp-Phe y ácido nonenedioico y triptófano y ácido L-treónico,
- Asp-Phe y C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) y ácido L-treónico y ácido sebácico,
- 10 – Asp-Phe y Ser-Phe y cafeína,
- Asp-Phe y ácido dodecanodioico y Ser-Phe,
- Asp-Phe y guanosina y Ser-Phe,
- Asp-Phe y ácido hipúrico y Ser-Phe,
- Asp-Phe y ácido 4-metil-2-oxovalérico y Ser-Phe,
- 15 – Asp-Phe y Ser-Phe y octadecadienoil-glicero-3-fosfato,
- Asp-Phe y Ser-Phe y ácido 9,12-dioxo-dodecanoico,
- Asp-Phe y Ser-Phe y fenilacetilglutamina,
- Asp-Phe y ácido valérico y Ser-Phe,
- Ser-Phe y ácido caproico y ácido undecanodioico,
- 20 – Ser-Phe y L-citrulina e inosina y aspartato,
- Ser-Phe y tirosina y 1-monopalmitina y aspartato,
- Ser-Phe y ácido nonenedioico y ácido undecanodioico y alcohol sulfobencílico,
- L-citrulina y ácido iso-valérico y aspartato,
- L-citrulina y triptófano y aspartato y ácido L-treónico,
- 25 – L-citrulina y ácido undecanodioico y aspartato y alcohol sulfobencílico,
- L-citrulina y ácido azelaico y aspartato y ácido glicocólico,
- L-citrulina y C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) y ácido azelaico,
- L-citrulina y ácido azelaico y ácido valérico y fenilacetilglutamina,
- L-citrulina y ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico y triptófano,
- 30 – L-citrulina y ácido azelaico y triptófano y ácido 4-metil-2-oxovalérico,
- L-citrulina y ácido azelaico y triptófano y ácido iso-valérico y fenilacetilglutamina,
- L-citrulina y tirosina y ácido azelaico y triptófano y ácido iso-valérico,
- Ácido azelaico y ácido dodecanodioico,
- Ácido azelaico y ácido sebácico,

## ES 2 731 678 T3

- Ácido azelaico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- Ácido azelaico y ácido undecanodioico,
- Ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido dodecanodioico,
- Ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico,
- 5 – Ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido dodecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido sebácico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- 10 – Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido undecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido dodecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico,
- Ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido dodecanodioico,
- 15 – Ácido nonenedioico y ácido sebácico,
- Ácido nonenedioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido undecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido undecanodioico y ácido dodecanodioico,
- Ácido nonenedioico y ácido undecanodioico y ácido sebácico,
- 20 – Ácido nonenedioico y ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- Ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
- Ácido undecanodioico y ácido dodecanodioico,
- Ácido undecanodioico y ácido sebácico,
- Ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico
- 25 – Ácido sebácico y tirosina,
- Ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina,
- Ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido sebácico y triptófano y tirosina,
- Ácido sebácico y triptófano,
- 30 – Ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y tirosina,
- Ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,

## ES 2 731 678 T3

- Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido hipúrico y ácido sebácico,
- 5 – Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina,
- Ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
- Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
- 10 – Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico,
- Ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido undecanodioico,
- 15 – Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido sebácico,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y triptófano,
- 20 – Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y tirosina,
- Ácido dodecanodioico y triptófano,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y tirosina,
- 25 – Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y triptófano y ácido undecanodioico,
- Ácido hipúrico y triptófano,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y triptófano y tirosina,
- Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y tirosina y ácido undecanodioico,
- 30 – Ácido dodecanodioico y triptófano y tirosina,
- Ácido dodecanodioico y triptófano y ácido undecanodioico,
- Ácido dodecanodioico y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido hipúrico y tirosina y ácido undecanodioico,
- Ácido hipúrico y triptófano y tirosina,

- Ácido hipúrico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y tirosina,
  - 5 - Ácido dodecanodioico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - Tirosina y ácido undecanodioico,
  - Triptófano y ácido undecanodioico,
  - Triptófano y tirosina y ácido undecanodioico, o
  - 10 - Triptófano y tirosina.
- En una realización de la invención, los conjuntos de biomarcadores preferidos se seleccionan de entre:
- Asp-Phe y  $C_7H_8N_4O_2$  (teofilina y/o paraxantina) y ácido L-treónico y ácido sebácico,
  - L-citrulina y ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico y triptófano,
  - Ácido sebácico y triptófano y tirosina,
  - 15 - Ácido sebácico y triptófano,
  - Ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,
  - Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano,
  - Ácido hipúrico y ácido sebácico,
  - 20 - Ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano,
  - Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - Ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - 25 - Ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,
  - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico,
  - Ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido undecanodioico,
  - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano,
  - 30 - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido undecanodioico,
  - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - Ácido dodecanodioico y ácido sebácico, o
  - Ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico;

En una realización particular de la invención, un conjunto de biomarcadores es:

- C7H8N4O2 (teofilina y/o paraxantina) y Asp-Phe y ácido L-treónico y ácido sebáico,

En la presente memoria, se describe también el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados, que comprende la identificación, dentro de LC/MS o el perfil de masas GC/MS a partir de la muestra del mamífero, de un perfil de masas de metabolito determinado como específico para la EA o un trastorno relacionado, en el que dicho perfil está constituido por 2, 3, 4 o 5 picos de masas correspondientes a los iones dominantes de los metabolitos identificados en las Tablas 1 y 2.

En una realización particular, cualquiera de los biomarcadores anteriores o sus combinaciones se usa en un procedimiento de diagnóstico de la EA o trastornos relacionados, junto con al menos un ensayo de diagnóstico o un biomarcador adicional para la EA o trastornos relacionados, seleccionados preferiblemente de entre un ensayo o biomarcador de entre ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos, obtención de imágenes neurofisiológicas (por ejemplo, electroencefalografía), genéticas, cerebrales, clínico y cognitivo. Dicho ensayo de diagnóstico o biomarcador puede realizarse o medirse de manera simultánea, antes o después de la medición de los biomarcadores de la invención. Dichos biomarcadores de diagnóstico adicionales pueden ser detectados en cualquier muestra conveniente para el ensayo.

Dicho biomarcador de proteína adicional, que puede ser usado para el diagnóstico de la EA o trastornos relacionados, puede ser seleccionado de entre las proteínas enumeradas en el documento WO2011/012672. Otros candidatos a biomarcadores proteicos que se conocen en la técnica como una ayuda en el diagnóstico de la EA son A $\beta$ <sub>42</sub>, Tau o P-Tau<sub>181</sub>, que pueden ser dosificados desde el LCR. Se detecta una disminución en la A $\beta$ <sub>42</sub>, y un aumento de Tau y P-Tau<sub>181</sub> en el LCR de pacientes con EA. Cuando se habla de biomarcadores plasmáticos, la utilidad de los péptidos A $\beta$  es al menos controvertida [17], pero la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> parece tener cierto uso, ya que se una relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> plasmática baja se ha asociado con el riesgo de un deterioro cognitivo más rápido [17].

Por consiguiente, en una realización, cualquiera de los biomarcadores de la invención o sus combinaciones se usan en un procedimiento de diagnóstico de la EA o trastornos relacionados, junto con la medición de la determinación de A $\beta$ <sub>42</sub>, Tau y/o P-Tau<sub>181</sub> en el LCR.

En otra realización, cualquiera de los biomarcadores de la invención o sus combinaciones se usa en un procedimiento de diagnóstico de la EA o trastornos relacionados o del riesgo de un deterioro cognitivo rápido, junto con la medición de la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> plasmática.

Los ensayos de obtención de imágenes cerebrales que pueden ser implementados junto con cualquiera de los biomarcadores de la invención pueden ser, por ejemplo:

- ensayos de detección y de cuantificación de la deposición de A $\beta$  y/o la carga de A $\beta$  fibrilar en el cerebro, o del patrón de deposición de los mismos, mediante procedimientos de obtención de imágenes, tales como tomografía por emisión de positrones, que pueden ser indicativas de la EA o de la evolución la EA,
- obtención de imágenes del cerebro morfológico, por ejemplo, medida del volumen del hipocampo, que puede ser indicativo de la EA o de la evolución de la EA.

En una realización más particular, los biomarcadores de la invención se usan para diagnosticar la EA o un trastorno relacionado en pacientes identificados como en riesgo de desarrollar la EA o de los que se sospecha que padecen la EA en fase prodrómica. Por ejemplo, dichos pacientes pueden haber sido diagnosticados como portadores del alelo ApoE  $\epsilon$ 4 de ApoE.

Los biomarcadores de la invención pueden usarse también además de cualquier ensayo cognitivo usado para evaluar el estado cognitivo de un paciente. Dichos ensayos son, por ejemplo, Mini Examen del Estado Mental (MMSE, Mini-Mental State Examination), Mini-Examen del Estado Mental Modificado (3MS, Modified Mini-Mental State Examination), Test Mental Abreviado (AMTS, Abbreviated Mental Test Score), Cuestionario de Demencia para Personas con Discapacidad (DMR, Dementia questionnaire for persons with Mental Retardation), Instrumento de Cribado de Capacidades Cognitivas (CASI, Cognitive Abilities Screening Instrument), Test del Trazo (Trail-making test), Test de dibujo de Reloj (Clock drawing test), Escala de Evaluación de la Enfermedad de Alzheimer - Cognición (ADAS-Cog, Alzheimer's disease assessment scale - Cognition), Evaluación de la Cognición por el Médico de Cabecera (GPCOG, General Practitioner Assessment of Cognition), Evaluación Cognitiva Montreal (MOCA, Montreal Cognitive Assessment), o Escala Rowland de Evaluación de Demencia Universal (RUDAS, Rowland Universal Dementia Assessment Scale).

En una realización preferida, cualquiera de los biomarcadores de la invención se usa junto con MMSE.

- En otra realización preferida, los biomarcadores de la invención se usan para diagnosticar la EA o un trastorno relacionado en pacientes identificados como en riesgo de desarrollar EA o de los que se sospecha que padecen EA en fase prodrómica por el resultado que obtuvieron en el MMSE. Tal como se ha indicado anteriormente, las puntuaciones de MMSE se ven afectadas por la edad y por el nivel cultural del sujeto. De esta manera, estas puntuaciones deben ser corregidas en función de estos criterios antes de su interpretación. Como regla general, según el Consorcio para el establecimiento de un registro para la enfermedad de Alzheimer (CERAD, Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease), una puntuación comprendida entre 19 y 24 está asociada con una demencia débil, entre 10 y 18 con una demencia moderada y, finalmente, una puntuación menor de 10 corresponde a una demencia severa.
- 5 Otro aspecto de la descripción se refiere al uso de uno o más biomarcadores seleccionados de entre los biomarcadores descritos en la presente memoria en un procedimiento de diagnóstico de la EA en un sujeto mamífero.
- 10 El procedimiento de la invención puede aplicarse a cualquier muestra biológica del mamífero a ser sometido a una prueba. Los ejemplos de dichas muestras incluyen sangre, plasma, suero, saliva, orina, ascitis, esputo, aerosoles, sudor, etc. El nivel de metabolitos derivado de los mismos puede ser medido también a partir de biopsias de tejido o heces. La muestra puede ser obtenida mediante cualquier técnica conocida de por sí en la técnica, por ejemplo, mediante recogida usando, por ejemplo, técnicas no invasivas, o a partir de colecciones o bancos de muestras, etc. Además, la muestra puede ser tratada previamente para facilitar la accesibilidad del biomarcador diana, para permitir la dosificación de dicho biomarcador mediante un procedimiento dedicado (por ejemplo, la derivatización de aminoácidos para permitir su dosificación posterior mediante espectrofotometría), o para enriquecer para el biomarcador diana, por ejemplo, mediante lisis (mecánica, química, enzimática, etc.), purificación, extracción, centrifugación, separación, precipitación, etc. La preparación de suero a partir de la sangre puede ser realizada tal como se ejemplifica en la sección experimental. Pueden usarse diversas otras preparaciones de muestra, tales como extracción líquido-líquido, precipitación de proteínas y extracción en fase sólida [18].
- 15 20 25 En una realización preferida, los niveles de los biomarcadores de la invención se determinan a partir de muestras de sangre, plasma, suero, saliva u orina.
- En otra realización, el biomarcador o los biomarcadores pueden cuantificarse a partir de diferentes muestras del mismo mamífero.
- La invención puede aplicarse a cualquier mamífero, preferiblemente a un ser humano.
- 30 En una realización, dicho ser humano todavía no sufre un deterioro cognitivo significativo en comparación con las personas de la misma edad y nivel cultural.
- En otra realización, dicho ser humano presenta deposición de agregados de A $\beta$  o una carga de A $\beta$  fibrilar en el cerebro, asociada o no con un deterioro cognitivo.
- 35 Se conoce que los pacientes con síndrome de Down presentan una incidencia extremadamente alta a una aparición precoz de la EA [19]. Por consiguiente, en otra realización, dicho humano padece síndrome de Down.
- 40 Los niveles de dicho biomarcador o dichos biomarcadores pueden determinarse mediante cualquier procedimiento conocido de por sí en la técnica, tales como, sin limitación, procedimientos inmunológicos, procedimientos bioquímicos, procedimientos cromatográficos, procedimientos enzimáticos, ensayos basados en células, ensayos in vitro, LC/MS, GC/MS, etc. Dichos ensayos son rutinarios y son bien conocidos en la técnica. Los niveles determinados del biomarcador o de los biomarcadores pueden compararse con un valor de referencia, un control o un valor medio, en el que una desviación con relación a dicho valor es indicativa de la presencia, del riesgo, de la progresión y/o de la gravedad de la EA o trastornos relacionados. Típicamente, la desviación debe ser superior al 1%, preferiblemente superior al 3%, más preferiblemente superior al 9%, incluso más preferiblemente superior al 15%. En otras realizaciones, la desviación puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.
- 45 En otra realización, se cuantifica la presencia de una diferencia en otros metabolitos relacionados con las mismas rutas metabólicas que los biomarcadores de la invención.
- 50 En la presente memoria, se describe también un kit que comprende un soporte sólido que comprende al menos un agente de captura unido al mismo, en el que dicho al menos un agente de captura se une o reacciona con un biomarcador de la presente invención. Típicamente, el kit puede comprender varios agentes de captura distintos que se unen a un biomarcador distinto. El al menos un agente de unión es preferiblemente selectivo para un biomarcador, tal como un anticuerpo o un derivado del mismo, un aptámero, etc.

5 Por ejemplo, el kit comprende un soporte sólido que comprende al menos un agente de captura unido al mismo (por ejemplo, un anticuerpo o un aptámero), en el que el agente de captura se une o reacciona con un biomarcador de entre los biomarcadores descritos en la presente memoria. En este sentido, el kit comprende al menos un compuesto que se une a, o que reacciona con al menos un biomarcador seleccionado de entre los biomarcadores descritos en la presente memoria para el diagnóstico, el pronóstico y/o la evaluación de la eficacia de un tratamiento o el seguimiento de la evolución de la EA o trastornos relacionados.

Además del procedimiento de LC/MS para el ensayo de los biomarcadores de la invención, existen otros ensayos, tal como se describe de manera ilustrativa a continuación.

Cuantificación de aminoácidos (o derivados de los mismos)

10 Perfil HPLC-espectrofotometría de aminoácidos enteros.

Los análisis de sangre aminoácidos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se usan comúnmente para determinar aminograma de los niños pequeños con el fin de diagnosticar aminoacidopatías.

15 Los procedimientos de HPLC/espectrofotometría son los procedimientos usados más comúnmente para ensayar aminoácidos enteros (o sus derivados) a la vez a partir de fluidos biológicos. Más frecuentemente, están automatizados. Los aminoácidos deben ser derivatizados para ser detectables mediante espectrofotometría de absorbancia. La derivatización puede ser realizada antes o después de la separación de aminoácidos mediante HPLC.

20 La derivatización consiste en la unión covalente de los aminoácidos a un resto cromóforo, convirtiendo de esta manera los aminoácidos modificados en fácilmente detectables mediante espectrofotometría UV, visible o fluorométrica. La derivatización puede ser realizada, por ejemplo, con fenil-tio-cianato (PTC; espectrofotometría UV), Orto-Pht Aldehído (OPA; espectrofotometría UV o fluorométrica), dimetilamino-1-NaftalenSulfonilo (DANSYL; espectrofotometría visible), o 9-FluorenilMetoxiCarbonilo (Fmoc; espectrofotometría fluorométrica).

El protocolo para la cuantificación de aminoácidos usando derivatización OPA se describe ampliamente en Babu et al. [20].

25 Se comercializan también kits comerciales para la realización de ensayos HPLC para medir la cantidad de ácidos amino en fluidos humanos, tales como, por ejemplo, " Ensayo de HPLC para fenilalanina, tirosina y triptófano" de Eagle biosciences (Número de catálogo: PNL31-H100).

Kits dedicados a la cuantificación de aminoácidos específicos

30 Los biomarcadores aminoácidos pueden ser cuantificados también específicamente a partir de muestras biológicas usando kits de detección y de cuantificación dedicados listos para usar.

35 El ácido aspártico puede ensayarse usando, por ejemplo, el "kit de ensayo de aspartato" (Biovision, ref K552-100): un ensayo colorimétrico enzimático basado en la conversión enzimática de aspartato en piruvato. El L-triptófano puede medirse usando " Ensayo de fluorescencia de L-triptófano Bridge-It<sup>®</sup>" (Mediomics) que se basa en la actividad de la proteína represora de triptófano y puede detectar triptófano, por ejemplo, en la orina o el suero humano.

Detección y cuantificación de ácidos grasos

40 Los ácidos grasos usados en la invención y los compuestos relacionados (es decir, ácido dodecanodioico; ácido sebáico, ácido azelaico, ácido caproico, ácido undecanodioico, ácido 9,12-dioxo-dodecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato) pueden ser identificados también mediante HPLC (revisado por Lima y Abdalla, 2002, y Chen y Chuang, 2002) [21, 22] o mediante procedimientos GC (véase en Bondia-Pons et al. en 2004 [23], por ejemplo) bien conocidos por la persona con conocimientos en la técnica. Normalmente, estos procedimientos necesitan etapas de preparación de muestras, tales como extracción, purificación y derivatización de lípidos; pueden ser acoplados o no a diferentes procedimientos de detección y de cuantificación, dependiendo del procedimiento de derivatización que se haya usado. Los compuestos de referencia pueden encontrarse fácilmente para permitir una correcta identificación de los ácidos grasos que están siendo buscados.

45

Procedimientos inmunológicos y basados en aptámeros

Los procedimientos inmunológicos son procedimientos que usan un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, un biomarcador, fragmentos y derivados del mismo). El procedimiento inmunológico se usa, en particular, para aislar, dirigir y/o cuantificar el antígeno. Por ejemplo, los procedimientos inmunológicos

incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos fluorescentes.

- 5 Anticuerpo se refiere a un ligando polipeptídico sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que se une específicamente a y que reconoce un epítipo (por ejemplo, un antígeno). El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, incluye también los fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante. Incluye también anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos de cadena sencilla.
- 10 Los procedimientos de detección para ensayar los metabolitos usados en la invención podrían usar un aptámero que se une específicamente a los metabolitos buscados. Los aptámeros son moléculas de ADN monocatenario o ARN sintéticas que reconocen un ligando con una alta especificidad y una alta afinidad; pueden representar una alternativa valiosa a los anticuerpos en el caso de metabolitos sin inmunogenicidad o con una baja inmunogenicidad. Pueden ser usados para ensayar metabolitos de cualquier tipo, y su especificidad permite la
- 15 diferenciación de moléculas estrechamente relacionadas. Pueden ser sintetizados fácilmente mediante la técnica selex y sus variantes, que son bien conocidas en la técnica [24] o pueden ser seleccionados de una biblioteca comercial, tal como, por ejemplo, la de Aptagen ([www.aptagen.com](http://www.aptagen.com)). La detección o la cuantificación se realiza prácticamente de la misma manera que para los procedimientos inmunológicos bien conocidos o con procedimientos dedicados [25].
- 20 Los aspectos y las ventajas adicionales de la presente invención se revelarán en la sección experimental siguiente, que se considerará solo como meramente ilustrativa.

### Ejemplos

#### A) Identificación de biomarcadores de la EA a partir de muestras humanas

##### 1. Preparación de muestras

##### 25 1.1. muestras de suero humano

Las muestras y los datos clínicos se manipularon según los más altos estándares éticos y en el más estricto cumplimiento de todas las reglas y regulaciones, incluyendo las recomendaciones del Comité de Asuntos Éticos, Legales, y Sociales del Consejo de la Organización del Genoma Humano (HUGO, Human Genome Organization) (HUGO-ELSI, 1998); con la Declaración Universal sobre los Derechos Humanos y el Genoma Humano de la

30 Organización para la Educación, la Ciencia y la Cultura de Naciones Unidas (UNESCO) (1997); y con las recomendaciones que guían a los médicos en la investigación biomédica en seres humanos aprobadas por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, 1964 y revisiones posteriores. Todas las muestras se recogieron bajo protocolos clínicos aprobados por U.S. IRB.

Se recogieron dos conjuntos de muestras de suero humano.

35 El primer conjunto se usó para identificar biomarcadores a partir de rondas experimentales de identificación, validación y caracterización LC/MS de picos de masa obtenidos mediante un análisis LC/MS en el marco de las rutas identificadas como alteradas, tal como se ha explicado anteriormente. El segundo, a pesar de ciertas diferencias en los criterios de selección de muestras, confirmó la utilidad de los biomarcadores de la invención a la hora de discriminar los pacientes con EA de los controles

##### 40 1.1.1. Primer conjunto de muestras

Las muestras de suero de 50 sujetos con EA, 3 sujetos con deterioro cognitivo leve (DCL) y 48 controles ancianos sin demencia (CTRL) se obtuvieron de PrecisionMed (San Diego, CA, EE.UU.). El diagnóstico de la EA se basó en una evaluación médica y pruebas neuropsiquiátricas.

Los criterios de selección del primer conjunto de muestras fueron los siguientes:

- 45
- grupos de edades homogéneas (> 65 años),
  - donantes en ayuno (muestras recogidas por la mañana),
  - fecha de muestreo, centro de recogida de muestras, protocolo de muestreo entre pacientes EA, DCL y controles, homogéneos,

- proporción de hombres y mujeres ajustada.

Los datos relativos a esta recogida de muestras se resumen en la Tabla 3 a continuación.

**Tabla 3**

Datos	EA (n = 50)	DCL (n = 3)	CTRL (n = 48)	Valor P
<b>Sexo (H/V)</b>	25/25	1/2	24/24	0,851
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,5±6,1	24,9±2,5	29,7±5,9	0,124
<b>MMSE</b>	17,7±4,7	21,3±3,1	29,3±1,4	8,41 E-28

IMC: Índice de Masa Corporal

1.1.2. Segundo conjunto de muestras

- 5 Las muestras de suero de 42 sujetos con EA y 33 controles ancianos sin demencia (CTRL) se obtuvieron de ABS Inc. (Wilmington, DE, EE.UU.). El diagnóstico de la EA se basó en una evaluación médica y pruebas neuropsiquiátricas.

Los criterios de selección del segundo conjunto de muestras fueron los siguientes:

- grupos de edad homogéneos (> 65 años),
- 10 - fecha de muestreo, centro de recogida de muestras, protocolo de muestreo entre los pacientes con EA y controles, homogéneos,

A los sujetos con EA de este segundo conjunto se les administró Cerebrosilina.

Los datos acerca de esta colección de muestras se resumen en la Tabla 4, a continuación.

**Tabla 4**

Datos	EA (n = 42)	CTRL (n = 33)	Valor P
<b>Sexo (H/V)</b>	29/13	15/18	0,0682
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24,4	25,9	0,026
<b>MMSE</b>	10,1	n/a	n/a

IMC: Índice de Masa Corporal

- 15 Los tubos de separación de suero se invirtieron suavemente 5 veces para mezclar el activador de la coagulación de sangre; a continuación, se permitió que la sangre se coagule durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente en una posición vertical. Los tubos se centrifugaron a continuación a 1.300-1.500 g a temperatura ambiente como máximo 2 horas después de la recogida, durante aproximadamente 10 minutos.

A continuación, los sueros divididos en alícuotas se congelaron inmediatamente a -80°C.

20 1.2. Muestras de plasma humano

Se recogieron los plasmas de 28 sujetos de control sanos y 27 pacientes con EA. Las muestras EA procedían del Department of Neurology, Memory Research Resources Center (Montpellier University Hospital Gui de Chauliac, Francia) y las muestras de plasma de los controles de la misma edad fueron recogidos por el Institut de Santé Publique d'Epidémiologie et de Développement (ISPED, University of Bordeaux, Francia).

- 25 Estos biomarcadores de plasma humano se encuentran también en el suero humano.

1.3. Muestras de ratón de Tg2576, un modelo de ratón para la EA

Se usaron once ratones Tg(HuAPP695.K670N-M671L)2576 (APP695 humana sueca = Tg2576) hembra y doce compañeros de camada de tipo salvaje (WT) para realizar el estudio en animales. Tal como indicó Hsiao [26], este ratón transgénico muestra características de comportamiento, bioquímicas y patológicas que pueden considerarse similares a las observadas en los seres humanos con EA.

- 5 En este modelo, la aparición de los síntomas comienza a los 9-10 meses. A los 17 meses, después de la dislocación cervical, los ratones fueron sometidos a punción cardíaca y se recogieron muestras de sangre de 1 ml en tubos heparinizados enfriados previamente. La sangre entera se centrifugó inmediatamente a 3.000 g durante 15 minutos a 4°C. A continuación, el plasma se retiró cuidadosamente del sedimento después de la centrifugación para evitar cualquier contaminación por las células rojas de la sangre, y se almacenaron alícuotas de  
10 aproximadamente 100 µl en tubos de 1,5 ml de polipropileno a -80°C. A continuación, se realizó un tratamiento de las muestras y un análisis LC/MS, tal como se explica más adelante en la presente memoria.

#### 1.4. Procesamiento de muestras

- Después de la descongelación a temperatura ambiente de las muestras congeladas, se realizó una etapa de precipitación de proteína con metanol (MeOH). Cuatro volúmenes de MeOH se añadieron a 50 µl de cada suero. A  
15 continuación, las soluciones mezcladas se sonicaron, se agitaron con vórtex y se centrifugaron (durante 20 minutos, a 8.000 g y 4°C) antes de la recuperación del sobrenadante (volúmenes disponibles de aproximadamente 350-400 µl). A continuación, las muestras se evaporaron hasta la sequedad (usando un evaporador Turbo Vap) para eliminar el disolvente orgánico. Las muestras se prepararon a continuación dependiendo de un análisis más detallado, o bien cromatografía en fase líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC/MS) o bien cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC/MS). Las muestras se  
20 usaron de manera aleatoria en todas las plataformas, GC y LCs.

### 2. Adquisición de los perfiles metabólicos

#### 2.1. LC-MS/MS

- Las muestras se reconstituyeron con 150 µl de agua desionizada/acetonitrilo (95/5 v/v). Los análisis se realizaron  
25 usando un dispositivo Prominence UFLC de Shimadzu (sueros humanos y plasmas de ratón) o Water Acquity (plasmas humanos). Las muestras se separaron en una columna 150 x 2,1 mm Hypersil Gold C<sub>8</sub> (1,9 µm) (Thermo Fisher Scientific) y cada análisis se realizó a un caudal de 500 µl/min con las fases móviles A (agua desionizada) y B (acetonitrilo), que contenían ambas ácido fórmico al 0,1%. El gradiente consistió en una etapa isocrática de 2 minutos al 95% de fase A, seguido de un gradiente lineal desde el 5 al 100% de la fase B durante los próximos 11  
30 minutos, a continuación, seguida por una etapa isocrática de 12,5 minutos al 100% de la fase B, antes de volver al 95% de la fase A durante 4,5 minutos. El espectrómetro de masas (Exactive, Orbitrap technology de Thermo Fisher Scientific) se equipó con una fuente de ionización por electroaspersión calentada. Los experimentos ESI-MS de obtención de los perfiles de los metabolitos se realizaron sucesivamente en ambos modos de detección de iones positivos y negativos. Los espectros de masas se registraron usando una resolución de masa de 50 000  
35 FWHM en el analizador Exactive. Los análisis de las muestras de Control y EA se aleatorizaron totalmente durante los experimentos LC/MS. Las inyecciones de blanco consistían en una mezcla de H<sub>2</sub>O/ACN (95/5, v/v).

#### 2.2. GC/MS.

- Las muestras destinadas para el análisis GC/MS se volvieron a secar bajo desecación en vacío durante un mínimo de 24 horas antes de ser derivatizadas bajo nitrógeno seco usando bistrimetil-silil-trifluoroacetamida (BSTFA). La  
40 columna de GC fue del 5% de fenilo y la rampa de temperatura fue de 40° a 300°C en un período de 16 minutos. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas Thermo-Finnigan Trace DSQ, de exploración rápida, de un solo cuadrupolo, usando ionización por impacto de electrones. El instrumento fue sintonizado y calibrado diariamente para la resolución de masas y la exactitud de la masa.

### 3. Tratamiento de los datos LC/MS y/o GC/MS brutos

- 45 3.1. Sueros humanos y plasmas de ratones

Los perfiles metabólicos LC/MS se adquirieron usando el software Xcalibur versión 2.1. La canalización de procesamiento de datos, incluyendo el filtrado, la detección de características y la alineación de los picos cromatográficos, se consiguió usando el software XCMS (Scripps Center, La Jolla, CA, EE.UU.) de acceso abierto. Se generó una lista de picos para un procesamiento adicional mediante un análisis estadístico.

- 50 3.2. Plasmas humanos

Los fundamentos de hardware y software para estos componentes informáticos eran la LAN troncal, y un servidor de base de datos que ejecutaba Oracle 10.2.0.1 Enterprise Edition.

4. Identificación de los metabolitos que discriminan entre muestras con enfermedad de Alzheimer y muestras de control.

- 5 Con el fin de identificar los metabolitos que discriminan entre pacientes de Alzheimer y pacientes de control en el primer conjunto de muestras de suero humano, cada una de las 3.537 variables que pasaron el tratamiento de control de calidad se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) ajustado a la edad, según el siguiente modelo lineal:

$$y_i \sim \text{Estado} + \text{Edad} + \text{Género}$$

- 10 en el que  $y_i$  corresponde a cada una de las 3.537 variables. Un punto de corte de 0,005 en los valores p resultantes (que corresponde a una tasa de falso descubrimiento local del 5% [27]) seleccionó 795 variables significativas.

Los modelos de rendimiento de clasificación a partir de variables individuales o una combinación de variables se evaluaron con ABC, sensibilidad y especificidad en base a una validación de submuestreo aleatorio repetido mediante análisis lineal discriminante (LDA) con el fin de evitar un sobreajuste (“overfitting”) (paquete `caret` R [28]).

- 15 5. identificación de biomarcadores; petición de bases de datos de acceso libre

Las anotaciones de las variables brutas según la masa  $m/z$  de cada señal se realizaron mediante la petición de bases de datos de metabolitos de acceso libre, tales como KEGG, HMDB, Metlin o Lipid Maps. Estas anotaciones automáticas se realizaron en cada variable considerada como asociada con un pico molecular  $[M+H]^+$  o  $[M-H]^-$  en los modos positivo o negativo, respectivamente). De esta manera, se identificaron los picos moleculares, picos secundarios o aductos asociados con el mismo metabolito mediante anotación automática.

- 20 Las señales de interés, asociadas con variables discriminativas y/o anotadas, se validaron en espectros de masas de muestras aleatorias (EA, DCL y muestras de control) usando el software Xcalibur 2.1 (Thermo Fischer Scientific).

- 25 Los compuestos no identificados tienen el potencial de ser identificados mediante una futura adquisición de un patrón purificado coincidente o mediante un análisis estructural clásico.

6. Caracterización de los metabolitos de interés: análisis y fragmentación de las señales diana.

Algunos de los metabolitos considerados como supuestos biomarcadores se analizaron de nuevo en las mismas condiciones cromatográficas usadas para la adquisición de los perfiles metabólicos, excepto que el dispositivo LC/MS-MS fue un instrumento de cromatografía UPLC Accela acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific).

- 30 Se consiguieron los espectros CID (Collision Induced Dissociation, disociación inducida por colisión) (es decir, espectros de fragmentación) para cada señal diana, si estaban presentes en cantidad suficiente. La fragmentación se realizó en exploración completa de las muestras biológicas y un evento dependiente de los datos (usando una molécula estándar) en 7 500 FWHM. Se usaron tres energías de colisión a 20, 30 y 40 (unidad arbitraria). Todas las exploraciones completas y los espectros CID se interpretaron usando el software Xcalibur 2.1 (Thermo Fischer Scientific).

Se realizó una identificación manual de los supuestos metabolitos a partir de los resultados de los productos de fragmentación.

- 40 Cuando había disponible un compuesto patrón, era posible una identificación precisa de la molécula correspondiente a la masa y al tiempo de retención.

7. Identificación de los metabolitos

- 45 Se identificaron treinta y un metabolitos de suero, correspondientes a 45 aductos primarios para el modo positivo o negativo, a partir de este análisis (Tabla 5). El valor  $m/z$  observado, el tiempo de retención aproximado y la masa monoisotópica proporcionados en las Tablas 1 y 2 permiten identificar fácilmente los biomarcadores en una muestra de un paciente. Los valores  $m/z$  observados pueden estar sometidos a variaciones de hasta 15 ppm debido a la precisión del procedimiento usado para analizar la muestra. Los tiempos de retención aproximados se proporcionan para facilitar la detección de los metabolitos, pero pueden usarse diversos procedimientos diferentes para la dosificación de estos metabolitos.

Tabla 5

Metabolito	M/z ((M+H) o (M-H))	Tiempo de retención (min)	Modo de ionización	Valor P	Variación en EA (con respecto a la muestra de control)
Ácido azelaico	189,11139	6,09598	+	4,59E-09	incremento
Ácido azelaico	187,09608	6,07627	-	4,57E-07	incremento
Ácido dodecanodioico	229,14336	7,76616	-	3,88E-03	incremento
Ácido sebácico	203,12714	6,69376	+	1,38E-10	incremento
Ácido sebácico	201,11236	6,67086	-	1,06E-07	incremento
Ácido hipúrico	180,06510	4,62134	+	3,21E-02	disminución
Ácido hipúrico	178,04986	4,59374	-	1,85E-02	disminución
Triptófano	203,08168	3,89386	-	4,76E-04	disminución
Triptófano	205,09669	3,94109	+	3,80E-05	disminución
Tirosina	182,08092	1,22084	+	6,29E-05	disminución
Fenilacetilglutamina	265,11725	4,72844	+	1,35E-02	incremento
Fenilacetilglutamina	263,10342	4,70433	-	1,10E-02	incremento
Ácido caproico	115,07516	4,69762	-	8,57E-05	incremento
Ácido Iso-valérico	101,05930	3,44798	-	8,24E-05	incremento
Cafeína	195,08706	4,49411	+	2,76E-03	disminución
L-citrulina	176,10229	0,85602	+	3,00E-02	disminución
PFAM (22:1)	338,34022	13,69282	+	7,90E-28	disminución
Ácido 4-metil-2-oxovalérico	129,05427	4,41515	-	2,93E-02	disminución
PFAM (20:1)	310,30909	13,01947	+	1,11E-35	disminución
PFAM (22:2)	336,32463	13,17333	+	1,15E-32	disminución
Teofilina y/o paraxantina*	181,07141	3,67416	+	8,63E-04	disminución
Ácido valérico	101,05930	4,41422	-	2,14E-02	disminución
Ácido aminoisobutírico	102,05464	0,84354	-	3,36E-03	incremento
Ácido aminoisobutírico	104,07150	0,87952	+	2,74E-04	disminución

<b>aspartato</b>	132,02883	0,85020	-	5,01E-08	incremento
<b>Asp-Phe</b>	281,11195	4,08528	+	9,12E-13	incremento
<b>Asp-Phe</b>	279,09810	4,05148	-	1,09E-12	incremento
<b>Ácido undecanodioico</b>	217,14292	7,25432	+	5,17E-09	incremento
<b>Ácido undecanodioico</b>	215,12814	7,23320	-	1,86E-07	incremento
<b>1-Monopalmitina</b>	331,28362	12,13150	+	6,78E-07	incremento
<b>Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico</b>	229,14282	7,16655	+	8,63E-05	incremento
<b>Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico</b>	227,12787	7,14630	-	2,16E-03	incremento
<b>Ácido nonenedioico</b>	187,09584	5,19255	+	5,62E-07	incremento
<b>Ácido nonenedioico</b>	185,08082	5,17398	-	1,10E-05	incremento
<b>Octadecadienoil-glicero-3-fosfato</b>	433,23620	10,69926	-	3,71E-03	incremento
<b>Alcohol sulfobencílico</b>	187,00591	5,31783	-	1,51E-03	incremento
<b>Ácido glicocólico</b>	466,31603	7,58454	+	1,29E-02	disminución
<b>Ácido glicocólico</b>	464,29950	7,54681	-	5,78E-03	disminución
<b>Guanosina</b>	284,09824	1,15543	+	2,00E-10	disminución
<b>Guanosina</b>	282,08365	1,14429	-	1,40E-08	disminución
<b>Inosina</b>	269,08695	1,23465	+	9,99E-08	disminución
<b>Inosina</b>	267,07274	1,18228	-	1,10E-07	disminución
<b>L-treónico</b>	135,02841	0,84726	-	6,96E-03	disminución
<b>Ser-Phe</b>	253,11788	1,79742	+	1,75E-07	disminución
<b>Ser-Phe</b>	251,10285	1,73240	-	6,54E-08	disminución

\* Biomarcador corresponde a teofilina o paraxantina o una mezcla de las mismas;

Un análisis LC/MS similar al aplicado al conjunto 1 de muestras de sueros humanos se realizó también para la muestra sanguínea de ratón Tg2576, un modelo transgénico para la EA y, tal como se ha indicado anteriormente, para una segunda colección de sueros humanos. Los resultados se replicaron en el otro conjunto de muestras de suero humano para 17 de los metabolitos identificados en primer lugar. Curiosamente, los picos de masas correspondientes a 7 de estos 17 metabolitos demostraron estar estadísticamente asociados al estado de la enfermedad de los animales transgénicos y, además, su cantidad variaba de la misma manera que en los seres humanos (Tabla 6). El análisis de plasma humano (LC/MS - GC/MS) confirmó la utilidad de los biomarcadores identificados durante el análisis de los sueros.

5

**Tabla 6**

Metabolitos replicados en seres humanos	Variación de nivel (EA frente CTRL)	Variación de nivel cuando se replicó en ratón
Ácido azelaico	incremento	incremento
Ácido 4-metil-2-oxovalérico	disminución	disminución
Ácido dodecanodioico	incremento	incremento
Triptófano	disminución	disminución
PFAM (22:1)	disminución	disminución
PFAM (20:1)	disminución	disminución
PFAM (22:2)	disminución	disminución
Ácido sebácico	incremento	n/a
Ácido hipúrico	disminución	n/a
Tirosina	disminución	n/a
Fenilacetilglutamina	incremento	n/a
Ácido caproico	incremento	n/a
Ácido Iso-valérico	incremento	n/a
Cafeína	disminución	n/a
L-citrulina	disminución	n/a
Teofilina y/o paraxantina*	disminución	n/a
Ácido valérico	disminución	n/a

\* Biomarcador corresponde a teofilina o paraxantina o una mezcla de las mismas; n/a: no disponible

#### B) Análisis de los resultados

1. Los conjuntos de biomarcadores de la invención permiten un diagnóstico preciso y eficiente de la EA y trastornos relacionados.

5 Aunque los biomarcadores de la invención son particularmente eficientes para el diagnóstico de la EA y los trastornos relacionados cuando se usan individualmente, el uso de conjuntos de al menos dos biomarcadores es de interés con el fin de aumentar la sensibilidad de los ensayos de diagnóstico.

Con el fin de configurar conjuntos eficientes de biomarcadores (clasificadores) para el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados, se realizó un análisis discriminante lineal [29].

10 Se calcularon el ABC, la sensibilidad y la especificidad como la media de 100 iteraciones de re-exploración. Para cada iteración, 2/3 de las muestras se usaron para entrenar el clasificador, y el tercio restante se usó para ensayar el clasificador y para proporcionar las estimaciones de ABC, sensibilidad y especificidad.

Los presentes inventores han podido identificar varios conjuntos de biomarcadores de la invención con sensibilidad y especificidad satisfactorias que se enumeran en la Tabla 7. La sensibilidad es la proporción de sujetos

categorizados correctamente como enfermos de entre aquellos que realmente tienen la enfermedad. De manera similar, la especificidad es la proporción de sujetos que categorizados correctamente como no enfermos de entre todos los sujetos que realmente no tienen la enfermedad. Cabe señalar que se observó una sensibilidad superior al 80% para más del 50% de estos conjuntos.

5

**Tabla 7**

<b>Conjunto de biomarcadores</b>	<b>ABC</b>	<b>Sensibi- lidad</b>	<b>Especi- ficidad</b>
Asp-Phe + Ser-Phe	93	88	84
Triptófano + Asp-Phe + ácido caproico	88	85	80
Ácido azelaico + Asp-Phe + ácido L-treónico	87	81	80
L-citrulina + ácido iso-valérico + aspartato	85	81	81
Ácido caproico + Ser-Phe + ácido undecanodioico	89	83	83
L-citrulina + inosina + aspartato + Ser-Phe	91	90	80
Tirosina + 1-monopalmitina + aspartato + Ser-Phe	90	88	80
Ácido nonenedioico + triptófano + Asp-Phe + ácido L-treónico	88	80	81
Teofilina y/o paraxantina* + Asp-Phe + ácido L-treónico + ácido sebácico	87	80	81
L-citrulina + triptófano + aspartato + ácido L-treónico	86	81	82
Ácido nonenedioico + ácido undecanodioico + alcohol sulfobencílico + Ser-Phe	86	80	80
L-citrulina + ácido undecanodioico ácido + aspartato + alcohol sulfobencílico	85	81	80
L-citrulina + ácido azelaico + aspartato + ácido glicocólico	84	81	80
L-citrulina + teofilina y paraxantina* + ácido azelaico	83	83	75
L-citrulina + ácido azelaico + ácido valérico + fenilacetilglutamina	83	80	75
L-citrulina + ácido hipúrico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico + triptófano	83	80	77
L-citrulina + ácido azelaico + triptófano + ácido 4-metil-2-oxovalérico	83	80	75
L-citrulina + ácido azelaico + triptófano + ácido iso-valérico + fenilacetilglutamina	83	82	75
L-citrulina + tirosina + ácido azelaico + triptófano + ácido iso-valérico	83	80	75
PFAM (20:1) + PFAM (22:2)	98	89	92
PFAM (20:1) + PFAM (22:1)	99	93	94
PFAM (22:2) + PFAM (22:1)	97	94	89

ES 2 731 678 T3

PFAM (20:1) + PFAM (22:2) + PFAM (22:1)	<b>99</b>	<b>94</b>	<b>94</b>
Cafeína + Asp-Phe + Ser-Phe	<b>92</b>	<b>88</b>	<b>81</b>
Asp-Phe + ácido dodecanodioico + Ser-Phe	<b>93</b>	<b>89</b>	<b>82</b>
Asp-Phe + guanosina + Ser-Phe	<b>93</b>	<b>89</b>	<b>82</b>
Asp-Phe + ácido hipúrico + Ser-Phe	<b>92</b>	<b>86</b>	<b>85</b>
Asp-Phe + ácido 4-metil-2-oxovalérico + Ser-Phe	<b>92</b>	<b>89</b>	<b>82</b>
Asp-Phe + Ser-Phe + octadecadienoil-glicero-3-fosfato	<b>92</b>	<b>88</b>	<b>81</b>
Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico + Asp-Phe + Ser-Phe	<b>92</b>	<b>88</b>	<b>82</b>
Asp-Phe + Ser-Phe + fenilacetilglutamina	<b>92</b>	<b>87</b>	<b>80</b>
Ácido azelaico + ácido dodecanodioico	<b>78</b>	<b>78</b>	<b>67</b>
Ácido azelaico + ácido sebácico	<b>78</b>	<b>78</b>	<b>67</b>
Ácido azelaico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>79</b>	<b>79</b>	<b>68</b>
Ácido azelaico + ácido undecanodioico	<b>80</b>	<b>78</b>	<b>70</b>
Ácido azelaico + ácido undecanodioico + ácido dodecanodioico	<b>78</b>	<b>78</b>	<b>67</b>
Ácido azelaico + ácido undecanodioico + ácido sebácico	<b>80</b>	<b>77</b>	<b>72</b>
Ácido azelaico + ácido undecanodioico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>76</b>	<b>78</b>	<b>66</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico	<b>79</b>	<b>78</b>	<b>68</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido dodecanodioico	<b>79</b>	<b>76</b>	<b>69</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido sebácico	<b>79</b>	<b>74</b>	<b>69</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico +	<b>77</b>	<b>75</b>	<b>67</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido undecanodioico	<b>80</b>	<b>76</b>	<b>69</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido undecanodioico + ácido dodecanodioico +	<b>79</b>	<b>74</b>	<b>68</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido undecanodioico + ácido sebácico	<b>78</b>	<b>75</b>	<b>68</b>
Ácido nonenedioico + ácido azelaico + ácido undecanodioico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>76</b>	<b>74</b>	<b>64</b>
Ácido nonenedioico + ácido dodecanodioico	<b>75</b>	<b>73</b>	<b>68</b>
Ácido nonenedioico + ácido sebácico	<b>77</b>	<b>72</b>	<b>72</b>

ES 2 731 678 T3

Ácido nonenedioico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>75</b>	<b>70</b>	<b>68</b>
Ácido nonenedioico + ácido undecanodioico	<b>79</b>	<b>74</b>	<b>68</b>
Ácido nonenedioico + ácido undecanodioico + ácido dodecanodioico	<b>78</b>	<b>74</b>	<b>67</b>
Ácido nonenedioico + ácido undecanodioico + ácido sebácico	<b>79</b>	<b>75</b>	<b>69</b>
Ácido nonenedioico + ácido undecanodioico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>76</b>	<b>72</b>	<b>67</b>
Ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>76</b>	<b>72</b>	<b>69</b>
Ácido undecanodioico + ácido dodecanodioico	<b>79</b>	<b>78</b>	<b>71</b>
Ácido undecanodioico + ácido sebácico	<b>78</b>	<b>77</b>	<b>70</b>
Ácido undecanodioico + ácido sebácico + ácido dodecanodioico	<b>77</b>	<b>75</b>	<b>68</b>
Ácido sebácico + tirosina	<b>84</b>	<b>78</b>	<b>75</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + tirosina	<b>84</b>	<b>79</b>	<b>76</b>
Ácido sebácico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>77</b>	<b>74</b>
Ácido sebácico + triptófano + Tirosina	<b>85</b>	<b>80</b>	<b>75</b>
Sebácico ácido + triptófano	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>74</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>79</b>	<b>75</b>
Ácido dodecanodioico + ácido sebácico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>82</b>	<b>75</b>	<b>72</b>
Ácido dodecanodioico + ácido sebácico + tirosina	<b>82</b>	<b>75</b>	<b>73</b>
Ácido sebácico + triptófano + ácido undecanodioico	<b>84</b>	<b>85</b>	<b>73</b>
Ácido dodecanodioico + ácido sebácico + triptófano + tirosina	<b>83</b>	<b>78</b>	<b>74</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano + tirosina	<b>85</b>	<b>85</b>	<b>77</b>
Ácido dodecanodioico + ácido sebácico + triptófano	<b>84</b>	<b>85</b>	<b>74</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>82</b>	<b>78</b>	<b>74</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico	<b>84</b>	<b>82</b>	<b>71</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + tirosina	<b>83</b>	<b>79</b>	<b>73</b>
Ácido sebácico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>81</b>	<b>73</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano + ácido undecanodioico	<b>85</b>	<b>86</b>	<b>75</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano	<b>85</b>	<b>87</b>	<b>76</b>

ES 2 731 678 T3

Ácido dodecanodioico + ácido sebácico + triptófano + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>73</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	<b>84</b>	<b>83</b>	<b>75</b>
Ácido dodecanodioico + ácido sebácico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>80</b>	<b>73</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano + tirosina	<b>84</b>	<b>84</b>	<b>76</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico	<b>82</b>	<b>81</b>	<b>68</b>
Ácido hipúrico + ácido sebácico + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>82</b>	<b>70</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano	<b>84</b>	<b>86</b>	<b>75</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + ácido undecanodioico	<b>81</b>	<b>81</b>	<b>67</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	<b>82</b>	<b>82</b>	<b>72</b>
Ácido dodecanodioico + ácido sebácico	<b>81</b>	<b>81</b>	<b>69</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + triptófano	<b>76</b>	<b>78</b>	<b>68</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico	<b>69</b>	<b>71</b>	<b>63</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido sebácico + triptófano + ácido undecanodioico	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>74</b>
Ácido dodecanodioico + tirosina	<b>73</b>	<b>68</b>	<b>67</b>
Ácido dodecanodioico + triptófano	<b>74</b>	<b>74</b>	<b>61</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + tirosina	<b>72</b>	<b>70</b>	<b>68</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + triptófano + ácido undecanodioico	<b>82</b>	<b>80</b>	<b>73</b>
Ácido hipúrico + triptófano	<b>75</b>	<b>74</b>	<b>64</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + ácido undecanodioico	<b>80</b>	<b>78</b>	<b>68</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + triptófano + tirosina	<b>76</b>	<b>75</b>	<b>71</b>
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>80</b>	<b>76</b>	<b>71</b>
Ácido dodecanodioico + triptófano + tirosina	<b>75</b>	<b>73</b>	<b>69</b>
Ácido dodecanodioico + triptófano + ácido undecanodioico	<b>81</b>	<b>83</b>	<b>69</b>
Ácido dodecanodioico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>80</b>	<b>75</b>	<b>68</b>
Ácido hipúrico + tirosina + ácido undecanodioico	<b>82</b>	<b>76</b>	<b>71</b>
Ácido hipúrico + triptófano + tirosina	<b>75</b>	<b>68</b>	<b>71</b>

Ácido hipúrico + triptófano + ácido undecanodioico	84	81	73
Ácido hipúrico + ácido undecanodioico	81	78	68
Ácido hipúrico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	83	79	72
Ácido hipúrico + tirosina	72	61	69
Ácido dodecanodioico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	81	80	68
Ácido dodecanodioico + ácido hipúrico + triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	81	78	70
Tirosina + ácido undecanodioico	81	75	69
Triptófano + ácido undecanodioico	83	85	70
Triptófano + tirosina + ácido undecanodioico	83	80	69
Triptófano + tirosina	73	63	65
Asp-Phe + ácido valérico + Ser-Phe	92	87	83

\* Biomarcador corresponde a la teofilina o paraxantina o una mezcla de las mismas; ABC: área bajo la curva.

2. Los biomarcadores de la invención permiten la subclasificación de los pacientes.

La Tabla 8 proporciona, para los biomarcadores más significativos seleccionados tal como se ha explicado anteriormente, una desviación estimada en pacientes que padecen DCL o EA expresada como un porcentaje del nivel medido en el control (primer conjunto de muestras de suero humano).

5 Curiosamente, cuando un biomarcador seleccionado encontrado en menor cantidad en EA, se encontró también en menor cantidad en pacientes con DCL (Tabla 8) y, al contrario, un biomarcador encontrado en mayor cantidad en EA se encontró en mayor cantidad en pacientes de DCL.

Por lo tanto, los biomarcadores de la invención proporcionan herramientas para el diagnóstico de la EA y trastornos relacionados y, además, también para predecir el riesgo de que un paciente sufra una conversión desde DCL a EA establecida.

10

**Tabla 8**

Metabolito	Valor P	Variación en EA (% de control)	ABC (EA)	Sensibilidad (EA)	Sensibilidad (EA)	Variación de DCL (% de control)
1-monopalmitin	6,78E-07	incremento ***	76,3	68,8	65	Incremento
Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico	8,63E-05	incremento ***	69,9	61,7	66,8	incremento *
Ácido aminoisobutírico	2,74E-04	disminución ***	67,9	60	67,9	disminución
Aspartato	5,01E-08	incremento ***	80	74,4	67	incremento **
Asp-Phe	9,12E-13	incremento ***	84,8	76,2	76,7	incremento *
Ácido azelaico	4,59E-09	incremento ***	79,9	79,9	67,5	incremento *

Cafeína	2,76E-03	disminución **	64,9	68,5	52,9	disminución
Ácido caproico	8,57E-05	incremento ***	66,8	62,5	55,2	Incremento
Ácido dodecanodioico	3,88E-03	incremento **	68,8	67,8	68,4	incremento ***
Ácido glicocólico	5,78E-03	disminución *	65,5	59,4	66,1	* disminución
Guanosina	2,00E-10	disminución ***	80,3	84,8	66,4	disminución
Ácido hipúrico	1,85E-02	disminución *	63	53,8	67	disminución
Inosina	9,99E-08	disminución ***	76,6	77,2	67,1	disminución
Ácido Iso-valérico	8,24E-05	incremento ***	68,7	61,2	61	incremento *
L-citrulina	3,00E-02	disminución *	60,7	52,1	63,2	disminución
Ácido L-treónico	6,96E-03	disminución *	62,6	57,1	59,9	disminución
Ácido nonenedioico	5,62E-07	incremento ***	75,5	71,8	70,4	incremento *
Octadecadienoil-glicero-3-fosfato	3,71E-03	incremento **	66,6	59,3	64,5	incremento
PFAM (20:1)	1,11E-35	disminución ***	97,6	90,3	91,2	disminución ***
PFAM (22:1)	7,90E-28	disminución ***	95,5	91,4	85,7	disminución ***
PFAM (22:2)	1,15E-32	disminución ***	96,6	90,8	89,5	disminución ***
Ácido sebácico	1,38E-10	incremento ***	82,7	80,9	71,4	incremento *
Ser-Phe	6,54E-08	disminución ***	77,9	78,8	63,7	disminución *
Alcohol sulfobencílico	1,51E-03	incremento **	65,1	53,4	70,1	Incremento
Triptófano	3,80E-05	disminución ***	72,1	65,4	58,2	disminución
Tirosina	6,29E-05	disminución ***	70,1	59,5	65,4	disminución *
Ácido undecanodioico	5,17E-09	incremento ***	79,8	76,8	72,1	incremento *

\*\*\*: las diferencias entre los pacientes de control y pacientes EA o pacientes DCL y de control son significativas con un valor  $p < 0,001$ ;

\*\* : valor  $p < 0,005$ ;

\* : valor  $p < 0,05$ .

3. Los biomarcadores de la descripción pueden variar como una función de la respuesta a un tratamiento.

Los fármacos que tienen como diana el sistema colinérgico (por ejemplo, los inhibidores de la acetilcolinesterasa: donepezil, rivastigmina o galantamina) o los inhibidores de NMDA (tal como memantina) son los únicos medicamentos aprobados en la actualidad y proporcionados a pacientes con EA para contrarrestar los síntomas neurológicos de la EA. La Tabla 9 a continuación enumera los biomarcadores que se ha encontrado que varían de manera significativa como una función de la presencia de dichos tratamientos. Los niveles observados para estos biomarcadores están en una posición intermedia en comparación con los sujetos enfermos y los sujetos sanos (Fig. 1 y 2). Esto se observa también en el suero de pacientes con DCL (no se muestra). De esta manera, los

biomarcadores usados en la invención son eficaces en la monitorización de la respuesta de los pacientes a los tratamientos. Curiosamente, la desviación de algunos de estos biomarcadores es específica además a un tratamiento determinado.

Tabla 9

Metabolito	Asociación con tratamiento	
	Inhibidores de AChE	Memantina
Asp-Phe	+	+
Ácido glicocólico	-	+
Guanosina	+	+
Inosina	+	+
Tirosina	-	+
PFAM (20:1)	+	-
PFAM (22:1)	+	-
PFAM (22:2)	+	-
+: El nivel de expresión del biomarcador se correlaciona significativamente con el tratamiento; -: El nivel de expresión del biomarcador no se correlaciona significativamente con el tratamiento; n/a: datos no disponibles.		

5

### C. Cuantificación de los biomarcadores

Se realizó un análisis cuantitativo sobre el primer conjunto de muestras de suero humano (véase A) 1. Muestras de suero humano). Tres biomarcadores de interés, concretamente, ácido sebácico, ácido dodecanodioico y triptófano, se cuantificaron de manera significativamente diferencial en los sueros con EA en comparación con las muestras de control.

10

#### 1. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS

##### 1.1. Muestras biológicas

El estudio se realizó en los dos grupos del primer conjunto de muestra de suero humano.

##### 1.2. Toma de muestras de tejido: recogida de suero

15

Se requirió un volumen de 8 ml de tubos separadores de suero (SST, Serum Separator Tubes) para recoger las muestras de sangre humana. Los criterios de selección de las muestras eran los mismos que los descritos anteriormente.

##### 1.3. Patrones y reactivos

20

Los siguientes patrones (internos) puros marcados o no marcados de los tres metabolitos de interés se adquirieron en a Sigma-Aldrich:

- L-triptófano, fórmula  $C_{11}H_{12}N_2O_2$
- L-triptófano-D5 (indol-d5), fórmula  $C_{11}D_5H_7N_2O_2$
- ácido dodecanodioico, fórmula  $C_{12}H_{22}O_4$

- ácido [1,12-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]dodecanodioico, fórmula <sup>13</sup>C<sub>2</sub>C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>,
- ácido sebácico, fórmula C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>
- ácido d16 sebácico, fórmula C<sub>10</sub>D<sub>16</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

5 Los disolventes orgánicos para el grado gradiente de HPLC fueron: metanol (MeOH) [VWR Prolabo, HiPer-Solv CHROMANORM, ref. 20864.320] y acetonitrilo (ACN) [Sigma-Aldrich, Chromasolv, ref. 34851-2.5L]. El ácido fórmico (HCOOH) añadido al disolvente fue del 99-100% de pureza (VWR Prolabo, AnalaR NORMAPUR). El agua era agua ultra-pura propia (H<sub>2</sub>O) (USF Elga, Maxima II).

#### 1.4. Instrumentación

10 Las señales metabólicas se adquirieron en el modo de ionización negativa usando un espectrómetro de masas Q-Exacte (Orbitrap technology) equipado con una nueva fuente de iones por electrodispersión calentada HESI-II (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.). Las separaciones de cromatografía en fase líquida se realizaron usando un dispositivo de cromatografía en fase líquida de ultra-alto rendimiento (UHPLC) Transcend (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.). El sistema se hizo funcionar con el software Xcalibur (versión 2.2, Thermo Fischer Scientific).

#### 15 1.4.1. (Ajuste de los) Parámetros de la fuente de iones

Los parámetros fueron los siguientes: gas de protección/impulsión = 80 (AU), gas auxiliar = 20 (AU), gas de barrido = 0 (UA), voltaje de pulverización = | 2,50 | kV, temperatura capilar = 380°C, radio-frecuencia lente S = 70 (UA), temperatura del calentador = 200°C. La Tabla 10 resume las intensidades de cada compuesto para estos parámetros optimizados.

20

**Tabla 10: Parámetros de la fuente de iones**

Patrón	Masa teórica de señal [MH] <sup>-</sup> (m/z)	La intensidad de la señal (promedio de 0,30 min)
Triptófano	203,0826009	1,32E + 08
Ácido sebácico	201,1132323	2,05E + 09
Ácido dodecanodioico	229,1445324	1,39E09 (Nb.: Cap T°C = 400°C y calentador = 360°C)

#### 1.4.2. Fragmentación parámetros (HCD)

25 La Tabla 11 resume los parámetros de disociación inducida por colisión (HCD, Higher-energy Collisional-induced Dissociation) de energía más alta (es decir, los valores de energía de colisión normales (NCE, Normal Collision Energy)) obtenidos para cada patrón y la transición usada para la cuantificación específica de cada compuesto.

**Tabla 11: Parámetros de fragmentación (HCD)**

Patrón	Señal precursora (m/z)	Intervalo exploración (m/z)	Señal resultante para la cuantificación (m/z)	Pérdida neutra	NCE (unidad arbitraria)
Triptófano	203,0826009	50-225	116,05072	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	33
Ácido sebácico	201,1132323	50-225	183,10275	H <sub>2</sub> O	32
Ácido dodecanodioico	229,1445324	50-250	211,13425	H <sub>2</sub> O	45

Triptófano-d5	208,1139847	50-230	121,0821	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	42
Ácido sebácico [d16]	217,2136603	50-240	153,20091	CD <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	37
Ácido dodecanodioico [2x13C]	231,151242	50-255	168,14766	[13]CH <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	64

#### 1.4.3. Procedimiento de cromatografía en fase líquida (LC)

5 Se desarrolló un procedimiento cromatográfico específico para este estudio. Se eligió la columna cromatográfica Kinetex C8 y se ajustó a 60°C. Para cada muestra, se inyectaron 10 µl en el instrumento y el caudal se estableció a 400 µl/min.

Las fases móviles estaban compuestas por (A) agua ultra-pura (H<sub>2</sub>O) y (B) acetonitrilo (ACN) de grado cromatografía en fase líquida de alto rendimiento (HPLC), conteniendo ambas 0,1% de ácido fórmico (HCOOH). El gradiente usado se resume en la Tabla 12.

**Tabla 12: Condiciones de gradiente cromatográfico usadas para los experimentos LC-MS**

Tiempo (min)	Duración(es)	% A	% B	Tipo de gradiente
de 0 a 2	120	95	5	Isocrático
de 2 a 8	360	37	63	Rampa
de 8 a 8,17	10	5	95	Rampa
de 8,17 a 13,17	300	5	95	Isocrático
de 13,17 a 13,18	1	95	5	Rampa
de 13,18 a 17	229	95	5	Isocrático

10

#### 1.5. Preparación de las piscinas de normas

Se constituyeron dos lotes diferentes antes de la preparación de la muestra. El primer lote era una mezcla de los patrones no marcados y se denominó lote\_std. El segundo lote era una mezcla de los patrones (internos) marcados y se denominó lote\_IS. Ambos lotes se prepararon tal como se describe a continuación.

##### 15 1.5.1. Grupo de patrones (lote\_std)

Los patrones (no marcados) se pesaron y se solubilizaron con un disolvente apropiado. Se mezclaron entre sí a una concentración final de 600X y se almacenaron a -20°C.

La concentración final en el lote 600X fue de 1.800 µg/ml para triptófano, 6 µg/ml para ácido sebácico y 2,4 µg/ml para ácido dodecanodioico.

20 A partir de este lote lote\_std 600X, se prepararon trece soluciones hijas mediante dilución en serie en MeOH. Estas soluciones fueron las siguientes: 300X, 225X, 180X, 150X, 105X, 60X, 50X, 45X, 30X, 27X, 22,5X, 18X y 15X. Las soluciones 300X, 225X, 150X, 105X, 60X, 45X, 30X, 22,5X y 15X se usaron para la preparación de conjuntos de calibración (véase el apartado B.1.6.2), mientras que las soluciones 180X, 50X, 27X y 18X se usaron para la preparación de sus muestras de control de calidad (QC, Quality Control) asociadas.

##### 25 1.5.2. Grupo de patrones internos (lote\_IS)

Los patrones internos (IS, Internal Standards) (marcados) se pesaron y se solubilizaron con un disolvente apropiado. Se agruparon en una concentración final de 30X y se almacenaron a -20°C. La concentración final en el

lote 30X era de 180 µg/ml para el triptófano-d5, de 0,9 µmg/ml para ácido D16 sebácico y de 1,2 µg/ml para el ácido 2x13C dodecanodioico.

Este lote se usó para enriquecer con 5 µl todas las muestras antes de la extracción (véase el apartado B.1.6).

1.6. Planificación y preparación ejemplar

- 5 La preparación de muestras se realizó durante 3 días. La planificación de la preparación de la muestra se describe en la Tabla 13.

**Tabla 13: Lista de preparación de la muestra**

	Día 1	Día 2	Día 3
Muestras biológicas	Preparación del primer lote (54 muestras)	Preparación de segundo lote (54 muestras)	
Curvas de calibración	Preparación de conjunto de calibración CTRL1 y muestras de control de calidad (1)	Preparación de conjunto de calibración CTRL1 y muestras de control de calidad (2)	Preparación de conjunto de calibración CTRL2 y muestras de control de calidad

10 1.6.1. Muestras biológicas

Para cada alícuota de muestra de suero, una parte alícuota de 200 µl de biofluido congelado se descongeló en el banco a temperatura ambiente (RT°) durante 1 hora [etapa 1] y se sometió a agitación vorticial durante 5 segundos [etapa 2]. Para cada muestra, se retiraron 50 µl [etapa 3] y se preparó como se indica a continuación antes de la adquisición LC-MS/MS:

- 15
- 50 µl de muestra de suero + 200 µl de MeOH (= etapa de precipitación de proteínas) [etapa 4];
  - Adición de 5 µl del lote\_IS 30x [etapa 5];
  - 5 segundos de un tratamiento vorticial [etapa 6];
  - 5 minutos de tratamiento con ultrasonidos a temperatura ambiente [etapa 7];
  - 5 segundos de tratamiento vorticial [etapa 8];
- 20
- 20 minutos bajo agitación (400 rpm) a temperatura ambiente [etapa 9];
  - 5 segundos de un tratamiento vorticial [etapa 10];
  - Centrifugación a 10.000 g a 4°C durante 10 minutos [etapa 11];
  - Recuperación del sobrenadante a temperatura ambiente [etapa 12];
  - Evaporación hasta la sequedad (flujo de N2) a 30°C durante 90 minutos [etapa 13];
- 25
- Disolución en 150 µl de una mezcla de H2O/ACN/HCOOH (95/5/0,01, v/v/v) establecida a 4°C [etapa 14];
  - 5 segundos de tratamiento vorticial [etapa 15];
  - Centrifugación a 10.000 g a 4°C durante 5 minutos [etapa 16];
  - Recuperación de 100 µl del sobrenadante a temperatura ambiente y transferencia a un vial de inyección [etapa 17].

Se prepararon cinco "blancos" de extracción, tal como se ha descrito anteriormente, con 50 µl de agua ultra-pura colocada en cinco tubos de recogida a -80°C el día.

Cabe señalar que la concentración final de IS fue de 1X (añadido a cada vial).

#### 1.6.2. Curvas de calibración

- 5 Se prepararon tres conjuntos de calibración y su QC asociado, dos a partir de un lote de muestra de suero y uno en agua.

Conjunto de calibración CTRL1 y muestras de QC

El conjunto de calibración principal (n = 4) y sus muestras de QC asociadas (n = 5) se realizaron a partir de un lote de muestras CTRL del estudio realizado en el conjunto de sueros humanos.

- 10 Este lote se constituyó durante el día 1 de la preparación de muestras biológicas (véase el apartado 1.6.1). Para ello, se retiraron 70 µl de cada muestra de CTRL (n = 50) a partir de una alícuota y se agruparon en un tubo de recogida de 5 ml.

- 15 Durante el día 1, un volumen de 50 µl de este lote se dividió en alícuotas en veintiocho tubos de recogida para constituir un duplicado del conjunto de calibración y un duplicado de muestras de QC asociadas. A continuación, el lote se almacenó a -20°C después de su uso.

- 20 Durante el día 2, el resto del lote se descongeló en el banco durante 1 hora. A continuación, un volumen de 50 µl de este lote se dividió en alícuotas en treinta y dos tubos de recogida para constituir otro duplicado del conjunto de calibración y un triplicado de las muestras de QC asociadas. Se prepararon tres réplicas de las muestras de QC, en el que dos series se inyectaron con su curva de calibración asociada y una serie se inyectó entre el día 1 y el día 2.

Se realizaron cuatro series (n = 4) de conjunto de calibración y sus muestras de QC asociadas (cuatro niveles, n = 5).

Las sesenta alícuotas se extrajeron como las muestras biológicas (véase el apartado 1.6.1), excepto que 5 µl de soluciones hija del lote\_std 600X (véase el apartado 1.5.1) se enriquecieron durante la etapa 5 de la preparación.

- 25 Tal como se ha explicado en el párrafo 1.6.1, se observó una dilución de un factor de 30 para cada patrón enriquecido en el vial definitivo de cada muestra.

Conjunto de calibración CTRL2 y muestras de QC

Un segundo conjunto de calibración (n = 1) y sus muestras de QC asociadas (n = 4) se realizaron a partir de un lote de muestras de CTRL del conjunto de suero humano.

- 30 Este lote se constituyó durante el día 3 de la preparación de muestras biológicas (es decir, el día después de la preparación del segundo lote, 7 de Noviembre de 2013). Para ello, 50 µl de dieciséis muestras de CTRL del estudio realizado sobre el conjunto de sueros humanos se retiraron de una alícuota de 200 µl y se agruparon en un microtubo de 1,5 ml.

- 35 Las catorce alícuotas se extrajeron como las muestras biológicas (véase el apartado 1.6.1), excepto que 5 µl de las soluciones hija pertinentes de la solución "lote\_std 600X" (véase el apartado 1.5.1) se enriquecieron durante la etapa 5 de preparación.

Conjunto de calibración de H2O

Se realizó un conjunto de calibración (n = 1) en agua (H<sub>2</sub>O) con el fin de cuantificar los metabolitos diana en los cinco blancos de extracción con un conjunto de calibración apropiado.

- 40 Para ello, 50 µl de agua (ultra pura) se colocaron en catorce tubos de recogida diferentes. Estas muestras se extrajeron como las muestras biológicas (véase el apartado 1.6.1), pero 5 µl de soluciones hija del lote\_std 600X (véase el apartado 1.5.1) se enriquecieron durante la etapa 6 de la preparación. De hecho, para preparar diez niveles del conjunto de calibración, las alícuotas con la indicación: 10X, 7,5X, 5X, 3,5X, 2X, 1,5X, X, 0,75X y 0,5X se enriquecieron, respectivamente, con las soluciones hija 300X, 225X, 150X, 105X, 60X, 45X, 30X, 22,5X y 15X.

- 45 1.7. Bio-procesamiento de datos

Las señales se adquirieron con el software Xcalibur (versión 2.2, Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, EE.UU.). Los picos se integraron automáticamente usando una configuración de procesamiento con el software Xcalibur 2.2 (Thermo Fischer Scientific). Todas las señales fueron suavizadas mediante el algoritmo Genesis y se detectaron por "intervalo de masa" con una tolerancia de masa de 8 ppm.

- 5 Todas las señales de las diferentes muestras se detectaron y se integraron mediante la ejecución de la configuración de procesamiento con la parte QuanBrowser del software Xcalibur 2.2.

#### 1.8. Tratamiento de datos

- 10 Los datos bioprocesados se trataron con Excel 2010 (Microsoft Office). Las curvas de calibración, los gráficos y la prueba t de Student (muestras de EA versus muestras de CTRL, distribuciones bilaterales y varianzas iguales) se realizaron también con Excel 2010.

Las muestras de QC y las muestras de patrones (es decir muestras usadas para los conjuntos de calibración) se validaron si su porcentaje de diferencia (% Dif.) respectivo estaba por debajo del 15%. Si una muestra de patrón no se validó, se eliminó con el fin de trazar las curvas de calibración corregidas (es decir después de la corrección de la concentración endógena respectiva) con la mejor precisión posible.

- 15 **2. ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS DIANA EN EXTRACTOS DE SUERO**

#### 2.1. Preparación de la muestra, la adquisición y el procesamiento biológico de datos

- 20 Las muestras se prepararon tal como se detalla en el párrafo 1.6. En resumen, las muestras biológicas se dividieron en dos lotes de 54 muestras preparadas durante dos días. Se realizó un duplicado de la curva de calibración (con sus muestras de QC asociadas) a partir del lote CTRL1 para cada lote de muestras. Además, se preparó una curva de calibración (con sus muestras de QC asociadas) a partir de un lote de muestras de CTRL2 (tal como se explica en el párrafo 1.6.2) y se preparó una curva de calibración a partir de agua ultra-pura, respectivamente, durante los días 3 y 2.

Las muestras se aleatorizaron durante la preparación y la adquisición.

#### 2.2. Resultados

- 25 Los resultados se presentan en la figura 3. Las concentraciones de los tres biomarcadores de interés son significativamente diferentes de los del control. El ácido sebáico se encontró en los sueros de pacientes con EA a una concentración media de  $87,6 \pm 5,1$  ng/ml, mientras que era de  $58,4 \pm 2,4$  ng/ml en los controles (+50% del valor de control). El ácido dodecanodioico fue también significativamente mayor en los sueros de los pacientes con EA con una concentración media de  $13,1 \pm 1,4$  ng/ml, mientras que fue de  $8,2 \pm 0,7$  ng/ml en los controles (+60% del valor de control). El triptófano se redujo en los sueros de los pacientes con EA con una concentración media de  $2.832 \pm 108$  ng/ml y una concentración media de  $3.606 \pm 139$  ng/ml en los controles (-21% del valor de control).

Estos resultados confirman los obtenidos en los estudios semi-cuantitativos presentados anteriormente (véase la sección B)) y pueden servir como valores útiles para diagnosticar la EA en un sujeto que se sospecha que padece, o que tiene riesgo de contraer EA.

- 35 Por lo tanto, los biomarcadores y los conjuntos de los mismos son adecuados para diagnosticar, para realizar un seguimiento de la evolución, para evaluar la gravedad de la EA o un trastorno relacionado y para evaluar la eficacia del tratamiento de los mismos.

Los biomarcadores de la invención pueden ser usados para el desarrollo de ensayos complementarios para la medicación usada en la actualidad o que se desarrolle para la EA.

- 40

## Bibliografía

1. Citron M (2004) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 677-85.
2. Suh Y-H & Checler F (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* 54, 469-525.
- 5 3. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D & Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939-44.
4. American Psychiatric Association (1997) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. (American Psychiatric Association, ed.) U.S. National Library of Medicine, Washington, DC.
- 10 5. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG & Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch. Neurol.* 56, 303-8.
6. Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC, Snyder PJ, Carrillo MC, Thies B & Phelps CH (2011) The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers. Dement.* 7, 270-9.
- 15 7. Thambisetty M & Lovestone S (2010) Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible. *Biomark. Med.* 4, 65-79.
8. Gustaw-Rothenberg K, Lerner A, Bonda DJ, Lee H, Zhu X, Perry G & Smith MA (2010) Biomarkers in Alzheimer's disease: past, present and future. *Biomark. Med.* 4, 15-26.
- 20 9. Rupsingh R, Borrie M, Smith M, Wells JL & Bartha R (2011) Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 32, 802-10.
10. Skoumalová A, Ivica J, Santorová P, Topinková E & Wilhelm J (2011) The lipid peroxidation products as possible markers of Alzheimer's disease in blood. *Exp. Gerontol.* 46, 38-42.
- 25 11. Gabelle A, Richard F, Gutierrez L-A, Schraen S, Delva F, Rouaud O, Buée L, Dartigues J-F, Touchon J, Lambert J-C & Berr C (2013) Plasma amyloid- $\beta$  levels and prognosis in incident dementia cases of the 3-City Study. *J. Alzheimers. Dis.* 33, 381-91.
12. Pesini P, Pérez-Grijalba V, Monleón I, Boada M, Tárraga L, Martínez-Lage P, San-José I & Sarasa M (2012) Reliable Measurements of the  $\beta$ -Amyloid Pool in Blood Could Help in the Early Diagnosis of EA. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2012, 604141.
- 30 13. Toledo JB, Shaw LM & Trojanowski JQ (2013) Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers. Res. Ther.* 5, 8.
14. Doecke JD, Laws SM, Faux NG, Wilson W, Burnham SC, Lam C-P, Mondal A, Bedo J, Bush AI, Brown B, De Ruyck K, Ellis KA, Fowler C, Gupta VB, Head R, Macaulay SL, Pertile K, Rowe CC, Rembach A, Rodrigues M, Rumble R, Szoeki C, Taddei K, Taddei T, Trounson B, Ames D, Masters CL & Martins RN (2012) Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 69, 1318-25.
- 35 15. Aftab MF & Waraich RS (2012) A REVIEW OF BIOCHEMICAL MARKERS FOR EARLY DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE. *Am. J. Neurosci.* 3, 54-62.
16. Rosén C, Hansson O, Blennow K & Zetterberg H (2013) Fluid biomarkers in Alzheimer's disease - current concepts. *Mol. Neurodegener.* 8, 20.
- 40 17. Gabelle A, Touchon J & Lehmann S (2013) Les biomarqueurs du LCR et du plasma: utilisation diagnostique et pronostique dans la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés. *Prat. Neurol. - FMC* 4, 65-72.
18. Laxman Kote P, Venkatesh G, Kotecha J & Sheshala R (2011) Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* 25, 199-217.
- 45 19. Sabbagh MN, Fleisher A, Chen K, Rogers J, Berk C, Reiman E, Pontecorvo M, Mintun M, Skovronsky D, Jacobson SA, Sue LI, Liebsack C, Charney AS, Cole L, Belden C & Beach TG (2011) Positron emission tomography and neuropathologic estimates of fibrillar amyloid- $\beta$  in a patient with Down syndrome and Alzheimer

- disease. Arch. Neurol. 68, 1461-6.
20. Babu SVS, Shareef MM, Shetty APK & Shetty KT (2002) HPLC method for amino acids profile in biological fluids and inborn metabolic disorders of aminoacidopathies. Indian J. Clin. Biochem. 17, 7-26.
- 5 21. Lima E.S. & Abdalla D.S.P. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. Anal. Chim. Acta 465, 11.
22. Chen S.-H. & Chuang Y.-J. Analysis of fatty acids by column liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 465, 11.
23. Bondia-Pons I, Castellote AI & López-Sabater MC (2004) Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 809, 339-44.
- 10 24. Stoltenburg R, Reinemann C & Strehlitz B (2007) SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. Biomol. Eng. 24, 381-403.
25. Radom F, Jurek PM, Mazurek MP, Otlewski J & Jelen F (2013) Aptamers: Molecules of great potential. Biotechnol. Adv. 31, 1260-1274.
- 15 26. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F & Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. Science 274, 99-102.
27. Guedj M, Robin S, Celisse A & Nuel G (2009) Kerfdr: a semi-parametric kernel-based approach to local false discovery rate estimation. BMC Bioinformatics 10, 84.
28. Kuhn A, Luthi-Carter R & Delorenzi M (2008) Cross-species and cross-platform gene expression studies with the Bioconductor-compliant R package "annotationTools". BMC Bioinformatics 9, 26.
- 20 29. McLachlan GJ (2004) Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition (J. Wiley, ed.) Wiley Interscience.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento in vitro para diagnosticar una enfermedad neurológica seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA (SDAT), EA en fase prodrómica, deterioro cognitivo leve (DCL), deterioro de memoria asociado a la edad (PMAE), demencia vascular o demencia frontotemporal (DFT) en un sujeto, en el que el procedimiento comprende determinar la presencia, la cantidad, la frecuencia o la forma de ácido sebácico, en una muestra de sangre, suero y/o plasma procedente de dicho sujeto, en el que una alteración en la presencia, la cantidad, la frecuencia o la forma de ácido sebácico, en comparación con un control, es indicativa de la presencia, del riesgo, del subtipo, de la progresión o de la gravedad de dicha enfermedad.
2. Procedimiento in vitro según la reivindicación 1, que comprende determinar, de manera simultánea o secuencial, la presencia de una alteración en la cantidad, la frecuencia o la forma de una combinación de al menos cuatro biomarcadores que comprende ácido sebácico, ácido dodecanodioico, triptófano y al menos un metabolito seleccionado de entre PFAM (20:1), PFAM (22:1), PFAM (22:2), ácido azelaico, ácido hipúrico, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, cafeína, ácido caproico, ácido isovalérico, L-citulina, fenilacetilglutamina, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina), ácido valérico, ácido aminoisobutírico, aspartato, Asp-Phe, ácido glicocólico, guanosina, inosina, ácido L-treónico, ácido undecanodioico, 1-monopalmitina, ácido 9,12-dioxododecanoico, ácido nonenedioico, octadecadienoil-glicero-3-fosfato, Ser-Phe y alcohol sulfobencílico.
3. Procedimiento in vitro según la reivindicación 2, en el que un incremento de ácido sebácico y un decremento de al menos un biomarcador seleccionado de entre cafeína, ácido glicocólico, guanosina, ácido hipúrico, inosina, L-citulina, ácido L-treónico, PFAM (22:1), triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, PFAM (20:1), PFAM (22:2), Ser-Phe, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico es indicativo de la presencia, del riesgo, del subtipo, de la progresión o de la gravedad de dicha enfermedad.
4. Procedimiento in vitro según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende determinar, de manera simultánea o secuencial, la presencia de una alteración en la cantidad, la frecuencia o la forma de un conjunto de biomarcadores seleccionados de entre:
- Asp-Phe y C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (teofilina y/o paraxantina) y ácido L-treónico y ácido sebácico,
  - L-citulina y ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico y triptófano,
  - ácido azelaico y ácido sebácico,
  - ácido azelaico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico,
  - ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido nonenedioico y ácido sebácico,
  - ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido sebácico,
  - ácido nonenedioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico,
  - ácido nonenedioico y ácido azelaico y ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido dodecanodioico,
  - ácido undecanodioico y ácido sebácico,
  - ácido nonenedioico y ácido undecanodioico y ácido sebácico,
  - ácido nonenedioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido nonenedioico y ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido undecanodioico y ácido sebácico y ácido dodecanodioico,
  - ácido sebácico y tirosina,

- ácido dodecanodioico y ácido sebácico y tirosina,
  - ácido dodecanodioico y ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico
  - ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina,
  - ácido sebácico y triptófano y tirosina,
- 5
- ácido sebácico y triptófano,
  - ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico,
  - ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico
  - ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina y ácido undecanodioico,
- 10
- ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,
  - ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano,
  - ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y tirosina
  - ácido hipúrico y ácido sebácico,
  - ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
- 15
- ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano,
  - ácido hipúrico y ácido sebácico y tirosina,
  - ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
- 20
- ácido dodecanodioico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina,
  - ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico,
  - ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido undecanodioico,
  - ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano,
- 25
- ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y ácido undecanodioico,
  - ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y tirosina y ácido undecanodioico,
  - ácido dodecanodioico y ácido sebácico,
  - ácido dodecanodioico y ácido hipúrico y ácido sebácico y triptófano y ácido undecanodioico,
  - C7H8N4O2 (teofilina y/o paraxantina) y Asp-Phe y ácido L-treónico y ácido sebácico.
- 30
5. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la determinación simultánea o secuencial de una alteración en la cantidad, la frecuencia o la forma de al menos un biomarcador o ensayo de diagnóstico adicional.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el al menos un ensayo de diagnóstico adicional o biomarcador se selecciona de entre ácidos nucleicos, proteínas, metabolitos, obtención de imágenes neurofisiológicas, genética, cerebrales, ensayos clínicos y cognitivos o marcadores.
- 35
7. Procedimiento in vitro para evaluar la capacidad de respuesta de un sujeto a un tratamiento para una enfermedad neurológica seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA, EA en

- fase prodrómica, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado con la edad, demencia vascular o demencia frontotemporal, en el que el procedimiento comprende determinar en una muestra de sangre, suero y/o plasma procedente de dicho sujeto, la presencia, la cantidad, la frecuencia o la forma, de uno o más biomarcadores tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, durante el curso de dicho tratamiento, en el que una alteración en dicha presencia, cantidad, frecuencia o forma es indicativa de un sujeto que responde a un tratamiento para dicha enfermedad.
- 5
8. Procedimiento in vitro para monitorizar el efecto de un tratamiento en un sujeto que tiene una enfermedad neurológica seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA, EA en fase prodrómica, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociada con la edad, demencia vascular o demencia frontotemporal, en el que el procedimiento comprende determinar una alteración de la cantidad, la frecuencia o la forma, en comparación con un control, en una muestra de sangre, suero y/o plasma procedente del sujeto, de uno o más biomarcadores, tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, después de la administración de dicho tratamiento y/o en diferentes puntos temporales durante el curso del tratamiento, en el que una corrección de dicha alteración durante el tratamiento es indicativa de un tratamiento eficaz.
- 10
9. Procedimiento in vitro para diagnosticar una enfermedad neurológica seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer (EA), demencia senil de tipo EA, EA en fase prodrómica, deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado con la edad, demencia vascular o demencia frontotemporal, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 15
- recoger una muestra de sangre, suero o plasma a partir de un sujeto que padece, o que se sospecha que padece o que tiene riesgo de padecer dicha enfermedad,
  - tratar la muestra para un análisis adicional mediante LC/MS y/o GC/MS, y
  - medir mediante LC/MS y/o GC/MS la cantidad de ácido sebácico en dicha muestra tratada, en el que un incremento en el ácido sebácico en comparación con un valor de control es indicativo de la presencia, del riesgo, del subtipo, de la progresión o de la gravedad de dicha enfermedad.
- 20
10. Procedimiento in vitro según la reivindicación 9, que comprende además determinar, a partir de una muestra, la cantidad de al menos un biomarcador adicional seleccionado de entre cafeína, el ácido glicocólico, guanosina, ácido hipúrico, inosina, L-citulina, ácido L-treónico, PFAM (22:1), triptófano, tirosina, ácido 4-metil-2-oxovalérico, PFAM (20:1), PFAM (22:2), Ser-Phe, C7H8N4O2 (teofilina y/o paraxantina) o ácido valérico, mediante LC/MS y/o GC/MS, en el que una disminución en dicha cantidad, en comparación con un valor de control, es indicativa de la presencia, del riesgo, del subtipo, de la progresión o de la gravedad de dicha enfermedad.
- 25
11. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de ácido sebácico aumenta en los sujetos enfermos del 10 al 90%, preferiblemente del 30% al 70% y, más preferiblemente, del 50%, en comparación con un nivel de concentración en una muestra de control.
- 30
12. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 o 10 a 11, en el que la concentración de ácido dodecanodioico aumenta en los sujetos enfermos del 10 al 90%, preferiblemente del 40% al 80% y, más preferiblemente, del 60%, en comparación con un nivel de concentración en una muestra de control.
- 35
13. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 o 10 a 12, en el que la concentración de triptófano disminuye en los sujetos enfermos del 10 al 90%, preferiblemente del 10% al 50% y, más preferiblemente, del 20%, en comparación con un nivel de concentración en una muestra de control.
- 40
14. Procedimiento in vitro según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el control es la cantidad y/o la frecuencia y/o la forma del biomarcador tal como se determina en una muestra similar de un sujeto sano, o un valor de referencia y/o un nivel o niveles del biomarcador en una muestra procedente del mismo sujeto antes del desarrollo de la enfermedad y/o en una etapa anterior de tratamiento/enfermedad en el sujeto

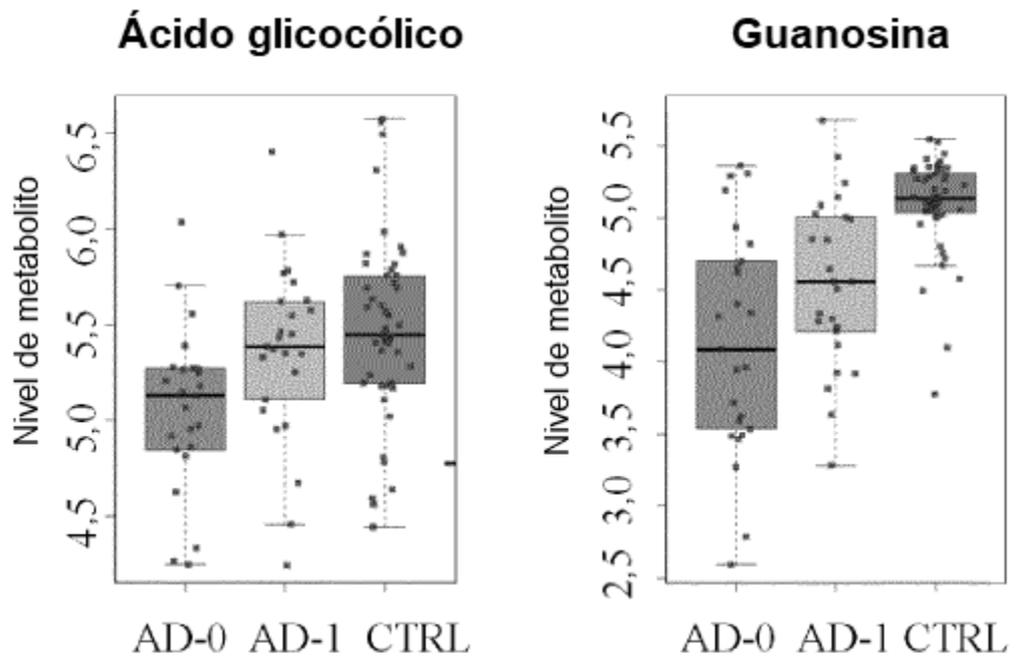


FIGURA 1

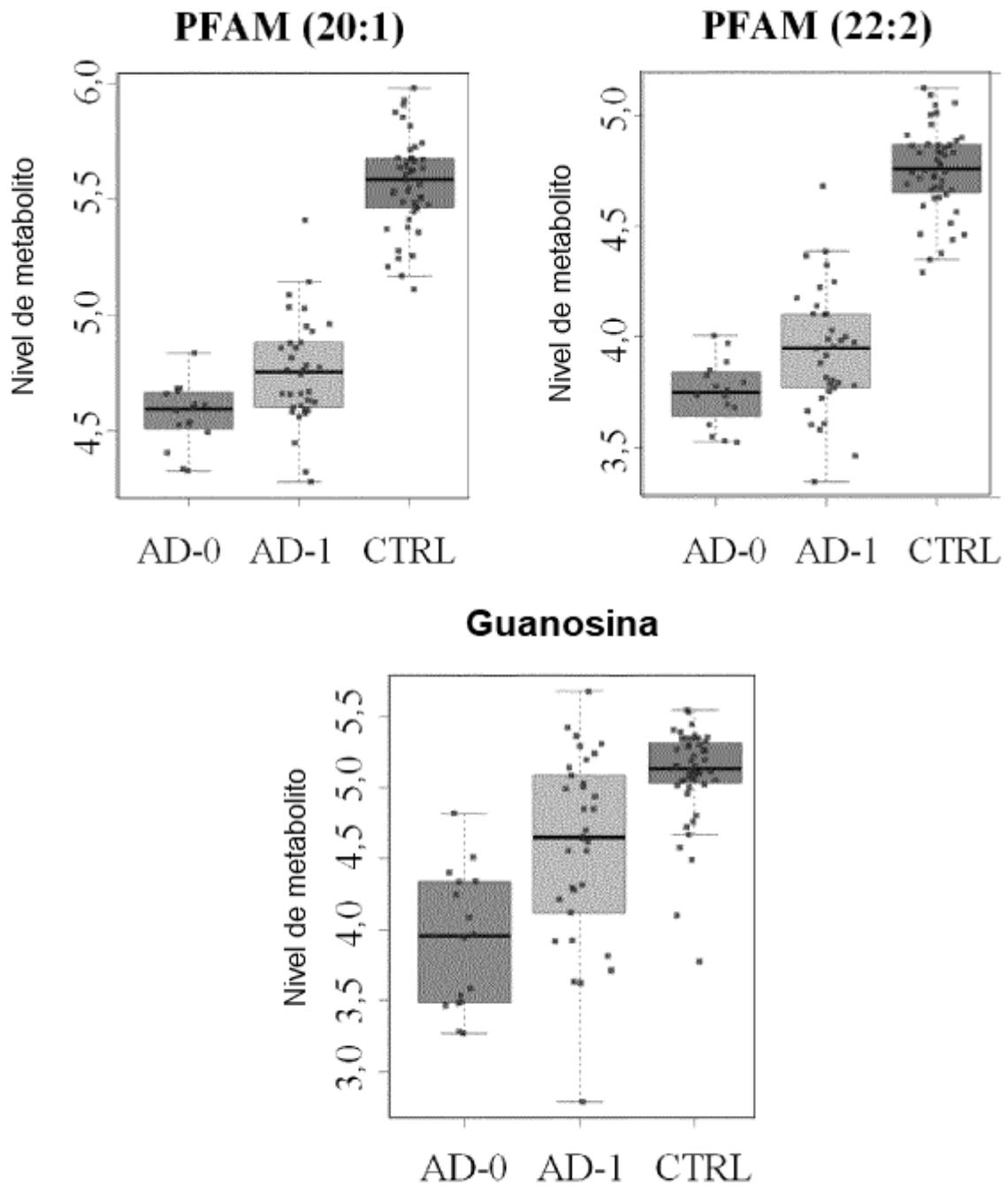


FIGURA 2

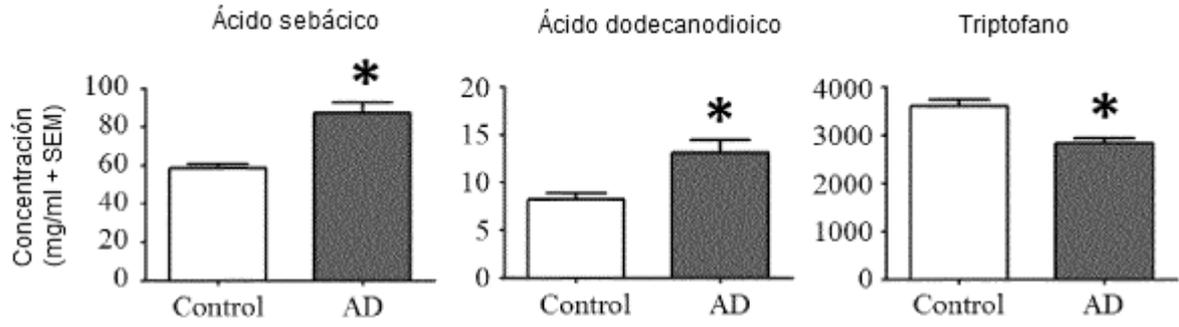


FIGURA 3