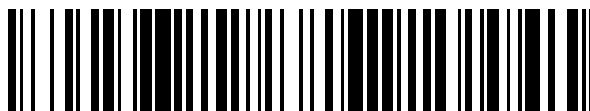


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 048**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2015 PCT/JP2015/064386**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15178398**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2015 E 15796166 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3147668**

54 Título: **Biomarcador indirecto para evaluar la acumulación de péptido beta amiloide intracerebral y método para el análisis del mismo**

30 Prioridad:

**22.05.2014 JP 2014106560**

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

**24.06.2020**

73 Titular/es:

**SHIMADZU CORPORATION (50.0%)  
1, Nishinokyo-Kuwabaracho Nakagyo-ku  
Kyoto-shi, Kyoto 604-8511, JP y  
NATIONAL CENTER FOR GERIATRICS AND  
GERONTOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANEKO, NAOKI y  
YANAGISAWA, KATSUHIKO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 769 048 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

Biomarcador indirecto para evaluar la acumulación de péptido beta amiloide intracerebral y método para el análisis del mismo

5 La presente invención pertenece al campo de la neurociencia cerebral y al campo de la medicina clínica, y se refiere a un biomarcador indirecto para evaluar un estado de acumulación de péptido  $\beta$  amiloide cerebral ( $A\beta$ ), y un método para el análisis del mismo. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de un biomarcador indirecto para evaluar un estado de acumulación de  $A\beta$  cerebral utilizando, como índice, un nivel de péptido similar a  $A\beta$  y de péptido  $A\beta$  generado por la descomposición de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés) en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo, y un método para el análisis del mismo. El biomarcador utilizado en la presente invención es un marcador que se utiliza, por ejemplo, para el diagnóstico presintomático, el cribado de sujetos con intervención preventiva de desarrollo (administración preventiva de fármacos terapéuticos, etc.) y la evaluación de la eficacia del fármaco de fármacos terapéuticos y profilácticos con respecto a la enfermedad de Alzheimer.

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa principal de demencia y ocupa del 50 al 60% de toda la demencia. El número de pacientes que padecían demencia era mayor o igual a 24 millones en el mundo en 2001, y se estima que alcanzará los 81 millones en 2040 (Documento no de patente 1). Se considera que  $A\beta$  está profundamente involucrado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.  $A\beta$  se produce como resultado de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP), que es una proteína transmembrana de un solo paso y está compuesta de 770 restos de aminoácidos, por  $\beta$ -secretasa y  $\gamma$ -secretasa (véase Fig. 1). La aparición de placas seniles debido a la agregación de  $A\beta$  que acompaña a la fibrosis desencadena la agregación y la acumulación de proteína tau dentro de los neurocitos para causar un mal funcionamiento del nervio y la muerte de las células neuronales. Se considera que esto da como resultado un deterioro extremo de la capacidad cognitiva. Desde hace tiempo se sabe que  $A\beta$  consiste principalmente en 40 mer ( $A\beta$ 1-40) y 42 mer ( $A\beta$ 1-42) y migra hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la sangre. Además, en los últimos años, se ha dado a conocer la existencia de péptidos similares a  $A\beta$  que tienen longitudes diferentes de las de  $A\beta$ 1-40 y  $A\beta$ 1-42 en LCR (Documento no de patente 2).

La enfermedad de Alzheimer se desarrolla de forma latente y avanza lentamente. El diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se realiza mediante ADAS-cog, MMSE, DemTect, SKT o una prueba de función cognitiva tal como una prueba del dibujo del reloj para examinar el síntoma clínico y el examen de hallazgos de imágenes mediante el diagnóstico de imagen por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) y similares en combinación. Si bien la MRI es un método de diagnóstico por imagen capaz de detectar la atrofia cerebral degenerativa, la atrofia cerebral no es específica para la enfermedad de Alzheimer. Mientras tanto, se conoce un método de diagnóstico por imagen que visualiza la retención de una molécula de ligando que detecta específicamente depósitos de  $A\beta$  (PiB: compuesto-B de Pittsburgh), la PiB-PET. Se ha descubierto que el análogo de tioflavina T, denominado PiB (11C), se retiene en reflejo de  $A\beta$  que se acumula gradualmente en una región específica del cerebro de un paciente que sufre un deterioro cognitivo leve (DCL) o enfermedad de Alzheimer leve, y por lo tanto PiB-PET es una herramienta óptima para detectar depósitos de  $A\beta$ . A partir de los hallazgos patológicos de la necropsia de la enfermedad de Alzheimer, se descubre que una gran cantidad de placas seniles ya se ha acumulado incluso en el caso de un deterioro leve de la función cognitiva. Esto lleva a la inferencia de que la agregación y la deposición de  $A\beta$  comienzan bastante antes de la exteriorización de la demencia, y el resultado que respalda esta inferencia también se ha dado a conocer en los hallazgos de PiB-PET. Sin embargo, el examen PET requiere un enorme equipo y requiere un precio de examen costoso para realizar un examen, y por lo tanto no es adecuado como método que permite al ciudadano tener un examen amplio.

Un biomarcador en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR) es un índice útil capaz de detectar el desarrollo y la progresión de una enfermedad a nivel molecular. En la enfermedad de Alzheimer, se ha dado a conocer que una disminución en la concentración de  $A\beta$ 1-42 en LCR o en la relación de concentración entre  $A\beta$ 1-42/ $A\beta$ 1-40, y un aumento en el valor tau total o en el valor tau de fosforilación son un marcador de diagnóstico útil (Documento de patente 1: JP-A-2010-19864, Documento no de patente 3). Sin embargo, la recolección de LCR es altamente invasiva y no es adecuada como método que permita que el ciudadano tenga un examen amplio.

En estas circunstancias, se espera la posibilidad de que  $A\beta$ 1-42 exista en la sangre como marcador de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un examen de sangre; sin embargo, se ha dado a conocer que la relación entre la concentración de  $A\beta$ 1-42 en sangre y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer es baja, a diferencia del comportamiento de  $A\beta$ 1-42 en el LCR (Documento no de patente 3). La razón de esto no ha sido aclarada.

Además, el Documento de Patente 2: JP-A-2013-63976 describe un anticuerpo monoclonal que no reconoce un monómero  $A\beta$  soluble, pero se une específicamente sólo a un oligómero de  $A\beta$  soluble, y también describe un método de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer utilizando el anticuerpo. El párrafo [0104] de la publicación describe un método en el que cuando la relación entre el oligómero  $A\beta$  y el monómero  $A\beta$  en una muestra de un sujeto es mayor que la de una persona sana normal, se determina que el sujeto es candidato para la enfermedad de Alzheimer.

El Documento no de patente 4 describe la existencia de 22 tipos de péptidos similares a  $A\beta$  y péptidos  $A\beta$  obtenidos a partir de APP en plasma humano mediante la combinación de inmunoprecipitación y un espectrómetro de masas, y también describe un método para cuantificar estos péptidos similares a  $A\beta$  y péptidos  $A\beta$ .

Documento de patente 1: JP-A-2010-19864

Documento de patente 2: JP-A-2013-63976

5 Documento de patente 3: WO 2006/118959 A2 describe anticuerpos dirigidos contra el péptido beta-amiloide y los métodos que utilizan el mismo.

Documento no de patente 1: Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.: Alzheimer's disease. Lancet. 2006 Jul 29; 368 (9533): 387-403

10 Documento no de patente 2: Portelius E, Westman-Brinkmalm A, Zetterberg H, Blennow K.: Determination of beta-amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry. J Proteome Res. 2006 Apr; 5(4): 1010-6

Documento no de patente 3: Hampel H, Shen Y, Walsh DM, Aisen P, Shaw LM, Zetterberg H, Trojanowski JQ, Blennow K.: Biological markers of amyloid beta-related mechanisms in Alzheimer's disease. Exp Neurol. 2010 Jun; 223(2): 334-46

15 Documento no de patente 4: Kaneko N, Yamamoto R, Sato TA, Tanaka K.: Identification and quantification of amyloid beta-related peptides in human plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2014;90(3):104-17

Documento no de patente 5: Bibl M. et al.: Stability of amyloid- $\beta$  peptides in plasma and serum. Electrophoresis 2012, 33, 445-450

20 Documento no de patente 6: Bibl M. et al.: CSF diagnosis of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. Journal of Neural Transmission, 2006, 113, 1771-1778

Documento no de patente 7: Bibl M. et al.: Cerebrospinal fluid tau, p-tau 181 and amyloid- $\beta$ 38/40/42 in frontotemporal dementias and primary progressive aphasias. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 2011, 31, 37-44

25 Documento no de patente 8: Shimada, H. et al.: PIB-PET in DCL and Alzheimer-type dementia patients and the relation to the spinal fluid and plasma biomarkers. Keido ninchi shogai no stuitei haikai byori ni motozuku saiteki ninchisho shinten yoboho no kaihatsu ni kansuru kenkyu Heisei 19 nendo sokatsu buntan kenkyu hokokusho, 2008, pages 40-42

Documento no de patente 9: Devanand, D.P. et al.: Plasma A $\beta$  and PET PiB binding are inversely related in mild cognitive impairment. Neurology, 2011, Vol. 77, No. 2, 125-131

30 Se ha descubierto que se ha depositado una gran cantidad de A $\beta$  antes de la exteriorización de la disminución de la función cognitiva en un paciente con enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque PiB-PET es efectiva para detectar la acumulación de A $\beta$ , requiere un alto coste de examen y mucho tiempo para ejecutar el examen, y por lo tanto no es un método de diagnóstico que permita que la mayoría de las personas mayores se sometan fácilmente al examen. Por lo tanto, se ha exigido un método analítico simplificado capaz de detectar un aumento en la acumulación de A $\beta$  antes de la exteriorización de los síntomas clínicos.

35 Como se describió anteriormente, generalmente, un método de examen que utiliza un biomarcador existente en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR) como índice es un método efectivo capaz de detectar convenientemente el desarrollo y la progresión de una enfermedad a nivel molecular. El documento de patente 1 y el Documento no de patente 3 descritos anteriormente han dado a conocer que, en la enfermedad de Alzheimer, una disminución en la concentración de A $\beta$ 1-42 en LCR o una relación de concentración entre A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40, y un aumento en el valor de tau total o en el valor de fosforilación de tau son marcadores de diagnóstico útiles. Por otro lado, sin embargo, el Documento no de patente 3 también ha dado a conocer que la relación entre la concentración de A $\beta$ 1-42 en sangre y el desarrollo de EA es baja, a diferencia del caso de A $\beta$ 1-42 en LCR.

45 En informes anteriores con respecto a A $\beta$  en sangre, la correlatividad con EA se examina solo para concentraciones de dos tipos de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en sangre. Sin embargo, se ha descubierto la existencia de péptidos A $\beta$  más cortos que se escinden en el lado N-terminal o en el lado C-terminal de A $\beta$ 1-40 en LCR además de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 mediante un método combinatorio de inmunoprecipitación y un espectrómetro de masas. En sangre, había sido técnicamente difícil detectar A $\beta$  que está presente en una cantidad menor que en LCR por inmunoprecipitación y un espectrómetro de masas; sin embargo, como resultado de la mejora en la inmunoprecipitación, se ha elucidado la existencia de 22 tipos de péptidos similares a A $\beta$  y péptidos A $\beta$  obtenidos a partir de APP en plasma humano, y se ha desarrollado un método para cuantificar estos péptidos (Documento no de patente 4).

55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un biomarcador para evaluar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral utilizando un péptido obtenido a partir de la proteína precursora amiloide (APP) en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo como índice, y un método para el análisis del mismo. En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar un biomarcador para evaluar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral utilizando péptidos similares a A $\beta$  y péptidos A $\beta$  obtenidos a partir de la proteína precursora amiloide (APP) en una muestra de sangre

como índice, y un método para análisis del mismo. Más específicamente, un objeto de la presente invención es proporcionar un marcador para ser utilizado, por ejemplo, para diagnóstico presintomático, cribado de sujetos con intervención preventiva de desarrollo (administración preventiva de fármacos terapéuticos, etc.) y evaluación de la eficacia del fármaco de fármacos terapéuticos y medicamentos profilácticos con respecto a la enfermedad de Alzheimer, y un método para análisis del mismo.

Como resultado de esfuerzos diligentes, los presentes autores han descubierto que el péptido A $\beta$  obtenido a partir de APP específica y el péptido similar a A $\beta$  logran el objeto mencionado anteriormente, y consiguen la presente invención.

En la presente descripción, "A $\beta$ " se utiliza como una abreviatura de un péptido  $\beta$  amiloide. Es decir, "A $\beta$ " incluye A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42. Un péptido distinto del A $\beta$  generado por la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) se puede denominar un péptido similar a A $\beta$ . El péptido A $\beta$  y el péptido similar a A $\beta$  que se generan por escisión de la proteína precursora amiloide (APP) se puede denominar "péptido obtenido a partir de APP".

La presente invención incluye los siguientes aspectos.

(1) Un método analítico para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral, cuyo método comprende:

una etapa de medición para someter una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo obtenida a partir de un sujeto de ensayo a la detección de un marcador que contiene:

APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ ID NO.: 7), para obtener niveles de medición de: APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y APP669-711 en la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo;

una etapa de cálculo para calcular una relación entre el nivel de APP669-711 y el nivel de APP672-713 (A $\beta$ 1-42): APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42); y

una etapa de evaluación para determinar que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral del sujeto de ensayo es mayor que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral de una persona que tiene una función cognitiva normal NC-, que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, cuando la relación del sujeto de ensayo es más alta que un nivel estándar, que es la relación de una persona que tiene una función cognitiva normal NC-

(2) El método analítico para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral de acuerdo con el anterior (1), en donde la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo se selecciona del grupo que consiste en sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, fluidos secretados por el cuerpo, heces, saliva, y esputo.

(3) Uso de un marcador que comprende una combinación de APP669-711 (SEQ ID NO.: 7) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral.

(4) Un método para determinar la eficacia de una intervención médica con respecto al estado de acumulación de A $\beta$  cerebral, cuyo método comprende, antes y después una intervención médica realizada para un sujeto de ensayo:

una etapa de medición para someter una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo obtenida a partir del sujeto de ensayo a la detección de un marcador que contiene:

APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ ID NO.: 7), para obtener niveles de medición de: APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y APP669-711 en la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo; y

una etapa de cálculo para calcular una relación entre el nivel de APP669-711 y el nivel de APP672-713 (A $\beta$ 1-42):APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42); y

comparar la relación del sujeto de ensayo antes de la intervención médica y la relación del sujeto de ensayo después de la intervención médica para determinar la eficacia de la intervención médica con respecto a un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral.

En la presente invención, el término "nivel de marcador" significa básicamente una concentración, pero puede ser otras unidades aplicadas correspondientemente a la concentración por un experto en la materia. El término "sujeto de ensayo" incluye humanos y mamíferos que no sean humanos (rata, perro, gato, etc.). En la presente invención, la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo se desecha en lugar de ser devuelta al sujeto de ensayo (por ejemplo, sujeto) del que se obtiene la muestra biológica. La intervención médica incluye la administración de un fármaco terapéutico o un fármaco profiláctico, terapia dietética, terapia de ejercicio, terapia de aprendizaje, operación quirúrgica y similares.

La presente invención proporciona el uso de un marcador para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral de un sujeto de ensayo, que incluye una combinación de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ

ID NO.: 7) en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo. Además, la presente invención proporciona un método para el análisis del marcador.

5 Al analizar el marcador en la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo del sujeto de ensayo, es posible discriminar si la acumulación de A $\beta$  cerebral en el sujeto de ensayo es menor o igual al nivel estándar o si el A $\beta$  cerebral se acumula excesivamente. La presente invención es aplicable a la detección no solo de la etapa avanzada de la enfermedad de Alzheimer en la que se acumula excesivamente A $\beta$  cerebral y ha aparecido un trastorno cognitivo funcional, sino también de la etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer en la que se acumula excesivamente A $\beta$  cerebral pero no ha aparecido un trastorno funcional cognitivo.

10 Según la presente invención, como muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo, no solo se puede utilizar sangre, sino también líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, fluidos secretados por el cuerpo, heces, saliva y esputo. Por lo tanto, en la etapa donde se han establecido el método preventivo y el método terapéutico preventivo para la enfermedad de Alzheimer, el análisis de un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral para una persona que tiene una función cognitiva normal en un examen médico general, un examen físico completo y similares, es efectiva para el diagnóstico presintomático de la enfermedad de Alzheimer.

15 Al aplicar la presente invención antes y después de una intervención médica realizada para el sujeto de ensayo, es posible evaluar la eficacia del fármaco de un fármaco terapéutico o un fármaco profiláctico para la enfermedad de Alzheimer, o evaluar la eficacia de otro tratamiento. Además, la presente invención es útil para el seguimiento de un paciente que padece la enfermedad de Alzheimer.

20 Las figs. 2 a 19 no representan la presente invención.

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra un diagrama que muestra esquemáticamente la vía de formación de péptidos A $\beta$  y p3 mediante escisiones de la proteína precursora amiloide (APP).

25 [Fig. 2] La Fig. 2 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y el SIL-A $\beta$ 1-38 estándar interno en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) para APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en el Ejemplo 1.

[Fig. 3] La Fig. 3(A) y la Fig. 3(B) muestran cada una, una curva característica de funcionamiento del receptor (ROC) de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para la APP672-713 (A $\beta$ 1-42)/SIL- A $\beta$ 1-38.

[Fig. 4] La Fig. 4(C) y la Fig. 4(D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP672-713 (A $\beta$ 1-42)/SIL-A $\beta$ 1-38.

30 [Fig. 5] La Fig. 5 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-709 (A $\beta$ 1-38) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) en el ejemplo 1.

[Fig. 6] La Fig. 6 (A) y la Fig. 6 (B) muestran una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para la APP672-709 (A $\beta$ 1-38)/APP 672-713 (A $\beta$ 1- 42).

35 [Fig. 7] La Fig. 7 (C) y la Fig. 7 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para la APP672-709 (A $\beta$ 1-38)/APP672-713 (A $\beta$ 1- 42).

[Fig. 8] La Fig. 8 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP674-711 (A $\beta$ 3-40) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) en el ejemplo 1.

[Fig. 9] La Fig. 9 (A) y la Fig. 9 (B) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para APP674-711 (A $\beta$ 3-40)/APP672-713 (A $\beta$ 1- 42).

40 [Fig. 10] La Fig. 10 (C) y la Fig. 10 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP674-711 (A $\beta$ 3-40)/APP672-713 (A $\beta$ 1- 42).

[Fig. 11] La Fig. 11 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-710 (A $\beta$ 1-39) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) en el ejemplo 1.

45 [Fig. 12] La Fig. 12 (A) y la Fig. 12 (B) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para la APP672-710 (A $\beta$ 1-39)/APP672-713 (A $\beta$ 1- 42).

[Fig. 13] La Fig. 13 (C) y la Fig. 13 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para la APP672-710 (A $\beta$ 1-39)/APP672-713 (A $\beta$ 1- 42).

[Fig. 14] La Fig. 14 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-711 (A $\beta$ 1-40) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) en el ejemplo 1.

50 [Fig. 15] La Fig. 15 (A) y la Fig. 15 (B) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para la APP672-711 (A $\beta$ 1-40)/APP672-713 (A $\beta$ 1- 42).

[Fig. 16] La Fig. 16 (C) y la Fig. 16 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para la APP672-711 (A $\beta$ 1-40)/APP672-713 (A $\beta$ 1-42).

5 [Fig. 17] La Fig. 17 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre OxAPP672-711 (OxA $\beta$ 1-40) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) en el ejemplo 1.

[Fig. 18] La Fig. 18 (A) y la Fig. 18 (B) muestran una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para OxAPP672-711 (OxA $\beta$ 1-40)/APP672-713 (A $\beta$ 1-42).

[Fig. 19] La Fig. 19 (C) y la Fig. 19 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para OxAPP672-711 (OxA $\beta$ 1-40)/APP672-713 (A $\beta$ 1-42).

10 [Fig. 20] La Fig. 20 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP669-711 y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en cada grupo (NC-, NC+, DCL, EA) en el Ejemplo 1.

[Fig. 21] La Fig. 21 (A) y la Fig. 21 (B) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL) versus el grupo NC- para la APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42).

15 [Fig. 22] La Fig. 22 (C) y la Fig. 22 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (EA, PiB+) versus el grupo NC- para la APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42).

[Fig. 23] La figura 23 es un diagrama de dispersión del valor medio de acumulación de PiB de la región cortical (mcSUVR: relación de valor de captación estándar cortical medio) y APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en un total de 62 casos en el Ejemplo 1. Se indica una elipse de probabilidad ( $p=0.95$ ) mediante una curva.

[1. Sujeto de ensayo]

20 En la presente invención, el sujeto de ensayo incluye humanos y mamíferos que no sean humanos (rata, perro, gato, etc.). En lo sucesivo, la descripción se realizará principalmente para el caso de los humanos, pero lo mismo se aplica a los mamíferos que no sean humanos.

25 En el método de la presente invención, el sujeto puede ser cualquier individuo, que incluye una persona que se espera que sea una persona sana normal, independientemente de la historia clínica anterior. Para una persona que se espera que sea una persona sana normal, se puede determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral en un examen médico general o un examen físico completo, preferiblemente mediante un análisis de sangre, y el método es particularmente efectivo para la detección/diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer. El método de la presente invención puede ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer para un sujeto sospechoso de ser candidato para la enfermedad de Alzheimer como resultado de ADAS-cog, MMSE, DemTect, SKT o una prueba de función cognitiva, tal como una prueba de dibujo de reloj para examinar los síntomas clínicos y la confirmación de hallazgos de imágenes mediante diagnóstico de imagen por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET) y similares.

[2. Muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo]

35 El marcador utilizado en la presente invención se puede detectar y analizar en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo de un sujeto. Por lo tanto, en el método de la presente invención, se analiza el nivel de un marcador en una muestra obtenida a partir del cuerpo vivo de un sujeto.

40 La muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo se puede seleccionar de fluidos corporales tales como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, fluidos secretados por el cuerpo, saliva y esputo; y heces. Entre estos, se prefiere la sangre para el diagnóstico y el diagnóstico presintomático de la enfermedad de Alzheimer en un examen médico general, un examen físico completo o similar.

45 La muestra de sangre es una muestra que se somete directamente a una etapa de medición del nivel del marcador e incluye sangre completa, plasma, suero y similares. La muestra de sangre se puede preparar tratando adecuadamente la sangre completa recolectada de un sujeto de ensayo. El tratamiento realizado en el caso de preparar una muestra de sangre a partir de sangre completa recolectada no está particularmente limitado, y se puede realizar cualquier tratamiento que sea clínicamente aceptable. Por ejemplo, se puede realizar una separación centrífuga o similar. La muestra de sangre sometida a la etapa de medición se puede almacenar adecuadamente a una temperatura baja tal como congelación en la etapa intermedia de la etapa de preparación o en la etapa posterior de la etapa de preparación. En la presente invención, la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo, tal como una muestra de sangre, se desecha en lugar de ser devuelta al sujeto del que se obtiene.

50 [3. Marcador]

El marcador utilizado en la presente invención incluye una combinación de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ ID NO.: 7) en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo. Para este marcador, se ha observado una diferencia significativa entre el nivel en la muestra de plasma de una persona que tiene una función cognitiva normal, que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y el nivel en la muestra de plasma a partir de

un sujeto que tiene Aβ cerebral excesivamente acumulado.

APP672-713 (Aβ1-42) (SEQ ID NO.: 6): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

APP669-711 (SEQ ID NO.: 7): VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

5 APP672-709 (Aβ1-38) (SEQ ID NO.: 1): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG

APP674-711 (Aβ3-40) (SEQ ID NO.: 2): EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

APP672-710 (Aβ1-39) (SEQ ID NO.: 3): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV

APP672-711 (Aβ1-40) (SEQ ID NO.: 4): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

10 OxAPP672-711 (Ox Aβ1-40) (SEQ ID NO.: 5): DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (Met 706 está oxidado).

La proteína precursora amiloide (APP) es una proteína transmembrana de un solo paso y está compuesta por 770 restos de aminoácidos. La proteína precursora amiloide (APP) es proteolizada por la β secretasa y la γ secretasa, y se produce un péptido β amiloide (Aβ) por la proteólisis. APP672-713 y Aβ1-42 indican el mismo péptido (SEQ ID NO.: 6). APP672-711 y Aβ1-40 indican el mismo péptido (SEQ ID NO.: 4).

15 La Tabla 1 muestra secuencias de aminoácidos de péptidos obtenidos a partir de APP, y la Tabla 2 muestra masas promedio teóricas de los mismos. Para estos péptidos, se realizó el análisis de un marcador para determinar un estado de acumulación de Aβ cerebral.

[Tabla 1]

SEQ NO.	ID	Péptidos obtenidos a partir de APP	Secuencia
			<u>VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA</u>
			669 713
1		APP672-709 (Aβ1-38)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG
2		APP674-711 (Aβ3-40)	EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
3		APP672-710 (Aβ1-39)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGV
4		APP672-711 (Aβ1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
5		OxAPP672-711 (Ox Aβ1-40)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
6		APP672-713 (Aβ1-42)	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
7		APP669-711	VKMDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

20

[Tabla 2]

SEQ ID NO.	Masa media teórica
1	4132.6
2	4144.7
3	4231.8
4	4330.9
5	4346.9
6	4515.1
7	4689.4

En las Tablas 1 a 2, "péptidos obtenidos a partir de APP" indica péptidos obtenidos a partir de APP, y "Masa promedio teórica" indica masa promedio teórica.

5 En las Tablas 1 a 2, OxAPP672-711 (OxA $\beta$ 1-40) de SEQ ID NO.: 17 indica un péptido oxidado en Met 706 en APP672-711 (A $\beta$ 1-40) de SEQ ID NO.: 4.

En la enfermedad de Alzheimer, existe la enfermedad de Alzheimer familiar. Los marcadores utilizados en la presente invención pueden incluir la mutación de la enfermedad de Alzheimer familiar en la secuencia de aminoácidos que generalmente se conoce.

Para la enfermedad de Alzheimer familiar, por ejemplo, se conocen las siguientes secuencias de mutación.

10 Mutación sueca: los aminoácidos KM en APP670-671 están mutados en NL.

Mutación italiana: el aminoácido A en APP673 está mutado en V.

Mutación de Lovaina: el aminoácido E en APP682 está mutado en K.

Mutación islandesa: el aminoácido A en APP673 está mutado en T.

Mutación británica: el aminoácido H en APP677 está mutado en R.

15 Mutación de Tottori: el aminoácido D en APP678 está mutado en N.

Mutación ártica: el aminoácido E en APP693 está mutado en G.

Mutación de Iowa: el aminoácido D en APP694 está mutado en N.

Mutación holandesa: el aminoácido E en APP693 está mutado en Q.

[4. Análisis de marcador]

20 En la presente descripción, la siguiente clasificación se realiza desde el punto de vista del grado de avance de la enfermedad de Alzheimer.

NC- : una persona que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y no tiene un deterioro cognitivo.

NC+ : una persona que es positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral, pero no tiene un deterioro cognitivo.

DCL: una persona que es positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y tiene un deterioro cognitivo leve.

25 EA: una persona que es positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y tiene un deterioro cognitivo.

PiB+: grupo combinado del grupo NC+, el grupo DCL y el grupo EA; es decir, una persona determinada como positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral independientemente de la presencia o ausencia de un deterioro cognitivo.

Normalmente, un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral se determina comparando la cantidad de acumulación de PiB entre la corteza cerebral y la sustancia blanca en base a una imagen de PiB-PET.

30 Un método para analizar el marcador de la presente invención incluye:

una etapa de medición para someter una muestra, obtenida a partir de un cuerpo vivo obtenida a partir de un sujeto de ensayo, a la detección de un marcador que contiene APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ ID NO.: 7) para obtener niveles de medición de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y APP669-711 en la muestra obtenida a partir del cuerpo vivo;

35 una etapa de cálculo para calcular una relación entre el nivel de APP669-711 y el nivel de APP672-713 (A $\beta$ 1-42): APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42); y

40 una etapa de evaluación para determinar que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral del sujeto de ensayo es mayor que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral de una persona que tiene una función cognitiva normal NC- que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, cuando la relación del sujeto de ensayo es más alta que el nivel estándar, que es la relación de la persona que tiene una función cognitiva normal NC-. Esto hace posible determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral, o ayudar a la determinación.

45 El término "nivel de marcador" significa básicamente una concentración, pero pueden ser otras unidades aplicadas correspondientemente a la concentración por un experto en la materia, por ejemplo, una intensidad de iones detectada en la espectrometría de masas. En la presente invención, la concentración del marcador en la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo se analiza comparando un valor de medición y un valor estándar. Para un análisis más preciso, se prefiere que el valor de medición y el valor estándar a comparar sean valores basados en las muestras obtenidas



a partir de un cuerpo vivo preparadas en las mismas condiciones (condición de pretratamiento, condición de almacenamiento y similares). Como el nivel estándar del marcador, se puede utilizar un valor de medición para una persona que tiene una función cognitiva normal que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral NC-. Alternativamente, un valor estándar de concentración establecido para una persona que tiene una función cognitiva normal que es negativa para la acumulación intracerebral de A $\beta$  NC- se puede utilizar como el nivel estándar del marcador.

Un marcador se mide, preferiblemente, mediante una prueba basada en la afinidad específica de la molécula biológica. La prueba basada en la afinidad específica de la molécula biológica es un método bien conocido por un experto en la materia y no está particularmente limitado, pero preferiblemente es un inmunoensayo. Los ejemplos específicos del inmunoensayo incluyen ensayos competitivos y no competitivos tales como transferencia Western, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) (se incluyen inmunoensayo sándwich, ensayo competitivo y ensayo de unión directa), inmunoprecipitación, reacción de precipitación, inmunodifusión, medición de inmunoaglutinación, análisis de reacción de unión al complemento, ensayo inmunoradiométrico, inmunoensayo de fluorescencia e inmunoensayo de proteína A. En el inmunoensayo, se detecta un anticuerpo que se une al marcador en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo.

En la presente invención, la medición del marcador se puede realizar utilizando una inmunoglobulina que tiene un sitio de unión a antígeno capaz de reconocer un péptido obtenido a partir de la proteína precursora amiloide (APP), o un vehículo inmovilizador de anticuerpos preparado utilizando un fragmento de inmunoglobulina que tiene un sitio de unión a antígeno capaz de reconocer un péptido obtenido a partir de la proteína precursora amiloide (APP). Mediante inmunoprecipitación utilizando el vehículo de inmovilización de anticuerpos, se puede detectar un péptido en la muestra mediante un espectrómetro de masas (Inmunoprecipitación-Espectrometría de masas: IP-MS, por sus siglas en inglés).

Como se muestra en la sección de ejemplos, una muestra de sangre obtenida a partir de un sujeto de ensayo se somete a la detección de un marcador que contiene APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) para obtener un nivel de medición de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en la muestra de sangre; y se determina que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral del sujeto de ensayo es mayor que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral de una persona que tiene una función cognitiva normal NC-, que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, cuando el nivel de medición de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) del sujeto de ensayo es inferior a un nivel estándar que es un nivel de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) de la persona que tiene una función cognitiva normal NC-.

### Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá específicamente con referencia a ejemplos, pero no se limita a estos ejemplos. Las Figs. 2 a 19 no representan la presente invención. A continuación, la cantidad de una materia indicada por % se basa en el peso cuando la materia es un sujeto, y se basa en el volumen cuando la materia es líquida a menos que se indique lo contrario.

[Ejemplo experimental 1]

(1) Evaluación del rendimiento del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer mediante el marcador utilizado en la presente invención utilizando una muestra clínica

Se prepararon muestras de plasma de casos clasificados en grupos de NC-, NC +, DCL y EA en el Centro Nacional de Geriatria y Gerontología.

NC-: una persona que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y no tiene un deterioro cognitivo

NC+: una persona que es positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral, pero que no tiene un deterioro cognitivo

DCL: una persona que es positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y tiene un deterioro cognitivo leve

EA: una persona que es positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral, y tiene un deterioro cognitivo

PiB +: grupo combinado del grupo NC+, el grupo DCL y el grupo EA; es decir, una persona determinada como positiva para la acumulación de A $\beta$  cerebral independientemente de la presencia o ausencia de un deterioro cognitivo

Con el fin de determinar la positividad o negatividad de la acumulación de A $\beta$  cerebral, se adquirieron imágenes PiB-PET de los cerebros de los sujetos. Cuando la cantidad de acumulación de PiB de la corteza cerebral es mayor o equivalente a la cantidad de acumulación no específica de PiB de la materia blanca, el sujeto se determinó como positivo. Cuando solo se observó acumulación no específica a la sustancia blanca, y se observó poca acumulación en la corteza, el sujeto se determinó como negativo. El deterioro cognitivo se determinó de conformidad con los criterios NIA-AA publicados en 2011.

La Tabla 3 muestra la función y el número de casos de cada grupo.

[Tabla 3]

Esquema de muestra clínica			
Grupo	n	PiB-PET	Demencia
NC-	22	-	-
NC+	11	+	-
DCL	12	+	+
EA	17	+	++

5 Cuando se considera la aplicación al diagnóstico temprano de la enfermedad de Alzheimer, se supone que un  
 10 marcador sanguíneo que muestra variación en el nivel de medición en el grupo NC+, que se determina como positivo  
 para la acumulación de A $\beta$  cerebral, aunque no tiene un deterioro cognitivo en comparación con el grupo NC-, es  
 efectivo para el diagnóstico. En otras palabras, es importante encontrar un marcador sanguíneo que tenga un  
 rendimiento diagnóstico capaz de discriminar entre la positividad y la negatividad de la acumulación de A $\beta$  cerebral.  
 Desde este punto de vista, los criterios para la evaluación se hicieron en el análisis de marcadores si existe una  
 diferencia en el nivel de medición entre cada uno de los otros grupos y el grupo NC-.

#### (2) Preparación de perlas inmovilizadoras de anticuerpos

15 Se digirieron 250  $\mu$ g de anticuerpo anti-A $\beta$  (6E10: Covance) que reconoce los restos 3-8 de A $\beta$  como un epítipo con  
 1250  $\mu$ L de perlas de agarosa Ficin (Thermo) (suspensión al 33%) y se digirieron 100  $\mu$ g de anticuerpo anti-A $\beta$  (4G8:  
 Covance) que reconoce los restos 18-22 de A $\beta$  como un epítipo con 500 ng de lisil endopeptidasa (LysC), y los  
 20 productos digeridos respectivos se separaron y recolectaron por cromatografía de exclusión por tamaño. La muestra  
 fraccionada se examinó mediante SDS-PAGE reductora y no reductora, y se combinó una fracción correspondiente  
 con F(ab')<sub>2</sub>. Estas fracciones F(ab')<sub>2</sub> de 6E10 y 4G8 se redujeron respectivamente mediante cisteamina 30 mM para  
 obtener F(ab'). Después se prepararon 5  $\mu$ L (cantidad de perlas 150  $\mu$ g) de perlas magnéticas amino (Dynabeads M-  
 270 Amine: Invitrogen), y el PEG y las perlas se unieron covalentemente haciendo que los grupos NHS de SM (PEG)<sub>24</sub>  
 25 reaccionaran con grupos amino unidos en la superficie de las perlas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada  
 0,25  $\mu$ g de 6E10 F(ab') y 4G8 F(ab') se añadieron al mismo tiempo al SM (PEG)<sub>24</sub> unido a perlas magnéticas, y se  
 hizo que reaccionaran a temperatura ambiente durante 2 horas para unirse covalentemente un grupo maleimida y un  
 grupo tiol. Finalmente, se hizo reaccionar L-cisteína 0,4 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos para bloquear  
 los grupos maleimida. Las perlas de inmovilización de anticuerpos preparadas se almacenaron a una temperatura de  
 4°C antes de su uso.

#### (3) Preparación del péptido estándar interno

30 Como péptido estándar interno, se utilizó A $\beta$ 1-38 (denominado SIL-A $\beta$ 1-38) que es un AnaSpec marcado con isótopos  
 estables (San José, CA, EE.UU.). En SIL-A $\beta$ 1-38, los átomos de carbono en Phe e Ile están sustituidos por <sup>13</sup>C.  
 Después de disolver un producto seco de SIL-A $\beta$ 1-38 en NaOH 50 mM, se realizó una cromatografía de exclusión por  
 tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) mediante un sistema HPLC Prominence (Shimadzu Corp, Kyoto, Japón)  
 35 instalado con un COSMOSIL (R) 5Diol-120-II [7.5 mm I.D. x 600 mm] columna (Nacalai Tesque, Kyoto). Los ajustes  
 fueron los siguientes: fase móvil: Tris-HCl 40 mM, pH 8.0, velocidad de flujo: 1 ml/min, temperatura de la columna:  
 25°C, longitud de onda de detección: 214/280 nm. Parte de las fracciones recolectadas se sometieron a 15-20% de  
 Tricine-SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y las bandas se tiñeron con el kit Silver Staining (Invitrogen,  
 Carlsbad, CA, EE.UU.). La fracción identificada como monómero se diluyó con Tris-HCl 40 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0  
 que contenía 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, y después se dispensó y almacenó a una temperatura de -80°C.  
 Se extrajo parte de esto, y se midió la concentración de SIL-A $\beta$ 1-38 utilizando un kit de ensayo amiloide  $\beta$  humano (1-  
 38) (FL) (Laboratorios Immuno-Biological; Gunma, Japón).

#### 4) Medición de péptidos A $\beta$ y péptidos similares a A $\beta$ en plasma

40 Para un total de 62 casos, se realizó IP-MS utilizando perlas inmovilizadoras de anticuerpos con el uso de SIL-A $\beta$ 1-38  
 como el péptido estándar interno.

La inmunoprecipitación se realizó de la siguiente manera.

45 En 250  $\mu$ L de plasma humano, se mezclaron 250  $\mu$ L de un tampón de unión (0.2% (p/v) n-dodecil- $\beta$ -D-maltosido  
 (DDM), 0.2% (p/v) n-nonil- $\beta$ -D-tiomaltosido (NTM), GlcNAc 800 mM, Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM, pH 7.4) que  
 contiene SIL-A $\beta$ 1-38 10 pM. El precipitado contenido en la muestra de plasma se eliminó por centrifugación utilizando  
 Ultrafree-MC, dispositivos de filtro centrífugo, DV 0.65  $\mu$ m. Se lavaron 500  $\mu$ L de Proteína G Plus Agarosa (suspensión  
 al 50%; Pierce, Rockford, IL) una vez con 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, y después se lavaron tres veces con 400  $\mu$ L de un tampón

de lavado (0.1% (p/v) DDM, 0.1 % (p/v) NTM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4). En la Proteína G Plus Agarosa resultante, la muestra de plasma obtenida previamente se mezcló y se incubó a una temperatura de 4°C durante 1 hora. Después de retirar la Proteína G Plus agarosa de la muestra de plasma, la muestra de plasma se mezcló con 150 µg de perlas inmovilizadoras de anticuerpos que se lavaron dos veces con un tampón OTG-glicina (1% de n-octil-β-D-tioglucoído (OTG), Glicina 50 mM, pH 2.8) y tres veces con 100 µL de un tampón de lavado, y la mezcla se incubó a una temperatura de 4°C durante 1 hora para capturar péptidos similares a Aβ y péptidos Aβ. Posteriormente, las perlas se lavaron una vez con 500 µL de un tampón de lavado, cuatro veces con 100 µL de un tampón de lavado y dos veces con 20 µL de acetato de amonio 50 mM. Además, después de lavar una vez con 20 µL de H<sub>2</sub>O, los péptidos similares a Aβ y péptidos Aβ capturados en las perlas inmovilizadoras de anticuerpos se eluyeron con 2.5 µL de acetonitrilo al 70% que contenía ácido clorhídrico 5 mM. Cada 0.5 µL del eluato se vertió en 4 pocillos en una placa µFocusMAL™ de 900 µm. Después de mezclar 0.5 µL de una disolución matriz (0.5 mg/ml de CHCA, 0.2% (p/v) de MDPNA), la medición se realizó mediante MS TOF lineal.

Como valor de medición de péptidos similares a Aβ y péptidos Aβ en plasma, se utilizó un valor promedio entre las relaciones de intensidad máxima de cada uno de los péptidos similares a Aβ y péptidos Aβ con respecto al péptido estándar interno (SIL-Aβ1-38) obtenido en 4 pocillos medidos por TOF lineal. Para corregir una variación de señal en la intensidad máxima de MS, se proporcionaron los siguientes criterios. Se adquieren cuatro espectros de masas en una inmunoprecipitación única y, por lo tanto, se obtienen cuatro relaciones de intensidad máxima para un péptido. Una relación de intensidad máxima que está entre 0.7 y 1.3 veces la mediana de las cuatro relaciones de intensidad máxima en un péptido determinado se considera un valor atípico y no se utiliza en el procesamiento de datos para promediar. Si bien el número de datos de la relación de intensidad máxima utilizada para promediar un determinado péptido es cuatro como máximo, el número de datos disminuye cuando la intensidad máxima es menor que el límite de detección (S/N <3), o surge un valor atípico. Cuando el número de datos de la relación de intensidad máxima utilizada en el promedio es inferior a tres, la relación de intensidad en el pico se define como no detectable (N/D) en la inmunoprecipitación en ese momento.

La figura 2 es un gráfico de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-713 (Aβ1-42) y el estándar interno SIL-Aβ1-38 en cada grupo para APP672-713 (Aβ1-42). La Fig. 3(A), la Fig. 3(B), la Fig. 4(C) y la Fig. 4(D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP672-713 (Aβ1-42)/SIL-Aβ1-38.

En cada gráfico de caja y bigotes, el rango indicado por la caja en cada grupo representa el rango de contribución de la relación de intensidad (rango del cuartil) de las muestras cuya concentración se clasifica entre el 25 y el 75% de todas las muestras, y las líneas horizontales que se muestran arriba y debajo de la caja, respectivamente, indican el valor máximo y el valor mínimo de las muestras dentro del rango desde el extremo superior y el extremo inferior de la caja hasta 1.5 veces el rango del cuartil, y la barra horizontal en la caja indica la mediana de la relación de intensidad.

Una diferencia estadística significativa entre cada uno de los otros grupos y el grupo NC- se sometió a ensayo mediante el uso de una prueba de Dunnett, y se determinó que existe una diferencia significativa cuando P<0.05. El límite de detección o inferior se estableció en 0. Como resultado, se detectaron nueve tipos de péptidos similares a Aβ y péptidos Aβ en el 60% o más casos, y entre estos, en APP672-713 (Aβ1-42), hubo una diferencia estadísticamente significativa en NC+, DCL y EA en comparación con NC- (Fig. 2). Para evaluar el rendimiento diagnóstico de APP672-713 (Aβ1-42), se prepararon curvas ROC de grupos NC+, DCL, EA, PiB+ versus grupo NC-. Las áreas bajo las curvas ROC (AUC) fueron NC- vs NC+ = 0.789, NC- vs DCL = 0.746, NC- vs EA = 0.864, NC- vs PiB+ = 0.808, y mostraron valores relativamente altos (Fig. 3(A), Fig. 3(B), Fig. 4(C) y Fig. 4(D)).

Como se muestra en la Fig. 2, para APP672-713 (Aβ1-42), la relación de intensidad APP672-713 (Aβ1-42)/SIL-Aβ1-38 disminuyó en NC+, DCL y EA con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con NC-. Como se muestra en la Fig. 3 (A), la Fig. 3 (B), la Fig. 4 (C) y la Fig. 4 (D), el AUC: NC- vs NC+ = 0.789, NC- vs DCL = 0.746, NC- vs EA = 0.864 reveló que APP672-713 (Aβ1-42) tenía una capacidad relativamente alta de discriminar entre NC- y NC+, NC- y DCL, y NC- y EA. El NC- vs PiB+ = 0.808 reveló que el rendimiento capaz de detectar al sujeto que es positivo para la acumulación cerebral de Aβ es relativamente alto. En consecuencia, esto sugiere que APP672-713 (Aβ1-42) es un marcador sanguíneo capaz de estimar un estado de acumulación de Aβ cerebral, y por lo tanto tiene la posibilidad de ser utilizado para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

#### (5) Análisis más específico

Para observar una diferencia más clara entre cada grupo (NC+, DCL, EA) y NC-, se realizó la siguiente investigación.

La Fig.5 es un diagrama de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-709 (Aβ1-38) y APP 672-713 (Aβ1-42) en cada grupo. La Fig. 6 (A), la Fig. 6 (B), la Fig. 7 (C) y la Fig. 7 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- APP672-709 (Aβ1-38)/APP 672-713 (Aβ1-42).

La Fig. 8 es un gráfico de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP674-711 (Aβ3-40) y APP672-713 (Aβ1-42) en cada grupo. La Fig. 9 (A), la Fig. 9 (B), la Fig. 10 (C) y la Fig. 10 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP674-711 (Aβ3-40)/APP672-713 (Aβ1-42).

La Fig. 11 es un gráfico de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-710 (Aβ1-39) y APP672-

713 (Aβ1-42) en cada grupo. La Fig. 12 (A), la Fig. 12 (B), la Fig. 13 (C) y la Fig. 13 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP672-710 (Aβ1-39)/APP672-713 (Aβ1-42).

5 La Fig. 14 es un gráfico de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP672-711 (Aβ1-40) y APP672-713 (Aβ1-42) en cada grupo. La Fig. 15 (A), la Fig. 15 (B), la Fig. 16 (C) y la Fig. 16 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP672-711 (Aβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42).

10 La Fig. 17 es un gráfico de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre OxAPP672-711 (OxAβ1-40) y APP672-713 (Aβ1-42) en cada grupo. La Fig. 18 (A), la Fig. 18 (B), la Fig. 19 (C) y la Fig. 19 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- para OxAPP 672-711 (OxAβ1-40)/APP 672-713 (Aβ1-42).

La Fig. 20 es un gráfico de caja y bigotes que muestra la relación de intensidad entre APP669-711 y APP672-713 (Aβ1-42) en cada grupo. La Fig. 21 (A), la Fig. 21 (B), la Fig. 22 (C) y la Fig. 22 (D) muestran cada una, una curva ROC de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- para APP669-711/APP672-713 (Aβ1-42).

15 Entre los nueve tipos de péptidos similares a Aβ y péptidos Aβ detectados en el 60% o más de los casos, las intensidades máximas respectivas de ocho tipos distintos de APP672-713 (Aβ1-42) se dividieron por la intensidad máxima de APP672-713 (Aβ1-42), y los valores resultantes (relaciones) se analizaron comparativamente. Como resultado, en APP672-709 (Aβ1-38)/APP672-713 (Aβ1-42), APP674-711 (Aβ3-40)/APP672-713 (Aβ1-42), APP672-710 (Aβ1-39)/APP672-713 (Aβ1-42), APP672-711 (Aβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42), OxAPP672-711 (OxAβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42) y APP669-711/APP672-713 (Aβ1-42), se observó un aumento estadísticamente significativo en NC+, DCL y EA en comparación con NC- (Fig. 5, 8, 11, 14, 17 y 20). Se demostró que APP669-711/APP672-713 (Aβ1-42) en particular tiene una fuerte tendencia a aumentar a medida que avanza la enfermedad de Alzheimer (Fig. 20).

25 Para evaluar el rendimiento diagnóstico de APP672-709 (Aβ1-38)/APP672-713 (Aβ1-42), APP674-711 (Aβ3-40)/APP672-713 (Aβ1-42), APP672-710 (Aβ1-39)/APP672-713 (Aβ1-42), APP672-711 (Aβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42), OxAPP672-711 (OxAβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42) y APP669-711/APP672-713 (Aβ1-42), se prepararon curvas ROC de grupos NC+, DCL, EA y PiB+ versus grupo NC-. Como resultado, en todos estos seis tipos de relaciones, se observó un alto AUC, revelando que la capacidad de discriminar entre NC- y NC+, NC- y DCL, y NC- y EA es alta, y el rendimiento capaz de detectar el sujeto que es positivo para la acumulación de Aβ cerebral es alto [Fig. 6(A), Fig. 6(B), Fig. 7(C) y Fig. 7(D); Fig. 9(A), Fig. 9(B), Fig. 10(C) y Fig. 10(D); Fig. 12(A), Fig. 12(B), Fig. 13(C) y Fig. 13(D); Fig. 15(A), Fig. 15(B), Fig. 16(C) y Fig. 16(D); Fig. 18(A), Fig. 18(B), Fig. 19(C) y Fig. 19(D); Fig. 21(A), Fig. 21(B), Fig. 22(C) y Fig. 22(D)].

30 Con referencia a la Fig. 21(A), la Fig. 21(B), la Fig. 22(C) y la Fig. 22(D), el AUC del grupo NC+, DCL, EA versus NC- fue de 0.930 o más en la curva ROC de APP669-711/APP672-713 (Aβ1-42) en particular, revelando que la capacidad de discriminar entre NC- y NC+, NC- y DCL, y NC- y EA es muy alta. NC- vs PiB+ = 0.969 también reveló que el rendimiento capaz de detectar al sujeto que es positivo para la acumulación cerebral de Aβ es muy alto. Por consiguiente, esto sugiere que estos seis tipos de relaciones son marcadores sanguíneos capaces de estimar un estado de acumulación de Aβ cerebral, y por lo tanto tienen la capacidad de utilizarse para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

35 A continuación, para APP672-709 (Aβ1-38)/APP672-713 (Aβ1-42), APP674-711 (Aβ3-40)/APP672-713 (Aβ1-42), APP672-710 (Aβ1-39)/APP672-713 (Aβ1-42), APP672-711 (Aβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42), OxAPP672-711 (OxAβ1-40)/APP672-713 (Aβ1-42) y APP669-711/APP672-713 (Aβ1-42) en el que se observó un aumento estadísticamente significativo en NC+, DCL, EA en comparación con NC-, la discriminación de la enfermedad de Alzheimer se evaluó estableciendo un punto de corte. En cada curva ROC en las Figs. 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21 y 22, "cada péptido/APP672-713 (Aβ1-42)", que muestra el valor más alto de "sensibilidad-(1-especificidad)", se estableció como un punto de corte. El punto de corte establecido, la especificidad en ese caso y la sensibilidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN), la precisión de cada grupo (NC+, DCL, EA, PiB+) versus el grupo NC- se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4] Evaluación del rendimiento diagnóstico

	Sensibilidad	Valor predictivo positivo, VPP	Valor predictivo negativo, VPN	Precisión	
<b>APP672-709(Aβ1-38) / APP672-713(Aβ1-42)</b>					
Punto de corte = 7.895,	Especificidad = 0.682				
	NC- vs NC+	1.000	0.611	1.000	0.788
	NC- vs DCL	0.833	0.588	0.882	0.735

ES 2 769 048 T3

	Sensibilidad	Valor predictivo positivo, VPP	Valor predictivo negativo, VPN	Precisión
<b>APP672-709(Aβ1-38) / APP672-713(Aβ1-42)</b>				
NC- vs EA	0.765	0.650	0.789	0.718
NC- vs PiB+	0.850	0.829	0.714	0.790
<b>APP674-711(Aβ3-40) / APP672-713(Aβ1-42)</b>				
Punto de corte = 1.181,	Especificidad = 0.909			
NC- vs NC+		0.900	0.818	0.952
NC- vs DCL		0.833	0.833	0.909
NC- vs EA		1.000	0.895	1.000
NC- vs PiB+		0.923	0.947	0.870
<b>APP672-710(Aβ1-39) / APP672-713(Aβ1-42)</b>				
Punto de corte = 1.932,	Especificidad = 0.864			
NC- vs NC+		0.909	0.769	0.950
NC- vs DCL		0.833	0.769	0.905
NC- vs EA		0.941	0.842	0.950
NC- vs PiB+		0.900	0.923	0.826
<b>APP672-711(Aβ1-40) / APP672-713(Aβ1-42)</b>				
Punto de corte = 111.7,	Especificidad = 0.773			
NC- vs NC+		0.909	0.667	0.944
NC- vs DCL		0.750	0.643	0.850
NC- vs EA		0.647	0.688	0.739
NC- vs PiB+		0.750	0.857	0.630
<b>OxAPP672-711(Ox Aβ1-40) / APP672-713(Aβ1-42)</b>				
Punto de corte = 3.431,	Especificidad = 0.864			
NC- vs NC+		0.818	0.750	0.905
NC- vs DCL		0.727	0.727	0.864
NC- vs EA		0.824	0.824	0.864
NC- vs PiB+		0.795	0.912	0.704
<b>APP669-711 / APP672-713(Aβ1-42)</b>				
Punto de corte = 0.914,	Especificidad = 0.955			
NC- vs NC+		0.818	0.900	0.913
NC- vs DCL		0.917	0.917	0.955
NC- vs EA		1.000	0.944	1.000
NC- vs PiB+		0.925	0.974	0.875

En la tabla 4,

Punto de corte: punto de corte,

5 Valor predictivo positivo, VPP = (número de verdaderos positivos) / (número de verdaderos positivos + número de falsos positivos),

Valor predictivo negativo, VPN = (número de verdaderos negativos) / (número de verdaderos negativos + número de falsos negativos),

Precisión = (número de verdaderos positivos + número de verdaderos negativos) / número de casos totales.

10 APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) muestra valores numéricos muy altos en la especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y precisión, revelando que tiene una alta capacidad de discriminar entre NC- y NC+, DCL, EA y PiB+, y en particular, es efectiva para la determinación de la positividad de la acumulación de A $\beta$  cerebral. La capacidad muy alta de discriminar entre NC- y NC+, DCL y EA también indica la aplicabilidad para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer. Con respecto a otros cinco tipos de relaciones, muestran valores altos en especificidad, sensibilidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) o precisión, revelando que tienen una alta capacidad de discriminar entre NC- y NC+, DCL, EA, y PiB+, y en particular, muestran la posibilidad efectiva para la determinación de la positividad de la acumulación cerebral de A $\beta$ . La alta capacidad de discriminar entre NC- y NC +, DCL y EA también indica la aplicabilidad para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

(6) Análisis de correlación con el valor de medición PiB

20 La acumulación de A $\beta$  cerebral es un índice patológico importante para la enfermedad de Alzheimer, y se sabe que la acumulación excesiva de A $\beta$  comienza mucho antes de la exteriorización de la demencia. PiB es un agente radiactivo que se une específicamente con el agregado de A $\beta$ , y al medir la acumulación de PiB con el uso de PET, es posible formar una imagen de la acumulación de A $\beta$  cerebral. Para investigar si APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en plasma, que muestra la capacidad de determinar con alta precisión un sujeto que es positivo para la acumulación de A $\beta$  cerebral, refleja un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral, se analizó la correlación entre APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y el valor medio de acumulación de PiB de la región cortical (mcSUVR: relación del valor de captación estándar cortical medio).

La figura 23 es un diagrama de dispersión para un total de 62 casos, en los que el eje horizontal representa el valor medio de acumulación de PiB (mcSUVR) y el eje vertical representa la relación APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42).

30 El valor medio de acumulación de PiB se midió cuantificando la acumulación de PiB de la corteza y determinando la relación de acumulación del cerebro sobre la base del cerebelo. La correlación entre la relación APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) obtenida por IP-MS y el valor medio de acumulación de PiB (mcSUVR) obtenido por PET se evaluó con el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson. Como resultado, el coeficiente de correlación (r) fue de 0.687, p<0.001 (Fig. 23).

35 Se reveló que existe una correlación significativamente fuerte entre la relación APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y el valor medio de acumulación de PiB (mcSUVR). Esto significa que la relación APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42) en plasma refleja un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral e indica que tiene la posibilidad de ser utilizada como un marcador sanguíneo para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral.

40 Los resultados demostrados anteriormente indican que el marcador utilizado en la presente invención es útil como marcador sanguíneo para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral. Esto también ha indicado la aplicabilidad para ayudar al diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y para diagnosticar presintómicamente la enfermedad de Alzheimer.

#### Lista de secuencias

45 <110> CORPORACIÓN SHIMADZU CENTRO NACIONAL DE GERIATRÍA Y GERONTOLOGÍA

<120> Biomarcador indirecto para evaluar el estado de acumulación de amiloide  $\beta$  péptidos en cerebro y método analítico para el mismo

50 <130> G114472WO

<150> JP 2014-106560  
<151> 2014-05-22

55 <160> 7

<210> 1

ES 2 769 048 T3

<211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 5  
 <400> 1  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30  
 Gly Leu Met Val Gly Gly  
 35  
 <210> 2  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 10  
 <400> 2  
 Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu  
 20 25 30  
 Met Val Gly Gly Val Val  
 35  
 15 <210> 3  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 20 <400> 3  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30  
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val  
 35  
 <210> 4  
 <211> 40  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 4  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30  
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
 35 40  
 30 <210> 5  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 35 <400> 5  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
 20 25 30  
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
 35 40  
 <210> 6

ES 2 769 048 T3

<211> 42  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

5

<400> 6  
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15  
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30  
Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

<210> 7  
<211> 43  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

10

<400> 7  
Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His  
1 5 10 15  
His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly  
20 25 30  
Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val  
35 40

15

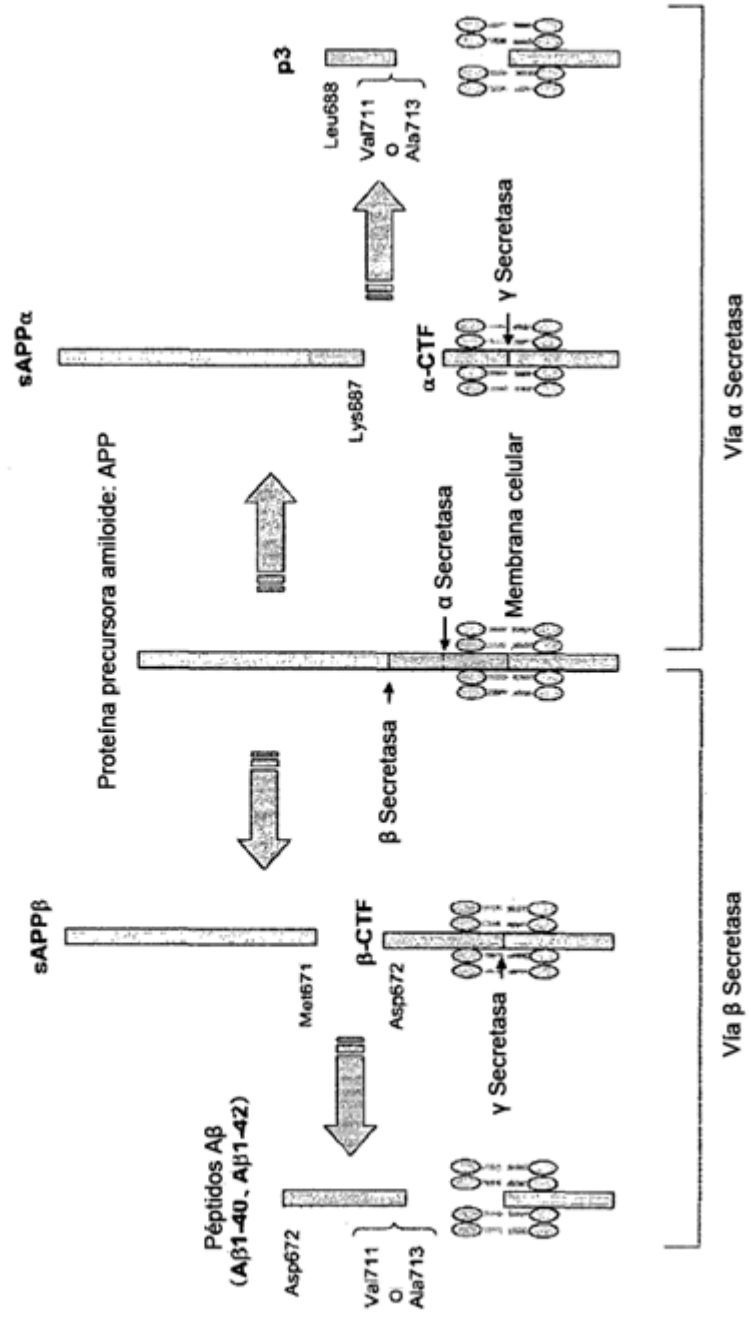


**REIVINDICACIONES**

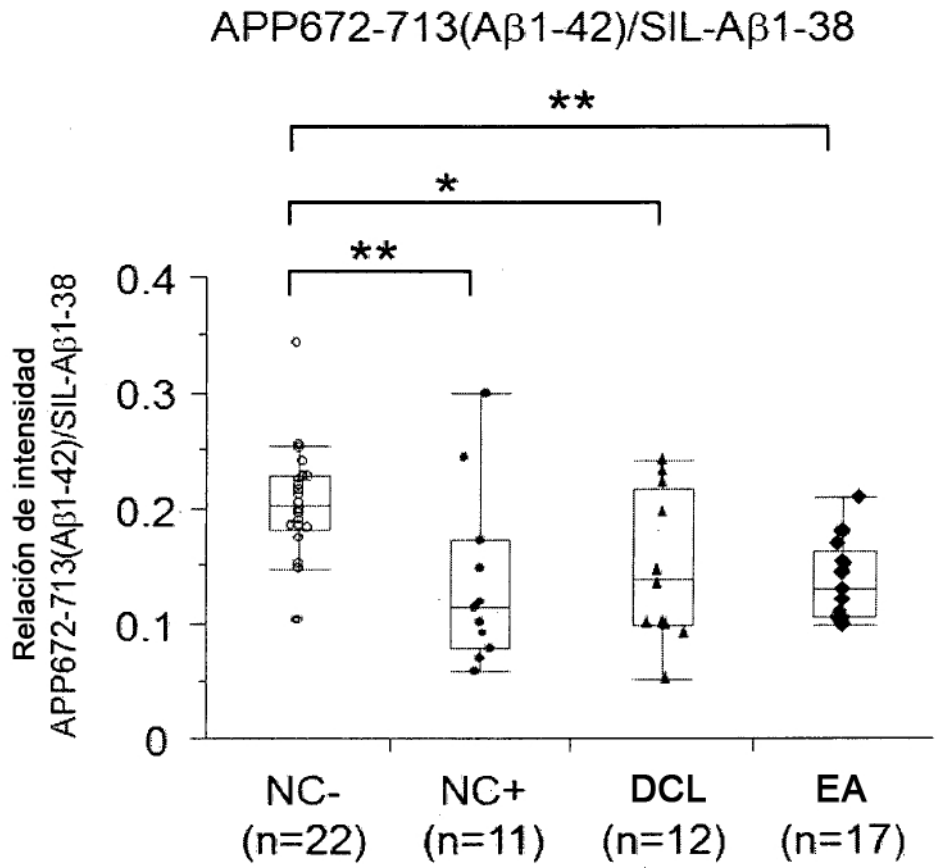
1. Un método analítico para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral, cuyo método comprende:
- 5 una etapa de medición en la que una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo obtenida de un sujeto de ensayo se somete a detección de un marcador que contiene:  
APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ ID NO.: 7), para obtener niveles de medición de:  
APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y APP669-711 en la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo;
- 10 una etapa de cálculo en la que se calcula una razón de nivel de APP669-711 a nivel de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) o APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42); y
- una etapa de evaluación en la que se determina que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral del sujeto de ensayo es mayor que una cantidad de acumulación de A $\beta$  cerebral de una persona que tiene una función cognitiva normal NC-, que es negativa para la acumulación de A $\beta$  cerebral, cuando la razón del sujeto de ensayo es más alta que un nivel estándar, que es una razón de la persona que tiene una función cognitiva normal NC-.
- 15 2. El método analítico para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral según la reivindicación 1, en donde la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo se selecciona del grupo que consiste en sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, fluidos secretados por el cuerpo, heces, saliva y esputo.
3. Uso de un marcador que comprende una combinación de APP669-711 (SEQ ID NO.: 7) y APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) en una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo para determinar un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral.
- 20 4. Un método para determinar la eficacia de una intervención médica con respecto a un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral, cuyo método comprende, antes y después de una intervención médica realizada para un sujeto de ensayo:
- 25 una etapa de medición en la que una muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo obtenida a partir del sujeto de ensayo se somete a la detección de un marcador que contiene:  
APP672-713 (A $\beta$ 1-42) (SEQ ID NO.: 6) y APP669-711 (SEQ ID NO.: 7), para obtener niveles de medición de:  
APP672-713 (A $\beta$ 1-42) y APP669-711 en la muestra obtenida a partir de un cuerpo vivo; y
- 30 una etapa de cálculo en la que se calcula una razón de nivel de APP669-711 a nivel de APP672-713 (A $\beta$ 1-42) o APP669-711/APP672-713 (A $\beta$ 1-42); y
- comparar la razón del sujeto de ensayo antes de la intervención médica y la razón del sujeto de ensayo después de la intervención médica para determinar la eficacia de la intervención médica con respecto a un estado de acumulación de A $\beta$  cerebral.
- 35

Fig.1

Vía de formación de péptido A $\beta$  y péptido p3 a partir de APP



**Fig.2**

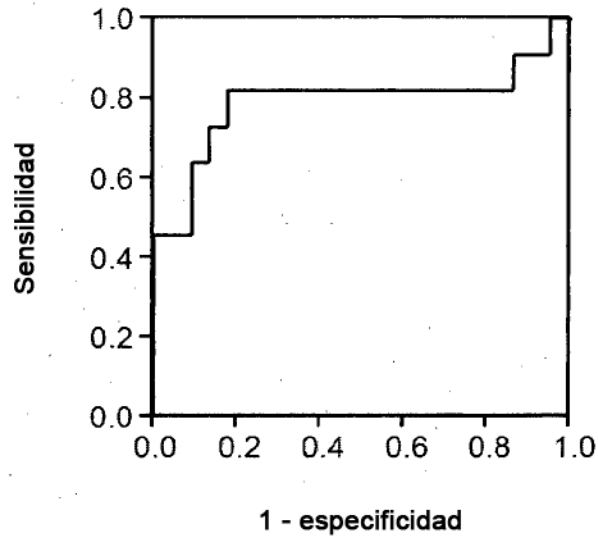


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

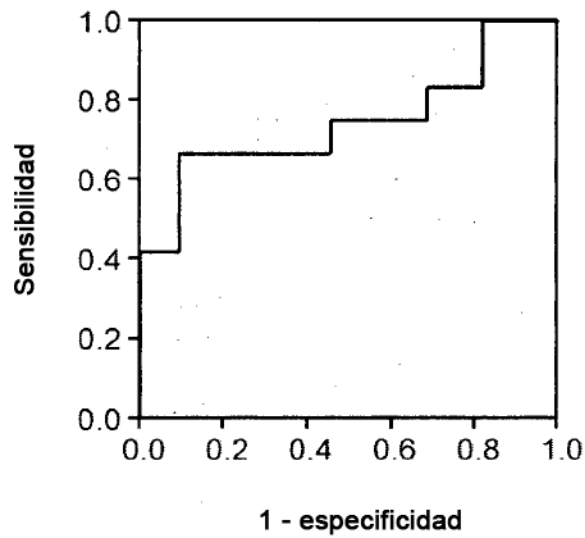
**Fig.3**

**(A)** APP672-713 (A $\beta$ 1-42) / SIL-A $\beta$ 1-38



NC- vs NC+, AUC=0.789

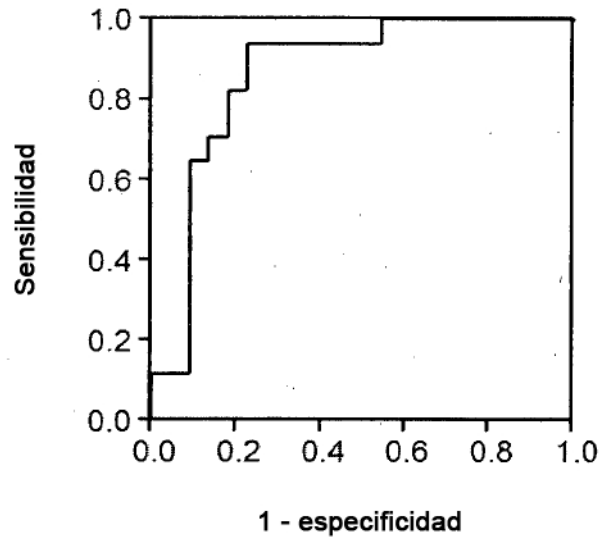
**(B)** APP672-713 (A $\beta$ 1-42) / SIL-A $\beta$ 1-38



NC- vs DCL, AUC=0.746

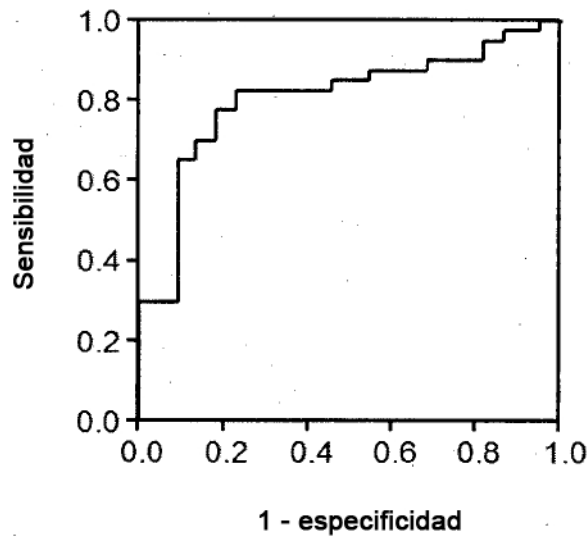
**Fig.4**

**(C)** APP672-713 (A $\beta$ 1-42) / SIL-A $\beta$ 1-38



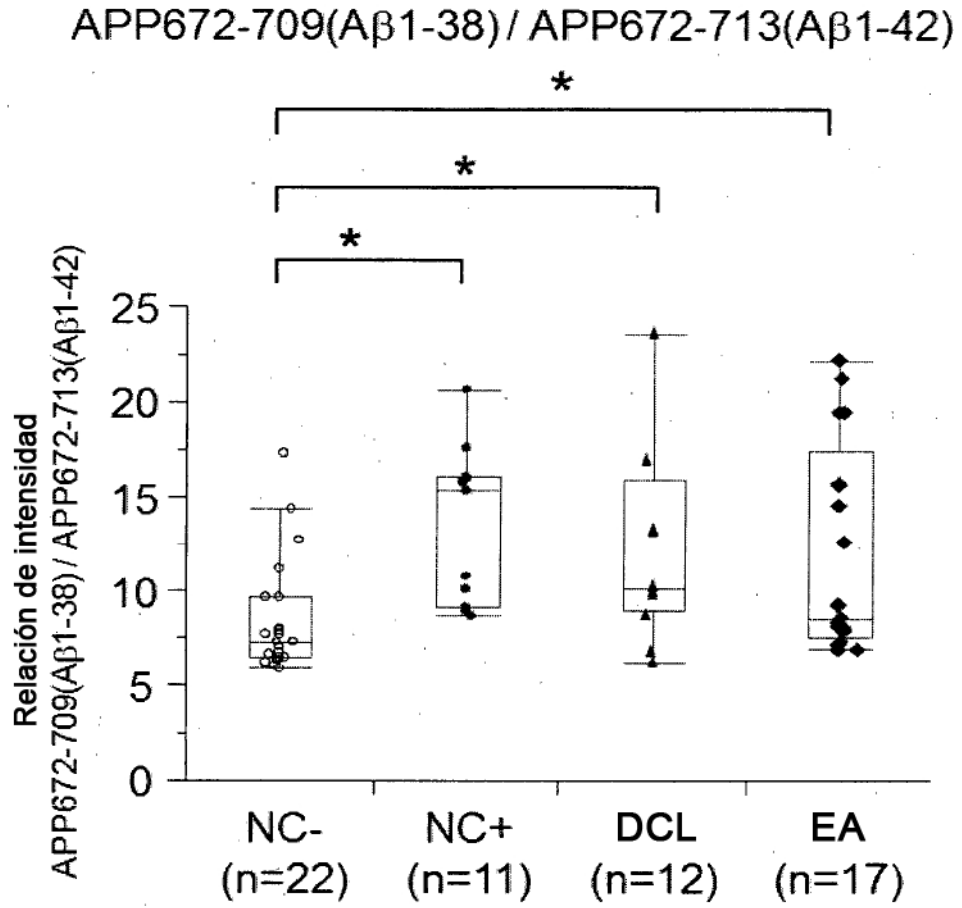
NC- vs EA, AUC=0.864

**(D)** APP672-713 (A $\beta$ 1-42) / SIL-A $\beta$ 1-38



NC- vs PIB+, AUC=0.808

**Fig.5**

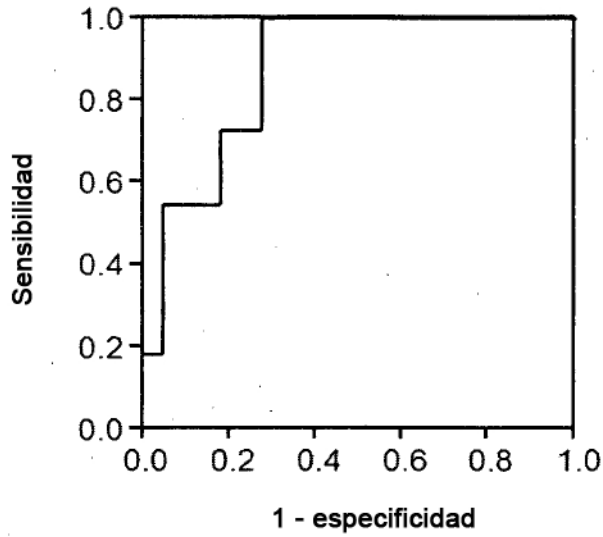


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

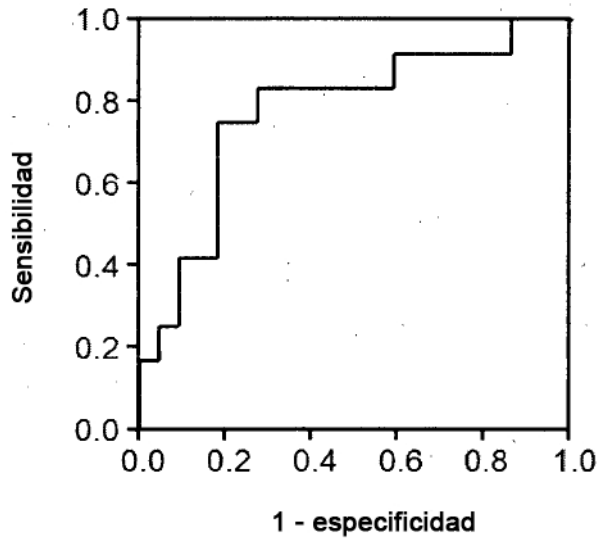
**Fig.6**

**(A)** APP672-709 (A $\beta$ 1-38) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs NC+, AUC=0.876

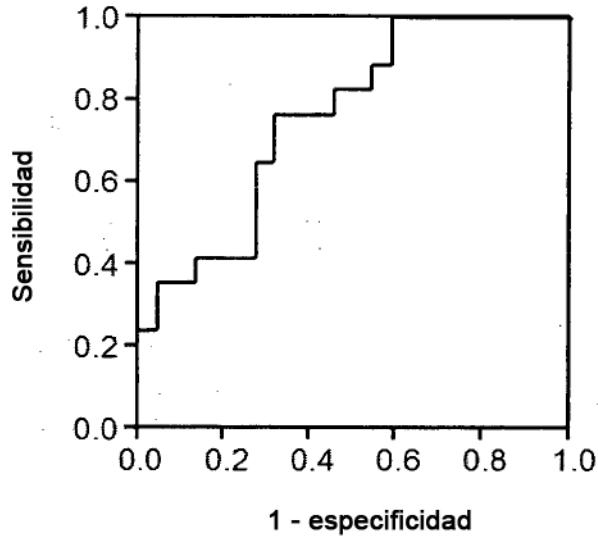
**(B)** APP672-709 (A $\beta$ 1-38) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs DCL, AUC=0.777

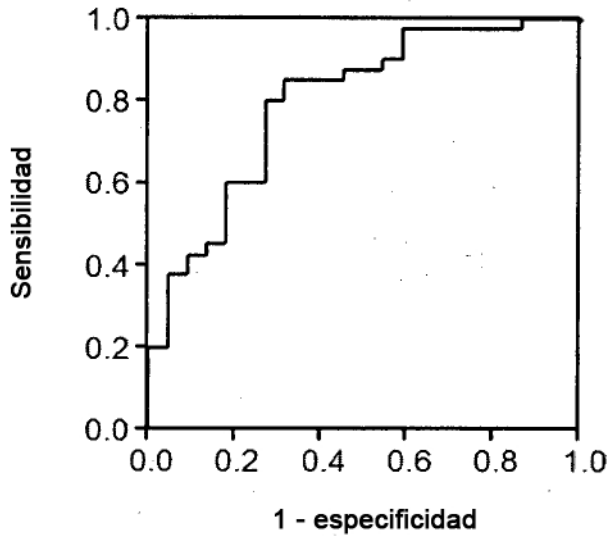
**Fig.7**

**(C)** APP672-709 (A $\beta$ 1-38) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs EA, AUC=0.757

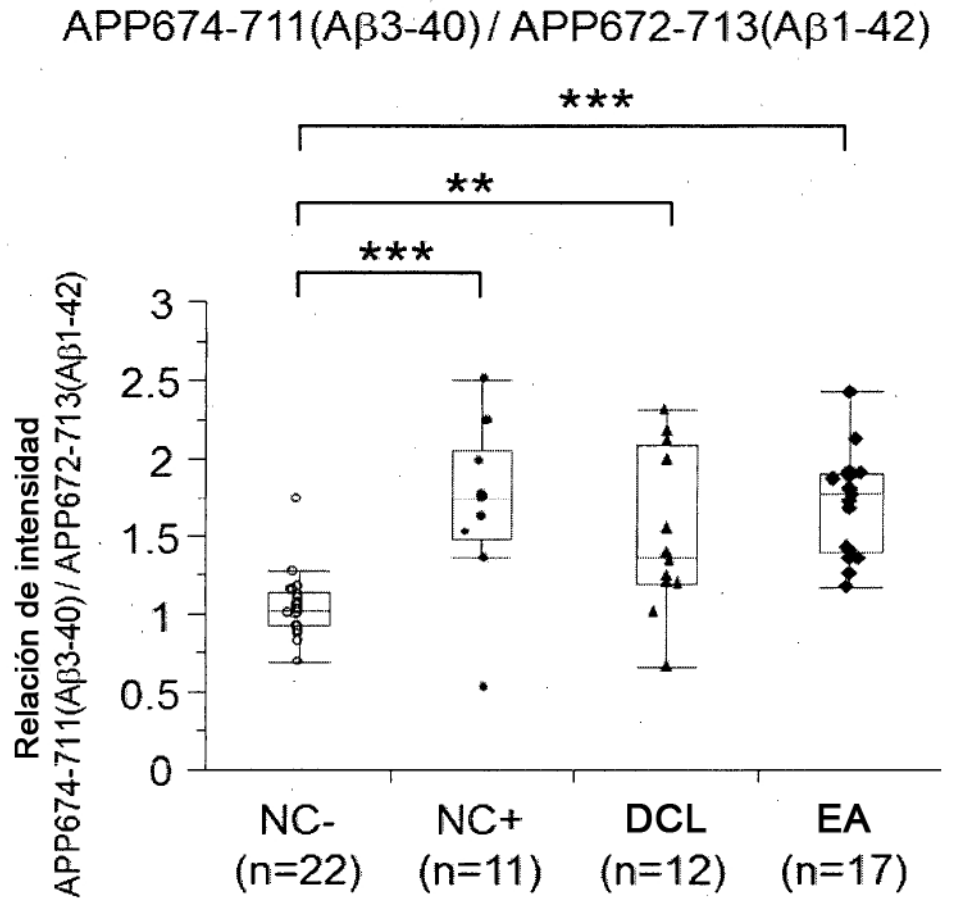
**(D)** APP672-709 (A $\beta$ 1-38) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs PIB+, AUC=0.795



**Fig.8**

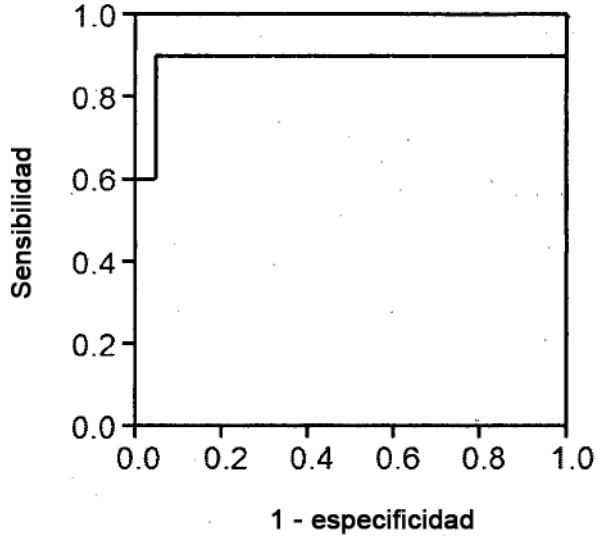


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

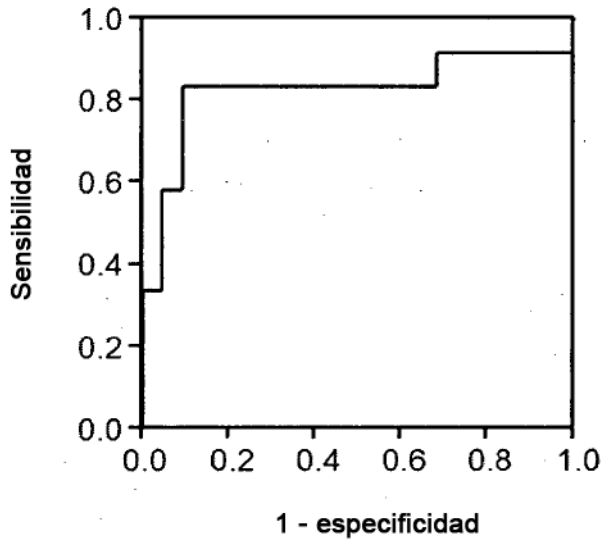
**Fig.9**

**(A)** APP674-711 (A $\beta$ 3-40) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs NC+, AUC=0.886

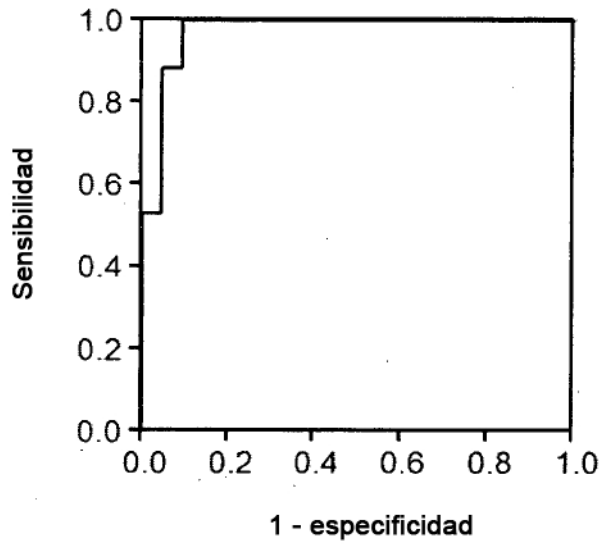
**(B)** APP674-711 (A $\beta$ 3-40) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs DCL, AUC=0.826

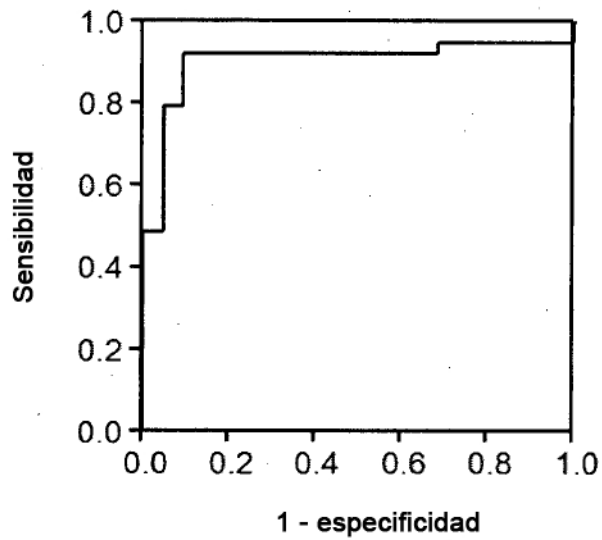
**Fig.10**

**(C)** APP674-711 (A $\beta$ 3-40) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs EA, AUC=0.973

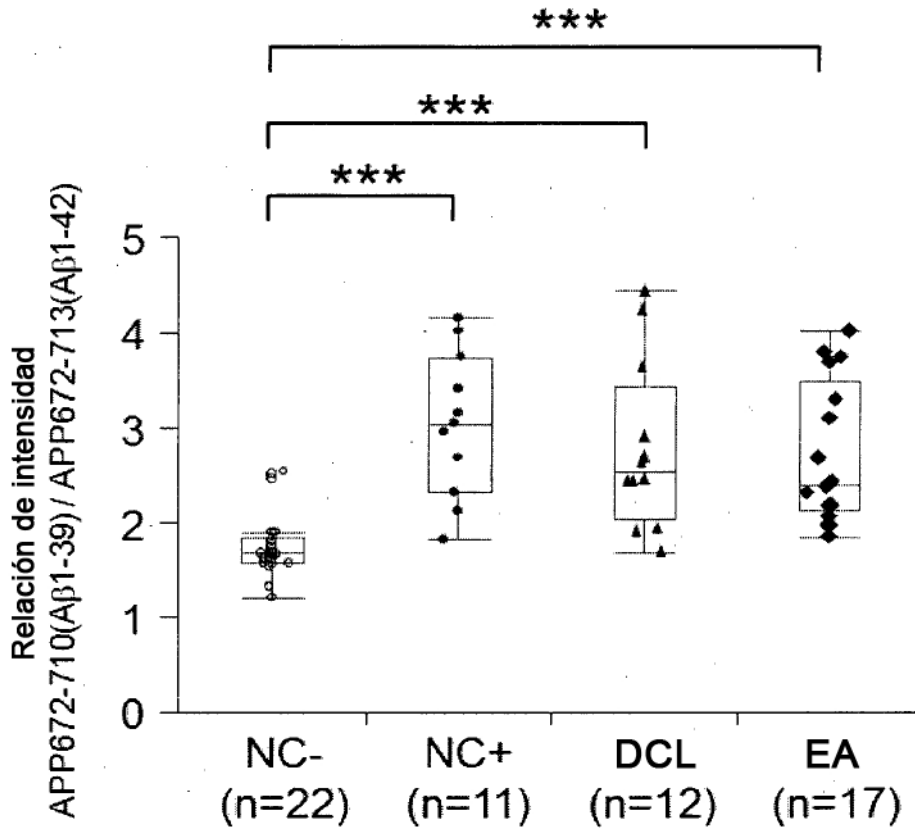
**(D)** APP674-711 (A $\beta$ 3-40) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs PIB+, AUC=0.906

**Fig.11**

APP672-710(A $\beta$ 1-39) / APP672-713(A $\beta$ 1-42)

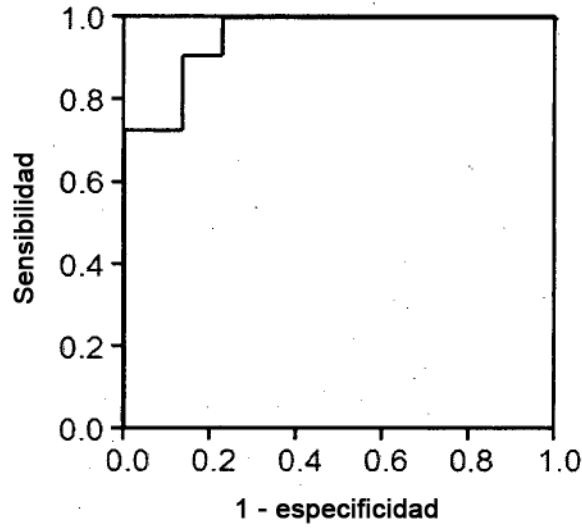


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

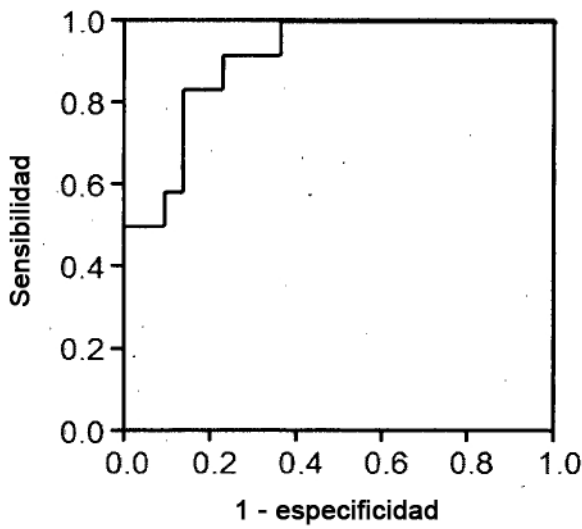
**Fig.12**

**(A)** APP672-710 (A $\beta$ 1-39) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs NC+, AUC=0.955

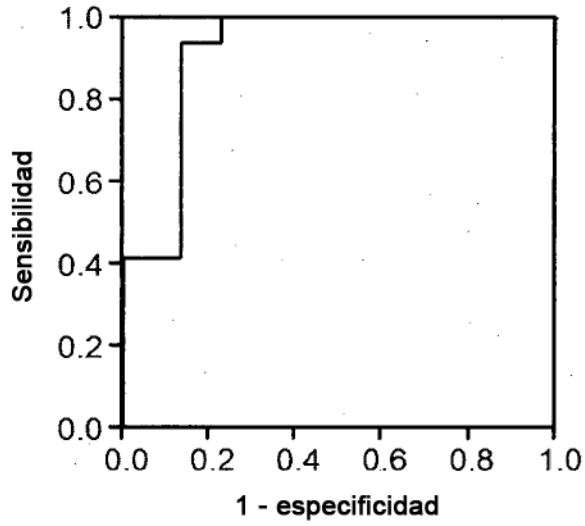
**(B)** APP672-710 (A $\beta$ 1-39) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs DCL, AUC=0.909

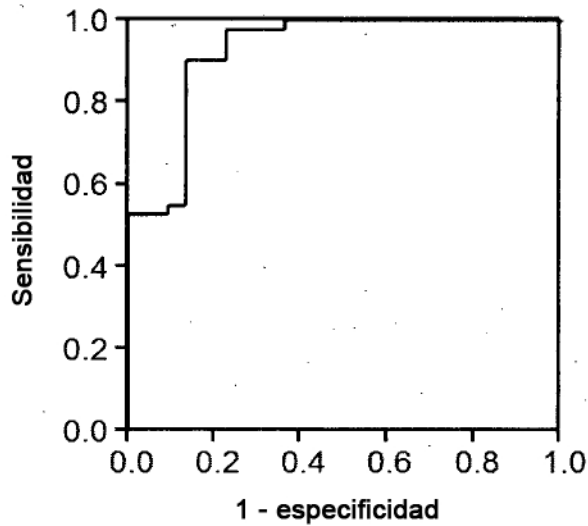
**Fig.13**

**(C)** APP672-710 (A $\beta$ 1-39) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs EA, AUC=0.914

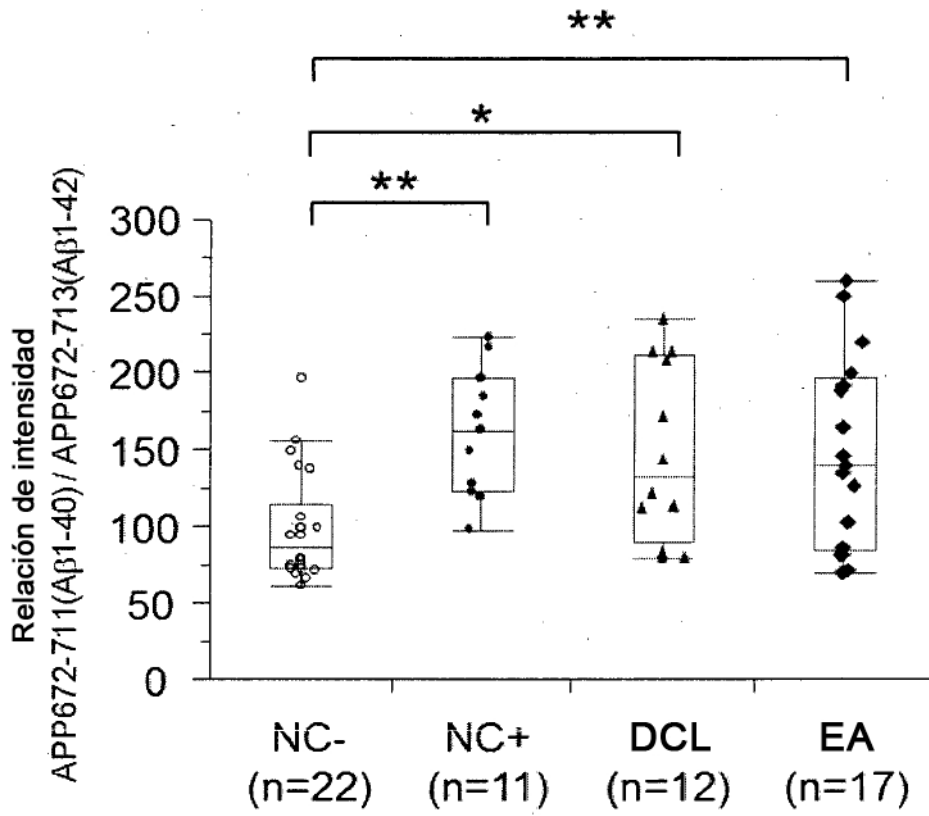
**(D)** APP672-710 (A $\beta$ 1-39) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs PIB+, AUC=0.924

**Fig.14**

APP672-711(A $\beta$ 1-40) / APP672-713(A $\beta$ 1-42)

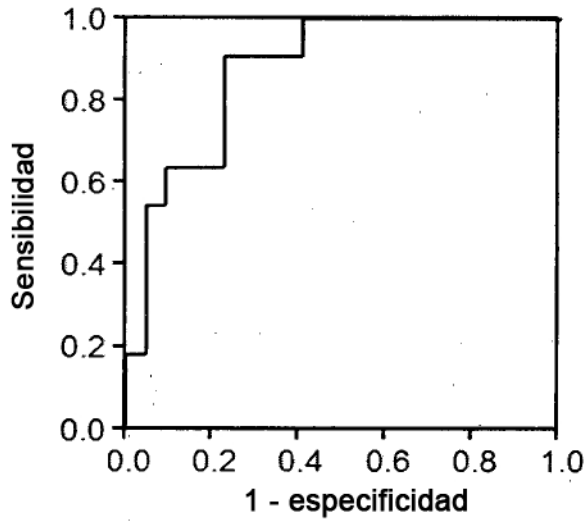


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

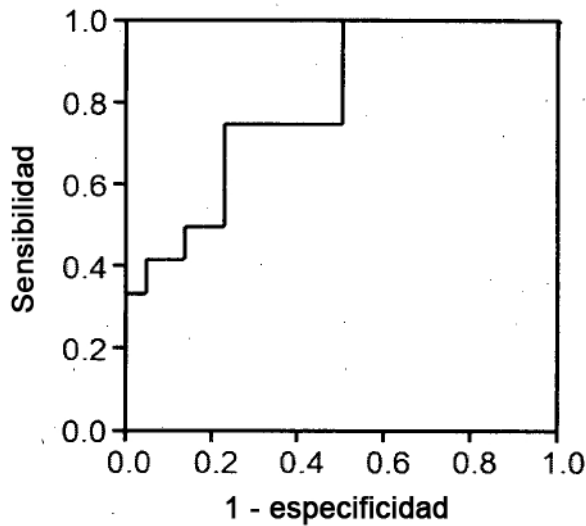
**Fig.15**

**(A)** APP672-711 ( $A\beta$ 1-40) / APP672-713 ( $A\beta$ 1-42)



NC- vs NC+, AUC=0.876

**(B)** APP672-711 ( $A\beta$ 1-40) / APP672-713 ( $A\beta$ 1-42)

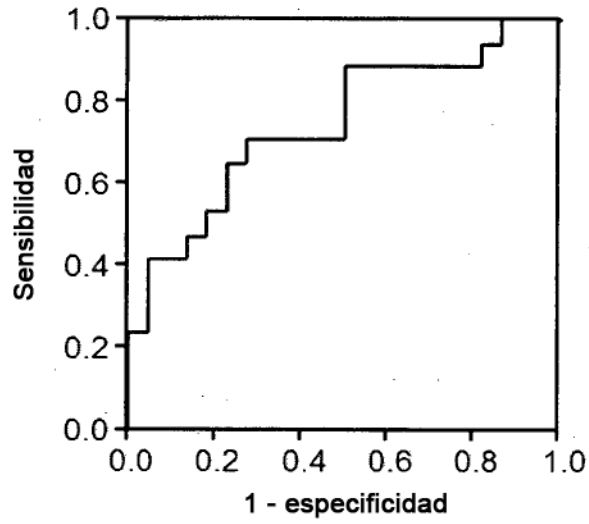


NC- vs DCL, AUC=0.803



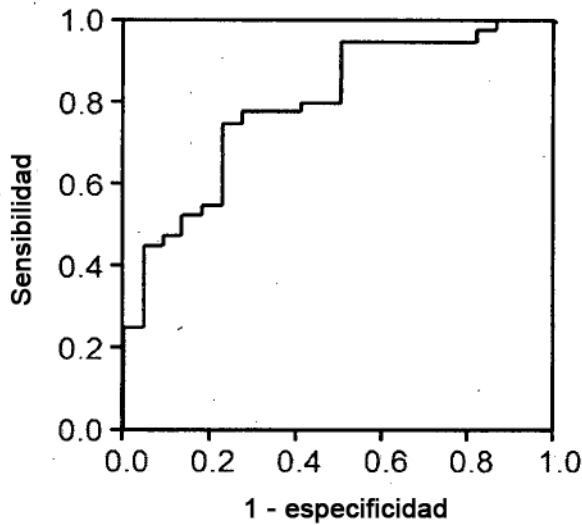
**Fig.16**

**(C)** APP672-711 (A $\beta$ 1-40) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs EA, AUC=0.743

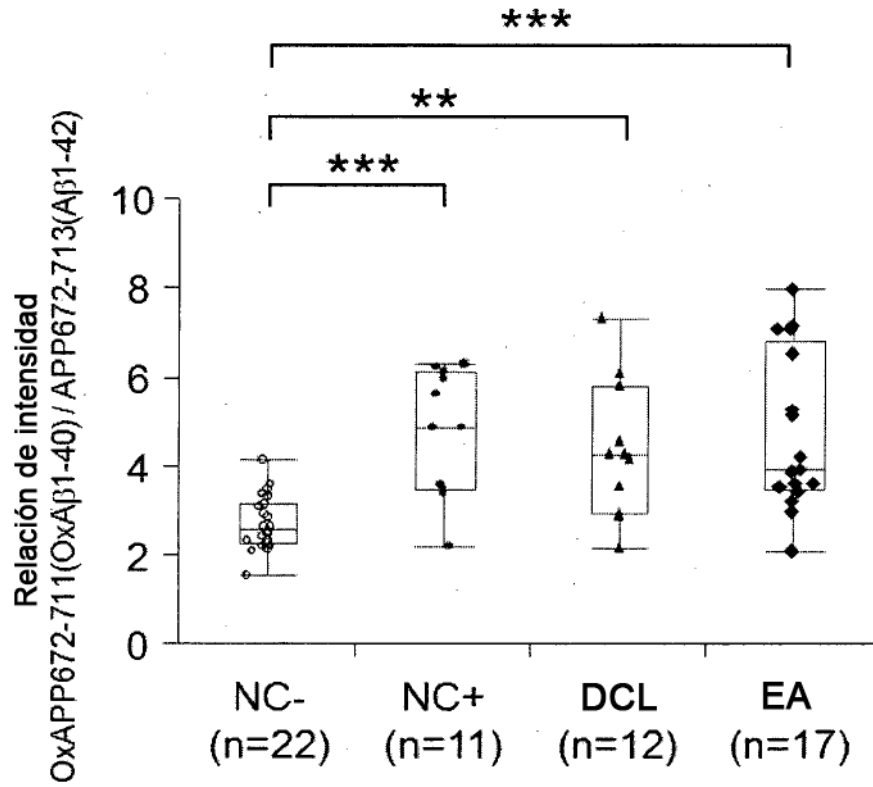
**(D)** APP672-711 (A $\beta$ 1-40) / APP672-713 (A $\beta$ 1-42)



NC- vs PIB+, AUC=0.798

**Fig.17**

OxAPP672-711(OxAβ1-40) / APP672-713(Aβ1-42)

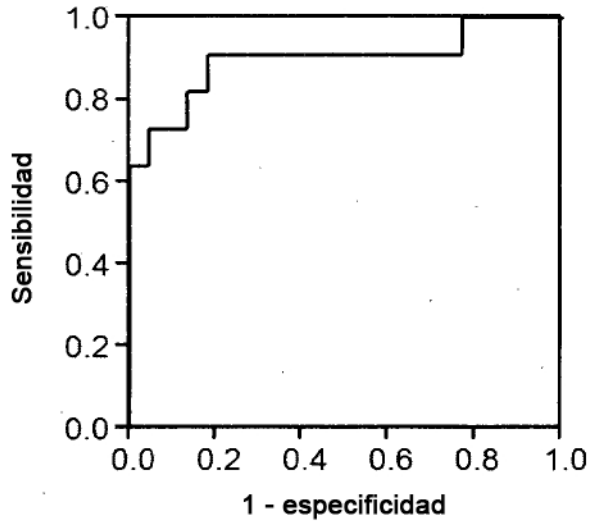


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

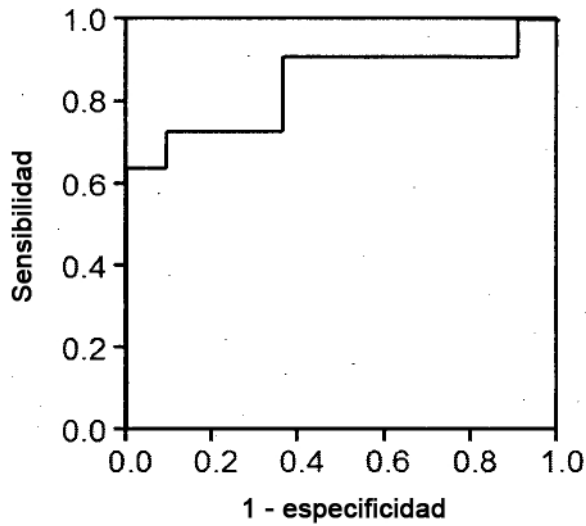
**Fig.18**

**(A)** OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ( $\text{A}\beta$ 1-42)



NC- vs NC+, AUC=0.897

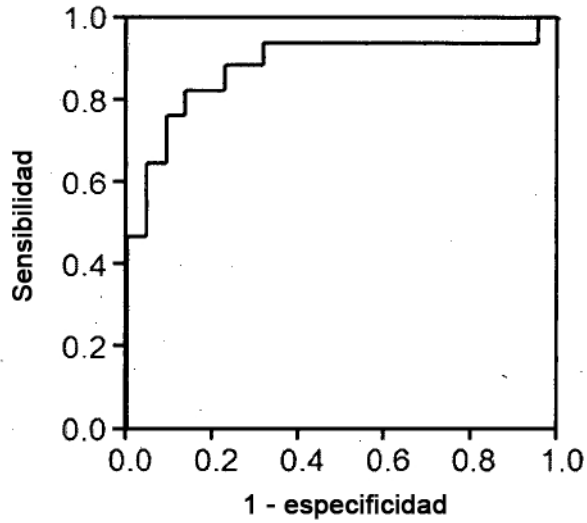
**(B)** OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ( $\text{A}\beta$ 1-42)



NC- vs DCL, AUC=0.843

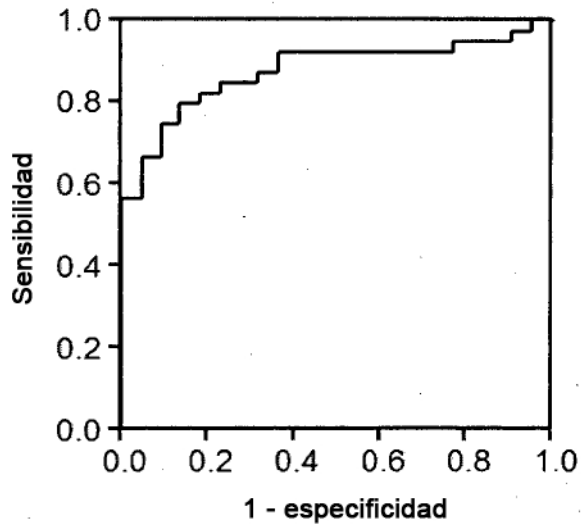
**Fig.19**

**(C)** OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ( $\text{A}\beta$ 1-42)



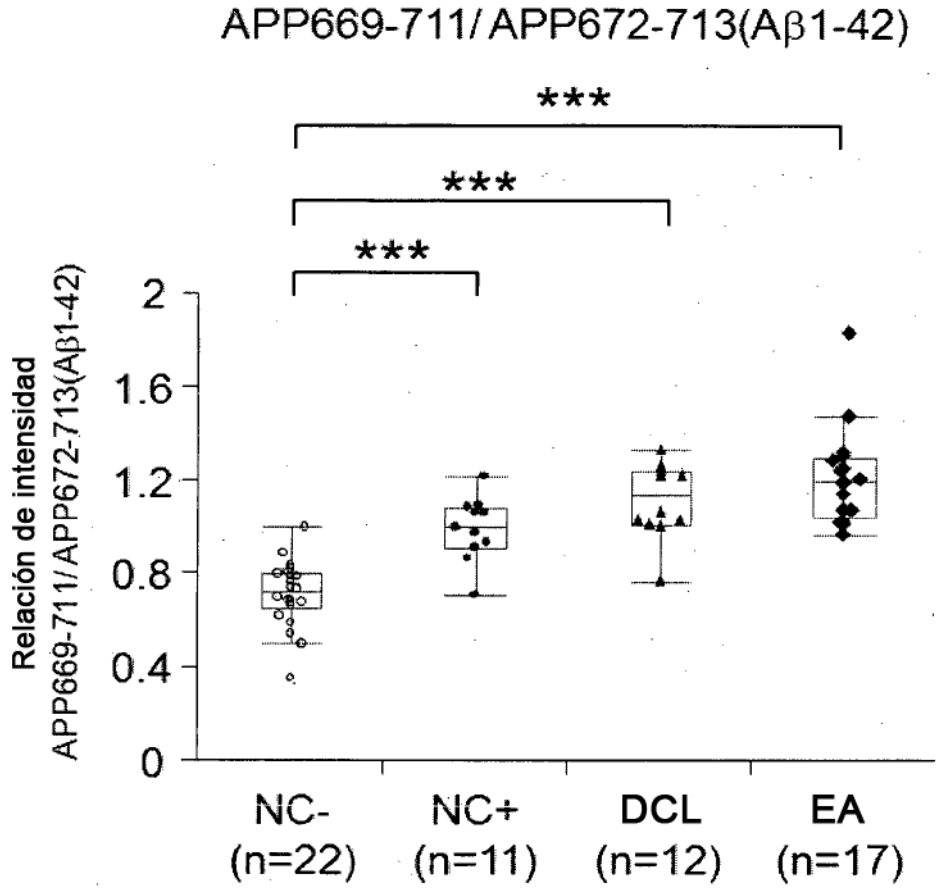
NC- vs EA , AUC=0.885

**(D)** OxAPP672-711 (Ox $\text{A}\beta$ 1-40) / APP672-713 ( $\text{A}\beta$ 1-42)



NC- vs PIB+, AUC=0.876

**Fig.20**

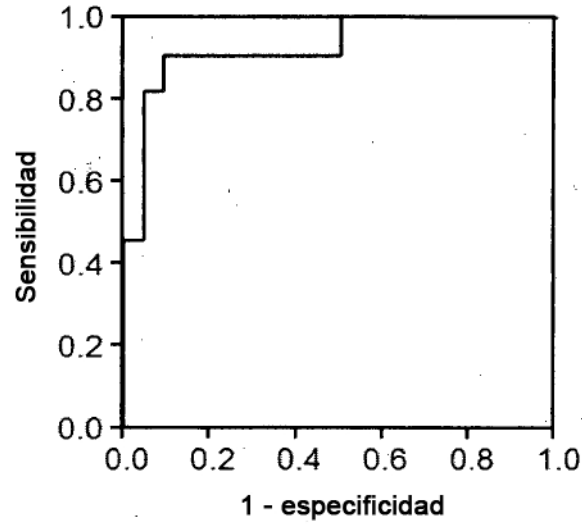


Prueba de Dunnett

\*  $0.05 > P \geq 0.01$ , \*\*  $0.01 > P \geq 0.001$ , \*\*\*  $P < 0.001$

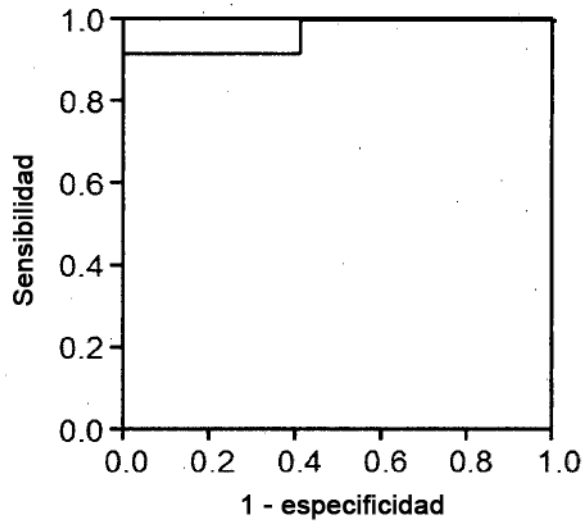
**Fig.21**

**(A)** APP669-711 / APP672-713 ( $A\beta$ 1-42)



NC- vs NC+, AUC=0.930

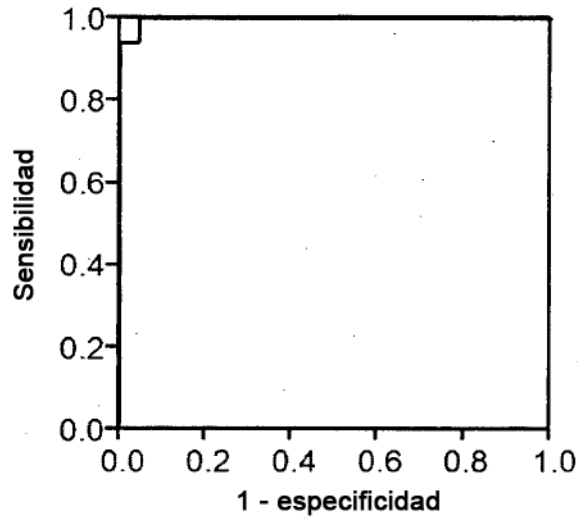
**(B)** APP669-711 / APP672-713 ( $A\beta$ 1-42)



NC- vs DCL, AUC=0.966

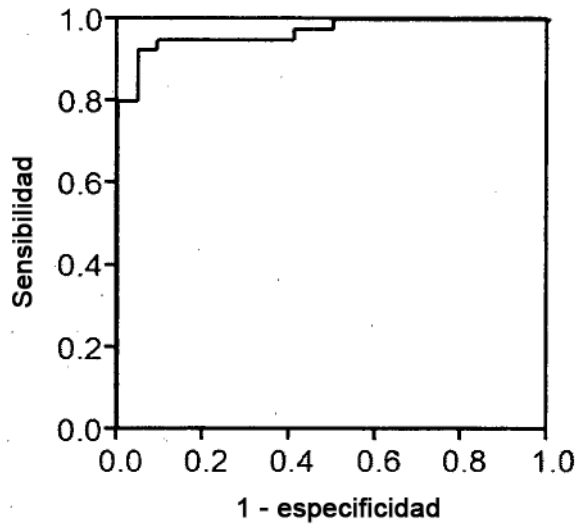
**Fig.22**

**(C)** APP669-711 / APP672-713 ( $A\beta$ 1-42)



NC- vs EA, AUC=0.997

**(D)** APP669-711 / APP672-713 ( $A\beta$ 1-42)



NC- vs PIB+, AUC=0.969

**Fig.23**

