ANTICUERPO, KIT Y MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PÉPTIDOS AMILOIDES

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere al campo de los inmunoensayos que permiten la detección de péptidos Aβ17 en virtud del uso de un anticuerpo anti-Aβ17 y un kit y un método que usa dicho anticuerpo. La invención también se refiere a un método para diagnosticar o distinguir entre diferentes fases de una enfermedad neurodegenerativa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad degenerativa progresiva del sistema nervioso central caracterizada por la pérdida progresiva y creciente de memoria, seguida por la pérdida del control de las extremidades y funciones corporales y muerte final. Es con mucho la causa más común de demencia que afecta del 1 al 6% de las personas de más de 65 años de edad y entre el 10 y el 20% de los de más de 80.

La EA se distingue de otros tipos de demencia por varias características patológicas, incluyendo la aparición progresiva en el cerebro de los pacientes de placas seniles en el espacio extracelular entre neuronas. Las placas tienen núcleos centrales de depósitos amiloides formados principalmente por fibrillas de un péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido β amiloide (Aβ) rodeado por neuritas degeneradas y células de glía. Este péptido resulta del procesamiento proteolítico de una proteína precursora llamada proteína precursora de β amiloide (βAPP).

El Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes cerebrovasculares (NINCDS, por sus siglas en inglés) y la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (ADRDA, por sus siglas en inglés) establecieron los criterios de Alzheimer NINCDS-ADRDA más comúnmente usados para el diagnóstico en 1984. Según el NINCDS/ADRDA estos criterios son los siguientes:

- Enfermedad de Alzheimer definitiva: El paciente cumple los criterios para enfermedad de Alzheimer probable y tiene evidencia histopatológica de EA mediante autopsia o biopsia.

- Enfermedad de Alzheimer probable o prodrómica: Se ha establecido demencia mediante examen clínico y neuropsicológico. Las deficiencias cognitivas también tienen que ser progresivas y estar presentes en dos o más áreas de conocimiento. El inicio de las deficiencias ha sido entre las edades de 40 y 90 años y por último debe haber una ausencia de otras enfermedades capaces de producir un síndrome de demencia.
- Enfermedad de Alzheimer posible o no prodrómica: Hay un síndrome de demencia con un inicio, presentación o evolución atípicos, y sin una etiología conocida; pero no se cree que enfermedades comórbidas capaces de producir demencia estén en el origen de la misma.
- Enfermedad de Alzheimer improbable: El paciente presenta un síndrome de demencia con un inicio repentino, signos neurológicos focales o convulsiones o trastorno en la marcha temprano en el curso de la enfermedad.

El deterioro cognitivo leve (DCL, también conocido como demencia incipiente o deterioro de memoria aislado) es un diagnóstico dado a individuos que tienen deterioros cognitivos más allá de lo esperado para su edad y educación, pero que no interfiere significativamente con sus actividades diarias (Petersen RC *et al.* (1999) Arch. Neurol. 56 (3): 303-8). Se considera que es la fase límite o transicional entre envejecimiento normal y demencia. Aunque el DCL se puede presentar con una variedad de síntomas, cuando la pérdida de memoria es el síntoma predominante se denomina "DCL amnésico" y con frecuencia se ve como un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Grundman M *et al.* (2004). Arch. Neurol. 61 (1): 59-66). Hay estudios que sugieren que estos individuos tienen a evolucionar a enfermedad de Alzheimer probable o prodrómica a una tasa de aproximadamente el 10% al 15% por año (Grundman M *et al ad supra).* Además, cuando los individuos tienen deterioros en dominios diferentes de la memoria se clasifica como DCL no amnésico de dominio único o múltiple y se cree que estos individuos es más probable que se conviertan a otras demencias (Tabert MH *et al.* (2006). Arch. Gen. Psychiatry 63 (8): 916–24).

El diagnóstico de DCL requiere considerable juicio clínico, y como tal una evaluación clínica amplia incluyendo observación clínica, imágenes neurológicas, pruebas sanguíneas y pruebas neuropsicológicas son las mejores para descartar un diagnóstico alternativo. Normalmente se hace una evaluación similar para diagnosticar

la enfermedad de Alzheimer. Se diagnostica DCL cuando hay (Morris JC *et al.* (2001). Arch. Neurol. 58 (3): 397–405):

- Evidencia de deterioro de memoria.
- Conservación de capacidades cognitiva general y funcionales
- Ausencia de demencia diagnosticada.

En la última década, se han realizado varios intentos para identificar marcadores periféricos usando plasma, suero o células circulantes. En particular, puesto que las placas amiloides son una característica definitoria de la neuropatología de enfermedad de Alzheimer, y Aβ se puede detectar en plasma, su medida es un convincente biomarcador candidato para la enfermedad de Alzheimer.

En la práctica clínica, el diagnóstico de EA se lleva a cabo usando criterios clínicos basados en la presencia de distintivos clínicos típicos y la exclusión de otros tipos de demencia usando técnicas de neuroimagen y análisis de sangre. Usando estos criterios, la fiabilidad de diagnóstico es aceptable aunque, según estudios hechos usando autopsia de cerebro, entre el 10-20% de los pacientes diagnosticados con EA padecían una enfermedad diferente. Además, los métodos de diagnóstico actuales solo se pueden llevar a cabo cuando el proceso neurodegenerativo está tan avanzado que el paciente padece demencia grave y los daños cerebrales son tan extensos que el número de medidas terapéuticas es limitado. El diagnóstico definitivo requiere examen patológico de tejido cerebral post-mortem.

En vista del hecho de que Aβ se acumula en el cerebro de pacientes de EA y es un elemento central en la patogénesis de la EA, esta proteína se ha considerado como el candidato más adecuado como biomarcador de EA. Sin embargo, el uso de Aβ como biomarcador plasmático para EA se enfrenta al problema de que las concentraciones de los péptidos Aβ (Aβ(1-40) y Aβ(1-42)) en suero son extremadamente bajas, de modo que no hay ensayos que sean lo suficientemente sensibles para permitir una detección fiable de dichas especies de péptidos.

Se han usado muchos ensayos diferentes para determinar los niveles de péptidos beta amiloides en muestras biológicas (véanse, por ejemplo los métodos descritos por Scheuner et al (Nature Med., 1996, 2:864-870); Tamaoka A et al. (J Neurol Sci., 1996, 141, 65–68); Suzuki, N. et al. (Science, 1994, 264:1336-1340); WO200722015, Vanderstichele H et al. (Amyloid, 2000, 7, 245–258); Fukomoto y col. (Arch. Neurol.

2003, 60, 958–964); Mehta et al. (Arch. Neurol. 57, 2000, 100–105); Mayeux, R. et al. (Ann Neurol. 1999, 46, 412–416); Lanz, T.A y Schacthter, J.B. (J. Neuroscience Methods, 2006, 157:71-81), WO200750359, WO0162801, WO0315617, WO0246237, WO0413172. Sin embargo, todos los ensayos basados en ELISA conocidos hasta ahora tienen un límite de detección inferior que no está en el intervalo pg/ml de un único dígito como máximo, que es suficiente para detectar Aβ40 y Aβ42 en LCR así como para detectar dichas especies en plasma de pacientes que padecen EA familiar, pero son inapropiados para detectar Aβ42 en el plasma de pacientes que padecen EA esporádica, en donde la concentración de Aβ42 es mucho menor.

Hasta la fecha, los únicos ensayos de péptido Aβ que muestran un límite de detección inferior menor pg/ml de único dígito corresponden a los ensayos descritos en los documentos WO200646644 y WO2009015696.

El documento WO200646644 describe un ensayo sándwich electroquimioluminiscente (ECL) en donde el Acm 21F12 (que reconoce los aminoácidos 33-42 de Aβ42) se acopla a bolas magnéticas, que se usan después para capturar el péptido Aβ42 en la muestra que contiene Aβ42 y se ponen en contacto además con el Acm 3D6 acoplado a un complejo de rutenio. Se detecta después la cantidad de anticuerpo 3D6 unido por la luminiscencia emitida por el complejo de rutenio cuando se aplica energía eléctrica. Usando este ensayo, los inventores son capaces de detectar tan poco como 0,5 pg/ml de un estándar de Aβ42. Sin embargo, cuando se usa el mismo ensayo para comparar Aβ42 en muestras de plasma de pacientes de EA y controles sanos, no se pudieron observar diferencias significativas entre dos conjuntos de pacientes, lo que llevó a los inventores a concluir que la cantidad de Aβ42 intacto en suero es muy baja debido a la degradación y se volvieron a un ensayo ELISA competitivo usando el Acm 21F12 que proporciona niveles de sensibilidad menores en el intervalo de ng/ml.

El documento WO2009015696 describe un ensayo ELISA sándwich de alta sensibilidad en donde el anticuerpo de detección se pone en contacto con un reactivo marcado con biotina que muestra especificidad para dicho anticuerpo. El reactivo se pone en contacto con estreptavidina que se acopla a peroxidasa. Se detecta después la actividad peroxidasa por colorimetría usando TMB o fluorescentemente usando QuantaBlue.

El documento WO2006053251 describe un método para la determinación de especies de péptido beta amiloide en un amuestra que comprende poner en contacto una muestra con un agente desnaturalizante, extraer el conjunto de péptidos de la mezcla muestra-agente desnaturalizante, separar las especies de péptido beta amiloide del conjunto y determinar la cantidad de especies de péptido beta amiloide. Este método requiere un paso de separación de los péptidos antes de la determinación, lo que produce un tiempo de procesamiento aumentado y costes aumentados.

En la técnica anterior se conocen métodos para diagnosticar la EA detectando los niveles de biomarcadores presentes en el cerebro o LCR de pacientes. Se han caracterizado diferentes biomarcadores cuya determinación se lleva a cabo en LCR. El LCR refleja directamente la composición del espacio extracelular del sistema nervioso central y así, proporciona concentraciones más altas como biomarcadores. Sin embargo, el LCR solo se puede recuperar mediante punción lumbar, que no es un método de diagnóstico rutinario aceptado fácilmente por los pacientes que padecen demencia, por no mencionar pacientes con trastornos de memoria. Por tanto, hay una necesidad para biomarcadores de EA que se puedan detectar en muestras que puedan ser obtenidas de forma no agresiva del cuerpo.

Los biomarcadores adecuados para la EA descritos en la técnica anterior y que se pueden detectar en plasma incluyen (i) marcadores derivados de la placa amiloide, (ii) autoanticuerpos contra Aβ o βAPP, (iii) marcadores inflamatorios tales como IL-6, su receptor o gp130, la proteína C reactiva o estrés oxidativo (isoprostanos), (iv) marcadores de metabolismo lipídico (apoE, oxiesteroles) y (v) marcadores de enfermedad vascular (homocisteína, lipoproteína b C1q) (Scheuner D et al. (1996) Nature Med 2, 864-870).

Sin embargo, en vista del hecho que Aβ se acumula en el cerebro de pacientes con EA y es un elemento central en la patogénesis de EA, esta proteína se ha considerado como el candidato más adecuado como biomarcador de EA. Sin embargo, el uso de Aβ como un biomarcador de plasma para la EA se enfrenta al problema de que las concentraciones de los péptidos Aβ (Aβ(1-40) y Aβ(1-42)) en suero son extremadamente bajas, de modo que no hay ensayos que sean lo suficientemente sensibles para permitir un detección fiable de dichas especies de péptidos.

Además, se han descrito varios anticuerpos para detectar péptidos Aβ y para ser usados en ensayos inmunológicos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-Aβ(1-17) (6E10) es un anticuerpo dirigido hacia la región N-terminal del péptido Aβ, generado contra el péptido Aβ(1-17) (Kim KS, et al. Neurosci. Res. Comm. 7; 1988) y que reconoce los péptidos Aβ que incluyen dicha región o el anticuerpo monoclonal generado contra el péptido Aβ(1-28) (Pierce).

Sin embargo, hay una necesidad en la técnica de ensayos y kits inmunológicos mejorados para detectar péptidos derivados de Aβ que salven los problemas de los métodos y kits conocidos en la técnica, en particular, que sean suficientemente sensibles para detectar péptidos Aβ de una forma fiable en plasma de pacientes que padecen EA esporádica. También existe una necesidad para identificar biomarcadores para el diagnóstico temprano de la EA que sean sensibles y específicos y que permitan distinguir el deterioro cognitivo debido a la edad de los asociados con los primeros síntomas del proceso, así como para distinguir cambio debidos a EA y debidos a otras afecciones degenerativas. Según Growdon et al., (Neurobiol. Aging 1998, 19: 109-116), el marcador ideal para la EA debe satisfacer los siguientes requerimientos:

- Debe detectar una característica fundamental de la neuropatología
- Debe ser validado en casos de la enfermedad confirmados neuropatológicamente
- Debe mostrar un sensibilidad de al menos el 80% para detectar EA
- Debe mostrar una especificidad de al menos el 80% para distinguir EA de otros tipos de demencia y
- Debe ser fiable, reproducible, no agresivo, sencillo de realizar y económico.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que específicamente se une al péptido Aβ(1-17).

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección del péptido Aβ(1-17), que comprende:

(i) un primer anticuerpo que es un anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y

(ii) un segundo anticuerpo que reconoce una región del péptido Aβ(1-17) diferente de la región que es reconocida por el primer anticuerpo.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar o detectar el péptido Aβ(1-17) en una muestra que comprende los pasos de

(i) capturar el péptido Aβ(1-17) presente en la muestra con un primer anticuerpo que se une específicamente a dicho péptido,

(ii) poner en contacto los complejos inmunes formados en el paso (i) con un segundo anticuerpo, en donde dicho segundo anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y en donde dicho segundo anticuerpo reconoce una región diferente que el primer anticuerpo y está acoplado a un primer miembro de un par de unión;

(iii) poner en contacto los complejos formados en el paso (ii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a una etiqueta detectable, y

(iv) detectar o determinar la actividad o cantidad de la etiqueta detectable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el seguimiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprende:

(a) determinar en una muestra de dicho sujeto en un primer punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en una muestra de dicho sujeto;

(b) determinar en una muestra de dicho sujeto en un segundo punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en una muestra de dicho sujeto y

(c) comparar el cociente del nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en dichos primer y segundo puntos temporales;

en donde si dicho cociente aumenta en el segundo punto temporal con respecto al primer punto temporal, es indicativo de un empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto entre dichos primer y segundo puntos temporales.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en:

(a) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma de dicho sujeto y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor añadido del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma del sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre del sujeto,

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre del sujeto; y

(e) el valor cociente entre el nivel de Aβ17 libre en una muestra de plasma de dicho sujeto y el péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de dichos parámetros en una muestra de referencia de un sujeto sano, entonces el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más de los parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(b) los valores añadidos del nivel de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma del sujeto y el nivel péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(d) el valor cociente entre el nivel de Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los niveles añadidos de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos de péptido Aβ42 total en

una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre y de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde al valor añadido de los péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de los parámetros (a), (b) o (c) aumenta y/o el valor de uno o más de los parámetros (d), (e), (f) o (g) disminuye con respecto al valor en una muestra de referencia de un sujeto sano, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de (a) aumenta y/o el valor de uno o más de dichos parámetros (b), (c), (d) y (e) disminuye con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(c) los valores añadidos de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ40 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y

el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que tiene DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece de enfermedad de Alzheimer leve.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ40 libre en una muestra de plasma; y

(b) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 libres en una muestra de plasma;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto con deterioro cognitivo leve prodrómico, el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Resultado de un ensayo de transferencia de manchas llevado a cabo usando el anticuerpo policlonal anti-Aβ(1-17) y diferentes péptidos Aβ adsorbidos a una membrana. El anticuerpo secundario usado en el ensayo fue un anticuerpo de cabra anti-conejo-HRP. La transferencia de mancha se reveló con ECL con la tecnología SNAP a 1 minuto y 3 minutos de exposición.

La **figura 2** muestra el análisis de espectrometría de masas para una muestra de LCR (2A) y una muestra de plasma (2B), en donde el pico de Aβ17 se indica con una flecha.

La **figura 3** muestra los valores medios de algunos de los marcadores en diferentes grupos de pacientes. LP: Aβ libre en plasma; TP: Aβ total en plasma; UC: Aβ unido a células; CES: conjunto en sangre (Aβ total en plasma + Aβ unido a células). (A)

Concentración en pg/ml de los marcadores de Aβ obtenida en un ELISA sándwich para los diferentes grupos: CS>65 (sujetos sanos mayores de 65), DCL posible (sujetos con deterioro cognitivo leve con EA posible o no prodrómica), DCL probable (sujetos con deterioro cognitivo leve con EA probable o prodrómica) y EA leve (sujetos con enfermedad de Alzheimer leve). (B) y (C): gráficas que representan la absorbancia obtenida en ELISA para varios marcadores en los diferentes grupos.

La **figura 4** muestra los valores medios de algunos de los marcadores en diferentes grupos de pacientes. LP: Aβ libre en plasma; TP: Aβ total en plasma; UC: Aβ unido a células; CES: conjunto en sangre (Aβ total en plasma + Aβ unido a células). (A) Cocientes de las concentraciones (en pg/ml) de los marcadores de Aβ obtenidos en un ELISA sándwich para los diferentes grupos: CS>65 (sujeto sano mayor de 65), DCL posible (deterioro cognitivo leve posible o no prodrómico), DCL probable (deterioro cognitivo leve probable o prodrómico) y EA leve (enfermedad de Alzheimer leve). (B) Gráficas que representan la absorbancia obtenida en ELISA para varios marcadores en los diferentes grupos.

La **figura 5** muestra los valores medios de algunos de los marcadores en diferentes grupos de pacientes. LP: Aβ libre en plasma; TP: Aβ total en plasma; UC: Aβ unido a células; CES: conjunto en sangre (Aβ total en plasma + Aβ unido a células). (A) Cocientes de las concentraciones en pg/ml de los marcadores de Aβ obtenidos en un ELISA sándwich para los diferentes grupos: CS>65 (sujeto sano mayor de 65), DCL posible (deterioro cognitivo leve posible o no prodrómico), DCL probable (deterioro cognitivo leve probable o prodrómico) y EA leve (enfermedad de Alzheimer leve). (B) Gráfica que representa la absorbancia obtenida en ELISA para varios marcadores en los diferentes grupos.

La **figura 6** muestra el cociente entre Aβ17 libre en plasma (LP) y Aβ17 unido a células (UC) para la distinción entre los diferentes grupos. (A) concentración en pg/ml de los marcadores de Aβ obtenidos en un ELISA sándwich para los diferentes grupos: CS>65 (sujeto sano mayor de 65), DCL posible (deterioro cognitivo leve posible o no prodrómico), DCL probable (deterioro cognitivo leve probable o prodrómico) y EA leve (enfermedad de Alzheimer leve). (B) Gráfica que representa la absorbancia obtenida en ELISA para dicho marcador en los diferentes grupos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han generado un anticuerpo muy específico para el péptido Aβ17, que no reconoce otras especies de Aβ. Por ejemplo, la figura 1 muestra que el anticuerpo reconoce Aβ17 de una manera específica sin mostrar reactividad cruzada sustancial hacia otras especies de Aβ tales como Aβ15, Aβ16, Aβ38, Aβ40 o Aβ42. También han diseñado un kit para la detección del péptido Aβ17 lo que permite una cuantificación fiable de dicha especie molecular en cualquier muestra en cualquier sujeto y, en particular, en el plasma de sujetos que se sospecha que padecen EA. Asimismo, los autores han mostrado que es posible distinguir entre diferentes grupos de sujetos: sujetos sanos, con EA prodrómica, con deterioro cognitivo leve no prodrómico y con EA leve midiendo el nivel de diferentes parámetros.

ANTICUERPO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo, de aquí en adelante el anticuerpo de la invención, que se une específicamente al péptido Aβ(1-17) (SEQ ID NO: 1).

El término "se une específicamente", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo que se une al péptido Aβ17 sin dar ninguna reacción cruzada sustancial con otros péptidos Aβ. En una forma de realización particular, la especificidad para el péptido Aβ17 es mayor del 50%, mayor del 60%, mayor del 70%, mayor del 80% o mayor del 90%. Más preferiblemente, la especificidad del anticuerpo por el péptido Aβ17 es mayor del 95%. Como se puede ver en la figura 1, los autores de la invención han ensayado la especificidad del anticuerpo anti-Aβ17 y han mostrado que es muy específico para el péptido Aβ17 y no muestra ninguna reactividad cruzada sustancial hacia otros péptidos Aβ (Aβ15, Aβ16, Aβ38, Aβ40 y Aβ42). De esta manera, en una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención no muestra reactividad cruzada sustancial hacia un péptido Aβ seleccionado del grupo que consiste en Aβ15, Aβ16, Aβ38, Aβ40, Aβ42 y una combinación de uno o más de ellos.

No hay prácticamente limitación con respecto al tipo de anticuerpo según la presente invención, siempre que contenga al menos un sitio de unión al antígeno específico para Aβ17. Por tanto, las moléculas de anticuerpo adecuadas incluyen:

- anticuerpos "intactos" que comprenden una región variable de unión al antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3,
- fragmentos "Fab" resultantes de la digestión con papaína de un anticuerpo intacto y que comprenden un único sitio de unión a antígeno y una región CL y una CH1,
- fragmentos "F(ab')$_2$" resultantes de la digestión con pepsina de un anticuerpo intacto y que contienen dos sitios de unión a antígeno,
- fragmentos "Fab´" que contienen el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada y que tienen un sitio de unión a antígeno solamente. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo,
- "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento de antígeno y de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un domino variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables (CDR) de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión entero.
- Los fragmentos de anticuerpo FV de cadena sencilla o "scFv" comprenden los dominios VL y VH del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, las regiones VL y VH están unidas por un enlazador polipeptídico que permite al "scFv" formar estructuras deseadas para la unión al antígeno.
- Los "diacuerpos" comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) unido a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena

polipeptídica (VH-VL) unidos por un enlazador peptídico que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza el emparejamiento con los dominios complementarios de otra cadena y fomenta el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno funcionales.

- Los "anticuerpos biespecíficos" (AcB) son anticuerpos individuales, divalentes (o fragmentos inmunoterapéuticamente efectivos de los mismos) que tienen dos sitios de unión a antígeno diferentemente específicos. Los dos sitios de antígeno pueden estar acoplados químicamente o por métodos de ingeniería genética conocidos en la técnica.

Todos estos fragmentos de anticuerpos se pueden modificar adicionalmente utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando deleción(es), inserción(es), sustitución(es), adición(es) de aminoácidos y/o recombinación (y/o cualquier otra modificación(es) (por ejemplo, modificaciones postraduccionales y químicas, tales como glicosilación y fosforilación) conocidas en la técnica), solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina los conoce bien el experto en la materia; véase, por ejemplo Sambrook et al.; Molecular Clonning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición 1989 y 3ª edición 2001.

Los anticuerpos adecuados para la presente invención incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diversos huéspedes incluyendo cabras, conejos, ratas, ratones, ovejas, perros, camellos, dromedarios, llamas, seres humanos, aves y otros mediante inyección con el péptido correspondiente al fragmento de Aβ17 que tiene propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie del huésped, se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, pero no están limitados a, de Freund, geles minerales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, KLH y dinitrofenol. Entre los adyuvantes utilizados en seres humanos el BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son especialmente preferidos. En una forma de realización preferida, los adyuvantes usados para la generación del anticuerpo

de la invención son adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund y alumbre Imjet.

Puede ser útil conjugar el antígeno a una proteína que sea inmunogénica en la especie que va a inmunizarse. Proteínas útiles para la conjugación con el péptido son, sin limitación, hemocianina de lapa californiana (KLH), Blue Carrier (hemocianina aislada de *Concholepas concholepas*), tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o de derivación, por ejemplo, éster de maleimidobenzoilo sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico o $SOCl_2$. En una forma de realización preferida, la proteína usada para conjugación es KLH. En una forma de realización preferida, la conjugación entre el péptido y KLH se lleva a cabo mediante el entrecruzador NHS-PEG_4-maleimida y los péptidos tienen una cisteína en el N-terminal para realizar la conjugación del péptido a KLH.

Para la producción de anticuerpos monoclonales, se pueden utilizar técnicas convencionales. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden hacer utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) utilizando el procedimiento descrito en detalle en las unidades 11.4 a 11.11 de Ausubel, F.M. et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc.; edición encuadernada en anillas, 2003). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales se pueden aislar mediante procedimientos de ADN recombinante de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990). Clacksoii et al., Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (en el intervalo nM) mediante mezcla de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como estrategia para construir bibliotecas muy grandes de fagos (Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales se pueden usar directamente como un antisuero obtenido de huéspedes inmunizados después del sangrado y la eliminación del coagulo de fibrina. Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar directamente como sobrenadante del cultivo de hibridoma o como líquido ascítico después de la implantación del hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped adecuado. Alternativamente, las moléculas de inmunoglobulina, policlonales o monoclonales, se pueden purificar antes de su uso mediante métodos convencionales tales como purificación de afinidad utilizando péptidos derivados de Aβ17, purificación en gel no desnaturalizante, HPLC o RP-HPLC, exclusión molecular, purificación en columna de proteína A, o cualquier combinación de estas técnicas.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo policlonal. En una forma de realización preferida, el método para la generación del anticuerpo de la invención incluye los siguientes pasos:

- 1ª dosis: Inmunización de un conejo con 100 μg del péptido usando adyuvante completo de Freund como adyuvante.
- 2ª dosis: Inmunización de un conejo con 100 μg del péptido usando adyuvante incompleto de Freund como adyuvante.
- 3ª dosis: Inmunización de un conejo con 100 μg del péptido usando alumbre como adyuvante.
- 3 dosis más con 200 μg del péptido alternando los adyuvantes; adyuvante incompleto de Freund-alumbre-adyuvante incompleto de Freund.

En una forma de realización preferida la región del péptido Aβ o inmunógeno usado para generar el anticuerpo de la invención se selecciona del grupo que consiste en péptido Aβ(12-17), correspondiente a la secuencia VHHQKL (SEQ ID NO: 2) y del péptido Aβ (11-17), correspondiente a la secuencia EVHHQKL (SEQ ID NO: 3).

KIT DE LA INVENCIÓN

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un kit para la detección o para la determinación del péptido Aβ(1-17), de aquí en adelante kit de la invención, que comprende:

(i) un primer anticuerpo que es el anticuerpo específico para Aβ(1-17) según la invención y

(ii) un segundo anticuerpo que reconoce una región del péptido Aβ(1-17) diferente de la región que es reconocida por el primer anticuerpo.

El término "péptido beta amiloide" se usa en el presente documento de manera intercambiable con Aβ, proteína beta amiloide, "A beta", "beta AP", "péptido A beta", o "péptido A beta" y se refiere a una familia de péptidos que son el constituyente químico principal de las placas seniles y los depósitos amiloides vasculares (angiopatía amiloide) encontrados en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), síndrome de Down y hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (HCHWA-D). En cualquier forma, el péptido beta amiloide es un fragmento de proteína precursora de beta-amiloide (APP) que comprende un número variable de aminoácidos que se produce por el corte proteolítico secuencial de la proteína precursora de amiloide por las secretasas β y γ o por las secretasas β y α.

Los péptidos beta amiloides se expresan comúnmente como "Aβ(x-y)", en donde x representa el número de aminoácido del extremo amino del péptido beta amiloide e y representa el número de aminoácido del extremo carboxi. "Aβ(1-17)" o "Aβ17", como se usan aquí, se refiere a un péptido de 17 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 672 a 688 (SEQ ID NO: 1) de la proteína precursora de amiloide y que se produce por el corte proteolítico secuencial de la proteína precursora de amiloide (SEQ ID NO: 4) por las secretasas β y α.

En el contexto de la presente invención, el "anticuerpo de captura" es el anticuerpo que se usa para recuperar de una muestra todas las especies moleculares a las que se une específicamente el anticuerpo. No hay prácticamente limitación respecto al tipo de anticuerpo que se puede usar como anticuerpo de captura siempre que contenga al menos un sitio de unión a antígeno específico para Aβ17. E principio, cualquier anticuerpo específico para el péptido Aβ17 se puede usar como anticuerpo de captura. El anticuerpo de captura se une a una región diferente que el segundo anticuerpo. En una forma de realización preferida, el anticuerpo de captura se dirige contra un epítopo en la región N-terminal del péptido Aβ17. En una forma de realización aún más preferida, los epítopos a los que se puede dirigir el anticuerpo de captura incluyen epítopos localizados en los aminoácidos 1 a 10 de Aβ17. En aún otra forma de realización preferida, el anticuerpo de captura es un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización aún más preferida, el anticuerpo de captura reconoce una región

correspondiente a los aminoácidos 1-16 del péptido Aβ. En una forma de realización aún más preferida, el anticuerpo monoclonal usado como anticuerpo de captura es el Acm 6E10 como se ha descrito en Kim, K.S. (Neuroscience Res. Comm. 1988, 2:121-130).

El segundo componente del kit de la invención corresponde al anticuerpo de la invención, ya descrito previamente en la presente invención. En el contexto de la presente invención, el "anticuerpo de detección" es el anticuerpo que se usará para detectar la cantidad de antígeno que ha retenido el anticuerpo de captura. El primer anticuerpo reconoce una región diferente que el segundo anticuerpo, porque se debe unir a una región del antígeno que no esté cubierta por el anticuerpo de captura.

El primer y segundo anticuerpos se pueden usar en el kit de la invención indistintamente como anticuerpos de captura y detección.

Uno de los dos anticuerpos (el primer o el segundo anticuerpo) puede estar acoplado a un primer miembro de un par de unión, de modo que permita la detección del anticuerpo que se une al antígeno capturado por el anticuerpo de captura. El anticuerpo que se acoplará actuará como anticuerpo de detección y puede ser el primer o el segundo anticuerpo.

En una forma de realización particular, el kit comprende además un anticuerpo o combinación de anticuerpos que específicamente se unen a Aβ40 y/o Aβ42. De esta manera, en una forma de realización particular, el kit sería útil para la detección del péptido Aβ17 y el/los péptido(s) Aβ40 y/o Aβ42.

"Aβ42", como se usa aquí, se refiere a un péptido de 42 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 672 a 713 (SEQ ID NO: 5) y que se produce mediante corte proteolítico secuencial de la proteína precursora de amiloide (SEQ ID NO: 4) por las secretasas β y γ.

"Aβ40", como se usa aquí, se refiere a un péptido de 40 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 672 a 711 (SEQ ID NO: 6) y que se produce mediante corte proteolítico secuencial de la proteína precursora de amiloide (SEQ ID NO: 4) por las secretasas β y γ.

En una forma de realización preferida, el primer o segundo anticuerpo, como pueda ser el caso, está acoplado a un primer miembro de un par de unión. Si este es el caso, también está incluido en el kit un segundo miembro de un par de unión acoplado a

una etiqueta detectable. En una forma de realización particular, si la etiqueta detectable que está acoplada al segundo miembro del par de unión es una etiqueta enzimática, entonces el kit comprende además un sustrato que pueda convertir dicha enzima en un producto detectable.

Primer y segundo miembros adecuados de pares de unión incluyen, sin limitación:

- hapteno o antígeno/anticuerpo, por ejemplo, digoxina y anticuerpos anti-digoxina,
- biotina o análogos de biotina (por ejemplo, aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina)/avidina o estreptavidina,
- azúcar/ lectina,
- enzima y cofactor
- ácido fólico/folato
- oligonucleótidos bicatenarios que se unen selectivamente a proteínas/factores de transcripción,
- ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y
- receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea

Se entenderá que el término "primer" y "segundo" miembro de un par de unión es relativo y que cada uno de los miembros anteriores se puede ver como primer o segundo miembro del par de unión. En una forma de realización preferida, el primer miembro de un par de unión es biotina o una variante funcionalmente equivalente de la misma y el segundo miembro del par de unión es avidina, estreptavidina o una variante funcionalmente equivalente de la misma. En una forma de realización preferida, el segundo miembro del par de unión es estreptavidina.

Las etiquetas detectables adecuadas incluyen, sin limitación, grupos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, cumarina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), grupos luminiscentes (por ejemplo, las nanopartículas Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA). Si la etiqueta detectable es una enzima, entonces esta enzima debe ser capaz de generar una señal detectable, por ejemplo, tras la adición de un activador, sustrato, agente

amplificador y similar. Las enzimas que son adecuadas como etiquetas detectables para la presente invención y sus sustratos correspondientes incluyen:

- Fosfatasa alcalina:
  - Sustratos cromogénicos: sustratos basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo /nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT), Fast-Red/fosfato de naftol-AS-TS
  - Sustratos fluorogénicos: fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), difosfato de 3,6-fluoresceína (3,6-FDP), sales diazónicas de Fast Blue BB, Fast Red TR, o Fast Red Violet LB.
- Peroxidasas:
  - Sustratos cromogénicos basados en 2,2-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilenediamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinahidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetrahidrocloruro de 3,3,'-diaminobenzidina (DAB).
  - Sustratos fluorogénicos: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxazinas reducidas y benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex® Red, Amplex UltraRed y dihidroxantenos reducidos.
- Glicosidasas:
  - Sustratos cromogénicos: o-nitrofenil-β-D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil-β-D-galactósido y 4-metilumbelifenil-β-D-galactósido (MUG) para la β-D-galactosidasa.
  - Sustratos fluorogénicos: resorufina β-D-galactopiranósido, digalactósido de fluoresceína (FDG), diglucurónido de fluoresceína, 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranósido, caroboxiumbeliferil-β-D-galactopiranósido y β-D-galactopiranósidos de cumarina fluorados.
- Oxidorreductasas (luciferasa):
  - Sustratos luminiscentes: luciferina.

En una forma de realización particular, la etiqueta detectable es una molécula fluorescente, una molécula luminiscente o una enzima. En una forma de realización

preferida, la etiqueta detectable es peroxidasa de rábano y el reactivo de detección es TMB.

En una forma de realización preferida, el kit comprende además un soporte sólido. Como se usa aquí, el término "soporte" o "superficie" se refiere a una fase sólida que es un material poroso o no poroso insoluble en agua que puede tener cualquiera de un número de formas, tal como una tira, varilla, partículas, incluyendo partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas, bolas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. En principio, cualquier material es adecuado como soporte sólido siempre que sea capaz de unir cantidades suficientes de anticuerpo de captura. Así, la elección del material de la fase sólida se determina en base a las características de realización del formato del ensayo deseado. Los materiales adecuados para el soporte sólido incluyen materiales poliméricos, particularmente materiales de celulosa y materiales derivados de celulosa, tales como papeles que contienen fibra, por ejemplo, papel de filtro, papel cromatográfico, papel de fibra de vidrio, etc.; polímeros sintéticos o naturales modificados, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poliacrilamida, dextrano entrecruzado, agarosa, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), etc.; usados por sí mismos o junto con otros materiales; vidrio tal como, por ejemplo, vidrio disponible como biovidrio, cerámica, metales, y similares. Se prefieren polímeros no entrecruzados de estireno y estireno carboxilado o estireno funcionalizado con otros grupos activos tales como amino, hidroxilo, halo y similares. En algunos casos, se usarán copolímeros de estirenos sustituidos con dienos tales como butadieno.

En una forma de realización particular, el anticuerpo que no está acoplado al primer miembro de un par de unión está preunido al soporte sólido, que puede ser el primer o segundo anticuerpo. El soporte sólido y el primer o segundo anticuerpo se pueden proporcionar por separado en el kit o, alternativamente, el soporte se puede distribuir ya precubierto con el anticuerpo. En este caso, el soporte puede haber sido tratado con una solución de bloqueo después de la unión del anticuerpo. Si el soporte está precubierto, se prefiere que el soporte se trate con una solución concentrada de trehalosa y se deje secar, en cuyo caso la trehalosa seca forma un halo en el soporte.

Estos soportes que contienen la trehalosa seca son excepcionalmente estables y se pueden almacenar hasta dos años si se mantienen a 4ºC en la oscuridad.

Los componentes adicionales del kit pueden incluir:

- Medios para retirar del paciente la muestra a analizar.
- Tampones y soluciones requeridas para preparar las curvas patrón de los péptidos diana.
- Tampones y soluciones para lavar y bloquear el soporte sólido durante el ensayo.
- Tampones y soluciones para recubrir el soporte sólido con el anticuerpo de recubrimiento.
- Reactivos para revelar la señal de color o fluorogénica de la etiqueta detectable.
- Reactivos para detener la formación del producto coloreado o fluorogénico de la etiqueta detectable (por ejemplo, H_2SO_4 1N).
- Medios para mantener los péptidos en un estado desplegado (por ejemplo, clorhidrato de guanidino concentrado).
- Una muestra que contiene una disolución madre del péptido Aβ17 y adicionalmente de los péptidos Aβ40 y/o Aβ42 o una combinación de los mismos.

La inmovilización del anticuerpo en el soporte sólido se puede llevar a cabo antes de la unión del péptido diana que se va a detectar o una vez que el péptido/proteína se une al anticuerpo. En cualquier caso, si se usa un soporte sólido, es conveniente bloquear el exceso de sitios de unión de proteínas en el soporte antes de añadir la muestra que contiene el péptido diana que se va a determinar. Preferiblemente, el bloqueo o extinción de los sitios de unión de péptidos en el soporte se lleva a cabo utilizando el mismo tampón que se usa para lavar los complejos tras cada reacción de unión (por ejemplo, Tris-HCl 50 mM, pH 8, PBS o TBS opcionalmente con Tween 20) suplementado con un compuesto macromolecular (por ejemplo, seroalbúmina bovina, leche desnatada en polvo, reactivo de bloqueo de inmunotransferencia, caseína, lactoalbúmina, ovoalbúmina) a concentraciones desde alrededor del 0,05% al 10%, preferiblemente del 1% al 5%, más preferiblemente alrededor del 3%. Si el soporte que comprende el anticuerpo de captura inmovilizado se debe almacenar durante algún tiempo, se prefiere que el soporte se trate con una solución concentrada de trehalosa y

se deje secar, en cuyo caso la trehalosa seca forma un halo en el soporte. Estos soportes que contienen la trehalosa seca son excepcionalmente estables y se pueden almacenar hasta dos años cuando se mantienen a 4ºC en la oscuridad.

El kit de la invención permite la detección o determinación con alta sensibilidad y especificidad del péptido o péptidos que son específicamente reconocidos por el primer y segundo anticuerpo componentes del kit. De esta manera, en un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un kit de la invención para detectar el péptido Aβ17 en una muestra. En una forma de realización particular, el kit se usa para detectar opcionalmente los péptidos Aβ40 y/o Aβ42 y la combinación de los mismos en una muestra.

En vista de la capacidad del kit de la invención para proporcionar una determinación con alta sensibilidad y especificidad del péptido Aβ17 en cualquier muestra, se puede usar para el diagnóstico de cualquier enfermedad en donde haya una concentración alterada de cualquiera de este péptido en cualquier líquido celular o tejido, en particular, enfermedades degenerativas y, más particularmente, enfermedades neurodegenerativas. Los ejemplos no limitantes de enfermedades degenerativas que se pueden diagnosticar basadas en la aparición de niveles alterados de Aβ17 o de niveles alterados de Aβ40 y/o Aβ42 incluyen:

- trastornos degenerativos del hueso como osteopenia, osteomalacia, osteoporosis, osteomieloma, osteodistrofia, enfermedad de Paget, osteogénesis imperfecta, esclerosis ósea, trastorno aplásico del hueso, mieloma hipercalcémico humoral, mieloma múltiple y adelgazamiento del hueso después de metástasis.
- trastornos degenerativos del cartílago como en síndrome de Gorham-Stout, enfermedades artríticas; artrosis; artritis reumatoide; artritis psoriásica; enfermedad reumatoide; y osteogénesis imperfecta.
- enfermedades degenerativas del músculo tales como distrofia muscular, atrofia muscular, enfermedad pulmonar obstructiva congestiva, atrofia muscular progresiva, sarcopenia, caquexia.
- enfermedades degenerativas del corazón incluyendo la muerte celular cardiaca debido a isquemia, muerte de tejido y órgano debido al rechazo de trasplante, pérdida de oído debido a autotoxicidad.
- trastornos degenerativos de la retina como la retinitis pigmentosa.

- enfermedades degenerativas del sistema nervioso como la enfermedad de Alexander, la enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia telangiectasia, encefalopatía espongiforme bovina (EEB), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia con cuerpo de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar tipo 3), esclerosis múltiple, atrofia sistémica múltiple, neuroborreliosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades por priones, enfermedad Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, esquizofrenia, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten (también conocida como enfermedad de Batten), ataxia espinocerebelar, atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, Tabes dorsal. En una forma de realización preferida, el trastorno neurodegenerativo que se diagnostica utilizando el kit de la invención es la enfermedad de Alzheimer.

MÉTODO PARA DETERMINAR O DETECTAR EL PÉPTIDO Aβ17

El kit de la invención permite llevar a cabo un método para determinar o detectar el péptido Aβ17 en una muestra. De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar o detectar el péptido Aβ(1-17) en una muestra, de aquí en adelante método para la detección de la invención, que comprende los pasos de:

(i) capturar el péptido Aβ(1-17) presente en la muestra con un primer anticuerpo que se une específicamente a dicho péptido,

(ii) poner en contacto los complejos inmunes formados en el paso (i) con un segundo anticuerpo, en donde dicho segundo anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y en donde dicho segundo anticuerpo reconoce una región diferente que el primer anticuerpo y está acoplado a un primer miembro de un par de unión;

(iii) poner en contacto los complejos formados en el paso (ii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a una etiqueta detectable, y

(iv) detectar o determinar la actividad o cantidad de la etiqueta detectable.

Una "muestra", como se entiende en la presente invención, incluye cualquiera de cultivo de tejido, plasma, suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), lágrimas, moco, sudor, leche, cerebro o extractos de tejidos periféricos y similares. En una forma de realización preferida, la muestra se selecciona del grupo de sangre, suero, plasma y LCR. En una forma de realización más preferida, la muestra es una muestra de plasma.

En una forma de realización preferida, los péptidos que se detectan corresponden a formas no oligoméricas de dicho péptido, más preferiblemente, formas monoméricas de Aβ17.

Los reactivos y los anticuerpos usados en cada paso del método se han descrito en detalle anteriormente para el kit de la invención.

En el primer paso del método según la presente invención, la muestra que contiene el péptido Aβ17 se pone en contacto con un primer anticuerpo para formar primer complejo inmune. En una forma de realización preferida, el primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una forma de realización más preferida el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo 6E10.

Después de haber llevado a cabo el primer paso de unión, los complejos se pueden lavar para retirar cualquier exceso de proteína/péptido que se encuentra en la muestra original que no se haya unido al anticuerpo de captura. Los tampones preferidos de lavado que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen cualquier tampón con un pH próximo al fisiológico (por ejemplo, Tris-HCl 50 mM) que opcionalmente comprende sales (por ejemplo, NaCl 150 mM) y que opcionalmente comprende concentraciones bajas de un detergente (por ejemplo, Tween-20 al 0,05%).

En un segundo paso, los complejos formados entre el anticuerpo de captura y el péptido Aβ en la muestra se ponen en contacto con el segundo anticuerpo de modo que se forme un complejo inmune de "tipo sándwich". El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unirán a diferentes regiones del péptido Aβ17, de modo que no haya interferencia entre ellos.

El primer y segundo paso del método presente se pueden intercambiar y la captura del péptido Aβ17 se puede realizar por el segundo anticuerpo (el anticuerpo de la invención). El complejo se pone luego en contacto con el primer anticuerpo, que se

unirá en una región diferente como el segundo anticuerpo. Uno de los dos anticuerpos estará acoplado a un primer miembro de un par de unión, que corresponderá al anticuerpo que no se usa en el paso de captura.

Después de llevar a cabo el segundo paso, los complejos inmunes se pueden lavar para eliminar los anticuerpos unidos inespecíficamente utilizando esencialmente los mismos tampones y procedimientos que se han descrito anteriormente.

En un tercer paso, el método de la invención implica poner en contacto los complejos formados entre el anticuerpo de captura-antígeno y el anticuerpo de detección acoplado con un primer miembro de un par de unión con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a una etiqueta detectable. En una forma de realización preferida, el primer miembro de un par de unión es biotina y el segundo miembro de un par de unión es avidina, estreptavidina o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En el cuarto paso del método según la invención, el método implica detectar la etiqueta detectable. Se entenderá que la detección y/o la cuantificación de la etiqueta detectable depende de la naturaleza de la etiqueta y son métodos conocidos en la técnica. Cuando un sustrato intacto o etiqueta detectable contiene un componente luminiscente o colorante, la detección puede ser mediante observación visual en un transiluminador de UV, o utilizando sistema de detección de cámara con un dispositivo de cargas interconectadas (CCD) de UV, un escáner de geles láser, un sistema de detección de cámara con CCD con arco de xenón, una cámara Polaroid combinada con un transiluminador de UV así como una variedad de otros dispositivos utilizados para la detección de luminiscencia. Cuando la etiqueta detectable es una enzima, el cuarto paso del método según la invención implica exponer los inmunocomplejos marcados con la etiqueta (por ejemplo, el péptido capturado, el anticuerpo de detección y el reactivo marcado con la etiqueta detectable) a activadores, sustratos o agentes amplificadores de la enzima utilizada como etiqueta detectable. Las etiquetas detectables bien conocidas capaces de generar una señal detectable incluyen anticuerpos marcados con enzimas. Ejemplos de enzimas bien conocidas para este propósito incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y glicosidasas, incluyendo β-galactosidasa, β-glucosidasa y β-glucuronidasa. Como ejemplo, un reactivo que se une específicamente al anticuerpo de detección puede estar etiquetado con peroxidasa de rábano. Tras la formación de un

complejo grupo de captura-anticuerpo de detección-reactivo, la detección se puede realizar utilizando cualquiera de una amplia gama de sustratos conocidos para la enzima utilizada como etiqueta detectable. En una forma de realización preferida, la etiqueta detectable es una molécula fluorescente, una molécula luminiscente o una enzima.

En una forma de realización particular, el método de detección de la invención comprende además la detección de péptidos Aβ40 y/o Aβ42.

MÉTODO PARA SEGUIR LA EVOLUCIÓN DE UNA ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVA

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el seguimiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, de aquí en adelante método de seguimiento de la invención, que comprende determinar en un muestra en un primer punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de dicho sujeto y comparar los niveles con dichos niveles en un segundo punto temporal; en donde si el cociente de péptido Aβ17 libre en plasma y péptido Aβ17 unido a células aumenta en el segundo punto temporal con respecto al primer punto temporal, es indicativo de un empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

El término "enfermedad neurodegenerativa", como se usa en el presente documento, se refiere a una afección o trastorno en el que se pierden células neuronales debido a muerte celular, lo que provoca un deterioro de las funciones cognitivas o produce daño, disfunción o complicaciones que pueden caracterizarse por anomalías neurológicas, neurodegenerativas, fisiológicas, psicológicas o de comportamiento. Las enfermedades neurodegenerativas adecuadas que pueden diagnosticarse con los métodos de la invención incluyen, sin limitación, degeneración macular senil, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Alzheimer, angiopatía cerebral con amiloidosis, demencia vascular, demencia inducida por radioterapia, lesión de axones, depresión cortical propagada aguda, alfa-sinucleinopatías, isquemia cerebral, enfermedad de Huntington, isquemia cerebral focal permanente, regeneración de nervios periféricos, modelo tras estado de epilepsia, lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica esporádica y encefalopatía espongiforme transmisible.

En una forma de realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa que se sigue según el método de la invención es la enfermedad de Alzheimer o formas prodrómicas de la misma incluyendo deterioro cognitivo leve, deterioro cognitivo leve con enfermedad de Alzheimer probable o deterioro cognitivo leve con enfermedad de Alzheimer posible.

El método de seguimiento de la invención es útil para la evaluación de la evolución de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto. De esta manera, los autores de la invención han mostrado que un aumento en el cociente del nivel de péptido Aβ17 libre en plasma/nivel de péptido Aβ17 unido a células es indicativo de un empeoramiento de la EA.

En una forma de realización particular, el método para el seguimiento de la invención comprende los siguientes pasos:

(a) determinar la concentración del péptido Aβ17 libre en plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de un sujeto, en un primer punto temporal (Aβ17 LP/Aβ17 UC),

(b) determinar la concentración del péptido Aβ17 libre en plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra del mismo sujeto, en un segundo punto temporal;

Los puntos temporales elegidos los debe determinar el experto en la materia, según el sujeto.

(c) comparar el cociente del nivel de péptido Aβ17 libre en plasma/nivel de péptido Aβ17 unido a células entre el primer punto temporal y el segundo punto temporal y

(d) si el cociente de dichos parámetros es mayor en el segundo punto temporal con respecto al primer punto temporal, es indicativo de un empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto.

El término "empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer", como se usa aquí, significa que la enfermedad evoluciona a una fase posterior con respecto a la fase en primer punto temporal medido. El experto en la materia reconocerá y confirmará si la evolución de la enfermedad es peor analizando también otras características indicativas. Las características o indicaciones que aparecen en una fase posterior, y que son indicativas de una progresión de la enfermedad son, sin limitación, la aparición de

placas amiloides y ovillos neurofibrilares y un deterioro más rápido en las funciones cognitivas. En una forma de realización preferida, si el cociente del nivel de péptido Aβ17 libre en plasma/nivel de péptido Aβ17 unido a células aumenta en el segundo punto temporal con respecto al primer punto temporal, es indicativo de índices mayores de deterioro cognitivo del sujeto. El mayor nivel de péptido Aβ17 libre en plasma es por tanto indicativo de una mayor deterioro cognitivo.

Puede usarse cualquier método adecuado para la determinación de péptidos en la presente invención. A modo de ejemplo, la concentración de péptido beta amiloide puede determinarse usando una o más técnicas elegidas de inmunotransferencia, inmunoprecipitación, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), resonancia de plasmón de superficie, reacción con precipitina, ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, radioinmunoanálisis (RIA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, electroforesis capilar, espectroscopía de masas (EM), desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo-EM (MALDI-TOF), desorción/ionización potenciada por láser de superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos de proteínas rápida (FPLC), cromatografía de líquidos multidimensional (LC) seguida por espectrometría de masas en tándem (EM/EM), cromatografía en capa fina, análisis de expresión con chips de proteínas y densitometría láser. En una forma de realización particular, la determinación del nivel de dichos parámetros se determina por ELISA. En una forma de realización preferida, uno de los anticuerpos usados en el ELISA es el anticuerpo de la invención, dirigido contra la región C-terminal del péptido Aβ17.

El término "péptido Aβ17 libre en plasma" (de aquí en adelante conocido como Aβ17 LP), como se usa en el presente documento, se refiere al nivel de péptidos beta amiloides que no están asociados a ningún componente de la muestra biológica y que están fácilmente disponibles para su unión a un anticuerpo específico. Este péptido puede determinarse mediante técnicas inmunológicas convencionales poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo específico para dicho péptido. En una forma de realización preferida, el nivel de péptido amiloide libre se determina en plasma.

El término "nivel de péptido Aβ17 unido a células" (de aquí en adelante conocido como Aβ17 UC), como se usa en el presente documento, se refiere a péptidos beta amiloides que están asociados de manera no covalente a la superficie de las células presentes en la muestra biológica y que no está disponible para su unión a anticuerpos añadidos a la muestra y por tanto, inmunológicamente detectable. Normalmente, si la muestra biológica es sangre, el péptido beta amiloide está asociado a glóbulos rojos, glóbulos blancos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos, y plaquetas. La cantidad de péptido beta amiloide asociado a células en una muestra determinada puede determinarse y este valor puede usarse solo o en combinación con otros parámetros relacionados con péptidos beta amiloides en los métodos de la invención. Para este fin, se requiere en primer lugar aislar la fracción celular de la muestra biológica. Esto puede llevarse a cabo usando cualquier técnica que conoce el experto tal como centrifugación, sedimentación, filtración y similares. Una vez que se ha aislado la fracción de células de una muestra biológica, las células se ponen en contacto con un agente de solubilización de proteínas.

La cantidad de péptido beta amiloide asociado a células en una muestra determinada puede determinarse y este valor puede usarse solo o en combinación con otros parámetros relacionados con péptidos beta amiloides en los métodos de la invención. Para este fin, se requiere en primer lugar aislar la fracción celular de la muestra biológica. Esto puede llevarse a cabo usando cualquier técnica que conoce el experto tal como centrifugación, sedimentación, filtración y similares. Una vez que se ha aislado la fracción de células de una muestra biológica, las células se ponen en contacto con un agente de solubilización de proteínas.

En una forma de realización preferida, la muestra del sujeto se selecciona del grupo de sangre, suero, plasma y LCR. En una forma de realización más preferida, la muestra es una muestra de plasma.

MÉTODOS PARA DETERMINAR SI UN SUJETO PADECE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER O FASES TEMPRANAS DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Los autores de la presente invención han identificado que los niveles de ciertas poblaciones de péptidos beta amiloides, determinados directamente o aplicando ciertos cálculos entre ellos, se pueden usar para determinar si un paciente padece enfermedad

de Alzheimer leve, para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer prodrómica, para distinguir un sujeto que padece deterioro cognitivo leve no prodrómico de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer prodrómica, para distinguir un sujeto que padece deterioro cognitivo leve no prodrómico de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve o para distinguir un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve.

De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en:

(a) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor añadido de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma de dicho sujeto y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor añadido del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma del sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre del sujeto,

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre del sujeto; y

(e) el valor cociente entre el nivel de Aβ17 libre en una muestra de plasma de dicho sujeto y el péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto sano, entonces el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

Por tanto, los parámetros que se van medir para la distinción de un sujeto sano de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve son los siguientes:

(a) Aβ17 UC + Aβ40 UC + Aβ42 UC

(b) (Aβ17 UC + Aβ40 UC + Aβ42 UC) + (Aβ17 TP + Aβ40 TP + Aβ42 TP)

(c) Aβ42 TP + Aβ42 UC

(d) (Aβ40 TP + Aβ42 TP) + (Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(e) Aβ17 LP/Aβ17 UC

Un método para determinar si un sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más de los parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(b) los valores añadidos del nivel de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma del sujeto y el nivel péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(d) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los niveles añadidos de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde al valor añadido de los niveles de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre y de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde al valor añadido de los péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de los parámetros (a), (b) o (c) aumenta y/o el valor de uno o más de los parámetros (d), (e), (f) o (g) disminuye con respecto al valor en una muestra de referencia de un sujeto sano, el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

Por tanto, los parámetros que se van a medir para la distinción de un sujeto sano de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica son los siguientes:

(a) Aβ42 TP + Aβ42 UC

(b) (Aβ40 TP + Aβ42 TP) + (Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(c) Aβ17 LP/Aβ17 UC

(d) Aβ17 UC/Aβ42 UC

(e) (Aβ17 TP + Aβ17 UC)/(Aβ42 TP + Aβ42 UC)

(f) Aβ17 UC/(Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(g) (Aβ17 TP + Aβ17 UC)/(Aβ40 TP + Aβ42 TP)+ (Aβ40 UC + Aβ42 UC)

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para distinguir un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre

y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de (a) aumenta y/o el valor de uno o más de dichos parámetros (b), (c), (d) y (e) disminuye con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

Por tanto, los parámetros que se van medir que permiten la distinción entre un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica y un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica son los siguientes:

(a) Aβ17 UC + Aβ40 UC + Aβ42 UC

(b) Aβ17 UC/Aβ42 UC

(c) (Aβ17 TP + Aβ17 UC)/(Aβ42 TP + Aβ42 UC)

(d) Aβ17 UC/(Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(e) (Aβ17 TP + Aβ17 UC)/(Aβ40 TP + Aβ42 TP)+(Aβ40 UC + Aβ42 UC)

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para distinguir un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(c) los valores añadidos de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ40 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que tiene DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece de enfermedad de Alzheimer leve.

Por tanto, los parámetros que se van a medir para la distinción de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve son los siguientes:

(a) Aβ17 UC + Aβ40 UC + Aβ42 UC

(b) (Aβ17 TP + Aβ40 TP + Aβ42 TP)+ (Aβ17 UC + Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(c) Aβ42 TP + Aβ42 UC

(d) (Aβ40 TP + Aβ42 TP)+(Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(e) Aβ40 TP + Aβ40 UC

(f) Aβ17 UC/(Aβ40 UC + Aβ42 UC)

(g) Aβ17 LP/Aβ17 UC

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para distinguir un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel péptido Aβ40 libre en una muestra de plasma; y

(b) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el

segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 libres en una muestra de plasma;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto con DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica, el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

Por tanto, los parámetros que se van a medir para la distinción entre un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica y un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve son los siguientes:

(a) Aβ17 LP/Aβ40 LP

(b) Aβ17 LP/Aβ40 LP + Aβ42 LP

El término "diagnóstico" como se usa en el presente documento incluye la evaluación de la susceptibilidad de un sujeto a una enfermedad, la determinación de si un sujeto tiene actualmente la enfermedad y también el pronóstico de un sujeto afectado por la enfermedad. Tal como entenderán los expertos en la materia, tal evaluación normalmente puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que van a diagnosticarse, aunque preferiblemente es correcta. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos pueda identificarse como que padece la enfermedad o que tiene una predisposición a la misma. Si una parte es estadísticamente significativa puede determinarlo de manera sencilla el experto en la materia usando varias herramientas de evaluación estadísticas bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación de valores de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se proporcionan detalles en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%. Los valores de p son preferiblemente 0,2, 0,1 o 0,05.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye pero no se limita a animales de granja y domésticos, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

La expresión "enfermedad de Alzheimer" (o "demencia senil") se refiere a un deterioro mental asociado con enfermedad cerebral degenerativa específica que se caracteriza por placas seniles, ovillos neuríticos y pérdida neuronal progresiva que se manifiesta clínicamente en deficiencias progresivas de memoria, confusión, problemas de comportamiento, incapacidad para cuidar de sí mismo, deterioro físico gradual y, en última instancia, muerte.

La expresión "enfermedad de Alzheimer leve", en el contexto de la presente invención, se refiere a una fase temprana de la enfermedad de Alzheimer, en donde el sujeto experimenta:

- Pérdida de memoria para hechos recientes.
- Dificultad resolviendo problemas, tareas complejas y juicios de sonido.
- Cambios en personalidad.
- Dificultad en organizar y expresar pensamientos.
- Perderse o extraviar pertenencias

Los pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer leve se identifican usando los criterios de NINCDS-ADRDA (CDR = 1, MMSE entre 16 y 24 puntos y atrofia temporal medial (determinada mediante IRM) >3 puntos en la escala de Scheltens.

El término "deterioro cognitivo leve" o DCL se refiere a una fase de transición de deterioro cognitivo entre el envejecimiento normal y enfermedad de Alzheimer temprana. Los pacientes normalmente se identifican como que tienen DCL si cumplen los criterios de la Clínica Mayo (CDR = 0,5, muestran una atrofia temporal medial (determinada mediante IRM) que es superior a 3 puntos en la escala de Scheltens, muestran un patrón de hipometabolismo parietal y/o temporal en tomografía por emisión de positrones con 18-fluorodesoxiglucosa (PET-FDG) (indicativo de la EA).

La expresión "enfermedad de Alzheimer prodrómica", también conocida como "DCL con enfermedad de Alzheimer probable" se refiere a pacientes que muestran DCL y que se considera que muestran alto riesgo de conversión a enfermedad de Alzheimer. Los criterios para identificar un paciente como EA probable son los definidos por los criterios del NINCDS-ADRDA (McKhann G. et al., 1984, *Neurology,* 34:939–44), es decir, demencia establecida por examen clínico y neuropsicológico, deterioro cognitivo progresivo presente en dos o más áreas de conocimiento, inicio de las deficiencias entre

las edades de 40 y 90 años y ausencia de otras enfermedades capaces de producir un síndrome de demencia.

La expresión "enfermedad de Alzheimer no prodrómica", también conocida como "DCL con enfermedad de Alzheimer posible" se refiere a pacientes que muestran DCL y que se considera que muestran bajo riesgo de conversión a enfermedad de Alzheimer. Los criterios para identificar un paciente como EA posible son los definidos por los criterios del NINCDS-ADRDA (McKhann G. et al., 1984, *Neurology,* 34:939-44), es decir, síndrome de demencia con un inicio, presentación o evolución atípicos y sin etiología conocida pero se cree que en su origen no estén enfermedades comórbidas capaces de producir demencia.

El término "sujeto sano", como se usa en la presente invención, se refiere a un sujeto con buena salud. En una forma de realización preferida, dicho sujeto es mayor de 65 años de edad. Corresponde a un sujeto que no padece una enfermedad neurodegenerativa o sin antecedentes de enfermedad neurodegenerativa. Preferiblemente, los sujetos sanos son pacientes que muestran una ausencia de síntomas de memoria, realización normal en pruebas neuropsicológicas y ausencia de alteraciones estructurales en IRM. Un sujeto sano puede estar sano y no tener otra enfermedad o puede tener enfermedades diferentes de DCL y EA.

El término "distinguir un sujeto sano de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer prodrómica" se refiere a la capacidad de discriminar entre un sujeto que no tiene síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA) y un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer prodrómica.

El término "distinguir un sujeto sano de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve" se refiere a la capacidad de discriminar entre un sujeto que no tiene síntomas de la enfermedad de Alzheimer (EA) y un sujeto en las fases iniciales de EA (enfermedad de Alzheimer leve).

El término "distinguir un sujeto que padece DCL no prodrómico de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer prodrómica" se refiere a la capacidad de discriminar entre un sujeto que tiene síntomas de DCL no prodrómico y un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer prodrómica.

El término "distinguir un sujeto que padece DCL no prodrómico de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve" se refiere a la capacidad de discriminar

entre un sujeto que tiene síntomas de DCL no prodrómico y un sujeto en las fases tempranas de la EA (enfermedad de Alzheimer leve).

El término "distinguir un sujeto que padece EA prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve" se refiere a la capacidad de discriminar entre un sujeto que tiene síntomas de EA prodrómica y un sujeto en las fases tempranas de la EA (enfermedad de Alzheimer leve).

El término "plasma" se refiere al componente líquido de la sangre. Dependiendo del método de separación usado, el plasma puede estar completamente libre de componentes celulares o puede contener varias cantidades de plaquetas y/o pequeñas cantidades de otros componentes celulares.

Los términos "niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 o Aβ42 unidos a células" (de aquí en adelante conocido como Aβ17 UC, Aβ40 UC o Aβ42 UC, respectivamente), como se usa en el presente documento, se refiere a péptidos beta amiloides que están asociados de manera no covalente a la superficie de las células presentes en la muestra biológica y que no está disponible para su unión a anticuerpos añadidos a la muestra y por tanto, inmunológicamente detectable. Normalmente, si la muestra biológica es sangre, el péptido beta amiloide está asociado a glóbulos rojos, glóbulos blancos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos, y plaquetas. La cantidad de péptido beta amiloide asociado a células en una muestra determinada puede determinarse y este valor puede usarse solo o en combinación con otros parámetros relacionados con péptidos beta amiloides en los métodos de la invención. Para este fin, se requiere en primer lugar aislar la fracción celular de la muestra biológica. Esto puede llevarse a cabo usando cualquier técnica que conoce el experto tal como centrifugación, sedimentación, filtración y similares. Una vez que se ha aislado la fracción de células de una muestra biológica, las células se ponen en contacto con un agente de solubilización de proteínas.

La cantidad de péptido beta amiloide asociado a células en una muestra determinada puede determinarse y este valor puede usarse solo o en combinación con otros parámetros relacionados con péptidos beta amiloides en los métodos de la invención. Para este fin, se requiere en primer lugar aislar la fracción celular de la muestra biológica. Esto puede llevarse a cabo usando cualquier técnica que conoce el experto tal como centrifugación, sedimentación, filtración y similares. Una vez que se

ha aislado la fracción de células de una muestra biológica, las células se ponen en contacto con un agente de solubilización de proteínas.

Los agentes de solubilización de proteínas adecuados incluyen detergentes, agentes caotrópicos y agentes reductores como se definen posteriormente y se proporcionan habitualmente en una solución tampón a una concentración adecuada. Se describen posteriormente agentes, disoluciones tampón y concentraciones de agentes adecuados en la disolución tampón. El paso de poner en contacto se lleva a cabo esencialmente como se explica posteriormente en el método para liberar el péptido amiloide que está unido a componentes (proteínas y lípidos) de la muestra biológica. En una forma de realización preferida, el agente de solubilización de proteínas es un detergente. En una forma de realización todavía más preferida, el detergente es Tween 20. Concentraciones adecuadas de Tween 20 para su uso como agente de solubilización de proteínas son como se definieron anteriormente, es decir, entre el 0,004-0,02%, más preferiblemente del 0,005-0,01% (p/v).

El paso de poner en contacto se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura baja con el fin de inhibir actividades proteolíticas presentes en la muestra. Temperaturas adecuadas son de aproximadamente 0-10ºC, preferiblemente de aproximadamente 3-5ºC, por ejemplo, aproximadamente 4ºC.

Normalmente, el paso de poner en contacto se lleva a cabo resuspendiendo la fracción celular en la muestra biológica con la solución que comprende el agente de solubilización de proteínas. Dicha resuspensión puede llevarse a cabo pipeteando arriba y abajo de manera suave, removiendo, preferiblemente mediante agitación, más preferiblemente mediante agitación a alta velocidad, lo más preferiblemente mediante agitación con vórtex durante al menos 5 segundos, preferiblemente durante al menos 10 segundos, más preferiblemente durante al menos 15 segundos (por ejemplo, durante 15-50 segundos). Velocidades ventajosas para dichos mezclado, removido, agitación, agitación a alta velocidad o agitación con vórtex comprenden una velocidad de al menos 250 rpm, preferiblemente de al menos 500 rpm, más preferiblemente de al menos 1.000 rpm, lo más preferiblemente de aproximadamente 2.000-2.500 rpm.

El paso de poner en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para lograr la disociación parcial o, preferiblemente, completa del péptido beta amiloide de las células presentes en la muestra biológica. Un experto en la materia puede determinar

adecuadamente las condiciones controlando la cantidad de péptido beta amiloide que es detectable antes del paso de poner en contacto y progresivamente a diferentes tiempos tras haber tenido lugar el paso de poner en contacto.

El término "péptido Aβ total en plasma" (de aquí en adelante conocido como Aβ17 TP, Aβ40 TP o Aβ42 TP), como se usa aquí, se refiere a "péptido Aβ libre en plasma" más el "péptido beta amiloide asociado a componentes macromoleculares". El término "péptido beta amiloide asociado a componentes macromoleculares", como se usa aquí, se refiere al péptido beta amiloide que está unido o enlazado de manera no covalente a moléculas que se encuentran en la muestra biológica en estudio. Habitualmente, este péptido no es fácilmente accesible para la detección inmunológica y, por tanto, requiere un pretratamiento de la muestra biológica con el fin de lograr la separación del péptido de los componentes. En estas condiciones, el péptido beta amiloide unido a componentes macromoleculares se liberará de dichos componentes y estará disponible para su detección inmunológica usando anticuerpos específicos. Puesto que la muestra biológica contiene ya una cierta cantidad de péptido beta amiloide libre, la cantidad total de péptido amiloide libre tras poner en contacto la muestra con el agente de solubilización de proteínas será el nivel agregado del péptido beta amiloide libre originalmente presente y el nivel de péptido beta amiloide que se ha liberado tras el tratamiento con el agente de solubilización de proteínas. En el caso de que sea necesario determinar el nivel de péptido beta amiloide asociado a componentes macromoleculares presentes en la muestra biológica, esto puede realizarse normalmente determinando el nivel de péptido beta amiloide libre antes del tratamiento con el agente de solubilización de proteínas y el nivel de péptido beta amiloide libre tras el tratamiento con el agente de solubilización de proteínas y restando el primer valor del segundo valor. Para los fines de la presente invención, habitualmente es adecuado determinar el nivel agregado de péptidos beta amiloides libres que incluye los péptidos beta amiloides originalmente libres así como el nivel de péptidos beta amiloides que se han liberado de los componentes macromoleculares tras el tratamiento con el agente de solubilización de proteínas. Por tanto, el parámetro que se determina habitualmente cuando se trata la muestra de modo que se disocie el péptido amiloide de componentes macromoleculares corresponde a la adición del péptido libre presente en la muestra y el péptido asociado a componentes macromoleculares.

Los componentes macromoleculares de la muestra que pueden unirse a péptidos beta amiloides y que contribuyen al conjunto de péptido beta amiloide asociado a componentes macromoleculares incluyen tanto proteínas como lípidos. En el caso particular de que el método se lleve a cabo en muestras de sangre o plasma, los componentes macromoleculares incluyen, sin limitación, proteínas y lípidos sanguíneos. Las proteínas sanguíneas a modo de ejemplo incluyen albúmina, inmunoglobulina G, inmunoglobulina E, inmunoglobulina M, inmunoglobulina A, fibrinógeno (fibrina y productos de degradación de la misma), alfa-1-antitripsina, prealbúmina, glicoproteína alfa-1 ácida, alfa-1-fetoproteína, alfa-2-haptoglobina, macroglobulina, ceruloplasmina, transferrina, beta-2-microglobulina C3/C4, beta-lipoproteína, alfa, beta y gamma-globulinas, proteína C reactiva (CRP), protrombina, proteína de unión a tiroxina, transtiretina y similares. Los lípidos sanguíneos a modo de ejemplo incluyen ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos y similares.

La cantidad de péptido beta amiloide asociado a componentes macromoleculares puede determinarse poniendo en contacto una muestra sin células de la muestra biológica con un agente de solubilización de proteínas en condiciones adecuadas para inducir la liberación de dichos péptidos beta amiloides de los componentes macromoleculares.

Mediante poner en contacto, se quiere decir en el presente documento añadir a la muestra una cantidad suficiente de una solución que comprende el agente de solubilización de proteínas de modo que la concentración del agente de solubilización de proteínas en la mezcla sea suficiente para solubilizar de manera eficaz el péptido beta amiloide que está unido a las proteínas y células de la muestra. Preferiblemente, el agente de solubilización de proteínas se encuentra en disolución en una solución tampón de modo que la adición del agente de solubilización de proteínas no produce una modificación sustancial del pH de la muestra.

El término “agente de solubilización de proteínas”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto de composición capaz de alterar la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria de los polipéptidos mientras deja la estructura primaria intacta. En virtud de estas propiedades, los agentes de solubilización de proteínas pueden aumentar la solubilidad de las proteínas en una muestra así como impedir la agregación inter e intramolecular de las proteínas. Los agentes de

solubilización de proteínas adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, detergentes, agentes caotrópicos, agentes reductores y mezclas de los mismos.

El término "detergente", como se usa en el presente documento, es un sinónimo usado para tensioactivos en general, y se refiere a agentes tensioactivos anfipáticos que, cuando se añaden a un líquido, reducen la tensión superficial del líquido en comparación con el mismo líquido en ausencia del detergente. Los detergentes también pueden impedir la agregación de proteínas e impedir la unión o interacción no específica de contaminantes a una proteína de interés. Los detergentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, detergentes no iónicos (neutros), aniónicos, catiónicos o dipolares.

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

Los ejemplos de detergentes aniónicos incluyen, sin limitación, ácido cólico y derivados del mismo, ácido taurocólico, Triton X-200, Triton W-30, Triton-30, Triton-770, sulfosuccinato de dioctilo, N-óxido de N_5N-dimetildodecilamina, 1-alquilsulfonatos de sodio, N-lauroilsarcosina o sales de ácidos grasos.

Los ejemplos de detergentes catiónicos incluyen, sin limitación, mono y dimetilaminas grasas, sales de alquiltrimetilamonio, sales de dialquildimetilamonio, acetatos de alquilamina, acetatos de trialquilamonio, sales de alquildimetilbencilamonio, sales de dialquilmetilbencilamonio, haluro de alquilpiridinio y sales de alquil(alquil sustituido)piridinio, sales de alquiltiometilpiridinio, sales de alquilamidometilpiridinio, sales de alquilquinolinio, sales de alquilisoquinolinio, sales de N,N-

alquilmetilpirrolidinio, sales de 1,1-dialquilpiperidinio, sales de 4,4-dialquiltiamorfolinio, sales de 1-óxido de 4,4-dialquiltiamorfolinio, metilsulfato de metil-bis(alquiletil)-2-alquilimidazolinio (y otras sales), metilsulfato de metil-bis(alquilamidoetil)-2-hidroxietilamonio (y otras sales), sales de alquilamidopropil-dimetilbencilamonio, sales de carboxialquil-alquildimetilamonio, óxidos de alquilamina, óxidos de alquildimetilamina, sales de poli(vinilmetilpiridinio), sales de poli(vinilpiridina), polietileniminas, bicarbonatos de trialquilfosfonio (y otras sales), sales de trialquilmetilfosfonio, sales de alquiletilmetilsulfonio y sales de alquildimetilsulfoxonio.

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

En una forma de realización preferida, el reactivo de solubilización de proteínas es un detergente. En una forma de realización todavía más preferida, el detergente es Tween 20. En una forma de realización todavía más preferida, se usa Tween 20 a una concentración del 0,5%.

Un "agente caotrópico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o mezcla de compuestos que rompe puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas tanto entre como dentro de las proteínas. Cuando se usan a altas concentraciones, los agentes caotrópicos rompen la estructura secundaria de la proteína y llevan a disolución proteínas que de otra forma no son solubles. Los agentes caotrópicos adecuados incluyen, sin limitación, urea, isotiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio (NaSCN), guanidina HCl, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, tetracloroacetato de litio, perclorato de sodio, tetracloroacetato de rubidio, yoduro de potasio o trifluoroacetato de cesio.

El término "agente reductor", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto o material que mantenga los grupos sulfhidrilo en estado reducido y reduzca los puentes disulfuro intra o intermoleculares. A modo de ejemplo, los agentes reductores adecuados para el método de la presente invención incluyen agentes reductores tanto de sulfhidrilo como de fosfina. Los ejemplos de agentes reductores de sulfhidrilo incluyen ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE) y β-mercaptoetanol. Los ejemplos de agentes reductores de fosfina incluyen tributilfosfina (TBP) y tris-carboxietilfosfina (TCEP).

Normalmente, la muestra biológica se trata en primer lugar para eliminar la fracción celular. Después, se pone en contacto la muestra sin células con el agente de solubilización de proteínas. En una forma de realización preferida, la muestra se diluye usando un tampón que comprende el agente de solubilización de proteínas. Normalmente, la muestra se diluye 5 veces en una disolución tampón que comprende Tween 20.

Como se usa en el presente documento, una "disolución tampón" es cualquier sustancia o mezcla de compuestos en disolución que puede neutralizar tanto ácidos como bases sin cambiar apreciablemente la acidez o alcalinidad originales de la disolución. Las disoluciones tampón adecuadas que van a usarse en el método de la invención incluyen, sin limitación, disolución tampón Tris, disolución tampón fosfato, disolución tampón borato, disolución tampón carbonato, disolución tampón glicina-hidróxido de sodio o similares. Preferiblemente, la disolución tampón es una disolución tampón fosfato tal como solución salina tamponada con fosfato o PBS.

La cantidad de solución que comprende el agente de solubilización de proteínas que se añade a la muestra biológica no es esencial siempre que se logre suficiente disociación del péptido beta amiloide. A modo de ejemplo, el líquido biológico puede diluirse en la disolución que comprende el agente de solubilización de proteínas a una dilución de al menos 1/2 (v/v), 1/3 (v/v), 1/4 (v/v), 1/5 (v/v), 1/6 (v/v), 1/7 (v/v), 1/8 (v/v), 1/9 (v/v), 1/10 (v/v), 1/20 (v/v), 1/50 (v/v), 1/60 (v/v), 1/80 (v/v), 1/90 (v/v), 1/100 (v/v) o más. El experto apreciará que puede usarse cualquier combinación de dichas tasas de dilución y de dicha concentración de agente de solubilización de proteínas siempre que la concentración final del agente de solubilización de proteínas sea adecuada para lograr el efecto deseado. Por ejemplo, la disolución que contiene el

agente de solubilización de proteínas puede comprender dicho(s) agente(s) de solubilización de proteínas seleccionado(s) a una concentración que varía desde el 0,001% hasta el 0,5% (p/v). Tras haberse diluido en dicha disolución que contiene el agente de solubilización de proteínas, dicho líquido biológico contiene normalmente dicho(s) tensioactivo(s) a menos del 0,1% (p/v), preferiblemente menos del 0,6% (p/v), más preferiblemente no más del 0,5% (p/v), lo más preferiblemente no más del 0,45% (p/v) e incluso lo más preferiblemente el 0,5%.

Los sistemas tampón adecuados para su uso en la presente invención incluyen tampones Tris-HCl que incluyen una sal tal como NaCl o KCl y, opcionalmente, BSA. Los sistemas tampón particulares incluyen, sin limitación,

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05%, GuHCl 1 M;

Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05%, GuHCl 1 M;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-80 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-80 al 0,05%;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M; BSA al 0,05%, Triton X-100 al 0,05%;

Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Triton X-100 al 0,05%;

Tris-HCl 50 mM pH 8; BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,1%;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,1%, Tween-20 al 0,1%;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 1 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05%;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 1,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 2 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 2,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 3 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05%, DMSO al 10%;

Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05%, GuHCl 0,5 M;

Tris-HCl 50 mM pH 6, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;

Tris-HCl 50 mM pH 9, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%, Tween-20 al 0,05% ;
Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M, BSA al 0,05%.

Por ejemplo cuando se usa Tween 20 como agente de solubilización de proteínas, la concentración preferida es del 0,004-0,02%, más preferiblemente del 0,005-0,01% (p/v).

El paso de poner en contacto se lleva a cabo preferiblemente a una baja temperatura con el fin de inhibir actividades proteolíticas presentes en la muestra. Temperaturas adecuadas son de aproximadamente 0-10ºC, preferiblemente de aproximadamente 3-5ºC, por ejemplo, aproximadamente 4ºC.

Una vez que el líquido biológico se ha puesto en contacto con la disolución que comprende el agente de solubilización de proteínas, ambos líquidos pueden mezclarse. El mezclado puede llevarse a cabo removiendo, preferiblemente mediante agitación, más preferiblemente mediante agitación a alta velocidad, lo más preferiblemente mediante agitación con vórtex durante al menos 5 segundos, preferiblemente durante al menos 10 segundos, más preferiblemente durante al menos 15 segundos (por ejemplo, durante 15-50 segundos). Velocidades ventajosas para dicho mezclado, removido, agitación, agitación a alta velocidad o agitación con vórtex comprenden una velocidad de al menos 250 rpm, preferiblemente de al menos 500 rpm, más preferiblemente de al menos 1.000 rpm, lo más preferiblemente de aproximadamente 2.000-2.500 rpm.

El paso de poner en contacto se lleva a cabo en condiciones adecuadas para lograr la disolución parcial o, preferiblemente, completa del péptido beta amiloide de las proteínas y los lípidos presentes en la muestra biológica. Un experto en la materia puede determinar adecuadamente las condiciones siguiendo la cantidad de péptido beta amiloide que puede detectarse antes de la etapa de poner en contacto y progresivamente a diferentes puntos temporales tras haber tenido lugar el paso de poner en contacto. El experimento de evolución temporal puede determinarse tal como se describe en el ejemplo de la parte experimental.

El experto apreciará que cuando el nivel de péptido beta amiloide se determina diluyendo una muestra biológica con un tampón que contiene el reactivo de solubilización de proteínas, el nivel de péptido beta amiloide libre obtenido mediante la determinación inmunológica tendrá que corregirse con el fin de tener en cuenta el factor de dilución aplicado previamente a la muestra biológica.

Los términos "péptidos Aβ17, Aβ40 o Aβ42 libres en plasma" (de aquí en adelante conocidos como Aβ17 LP, Aβ40 LP o Aβ42 LP, respectivamente), como se usa en el presente documento, se refiere a los péptidos beta amiloides que no están asociados a ningún componente de la muestra biológica y que están fácilmente disponibles para su unión a un anticuerpo específico. Este péptido puede determinarse mediante técnicas inmunológicas convencionales poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo específico para dicho péptido. En una realización preferida, el nivel de péptido amiloide libre se determina en plasma.

El término "valor de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor del parámetro que se usa para la comparación y que se ha determinado en un sujeto que no padece una enfermedad neurodegenerativa o sin antecedentes de enfermedad neurodegenerativa. Preferiblemente, los sujetos de los que se obtienen los valores de referencia para los diferentes parámetros y parámetros calculados son pacientes que muestran una ausencia de síntomas de memoria, rendimiento normal en pruebas neuropsicológicas y ausencia de alteraciones estructurales en IRM.

En particular, se seleccionan valores de referencia que permiten una sensibilidad superior al 85% y una especificidad superior al 75%. En otra realización preferida, los valores de referencia se seleccionan de modo que se obtenga una sensibilidad superior al 70% y una especificidad superior al 70%. Preferiblemente, los valores de referencia permiten obtener una predicción con una exactitud o precisión de al menos el 80%.

Una vez determinado el valor del parámetro, se lleva a cabo la determinación de si un sujeto padece de enfermedad de Alzheimer leve cuando hay una alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia.

Puede usarse cualquier método adecuado para la determinación de péptidos en la presente invención. A modo de ejemplo, la concentración de péptido beta amiloide puede determinarse usando una o más técnicas elegidas de inmunotransferencia, inmunoprecipitación, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), resonancia de plasmón de superficie, reacción con precipitina, ensayo de inmunodifusión de difusión en gel, radioinmunoanálisis (RIA), separación de células activadas por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel bidimensional, electroforesis capilar, espectroscopía de masas (EM), desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo-EM

(MALDI-TOF), desorción/ionización potenciada por láser de superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos de proteínas rápida (FPLC), cromatografía de líquidos multidimensional (LC) seguida por espectrometría de masas en tándem (EM/EM), cromatografía en capa fina, análisis de expresión con chips de proteínas y densitometría láser.

En una forma de realización preferida, la determinación del método de la invención se lleva a cabo mediante un método inmunológico. Como se usa en el presente documento, "método inmunológico", cuando se aplica a una determinación, se refiere a cualquier método que implica el uso de uno o más anticuerpos específicos para una sustancia diana con el fin de determinar la cantidad/concentración de dicha sustancia diana excluyendo otras sustancias encontradas en la muestra. Los métodos inmunológicos adecuados incluyen, sin limitación, inmunotransferencia, inmunoprecipitación, enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), resonancia de plasmón de superficie, radioinmunoanálisis (RIA). En una forma de realización preferida, la determinación o detección del péptido beta amiloide se lleva a cabo mediante ELISA.

El experto apreciará que cualquier tipo de anticuerpo es adecuado para realizar los métodos de detección inmunológicos según la invención siempre que el anticuerpo sea lo suficientemente específico para diferenciar eficazmente las especies de péptido beta amiloide en la muestra de otras sustancias.

El término "ELISA", como se usa en el presente documento, significa enzimoinmunoanálisis de adsorción y se refiere a un ensayo mediante el cual una cantidad desconocida de sustancia diana (el péptido beta amiloide) se fija a una superficie, y después se lava con un anticuerpo específico sobre la superficie de modo que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo está ligado a una enzima, y en el paso final se añade una sustancia que la enzima puede convertir en alguna señal detectable. Se conocen diferentes tipos de ensayos ELISA y pueden aplicarse al método de la invención, incluyendo ELISA directo, ELISA sándwich, ELISA competitivo y método y dispositivo inverso de ELISA (ELISA-R m&d).

El ELISA directo se lleva a cabo poniendo en contacto la muestra de prueba que comprende el péptido beta amiloide con un soporte sólido que se ha recubierto

previamente con una disolución concentrada de una proteína o un reactivo que no interacciona (seroalbúmina bovina, caseína). Una vez que se absorbe el péptido beta amiloide presente en la muestra de prueba sobre el soporte, se añade un anticuerpo específico para el péptido beta amiloide en condiciones adecuadas para su unión al péptido beta amiloide. El anticuerpo que se une se detecta después con un anticuerpo secundario que está acoplado a una etiqueta detectable o a una enzima modificadora de sustrato. La señal resultante de la etiqueta detectable o del sustrato es proporcional entonces a la cantidad de anticuerpo unido al soporte que, a su vez, se correlaciona directamente con la cantidad de péptido beta amiloide en la muestra.

El ensayo ELISA competitivo incluye un primer paso en el que la muestra de prueba que comprende una cantidad desconocida de péptido beta amiloide se pone en contacto con un primer anticuerpo como se definió anteriormente. Los complejos anticuerpo-antígeno se añaden a un pocillo recubierto con antígeno. Una vez lavado el soporte para eliminar cualquier complejo no unido específicamente, se detecta la cantidad de primer anticuerpo con un segundo anticuerpo que está acoplado a un grupo detectable. En este tipo de ensayos, cuanto mayor sea la concentración de antígeno original, más débil será la señal final. Un ensayo ELISA competitivo alternativo es el que incluye un antígeno ligado a enzima en vez de un anticuerpo ligado a enzima. El antígeno marcado compite por los sitios de unión del anticuerpo primario con el antígeno de la muestra (no marcado). Usando este tipo de ensayos, la concentración de antígeno en la muestra se correlaciona inversamente con la cantidad de antígeno marcado retenido en el pocillo y, por consiguiente, en una señal más débil.

El método y dispositivo inverso de ELISA (ELISA-R m&d) usa una fase sólida innovadora constituida por una varilla de poliestireno inmunoabsorbente con 4-12 ojivas prominentes; el dispositivo entero es adecuado para introducirlo en un tubo de ensayo que contiene la muestra recogida y los pasos siguientes (lavado, incubación en conjugado e incubación en cromógeno) se llevan a cabo fácilmente sumergiendo las ojivas en micropocillos de microplacas convencionales cargados previamente con reactivos, sellados y almacenados hasta su uso.

En una forma de realización preferida, el ensayo ELISA es un ensayo ELISA sándwich. El ensayo ELISA sándwich implica recubrir un soporte con un primer anticuerpo específico para el péptido beta amiloide, aplicar la muestra que contiene el

péptido beta amiloide, lo que producirá la unión del péptido beta amiloide al primer anticuerpo, y aplicar un segundo anticuerpo también específico para el péptido beta amiloide, en el que dicho segundo anticuerpo está acoplado habitualmente a una etiqueta detectable o a una enzima modificadora de sustrato. La señal generada por la etiqueta o por el sustrato convertido es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

Se prefiere llevar a cabo los diferentes pasos del método usando en paralelo las muestras que se van a determinar y un número de muestras de referencia que tienen concentraciones conocidas del compuesto que se va a determinar. Se debe preparar una curva patrón para el péptido Aβ17 usando concentraciones crecientes para determinar las concentraciones de los parámetros mencionados anteriormente. La curva patrón sirve al propósito dual de (i) establecer el intervalo de concentración en donde la señal aumenta linealmente con la concentración del péptido diana y (ii) determinar la concentración de los péptidos en la muestra de prueba por interpolación de la señal obtenida con las muestras de prueba o estándar en la curva para obtener valores de concentración. En vista de alta sensibilidad del ensayo de la invención, las concentraciones preferidas de las muestras de prueba son por ejemplo, 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 pg/ml. Se apreciará que las concentraciones de las muestras usadas para obtener la curva patrón variarán para cada sustrato de prueba. Sin embargo, la determinación del intervalo lineal del ensayo la puede determinar facialmente el experto en la materia por medios convencionales.

El término "alteración" se refiere a un aumento o disminución estadísticamente significativos en el valor del parámetro en consideración con respecto al valor de referencia.

Mediante "estadísticamente significativo", como se usa en el presente documento, se refiere a un análisis estadístico de la probabilidad de que haya una asociación no aleatoria entre dos o más resultados, criterios de valoración o desenlaces, es decir, que haya un cierto grado de certeza matemática de que el valor del parámetro esté asociado con una población de pacientes particular con respecto al valor de referencia.

La significación estadística de la alteración en los valores puede determinarse usando el valor de p. Por ejemplo, cuando se usa el valor de p, se identifica un

parámetro que muestra una alteración significativa cuando el valor de p es inferior a 0,1, preferiblemente inferior a 0,05, más preferiblemente inferior a 0,01, incluso más preferiblemente inferior a 0,005, lo más preferiblemente inferior a 0,001.

Normalmente, el valor del parámetro en consideración puede asignarse como que está "aumentado" cuando el valor por encima del valor de referencia es de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más en comparación con el valor de referencia. Por otra parte, un valor del parámetro puede considerarse como que está "disminuido" cuando es al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos en comparación con el valor de referencia. En una forma de realización particular, la alteración en el valor del parámetro o en el valor del parámetro calculado con respecto al valor de referencia es un aumento.

Formas de realización adicionales de la invención son las siguientes:

[1] Un anticuerpo que se une específicamente al péptido Aβ(1-17).

[2] Un anticuerpo como se define en [1] que no muestra reactividad cruzada sustancial hacia un péptido Aβ seleccionado del grupo que consiste en Aβ(1-15), Aβ(1-16), Aβ(1-38), Aβ(1-40), Aβ(1-42) y una combinación de uno o más de ellos.

[3] Un anticuerpo definido en [1] o [2] que es un anticuerpo policlonal.

[4] Un anticuerpo como se define en cualquiera de [1] a [3] en donde dicho anticuerpo se ha obtenido usando como inmunógeno un péptido Aβ seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[5] Un kit para la detección del péptido Aβ(1-17), que comprende:

(i) un primer anticuerpo que es un anticuerpo como se define en cualquiera de [1] a [3] y

(ii) un segundo anticuerpo que reconoce una región del péptido Aβ(1-17) diferente de la región que es reconocida por el primer anticuerpo.

[6] Kit según [5] en donde el primer o segundo anticuerpo está acoplado a un primer miembro de un par de unión.

[7] Kit según [6] que comprende además un segundo miembro de dicho par de unión en donde dicho segundo miembro del par de unión está acoplado a una etiqueta detectable.

[8] Kit como se define en [7] en donde, si la etiqueta detectable que está acoplada al segundo miembro del par de unión es una etiqueta enzimática, entonces el kit comprende además un sustrato que puede convertirse por dicha enzima en un producto detectable.

[9] Kit como se define en cualquiera de [5] a [8] que comprende además un anticuerpo o una combinación de anticuerpos que específicamente se unen a Aβ40 y/o Aβ42.

[10] Kit como se define en cualquiera de [5] a [9] que comprende además un soporte sólido.

[11] Kit como se define en [10] en donde el anticuerpo que no está acoplado a un primer miembro de un par de unión está unido previamente al soporte sólido.

[12] Kit como se define en cualquiera de [5] a [11] que comprende además una muestra que contiene péptidos Aβ17, Aβ40 y/o Aβ42.

[13] Un método para determinar o detectar el péptido Aβ(1-17) en una muestra que comprende los pasos de:

(i) capturar el péptido Aβ(1-17) presente en la muestra con un primer anticuerpo que se une específicamente a dicho péptido,

(ii) poner en contacto los complejos inmunes formados en el paso (i) con un segundo anticuerpo, en donde dicho segundo anticuerpo es como se define en cualquiera de [1] a [4] y en donde dicho segundo anticuerpo reconoce una región diferente que el primer anticuerpo y está acoplado a un primer miembro de un par de unión;

(iii) poner en contacto los complejos formados en el paso (ii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a una etiqueta detectable y

(iv) detectar o determinar la actividad o cantidad de la etiqueta detectable.

[14] Un método como se define en cualquiera de [13] a [17] en donde la muestra biológica se selecciona del grupo de sangre, suero, plasma y LCR.

[15] Un kit como se define en cualquiera de [1] a [12] o un método como se define en [13] o [14] en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[16] Un kit o método como se define en [15] en donde el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo 6E10.

[17] Un kit o método como se define en cualquiera de [1] a [16] en donde dicho primer miembro de un par de unión es biotina y el segundo miembro de un par de unión es avidina, estreptavidina o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

[18] Un kit o método como se define en cualquiera de [1] a [17] en donde la etiqueta detectable es una molécula fluorescente, una molécula luminiscente o una enzima.

[19] Un método para el seguimiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprende:

(a) determinar en una muestra de dicho sujeto en un primer punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en una muestra de dicho sujeto;

(b) determinar en una muestra de dicho sujeto en un segundo punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en una muestra de dicho sujeto y

(c) comparar el cociente de nivel de péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en dichos primer y segundo puntos temporales;

en donde si dicho cociente aumenta en el segundo punto temporal con respecto al primer punto temporal, es indicativo de un empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto entre dichos primer y segundo puntos temporales.

[20] Método según [19] en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

[21] Método según cualquiera de [19] o [20] en donde la determinación del nivel del péptido Aβ17 se lleva a cabo mediante ELISA.

[22] Método según [21] en donde la determinación del nivel del péptido Aβ17 se lleva a cabo usando un método como se define en cualquiera de [13] a [18].

[23] Un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en:

(a) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor añadido de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma de dicho sujeto y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor añadido del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma del sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre del sujeto;

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre del sujeto; y

(e) el valor cociente entre el nivel de Aβ17 libre en una muestra de plasma de dicho sujeto y el péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de dichos parámetros en una muestra de referencia de un sujeto sano, entonces el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

[24] Un método para determinar si un sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma del sujeto y el nivel péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(d) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los niveles añadidos del péptido Aβ17 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos del péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde al valor añadido de los niveles de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre y de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde al valor añadido de los péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de los parámetros (a), (b) o (c) aumenta y/o el valor de uno o más de los parámetros (d), (e), (f) o (g) disminuye con respecto al valor en una muestra de referencia de un sujeto sano, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

[25] Un método para distinguir un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma

de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de (a) aumenta y/o el valor de uno o más de dichos parámetros (b), (c), (d) y (e) disminuye con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

[26] Un método para distinguir un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(c) los valores añadidos de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ40 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que tiene DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece de enfermedad de Alzheimer leve.

[27] Un método para distinguir un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica de un sujeto que padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel péptido Aβ40 libre en una muestra de plasma; y

(b) el cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 libres en una muestra de plasma;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto con deterioro cognitivo leve prodrómico, el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

[28] Método según cualquiera de [23] a [27] en donde la determinación del nivel de uno o más de los péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 se determina mediante ELISA.

Los siguientes ejemplos se proporcionan como ilustración y no se deben interpretar como limitantes del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Generación del anticuerpo anti-Aβ17

Se inmunizaron cuatro conejos con los siguientes péptidos VHHQKL, que corresponde a Aβ(12-17) (SEQ ID NO: 2) y EVHHQKL, que corresponde a Aβ(11-17) (SEQ ID NO: 3), dos de ellos con el primer péptido y dos conejos más con el segundo péptido. Ambos péptidos contenían en el extremo N un aminoácido adicional, una cisteína para conjugación.

El soporte usado para la conjugación fue hemocianina de lapa californiana (KLH) (Pierce, ref. 77600). La conjugación se llevó a cabo con el entrecruzador NHS-PEG_4-Maleimida (Pierce, ref. 22104). Como adyuvantes se usaron tres tipos: adyuvante de Freund completo (Sigma, ref. F5881), adyuvante de Freund incompleto (Sigma, ref. F5506) y alumbre Imjet (Pierce, ref. 77161).

El protocolo de inmunización fue el siguiente:

- Los cuatro conejos se inmunizaron cada semana con 100 μg de los péptidos.
- La primera dosis se administró usando adyuvante de Freund completo como adyuvante, seguida por otra dosis con adyuvante de Freund incompleto y una tercera dosis con alumbre.
- Después de las tres primeras administraciones, el título del anticuerpo obtenido era demasiado bajo para permitir la purificación. Por tanto, la dosis se aumentó a 200 μg de los péptidos en tres administraciones más, alternando los adyuvantes: adyuvante de Freund incompleto - alumbre- adyuvante de Freund incompleto.
- Los títulos de los anticuerpos obtenidos para los cuatro conejos fueron muy altos y se llevó a cabo la purificación por cromatografía de afinidad (con el péptido Aβ17).

Se llevó a cabo una transferencia de mancha para determinar la especificidad de del anticuerpo anti-Aβ17, en donde se incluyeron otros péptidos Aβ (figura 1). El anticuerpo anti-Aβ17 se añadió en dos diluciones (1:1000 y 1:2000) y el anticuerpo secundario usado fue de cabra anti-conejo-HRP 1:2000. Se cargaron 500 ng de cada péptido en 2,5 μl. La transferencia de mancha se reveló con ECL con la tecnología SNAP a una exposición de 1 minuto y 3 minutos. Como se muestra en dicha figura, el

anticuerpo es muy específico para el péptido Aβ17 y no reconoce específicamente Aβ15, Aβ16, Aβ38, Aβ40 y Aβ42.

EJEMPLO 2

Determinación de péptido Aβ17 en muestras

(1) Determinación por espectrometría de masa

Reactivos

Ácido fórmico, cloruro de sodio, ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (α-CHCA), ácido trifluoroacético (TFA), DL-ditiotreitol (DTT), trietanolamina, Tris y seroalbúmina bovina (BSA) eran de Sigma (Steimheim, Alemania). El acetonitrilo se adquirió de Carlo-Erba (Rodano, MI, Italia). El pimelimidato de dimetilo·2HCl (DMP) se adquirió de Pierce (Rockford, IL, EE UU). El tampón de carga de tricina se adquirió de Bio-Rad (Hercules, CA, EE UU).

Procedimiento de inmunoprecipitación (IP)

El procedimiento IP-MALDI se llevó a cabo como describen Portelius *et al.* 2007 (J. Proteome. Res. 6 (11), 4433-4439), con algunas modificaciones para adaptar el procedimiento al análisis de muestras de perro. En primer lugar, se usaron diferentes cantidades de anticuerpos específicos de Aβ (6E10 y 4G8 específicos para epítopos Aβ en los aminoácidos 4-9 y 18-22, respectivamente, Signet Laboratories, Inc., Dedham, MA, EE UU) y SAR2 (específico para el epítopo anti-Aβ40 carboxi terminal, Araclon Biotech S.L., Zaragoza, España) para determinar la cantidad óptima de cada anticuerpo mediante inmunotransferencia. El procedimiento de optimización implicaba diferentes pasos. Cada anticuerpo se añadió por separado a 50 µl de Dynabeads proteína G (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega) según la descripción del fabricante. Las bolas se incubaron con diferentes cantidades de anticuerpo, se lavaron y después se eluyeron los anticuerpos hirviendo las bolas en tampón de carga de tricina con DTT. Se determinó la cantidad de saturación de cada anticuerpo mediante inmunotransferencia.

Además, también se optimizaron el tiempo (1 hora y durante la noche) y temperatura (4ºC, temperatura ambiente y 37ºC) de incubación de las bolas con el anticuerpo y los complejos bolas-anticuerpo con las muestras. Otro parámetro

optimizado fue la condición de elución (ácido fórmico al 0,5, 2,5 y 5%, así como varios porcentajes de solventes orgánicos, tal como acetonitrilo).

Se aplicaron dos protocolos diferentes durante este estudio. El primero se basa básicamente en las instrucciones del fabricante con los parámetros optimizados: se incubó una alícuota del anticuerpo específico de Aβ (4 µg de 6E10 o 8 µg de 4G8 o 6 µg de SAR2) con 50 µl de Dynabeads proteína G durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Después de eso, se llevaron a cabo tres lavados con solución salina tamponada en fosfato (PBS: NaH_2PO_4 H_2O 1mM, $Na_2HPO_4 \cdot 2$ H_2O 5 mM, NaCl 138mM). Se añadió 1 ml de LCR y se incubó durante la noche a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. El LCR se retiró de las bolas después de la incubación, con la ayuda de un imán (DynaMag-2 o DynaMag-15, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega) y se desechó. Las bolas se lavaron tres veces con 1 ml de Tris 100 mM pH=6,8 y por último se llevó a cabo la elución con 25 µl de ácido fórmico al 5%. El eluato se incubó 5 minutos a temperatura ambiente en un termomezclador. Los compuestos eluidos se desalaron con puntas ZipTip C_{18} (Millipore, Billerica, MA, EE UU). El protocolo de ZipTip C_{18} consiste en varios pasos: solvatación de las puntas con acetonitrilo, acondicionamiento con TFA al 0,1% (repitiendo este paso varias veces), carga de la muestra (pipeteando arriba y abajo varias veces), un paso de lavado con TFA al 0,1% y la elución final con 3 µl de α-CHCA (5 mg/ml).

En el segundo protocolo, se usó tampón citrato-fosfato, pH=5,0 (ácido cítrico 24,5 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 2$ H_2O 52 mM) para los pasos de lavado y unión en lugar de PBS. Antes de la elución las bolas se lavaron con PBS en lugar de Tris 100 mM pH=6,8. Este segundo protocolo produjo espectros de masa con menos ruido de fondo y picos más intensos y se usó para el resto de los experimentos.

Para la inmunoprecipitación de muestras humanas, se usaron 50 µl de Dynabeads oveja anti-ratón (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega). Las bolas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con la cantidad optimizada del anticuerpo específico (8 µg para 6E10 u 8 µg para 4G8) durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Después de eso, se eliminó el sobrenadante y las bolas se lavaron en 1 ml de trietanolamina 0,2 M pH=8,2. La reacción de entrecruzamiento tuvo lugar después de añadir 1 ml de DMP 20 mM (un agente de entrecruzamiento homobifuncional con grupos reactivos amina; Greg T Hermanson, 2010) en trietanolamina 0,2 M pH=8,2. Se

incubaron bolas y anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente, después el sobrenadante se desechó y la reacción se paró añadiendo 1 ml de Tris 50 mM pH=7,5 durante 15 minutos en un agitador rotatorio. Las bolas entrecruzadas se lavaron tres veces con 1 ml de PBS que contenía BSA al 0,1%. Se añadió 1 ml de LCR humano reunido y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se desecharon y las bolas se lavaron varias veces con PBS. Las especies Aβ se eluyeron con 25 µl de ácido fórmico al 5%. Los compuestos eluidos se desalaron con ZipTip C_{18} usando el mismo protocolo descrito anteriormente.

MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF-Espectrometría de masas (EM)

Se colocaron 0,7 µl de la muestra eluida directamente en la diana del MALDI hasta la evaporación completa. Todos los espectros se adquirieron con un espectrómetro de masa ABI4800 MALDI-TOF/TOF (AB/Sciex) equipado con un láser Nd:YAG (355 nm) de estado sólido con diodo bombeado que funciona a una tasa de repetición de 200 Hz. Para obtener los espectros de EM el instrumento se operó en modo reflector y todos los experimentos se llevaron a cabo en modo de ión positivo. 400 nanosegundos después de disparar el láser, se aplicó una diferencia de potencial de aceleración de 20 kV. Los iones se reenfocaron en el reflector de dos fases y por último se detectaron en el segundo detector. La diferencia de potencial del espejo 2 hacia la fuente 1 se mantuvo constante a un valor de cociente de 1,105. Para adquisiciones EM/EM la diferencia de potencial de la fuente 1 se mantuvo a 8 kV y el valor de láser se ajustó 1000 unidades mayor que en experimentos de EM. Se seleccionaron iones precursores para fragmentación por medio de un selector de iones regulado por tiempo a un valor de resolución de 250 (amplitud completa a semimáximo). Los iones seleccionados se desaceleraron antes de la llegada a la cámara de colisión en la pila de desaceleración y se disociaron tras las colisiones con aire a una energía cinética de 1 keV (disociación inducida por colisión de alta energía). Los iones fragmentados se volvieron a acelerar en la segunda fuente a 15 kV después un tiempo de retraso corto. El supresor metaestable se activó en todos los experimentos de EM/EM para evitar la detección de los iones precursores restantes y fragmentos de decaimiento metaestables no deseados. Se usó el software Data Explorer para el tratamiento espectral (alisamiento y/o filtrado de ruido). Solo se describen cocientes m/z monoisotópicos. El espectrómetro de masa se calibró

externamente con una mezcla de péptidos suministrada por el fabricante, que cubría el intervalo de masa de 900-4000 Da. Cuando fue necesario, el instrumento se calibró con insulina ($M+H^+$=5730,609 Da).

Los resultados de la espectrometría de masa se muestran en la figura 2, para una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) y una muestra de plasma, en donde el pico correspondiente a Aβ17 se índice con una flecha.

(2) Determinación por ELISA

Reactivos y soluciones

- Estándar de β-amiloide 1-17, origen humano. Solución madre de 20 ng/ml.
- Microplaca optimizada para adsorber anticuerpos a su superficie.
- Anticuerpo monoclonal de captura específico para el extremo NH_2 del péptido Aβ humano (anticuerpo 6E10).
- Anticuerpo policlonal de detección conjugado a biotina que específicamente reconoce péptidos Aβ humanos que terminan en el aminoácido 17.
- Solución amplificadora de conjugado estreptavidina-HRP.
- Cromógeno estabilizado TMB.
- Tampón de recubrimiento; Na_2CO_3/$NaHCO_3$ 100 mM pH 9,6.
- Tampón de lavado: Tris 50 mM, Tween20 al 0,05%, NaCl 150 mM, pH 8,0.
- Tampón de bloqueo: Tris 50 mM, Tween20 al 0,2%, BSA al 0,5%, pH 8,0.
- Solución conservante: trehalosa 20 mg/ml, Tris 50 mM, pH 8,0.
- Diluyente de anticuerpo: Tris 50 mM, BSA al 0,05%, NaCl 0,5 M, Tween20 al 0,05%, pH 8,0.
- PBST: Na_2HPO_4 80 mM, NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 100 mM, Tween20 al 0,5%, pH 7,5.
- Diluyente de estándar/muestra: reactivo de bloqueo sintético 1:100 en PBST.
- Solución de parada: H_2SO_4 1 N.

Método

La placa se recubrió usando el anticuerpo monoclonal de captura 6E10 que reconoce los aminoácidos 1-17 en el péptido amiloide Aβ. La concentración usada se

determinó según la concentración de saturación del anticuerpo, de modo que no fuera el factor limitante en la reacción antígeno-anticuerpo. Para este fin, se relacionó la absorbancia a 450 nm con la concentración de anticuerpo en cada pocillo controlando el anticuerpo adsorbido al pocillo con un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado a HRP incubado durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente y un paso de incubación con el sustrato cromógeno seguido por una parada de la reacción. Se eligió la concentración a la que la señal no aumentó con la concentración de anticuerpo.

Una vez se ha seleccionado la concentración de saturación, las microplacas se recubrieron con 100 µl de anticuerpo de captura en tampón de recubrimiento y se incubó durante la noche (ON) a 4ºC durante aproximadamente 20 horas.

Las placas se lavaron después 5 veces con el tampón de lavado y se añadieron 300 µl por pocillo de tampón de bloqueo. Las placas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron después 5 veces con el tampón de lavado y se añadieron 100 µl de la solución conservante. Las placas se dejaron evaporar hasta que aparece un halo blanco característico de trehalosa (2-3 días a temperatura ambiente). Las placas así tratadas se podrían mantener a 4ºC cubiertas con papel de aluminio y son estables durante dos años.

Preparación de la muestra

Las muestras se pueden usar sin diluir o diluidas de 1:2 a 1:10 en diluyente de muestra/estándar. Se recomienda la dilución 1:3 para muestras de plasma y 1:5 para muestras de células sanguíneas. Para asegurar la cuantificación precisa, se deben generar las curvas patrón y blancos en los mismos diluyentes o tampones que las muestras.

Las muestras de la curva patrón de Aβ17 humano (hAβ17) se prepararon a partir de una solución madre de 200 pg/ml de los péptidos Aβ17 en placas recubiertas con el Acm 6E10 y tratadas con trehalosa. Se hicieron diluciones en serie 1:2 en diluyente de muestra/estándar a partir de estas soluciones. Las diluciones se hicieron de modo que dieran las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 pg/ml. Se añaden 100 µl de cada muestra y se incuba durante la noche a 4ºC (o durante 2 horas a 37ºC).

Paso de detección

El anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal conjugado a biotina contra el péptido Aβ humano que termina en el aminoácido 17. La conjugación del anticuerpo a biotina tiene lugar después de un paso de activación y una incubación durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. El exceso de biotina se inactiva en un paso adicional. El anticuerpo de detección se añadió diluido en diluyente de anticuerpo. Se añaden 100 µl a cada pocillo y se incubaron después durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Después, se añadieron a cada pocillo 100 µl de una dilución 1/50 en diluyente de anticuerpo de estreptavidina acoplada a HRP (de SIGMA) y se incubó durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Para revelar la placa, se utilizaron 100 µl del sustrato cromogénico TMB (ZEU Inmunotec). Se añadió TMB y se incubó en la oscuridad durante 45 minutos. Se añadieron 50 µl de solución de parada por pocillo. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Synergy HT (BioTek Instruments).

Cuantificación de Aβ17

Los resultados se pueden calcular usando cualquier paquete de software para inmunoensayos. El método usado para el ajuste de la curva es regresión lineal y la concentración de Aβ17 se calculó como sigue:

(i) Calcular la DO neta media para cada dilución de estándar y muestras como sigue: DO neta media (nm) = DO unida media (nm) – DO cero media (nm).

(ii) En papel milimetrado representar la DO neta media de la dilución del estándar (nm) contra la concentración (pg/ml) de Aβ para los estándares. Dibujar la mejor curva a través de estos puntos para construir la curva patrón.

(iii) Las concentraciones de Aβ en muestras desconocidas y controles se puede determinar por interpolación a partir de la curva patrón.

(iv) Multiplicar los valores obtenidos para las muestras por el factor de dilución de cada muestra.

(v) Las muestras que produjeron señales mayores que el estándar de 200 pg/ml se diluyeron adicionalmente y se ensayaron.

EJEMPLO 3

Reproducibilidad y determinación del límite de detección y cuantificación

Para analizar la reproducibilidad del inmunoensayo, se midieron la variabilidad intraplaca, la variabilidad intraensayo, la variabilidad interensayo en muestras de plasma y la variabilidad interensayo en muestras celulares.

La variabilidad intraplaca se calculó analizando las diferencias entre los pocillos en triplicado, en muestras, muestras de estándar y muestras de referencia en la misma placa. En la reproducibilidad intraensayo, se comparó la concentración obtenida para 4 muestras de plasma de referencia analizadas en 11 placas diferentes en el mismo ensayo. En la variabilidad interensayo en muestras de plasma, se midieron las diferencias obtenidas en concentración cuando se analizaron dos muestras de plasma en dos ensayos diferentes e independientes. La variabilidad interensayo en muestras celulares se refiere a la comparación de los niveles de Aβ17 entre dos determinaciones diferentes e independientes de 8 muestras control de células.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1:

Variabilidad intraplaca (%)	5,11
Variabilidad intraensayo (%)	11,50
Variabilidad interensayo en muestras de plasma (%)	9,51
Variabilidad interensayo en muestras celulares (%)	21,55

Se calcularon el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) por dos métodos diferentes:

(a) Método 1:

$LD = \text{concentración}_{blanco} + 3\sigma_{blanco}$

$LC = \text{concentración}_{blanco} + 10\sigma_{blanco}$

(b) Método 2:

$LD = 3{,}3\sigma_{blanco}/m$

$LC = 10\sigma_{blanco}/m$

en donde σ_{blanco} es la desviación estándar del blanco y m es la pendiente de la línea de calibración.

El límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) obtenidos usando ambos métodos se muestran en la tabla 2:

	Método 1	*Método 2*
Límite de detección (pg/ml)	21,883	2,914
Límite de cuantificación (pg/ml)	21,904	8,830

EJEMPLO 4

Correlación entre diagnóstico de EA y niveles de Aβ17/Aβ40/Aβ42

Se determinaron los niveles de Aβ17, Aβ40 y Aβ42 usando el ensayo ELISA sándwich descrito en ejemplo 1 en muestras de plasma de una cohorte de sujetos control sanos (CS>65 o HC>65) mayores de 65 años (19 sujetos), de una cohorte de sujetos que padecían enfermedad de Alzheimer leve (EA leve) (17 sujetos), de una cohorte de sujetos que tenían deterioro cognitivo leve (DCL) prodrómico o probable (16 sujetos) y de una cohorte de sujetos que tenían deterioro cognitivo leve (DCL) no prodrómico o posible (16 sujetos). Las concentraciones en pg/ml obtenidas para los péptidos se muestran en las tablas de la figura 3A, figura 4A, figura 5A y figura 6A.

Los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 en plasma (péptido total en plasma + péptido unido a células) (CES (17+40+42)) en EA leve difiere significativamente con respecto tanto a sujetos controles sanos como a sujetos con DCL posible o no prodrómico con respecto a sujetos con enfermedad de Alzheimer leve. Sin embargo, el marcador CES (17+40+42) no difiere entre sujetos HC>65 y DCL probable, mientras CES (40+42) lo hace con alta significancia (figura 3B).

Otros parámetros relevantes que se van a medir, que pueden distinguir entre grupos, son los siguientes (figuras 3, 4, 5 y 6):

- Los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células (UC (17+40+42)). Como se muestra en la figura 3, los niveles de estos péptidos unidos a células son mayores en sujetos DCL probable y EA leve que en sujetos DCL posible y sanos. Y es posible distinguir con alta significancia entre sujetos sanos y EA leve, DCL posible y DCL probable y entre DCL posible y EA leve.

- Los niveles de péptido Aβ42 total en plasma + niveles de péptido Aβ42 unido a células (TP42+UC42). Como se muestra en la figura 3, los niveles de estos marcadores son mayores en sujetos DCL probable y EA leve que en sujetos con DCL posible y

sanos. Y es posible distinguir con alta significancia entre sujetos sanos y EA leve o DCL probable y entre DCL posible y EA leve.

- Los niveles de péptido Aβ40 total en plasma + niveles de péptido Aβ40 unido a células (TP40+UC40). Como se muestra en la figura 3, los niveles de estos marcadores son mayores en sujetos con DCL probable y EA leve que en sujetos con DCL posible y sanos. Y es posible distinguir con alta significancia entre DCL posible y EA leve.

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 libre en plasma y niveles de péptido Aβ40 libre en plasma (LP17/40) puede distinguir entre DCL probable y EA leve (figura 4).

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 unido a células y niveles de péptido Aβ42 unido a células (UC17/42) puede distinguir entre sujetos sanos o sujetos con DCL posible y DCL probable (figura 4).

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 total en plasma + niveles de péptido Aβ17 unido a células y niveles de péptido Aβ42 total en plasma añadidos a los niveles de péptido Aβ42 unido a células (TP17+UC17/TP42+UC42) puede distinguir entre sujetos sanos o sujetos con DCL posible y DCL probable (figura 4).

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 libre en plasma y niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 libres en plasma (LP17/LP40+LP42) puede distinguir entre DCL probable y EA leve (figura 5).

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 unido a células y niveles de péptido Aβ40 y Aβ42 unidos a células (UC17/UC40+UC42) puede distinguir entre sujetos sanos o sujetos con DCL posible y DCL probable y entre sujetos sanos y EA leve (figura 5).

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 total en plasma + niveles de péptido Aβ17 unido a células y niveles de péptido Aβ40 y Aβ42 total en plasma (CES (40+42)) puede distinguir entre sujetos sanos o sujetos con DCL posible de DCL probable (figura 5).

- El cociente entre niveles de péptido Aβ17 libre en plasma y niveles de péptido Aβ17 unido a células (LP17/UC17) puede distinguir entre sujetos sanos o sujetos con DCL posible de EA leve y entre sujetos sanos y DCL probable (figura 6). El análisis estadístico (prueba U de Mann-Whitney) con todos los cocientes de Aβ17 muestra diferencias estadísticamente significativas solo con el marcador de niveles de péptido Aβ17 libre en plasma/niveles de péptido Aβ17 unido a células (LP17/UC17) (véase la tabla 3).

Asimismo, hay una relación entre el cociente de niveles de péptido Aβ17 libre en plasma y niveles de péptido Aβ17 unido a células con la evolución de la EA. Cuanto más avanzado es el deterioro cognitivo, mayor es el nivel de péptido Aβ17 libre en plasma y por tanto, también es mayor el cociente de niveles de péptido Aβ17 libre en plasma y niveles de péptido Aβ17 unido a células (LP17/UB17).

Tabla 3:

	LP17/TP17	**TP17/UC17**	**LP17/UC17**	**LP17/CES17**	**TP17/CES17**	**UC17/CES17**
HC>65 frente a DCL pos.	0,313	0,987	0,296	0,282	0,987	0,987
HC>65 frente a DCL prob.	0,169	0,608	**0,020**	0,082	0,608	0,608
HC>65 frente a EA leve	0,113	0,296	**<0,001**	0,004	0,296	0,296
DCL pos frente a DCL prob.	0,749	0,720	0,109	0,462	0,720	0,720
DCL pos frente a EA leve	0,615	0,397	**0,002**	0,075	0,397	0,397
DCL prob frente a EA leve.	0,815	0,439	0,228	0,288	0,439	0,439

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo policlonal que se une específicamente al péptido Aβ (1-17)

que no muestra reactividad cruzada sustancial contra un péptido Aβ seleccionado del grupo que consiste en Aβ(1-15), Aβ(1-16), Aβ(1-38), Aβ(1-40), Aβ(1-42) y una combinación de uno o más de ellos.

2. Un kit para la detección del péptido Aβ(1-17), que comprende:
   (i) un primer anticuerpo que es un anticuerpo como se define en la reivindicación 1 y
   (ii) un segundo anticuerpo que reconoce una región del péptido Aβ(1-17) diferente de la región que es reconocida por el primer anticuerpo.

3. Kit según la reivindicación 2 en donde el primer o el segundo anticuerpo está acoplado a un primer miembro de un par de unión.

4. Kit según la reivindicación 3 que comprende además un segundo miembro de dicho par de unión en donde dicho segundo miembro del par de unión está acoplado a una etiqueta detectable.

5. Un método para determinar o detectar el péptido Aβ(1-17) en una muestra que comprende los pasos de:
   (i) capturar el péptido Aβ(1-17) presente en la muestra con un primer anticuerpo que se une específicamente a dicho péptido,
   (ii) poner en contacto los complejos inmunes formados en el paso (i) con un segundo anticuerpo, en donde dicho segundo anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y en donde dicho segundo anticuerpo reconoce una región diferente que el primer anticuerpo y está acoplado a un primer miembro de un par de unión;
   (iii) poner en contacto los complejos formados en el paso (ii) con un segundo miembro de un par de unión que está acoplado a una etiqueta detectable, y

(iv) detectar o determinar la actividad o cantidad de la etiqueta detectable.

6. Método como se define en la reivindicación 5 en donde la muestra se selecciona del grupo de sangre, suero, plasma y LCR.

7. Un método de seguimiento de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, que comprende:

(a) determinar en una muestra de dicho sujeto en un primer punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en una muestra de dicho sujeto;

(b) determinar en una muestra de dicho sujeto en un segundo punto temporal el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en una muestra de dicho sujeto y

(c) comparar el cociente de nivel de péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre en dichos primer y segundo puntos temporales

en donde si dicho cociente aumenta en el segundo punto temporal con respecto al primer punto temporal, es indicativo de un empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer en el sujeto entre dichos primer y segundo puntos temporales

8. Método según la reivindicación 7 en donde la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 en donde la determinación del nivel del péptido Aβ17 se lleva a cabo usando un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6.

10. Un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo que consiste en:

(a) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor añadido de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma de dicho sujeto y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor añadido del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma del sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre del sujeto;

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre del sujeto; y

(e) el valor cociente entre el nivel de Aβ17 libre en una muestra de plasma de dicho sujeto y el péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de dichos parámetros en una muestra de referencia de un sujeto sano, entonces el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

11. Un método para determinar si un sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma del sujeto y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma del sujeto y el nivel péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(d) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los niveles añadidos del péptido Aβ17 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos del péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre y de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde al valor añadido de los péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de los parámetros (a), (b) o (c) aumenta y/o el valor de uno o más de los parámetros (d), (e), (f) o (g) disminuye con respecto al valor en una muestra de referencia de un sujeto sano, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

12. Un método para determinar si un sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre de dicha muestra del sujeto;

(b) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre del sujeto y el nivel del péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre de dicho sujeto;

(c) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde a los valores añadidos del nivel de péptido Aβ17 total en una muestra de plasma de dicho sujeto y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de (a) aumenta y/o el valor de uno o más de dichos parámetros (b), (c), (d) y (e) disminuye con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que padece DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece DCL con enfermedad de Alzheimer prodrómica.

13. Un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) los valores añadidos de niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(b) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ17, Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(c) los valores añadidos de péptido Aβ42 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ42 unido a células en una muestra de sangre;

(d) los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 totales en una muestra de plasma y los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre;

(e) los valores añadidos del nivel de péptido Aβ40 total en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ40 unido a células en una muestra de sangre;

(f) el valor cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre y el segundo parámetro corresponde a los valores añadidos de los niveles de péptidos Aβ40 y Aβ42 unidos a células en una muestra de sangre; y

(g) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel de péptido Aβ17 unido a células en una muestra de sangre;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto que tiene DCL con enfermedad de Alzheimer no prodrómica, el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.

14. Un método para determinar si un sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve que comprende determinar el valor de uno o más parámetros seleccionados del grupo de:

(a) el valor cociente entre el nivel del péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el nivel péptido Aβ40 libre en una muestra de plasma; y

(b) el cociente entre dos parámetros, en donde el primer parámetro corresponde al nivel de péptido Aβ17 libre en una muestra de plasma y el segundo parámetro corresponde a los niveles añadidos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 libres en una muestra de plasma;

en donde si el valor de uno o más de dichos parámetros aumenta con respecto al valor de una muestra de referencia de un sujeto con deterioro cognitivo leve prodrómico, el sujeto padece enfermedad de Alzheimer leve.