

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.11.19	(73) Titular(es): SATORIS, INC. 2686 MIDDLEFIELD ROAD - SUITE E REDWOOD CITY, CA 94063 US THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY US U.S. GOVERNMENT REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS US
(30) Prioridade(s): 2003.11.19 US 523796 P 2004.04.30 US 566782 P 2004.04.30 US 566783 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.07.28	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.03.06 103/2013	(72) Inventor(es): SANDIP RAY US ANTON WYSS-CORAY US
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR E MONITORIZAR A DOENÇA DE ALZHEIMER**

(57) Resumo:

OS INVENTORES REVELARAM UMA SÉRIE DE BIOMARCADORES PROTEICOS (¿BIOMARCADORES AD¿) QUE PODEM SER QUANTIFICADOS NUMA AMOSTRA DE UM FLUIDO BIOLÓGICO PERIFÉRICO PARA AJUDAR O DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS MEURODEGENERATIVAS, EM ESPECIAL A DOENÇA DE ALZHEIMER E A DIMINUIÇÃO COGNITIVA MODERADA (MCI). A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA MÉTODOS PARA SE IDENTIFICAREM AGENTES CANDIDATOS PARA TRATAR A DOENÇA DE ALZHEIMER, TESTANDO NOS AGENTES EM PERSPECTIVA A CAPACIDADE DE MODULAREM OS TEORES DOS BIOMARCADORES AD.

RESUMO

"Método para diagnosticar e monitorizar a doença de Alzheimer"

Os inventores revelaram uma série de biomarcadores proteicos ("biomarcadores AD") que podem ser quantificados numa amostra de um fluido biológico periférico para ajudar o diagnóstico de patologias neurodegenerativas, em especial a doença de Alzheimer e a diminuição cognitiva moderada (MCI). A invenção também proporciona métodos para se identificarem agentes candidatos para tratar a doença de Alzheimer, testando nos agentes em perspectiva a capacidade de modularem os teores dos biomarcadores AD.

DESCRIÇÃO

"Método para diagnosticar e monitorizar a doença de Alzheimer"

ESTADO DA TÉCNICA ANTERIOR À INVENÇÃO

Estima-se que 4,5 milhões de Americanos tenham Doença de Alzheimer ("AD"). A gama estimada para 2050 para a prevalência da AD será de entre 13 milhões e 16 milhões. Hoje em dia, o custo social da AD para os E.U.A. é de \$100 mil milhões ao ano, incluindo \$61 mil milhões suportados por empresas dos E.U.A.. Nem a Medicare nem a maior parte dos seguros de saúde privados cobrem os cuidados a longo prazo de que a maior parte dos pacientes necessita.

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central associada a uma perda progressiva da memória resultando em demência. Observam-se duas características patológicas nas autópsias dos pacientes com AD: placas extracelulares e emaranhamentos intracelulares no hipocampo, no córtex cerebral, e noutras áreas do cérebro essenciais para a função cognitiva. As placas são constituídas sobretudo por deposição de amiloide beta ("A β "), um péptido derivado da proteína precursora amiloide ("APP"). Formam-se emaranhamentos filamentosos a partir de pares de filamentos

helicoidais compostos por neurofilamento e proteína tau hiperfosforilada, uma proteína associada a microtúbulos. Não é no entanto claro, se estas duas alterações patológicas estão apenas associadas à doença ou se estão verdadeiramente envolvidas no processo de degeneração. A AD de início tardio/espórádico apresenta uma patologia virtualmente idêntica à AD herdada com início precoce/familiar (FAD), o que sugere caminhos patológicos comuns para ambas as formas de AD. Até à data, identificaram-se por estudos genéticos três genes que provocam AD autossomal dominante, com início precoce, proteína precursora amilóide ("APP"), presenilina 1 ("PS1"), e presenilina 2 ("PS2"). Um quarto gene, da apolipoproteína E ("ApoE"), é o factor de risco genético mais forte e mais comum para a AD, mas não a provoca necessariamente. Todas as mutações associadas às proteínas APP e PS podem levar a um aumento da produção de péptidos A β , especificamente da sua forma mais amiloidogénica, A β ₄₂. Para além das influências genéticas sobre a formação da placa amilóide e dos emaranhamentos intracelulares, também podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento e na progressão da AD factores ambientais (por exemplo, citoquinas, neurotoxinas, etc.).

A característica clínica principal da AD é um declínio cognitivo progressivo levando a uma perda da memória. A disfunção da memória envolve uma incapacidade de apreender informação nova que amiúde é caracterizada por perda da memória de curto prazo. Nos estádios iniciais

(suaves) e moderados da doença, pode parecer que é mantida a capacidade de lembrança de material antigo bem aprendido, mas a informação nova não consegue ser adequadamente incorporada na memória. Uma desorientação em relação ao tempo está relacionada de perto com a perturbação da memória.

Também são parte proeminente da AD perturbações da linguagem. Estas são amiúde manifestas a princípio como dificuldades em encontrar palavras na fala espontânea. A linguagem do paciente com AD é amiúde vaga, faltando-lhe termos específicos e podendo aumentar as frases automáticas e os chavões. É amiúde proeminente uma dificuldade em atribuir designações aos objectos habituais. Estão presentes em muitos pacientes com AD défices complexos na função visual, tal como outros défices cognitivos focais tais como a apraxia, a acalculia e a desorientação direita-esquerda. São frequentemente observadas diminuições de discernimento e dificuldades na resolução de problemas.

Também são frequentes sintomas não cognitivos ou comportamentais na AD, que podem aliás constituir uma maior parte das tarefas com os cuidados a prestar e o *stress* provocado nos indivíduos que os prestam, do que a disfunção cognitiva. São habitualmente reportadas alterações de personalidade, que podem variar desde uma passividade progressiva a uma agitação notável. Os pacientes podem exhibir alterações tais como uma diminuição das expressões de afecto. Estão presentes sintomas depressivos em até 40

%. Também foi reconhecida uma taxa semelhante para a ansiedade. Ocorre psicose em 25 %. Em alguns casos, as alterações de personalidade podem ocorrer antes das anormalidades cognitivas.

Correntemente, o método principal para diagnosticar AD em pacientes vivos envolve recolher os históricos pormenorizados dos pacientes, administrando-lhes testes de memória e psicológicos, e eliminando outras explicações para as perdas de memória, incluindo estados temporários (por exemplo, depressão ou deficiência em vitamina B₁₂) ou permanentes (por exemplo, apoplexia). Estes métodos de diagnóstico clínico não dão, no entanto, resultados fiáveis.

Um dos obstáculos ao diagnóstico é identificar-se o tipo de demência; a AD é apenas um dos setenta estados de que resulta demência. Por causa disto, não se consegue diagnosticar a AD com uma certeza completa até depois da morte, quando a autópsia revela as placas amilóides e os emaranhamentos de neurofibrilas característicos da doença, no cérebro do paciente. Além disto, os processos de diagnóstico clínico só são úteis depois dos pacientes terem começado a manifestar perda de memória anormal ou alterações de personalidade, significativas. Nessa altura, um paciente já estará a sofrer de AD há anos.

Atentas as dimensões do problema de saúde pública que a AD constitui, têm sido levados a cabo esforços de

investigação consideráveis para a elucidação da etiologia da AD bem como para se identificarem biomarcadores (proteínas segregadas ou metabolitos) que se possam utilizar para diagnosticar e/ou prever se uma pessoa virá a sofrer provavelmente de uma AD. Uma vez que na AD o SCN está relativamente isolado de outros órgãos e sistemas do corpo, a maior parte da investigação (no que toca tanto à etiologia como aos biomarcadores) tem sido focada sobre acontecimentos, expressão genética, biomarcadores, etc. adentro do sistema nervoso central. No que toca aos biomarcadores, as proteínas amilóide beta e tau são provavelmente as mais bem caracterizadas. A investigação revelou que amostras do fluido cerebrospinal ("CSF") dos pacientes com AD contêm quantidades maiores do que as normais de tau, que é libertada quando os neurónios se degeneram, e quantidades inferiores às normais de amilóide beta, presumivelmente porque ela permanece armadilhada no cérebro sob a forma de placas amilóides. Uma vez que estes biomarcadores são libertados para o CSF, é necessária uma punção lombar (ou "torneira espinal") para se obter uma amostra para testar.

Foram emitidas diversas patentes U.S. relacionadas com métodos para o diagnóstico da AD, incluindo as Patentes U.S. N^{os}. 4.728.605, 5.874.312, 6.027.896, 6.114.133, 6.130.048, 6.210.895, 6.358.681, 6.451.547, 6.461.831, 6.465.195, 6.475.161, 6.495.335, e os US 2003/064.416 e US 2003/119.074.

Além disto, diversas publicações na literatura científica relacionam-se com determinados marcadores bioquímicos e a sua correlação/associação com a AD, incluindo Fahnestock *et al.*, 2002, *J. Neural. Transm. Suppl.* 2002 (**62**): 241-52; Masliah *et al.*, 1995, *Neurobiol. Aging* **16**(4): 549-56; Power *et al.*, 2001, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **12**(2): 167-70; e Burbach *et al.*, 2004, *J. Neurosci.* **24**(10):2421-30. Além disto, Li *et al.* (2002, *Neuroscience* **113**(3): 607-15) e Sanna *et al.* (2003, *J. Clin. Invest.* **111**(2): 241-50) investigaram a Leptina em relação, respectivamente com a memória e a esclerose múltipla.

São descritos factores de crescimento do tipo da insulina e proteínas de ligação a factores de crescimento do tipo da insulina no fluido cerebrospinal e no soro de pacientes com demência do tipo da de Alzheimer em Tham *et al.*, *Journal of neural transmission, Parkinson's disease and dementia section* **5** (1993), 165-176. São descritos marcadores biológicos e o tratamento da doença de Alzheimer em Galasko, *Journal of molecular neuroscience* **17** (2001), 119-125.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Os inventores revelaram uma série de marcadores biológicos, presentes no soro de indivíduos, que estão alterados nos indivíduos com a Doença de Alzheimer ("AD"). Portanto, estes biomarcadores ("biomarcadores de diagnóstico da AD") podem ser utilizados para avaliar a

função cognitiva, para diagnosticar ou ajudar no diagnóstico da AD e/ou para quantificar a progressão da AD em pacientes com AD. Podem utilizar-se os marcadores de diagnóstico da AD individualmente ou em combinação para o diagnóstico ou para ajudar no diagnóstico da AD. A invenção proporciona métodos para ajudar no diagnóstico da AD num indivíduo medindo a quantidade de pelo menos IGFBP-2 numa amostra de um fluido periférico que seja uma amostra de sangue ou de urina de um indivíduo, e comparando a quantidade determinada com um valor de referência para cada um dos biomarcadores de diagnóstico de AD quantificado. A informação obtida deste modo pode ser utilizada para ajudar no diagnóstico ou para diagnosticar a AD no indivíduo. Deste modo, a invenção presente proporciona um método para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que inclui comparar-se um teor determinado em pelo menos IGFBP-2 numa amostra de um fluido biológico periférico que seja uma amostra de sangue ou de urina de um indivíduo, com um teor de referência para o biomarcador, em que se podem seleccionar mais biomarcadores de diagnóstico da de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Em alguns exemplos, selecciona-se o biomarcador de diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por factor de crescimento básico de

fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor solúvel de interleuquina-6 (sIL-6R), leptina (também designada ob), proteína inflamatória 1 delta de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor solúvel 2 de factor de necrose tumoral (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular das metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular das metaloproteases-2 (TIMP-2), factor-beta 3 de transformação do crescimento (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β). Noutros exemplos, o marcador de diagnóstico da AD é seleccionado de entre o conjunto constituído por BDNF, sIL-6R, IL-8, leptina, MIP-1 δ , PDGF-BB, e TIMP-1. Noutros exemplos ainda, selecciona-se o marcador de diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por sIL-6R, IL-8, e TIMP-1. Noutros exemplos adicionais, selecciona-se o marcador de diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por BDNF, MIP-1 δ , e TIMP-1. Em exemplos adicionais, selecciona-se o marcador de diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES. Em exemplos adicionais, o marcador de diagnóstico da AD inclui BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

São descritos neste documento métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que incluem comparar um teor determinado de pelo menos quatro biomarcadores para o diagnóstico de AD, em que os referidos biomarcadores incluem BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES, numa amostra de um fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, proveniente de um indivíduo, com os teores de referência para cada um destes biomarcadores para diagnóstico de AD. Em alguns exemplos, diagnostica-se a AD quando o teor de BDNF está diminuído em pelos menos 20 % em comparação com um valor de referência para BDNF. Noutros exemplos, diagnostica-se a AD quando o teor em Leptina está diminuído em pelo menos cerca de 25 %, em comparação com o teor de referência em Leptina. Em exemplos adicionais, diagnostica-se a AD quando o teor em RANTES está diminuído em pelo menos cerca de 16 % em comparação com um teor de referência de RANTES. Em outros exemplos adicionais, diagnostica-se uma AD severa quando o teor em PDGF-BB está diminuído em pelo menos cerca de 85 % em comparação com um teor de referência para PDGF-BB. Em exemplos adicionais, a amostra de fluido biológico é uma amostra de fluido biológico periférico.

Proporcionam-se neste documento métodos para monitorizar a progressão da doença de Alzheimer (AD) num paciente com AD, que incluem: comparar-se um teor determinado em pelo menos IGFBP-2 numa amostra de um fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, de um indivíduo, com um teor de referência para este

biomarcador, em que se selecciona mais um biomarcador para diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1 α ; MSP- α ; SCF; TGF- β 3; TNF- β ; MIP-1 δ ; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1 β ; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Em alguns exemplos, selecciona-se o biomarcador para diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido-2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 solúvel de factor de necrose tumoral (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases-2 (TIMP-2), factor-beta 3 de transformação do crescimento (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β). Noutros exemplos, selecciona-se o marcador para diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

Os inventores também criaram métodos de identificação de indivíduos com défice cognitivo ligeiro (MCI), uma patologia clinicamente reconhecida e considerada distinta da AD, na qual o conhecimento e a memória apresentam uma ligeira deficiência. Os inventores verificaram que o teor do biomarcador RANTES é menor em indivíduos com MCI. Podem distinguir-se os indivíduos com MCI dos que tenham AD determinando biomarcadores cujo teor é diminuído nos pacientes com AD, mas não nos indivíduos com MCI (*por exemplo*, Leptina). Deste modo, são descritos neste documento métodos para diagnosticar ou ajudar ao diagnóstico da MCI pela determinação de um valor do teor em RANTES numa amostra de um fluido biológico periférico e pela comparação do teor determinado com um valor de referência. Incluem-se nestes métodos a determinação de um valor do teor em Leptina numa amostra de um fluido biológico periférico, comparando o teor determinado com um valor de referência. A informação obtida deste modo pode ser utilizada para ajudar a diagnosticar ou para diagnosticar a MCI no indivíduo.

Além disto, os inventores criaram métodos para estratificar os pacientes com AD (isto é, classificar indivíduos com um diagnóstico de probabilidade de sofrerem de AD ou com um diagnóstico de AD em classes distintas de AD) por intermédio da determinação de valores de teores em factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e em factor de crescimento homodimérico BB derivado de plaquetas (PDGF-BB) numa amostra de um fluido biológico periférico de um

paciente com AD. Comparam-se os teores medidos nestes dois biomarcadores com valores de referência. Pode utilizar-se a informação obtida deste modo na classificação do diagnóstico de AD (ou diagnóstico de probabilidade de AD) do indivíduo. Deste modo, são descritos neste documento métodos para classificar em extractos a doença de Alzheimer (AD) de cada indivíduo, incluindo compararem-se os valores determinados dos teores em factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e em factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB) numa amostra de fluido biológico proveniente do paciente referido, com valores de referência para BDNF e PDGF-BB. Em alguns exemplos, a amostra de fluido biológico é uma amostra de fluido periférico, incluindo sangue, soro ou plasma. Noutros exemplos, o método inclui também compararem-se valores determinados dos teores em leptina e em RANTES com valores de referência para leptina e para RANTES, em que os valores de referência para BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES se obtêm de amostras de indivíduos com classificações MMSE de entre 25 e 28, sendo que um aumento dos teores em leptina e em PDGF-BB mantendo-se os valores de BDNF e RANTES substancialmente os mesmos indicam uma AD ligeira, tal como indicada por uma classificação de 20-25 no MMSE. Em exemplos adicionais, o método também inclui a comparação entre os teores determinados em leptina e em RANTES com os valores de referência para leptina e para RANTES, em que os valores de referência para BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES provêm de amostras de indivíduos com classificações no MMSE de 20-25, enquanto um decréscimo nos valores para RANTES,

BDNF, e PDGF mantendo-se substancialmente o mesmo valor para a Leptina indicam uma AD moderada, tal como é indicada por uma classificação de 10-20 no MMSE.

Num aspecto, a invenção proporciona métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD") por obtenção de valores quantificados em pelo menos um biomarcador para diagnóstico de AD numa amostra de fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, para um indivíduo, em que o biomarcador para diagnóstico da AD é seleccionado de entre o conjunto constituído por factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido-2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 solúvel de factor de necrose tumoral (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases-2 (TIMP-2), factor-beta 3 de transformação do crescimento (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β), e comparando o teor quantificado com o teor de referência. Em algumas concretizações, obtêm-se teores quantificados para pelo menos dois, três, quatro ou cinco

biomarcadores para diagnóstico da AD. Em algumas concretizações, a comparação entre o valor determinado e o valor de referência inclui calcular-se uma diferença entre o número de vezes entre o valor determinado e o valor de referência. Em algumas concretizações obtém-se o ou os valores quantificando o teor do ou dos biomarcadores para diagnóstico da AD na amostra, enquanto noutras concretizações se obtém o valor quantificado a partir de um terceiro interveniente. Também são proporcionados métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD") por comparação entre um valor quantificado para pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, de um indivíduo, com um teor de referência. São também proporcionados métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD") pela medição do teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico tal como definido nas reivindicações, a partir de um indivíduo, em que um decréscimo em comparação com um teor de referência sugere um diagnóstico da AD.

Noutro aspecto, são descritos métodos para ajudar no diagnóstico de diminuição cognitiva moderada (MCI) obtendo-se um valor quantificado para RANTES numa amostra de fluido biológico periférico de um indivíduo, e comparando o teor determinado com um valor de referência.

O método para ajudar no diagnóstico de MCI também inclui obter-se um valor quantificado para a Leptina na amostra de fluido biológico periférico e comparar-se o valor determinado para a Leptina com um teor de referência. Obtém-se o valor quantificado medindo o teor em RANTES (e/ou em Leptina) na amostra, enquanto em outros aspectos, se obtém ou se obtém o ou os valores quantificados de um interveniente do exterior. São também proporcionados os métodos para ajudar no diagnóstico de diminuição cognitiva moderada (MCI) comparando um valor medido para RANTES, e opcionalmente para a Leptina, numa amostra de fluido biológico periférico de um indivíduo, com valores de referência. São também proporcionados métodos para ajudar no diagnóstico de MCI medindo-se um teor para RANTES, e opcionalmente para Leptina, numa amostra de fluido biológico periférico de um indivíduo, sendo que uma diminuição do teor em RANTES em comparação com o teor de referência sugere um diagnóstico de MCI (em aspectos nos quais se quantifica a Leptina, um teor em Leptina que seja maior ou igual ao teor de referência também sugere MCI).

Num aspecto adicional, a invenção proporciona métodos para monitorizar a progressão da doença de Alzheimer (AD) num paciente com AD, pela obtenção de um valor quantificado para a Leptina numa amostra de fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, e pela comparação do valor referido para a Leptina com um valor de referência. Em determinadas concretizações, obtém-se o valor quantificado medindo o teor em Leptina na

amostra, enquanto noutras concretizações, obtém-se o valor medido de um terceiro interveniente. São também proporcionados métodos para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD comparando um valor medido para Leptina numa amostra de fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, com um valor de referência. São também descritos métodos para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD medindo o teor em Leptina numa amostra de fluido biológico periférico, em que se compara uma diminuição da Leptina com um valor de referência, e uma diminuição sugere progressão (maior severidade) da AD.

Noutro aspecto, são descritos métodos para classificar a AD de um paciente com AD.

A classificação entre AD ligeira e mais avançada é levada a cabo obtendo um valor medido para o teor em factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) numa amostra de fluido biológico periférico a partir de um paciente com AD, e comparando este valor com valores de referência para BDNF.

A classificação da AD em ligeira, moderada e severa é levada a cabo obtendo valores para os teores em BDNF e em factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB), e comparando os valores determinados com valores de referência para BDNF e para PDGF-BB. Obtêm-se os valores determinados medindo-os para BDNF (e para PDGF-BB) na amostra, para se obterem estes valores,

enquanto noutras concretizações, os valores medidos são obtidos de um terceiro. São também proporcionados métodos para classificar a AD num paciente com AD por comparação de um teor em BDNF (e opcionalmente em PDGF-BB) de uma amostra de fluido biológico periférico de um paciente com AD, com um valor de referência para BDNF (e para PDGF-BB quando for apropriado). São também proporcionados métodos para classificar a AD num paciente com AD, medindo o teor em BDNF (e opcionalmente um teor em PDGF-BB) numa amostra de fluido biológico periférico, sendo que um valor pequeno de BDNF (em comparação com um valor de referência) sugere uma AD ligeira, um valor elevado de BDNF (em comparação com um valor de referência) sugere uma AD mais avançada, um valor elevado do teor em BDNF e um valor baixo do teor em PDGF-BB (em comparação com os valores de referência) sugerem uma AD moderada, e um valor elevado de BDNF em conjunto com um valor elevado de PDGF-BB (em comparação com os valores de referência) sugerem uma AD severa.

Em algumas concretizações, a amostra de fluido biológico periférico é uma amostra de sangue. Em determinadas concretizações a amostra de fluido biológico periférico é uma amostra de plasma. Noutras concretizações, a amostra de fluido biológico periférico é uma amostra de soro.

Em mais outro aspecto, são descritos métodos para identificar agentes candidatos para o tratamento da doença de Alzheimer, ensaiando um candidato em perspectiva a

agente quanto à sua actividade na modulação de um biomarcador de AD, em que o biomarcador de AD possa ser seleccionado de entre o conjunto constituído por factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido-2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 solúvel de factor de necrose tumoral (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases-2 (TIMP-2), factor-beta 3 de transformação do crescimento (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β). São proporcionados neste documento métodos para se identificar um agente para o tratamento da doença de Alzheimer, incluindo: ensaiar-se um candidato em perspectiva quanto à sua actividade na modulação de um biomarcador de AD, sendo o referido biomarcador de AD seleccionado de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF;

MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Em alguns exemplos, seleccionam-se os biomarcadores de AD de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES.

Num aspecto adicional, são descritos estojos para diagnosticar a doença de Alzheimer (AD), incluindo pelo menos um reagente que seja específico para um biomarcador para diagnóstico de AD, em que o biomarcador para diagnóstico da AD seja um de entre o conjunto constituído por factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido-2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 solúvel de factor de necrose tumoral (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases-2 (TIMP-2), factor-beta 3 de transformação do crescimento (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β), e instruções para se levar a cabo um método para ajudar no diagnóstico da AD descritas nelas. Descrevem-se neste documento estojos compreendendo pelo menos um reagente específico para pelo menos um marcador para diagnóstico de AD, sendo o referido pelo menos um

biomarcador para o diagnóstico de AD selecionado de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TTMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R, e instruções para se levar a cabo os métodos proporcionados no documento. Além disto, são descritos neste documento conjuntos de valores de referência para os biomarcadores da AD, incluindo os biomarcadores para diagnóstico BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES, e um conjunto de reagentes específicos para biomarcadores de diagnóstico de AD, em que os biomarcadores referidos incluam BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES.

Noutro aspecto, são descritos estojos para se identificarem indivíduos com diminuição cognitiva ligeira (MCI) incluindo pelo menos um reagente específico para RANTES; e instruções para se levar a cabo o método para ajudar no diagnóstico da MCI descritas no documento. Os estojos para se identificarem indivíduos com MCI também podem incluir um reagente específico para a Leptina.

Num outro aspecto ainda, são descritos estojos para monitorizar a progressão da doença de Alzheimer (AD) em pacientes com AD, incluindo pelo menos um reagente específico para a Leptina; e instruções para se levar a

cabo o método de monitorização da progressão da AD descrito no documento.

Num outro aspecto ainda, são descritos estojos para se classificar a doença de Alzheimer (AD) em pacientes, incluindo pelo menos um reagente específico para factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), pelo menos um reagente específico para factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB), e instruções para se levar a cabo um método para classificar um paciente com AD descritos neste documento. Em ainda outros exemplos, os estojos incluem marcadores para diagnóstico da AD seleccionados de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES. Em exemplos adicionais de estojos, o reagente específico para o biomarcador de diagnóstico da AD é um anticorpo, ou um seu fragmento, que seja específico para o referido biomarcador para diagnóstico da AD. Em ainda mais exemplos os estojos incluem pelo menos um reagente específico para um biomarcador que mede as características da amostra.

São descritas neste documento superfícies incluindo, ligado a elas, pelo menos um reagente específico para cada biomarcador de diagnóstico da AD, num conjunto de biomarcadores para diagnóstico da AD, em que o referido conjunto de biomarcadores de diagnóstico da AD inclui BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES. São descritas neste documento superfícies incluindo ligado a elas pelo menos um reagente específico para cada um dos biomarcadores para diagnóstico

da AD num conjunto de biomarcadores para diagnóstico da AD, em que o referido conjunto de biomarcadores para diagnóstico da AD seja constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES; e pelo menos um reagente específico para um biomarcador que consiga medir as características da amostra. Em exemplos adicionais, são descritos neste documento superfícies nas quais o referido reagente específico para o referido biomarcador para diagnóstico da AD seja um anticorpo, ou um seu fragmento, que seja específico para o referido biomarcador para o diagnóstico da AD.

São descritas neste documento combinações que incluem as superfícies tais como se descreveram neste documento, contendo a elas ligado pelo menos um reagente específico para cada um dos biomarcadores para diagnóstico da AD e uma amostra de um fluido biológico periférico de um indivíduo. Em alguns exemplos, o indivíduo terá pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, ou 85 anos de idade.

Descrevem-se neste documento métodos para se obterem valores para se comparar o teor determinado com o teor de referência das amostras de fluido biológico. São descritos formatos legíveis por computador que incluem os valores obtidos pelos métodos descritos neste documento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figs. 1A-1C mostram os resultados de um ELISA para 3 proteínas, a Fig. 1A para BDNF; a Fig. 1B para a Leptina; e a Fig. 1C para a RANTES, selecionadas da lista da Tabela 3 incluída neste documento, nos Exemplos. Compararam-se 95 amostras de plasma de indivíduos portadores de AD e com classificação média em MMSE de 20, e média de idades de 74, com amostras de plasma de 88 indivíduos com idades semelhantes para controlo, apresentando uma classificação média em MMSE de 30. Utilizaram-se testes t não paramétricos, não emparelhados, para comparar a média de concentrações em cada proteína, para se determinar a significância estatística (valor de p).

A Fig. 2 mostra um Gráfico de Barras Celular para a concentração em BDNF no plasma. (Gráfico de Barras Celular Agrupando Variáveis: Barras de Erro por passo: ± 1 Erros Padrão; Critérios de Inclusão: Faíscas do centro All)

Fig. 3 mostra a BDNF no controlo em relação à AD para homens e para mulheres. (Gráfico de Barras Celular Agrupando Variáveis: Doença Separada consoante o Sexo: Barras de Erro do sexo: ± 1 Erros padrão Exclusão de Linhas: Centro All)

A Fig. 4 mostra a concentração em RANTES no plasma. (Gráfico de Barras Celular Agrupando Variáveis: Barras

de Erro por passo: ± 1 Erros Padrão Exclusão de linhas: Centro All)

A Fig. 5 mostra a concentração em Leptina no plasma.
(Gráfico de Barras Celular Agrupando Variáveis: Barras de Erro por passo: ± 1 Erros Padrão Exclusão de linhas: Centro All)

A Fig. 6 mostra a concentração em PDGF-BB no plasma.
(Gráfico de Barras Celular Agrupando Variáveis: Barras de Erro por passo: ± 1 Erros Padrão Exclusão de linhas: Centro All)

A Fig. 7 mostra a concentração em BDNF no plasma.
(Gráfico de Barras Celular Agrupando Variáveis: Barras de Erro por passo: ± 1 Erros Padrão Exclusão de linhas: Centro All)

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

As respostas em relação a inflamações e a lesões estão invariavelmente associadas a uma degeneração dos neurónios na AD, na PD, na demência frontotemporal, na doença cerebrovascular, na esclerose múltipla, e nas neuropatias.

O cérebro e o SCN não são imunologicamente activos em fenómenos próprios, mas também apresentam interacções imunológicas periféricas complexas. Fiala et

al. (1998 Mol. Med., Julho, **4**(7) :480-9) mostraram que na doença de Alzheimer, alterações da permeabilidade da barreira sangue-cérebro e quimiotaxia, em parte mediadas por quimioquinas e citoquinas, podem permitir o recrutamento e a passagem transendotelial de células periféricas para o parênquima cerebral. Um paradigma da barreira sangue-cérebro foi construído utilizando células endoteliais e astrogliais cerebrais com as características anatómicas e fisiológicas observadas *in vivo*. Utilizou-se este modelo para testar a capacidade de monócitos/macrófagos para transmigrarem, quando provocados por A beta 1-42 do lado do cérebro do modelo da barreira sangue-cérebro. Naquele modelo A beta 1-42 e monócitos do lado do cérebro potenciavam a transmigração de monócitos do lado do sangue para o lado do cérebro. Em alguns indivíduos, os monócitos/macrófagos em circulação, quando são recrutados pelas quimioquinas produzidas pelas micróglias e pelos macrófagos, conseguem incrementar a destruição inflamatória do cérebro na doença de Alzheimer.

Os inventores afirmam que a monitorização das concentrações relativas de muitos marcadores segregados, em simultâneo no soro, é um método mais sensível para monitorizar a progressão da doença do que se consegue através da concentração absoluta de um único de entre os marcadores bioquímicos. Trata-se de um compósito ou conjunto envolvendo a utilização em simultâneo de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 marcadores na Tabela 7,

constituído por anticorpos ligados sobre um suporte sólido ou por proteína ligada a um suporte sólido, para a detecção dos marcadores de resposta à inflamação e às lesões associados à degeneração dos neurónios na AD, na PD, na demência frontotemporal, na doença cerebrovascular, na esclerose múltipla, e nas neuropatias.

Os inventores encontraram uma colecção de marcadores bioquímicos (colectivamente denominados "biomarcadores da AD") que é útil para o diagnóstico da AD, para ajudar o diagnóstico da AD, para monitorizar a AD em pacientes com AD (por exemplo, para despistar a progressão da doença em pacientes com AD, o que podem ser útil para despistar o efeito de terapia medicinal ou cirúrgica em pacientes com AD), para classificar os pacientes com AD, e para diagnosticar ou ajudar no diagnóstico de diminuição ligeira do conhecimento (MCI), bem como para diagnosticar ou para ajudar no diagnóstico da diminuição do conhecimento. Os biomarcadores da AD estão presentes nos fluidos biológicos dos indivíduos. Em alguns exemplos, os biomarcadores da AD estão presentes em fluidos biológicos periféricos (por exemplo, no sangue) de indivíduos, permitindo a obtenção de amostras recorrendo a processos relativamente não invasivos, em especial caso se comparem com o processo envolvendo punção lombar que se utiliza habitualmente para se obterem amostras do fluido cerebrospinal.

Definições

Tal como se utilizam neste documento, os termos "paciente com Alzheimer", "paciente com AD", e "indivíduo a que se diagnosticou AD" referem-se todos eles a um indivíduo a que se diagnosticou AD ou a quem foi conferido um diagnóstico de probabilidade de Doença de Alzheimer (AD).

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "biomarcador de AD" refere-se a um biomarcador que seja um biomarcador para o diagnóstico da AD.

O termo "polinucleótido biomarcador da AD", tal como se utiliza neste documento, refere-se a qualquer uma de entre: uma sequência polinucleotídica codificando para um biomarcador da AD, para os elementos de controlo actuando *trans* associados (por exemplo, as sequências genéticas promotora, incrementadora, e outras de regulação), e/ou a mRNA codificando para o marcador da AD.

Tal como se utilizam neste documento, os métodos para "ajudar no diagnóstico" referem métodos que ajudam a obter-se uma determinação médica acerca de presença, ou da natureza, da AD ou da MCI, e que podem ser ou não conclusivos no que toca ao seu diagnóstico definitivo. De acordo com isto, por exemplo, um método para ajudar o diagnóstico da AD pode incluir medir-se a quantidade de um ou mais biomarcadores da AD numa amostra biológica proveniente de um indivíduo.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "classificação" refere-se a distribuir indivíduos por diferentes classes ou estratos, com base nas características relativas a uma doença neurológica. Por exemplo, classificar uma população de indivíduos com doença de Alzheimer envolve atribuir os diversos indivíduos a classes com base na severidade da doença (por exemplo, ligeira, moderada, avançada, etc.).

Tal como se utiliza neste documento, o termo "prever" refere-se a determinar que um indivíduo tem uma probabilidade significativamente maior de desenvolver uma certa doença neurológica.

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "doença neurológica" refere-se a uma doença ou patologia do sistema nervoso central. Incluem-se nas doenças neurológicas a esclerose múltipla, as neuropatias, e as patologias neurodegenerativas tais como a AD, a doença de Parkinson, a esclerose lateral amiotrófica (ALS), a diminuição ligeira do conhecimento (MCI) e a demência frontotemporal.

Tal como se utiliza neste documento, "amostra de fluido biológico" inclui uma série de tipos de amostras fluidas obtidas de um indivíduo, e podendo ser utilizadas num ensaio de diagnóstico ou de monitorização. A definição inclui o sangue, o fluido cerebrospinal (CSF), a urina e

outras amostras líquidas com origem biológica. A definição também inclui amostras que tenham sido manipuladas de uma qualquer forma após a sua obtenção, tal como por tratamento com reagentes, dissolução, ou enriquecimento em determinadas componentes, tais como proteínas ou polinucleótidos.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "amostra de fluido biológico periférico" refere-se a uma amostra de um fluido biológico que não seja proveniente do sistema nervoso central (isto é, que não seja uma amostra de FNC), e inclui amostras de sangue e de outros fluidos biológicos não derivados do SCN.

Uma "amostra de sangue" é uma amostra biológica que é derivada do sangue, preferivelmente sangue periférico (ou circulante). Uma amostra de sangue pode ser, por exemplo, sangue inteiro, plasma ou soro.

Um "indivíduo" é um mamífero, mais preferivelmente um ser humano. Incluem-se nos mamíferos, sem se limitarem a estes, humanos, primatas, animais de quinta, animais de desporto, roedores e animais de estimação.

Um indivíduo "Normal" ou uma amostra de um indivíduo "Normal", tal como se utilizam neste documento para dados quantitativos e qualitativos, referem-se a um indivíduo que tenha sido ou viesse a ser avaliado por um

médico como não portador de AD nem de MCI, e que haja sido avaliado com uma classificação num Mini-Exame do seu Estado Mental (*Mini-Mental State Examination*, MMSE) (citado em Folstein *et al.*, J. Psychiatr. Res. 1975; **12**: 1289-198) ou pudesse vir a obter uma classificação no MMSE na gama de 25-30. Um indivíduo "Normal" tem em geral uma idade semelhante adentro de 5 a 10 anos, incluindo mas não se limitando a um indivíduo com a mesma idade, em relação ao indivíduo que se irá avaliar.

Um "indivíduo com uma AD ligeira" é um indivíduo em relação ao qual (a) haja sido feito um diagnóstico de AD ou um diagnóstico de provável AD, e (b) tenha quer sido avaliado através do Mini-Exame do seu Estado Mental (MMSE) (referido em Folstein *et al.*, J. Psychiatr. Res. 1975; **12**: 1289-198) com uma classificação de 22-27, quer pudesse vir a obter uma classificação de 22-27 num teste por MMSE. Portanto, "AD ligeira" refere-se a uma AD num indivíduo que tenha quer sido examinado pelo MMSE obtendo uma classificação de 22-27, quer pudesse vir a obter uma classificação de 22-27 num teste por MMSE.

Um "indivíduo com uma AD moderada" é um indivíduo ao qual (a) haja sido feito um diagnóstico de AD ou um diagnóstico de provável AD, e (b) tenha quer sido avaliado através do MMSE obtendo uma classificação de 16-21 ou pudesse vir a obter uma classificação de 16-21 num teste por MMSE. Portanto, "AD moderada" refere-se a uma AD num indivíduo que tenha quer sido examinado pelo MMSE obtendo

uma classificação de 16-21, quer pudesse vir a obter uma classificação de 16-21 num teste por MMSE.

Um "indivíduo com AD severa" é um indivíduo ao qual (a) haja sido feito um diagnóstico de AD ou um diagnóstico de provável AD, e (b) tenha quer sido avaliado através do MMSE obtendo uma classificação de 12-15 ou pudesse vir a obter uma classificação de 16-21 num teste por MMSE. Portanto, "AD severa" refere-se a uma AD num indivíduo que tenha quer sido examinado pelo MMSE obtendo uma classificação de 12-15, quer pudesse vir a obter uma classificação de 12-15 num teste por MMSE.

Tal como se utiliza neste documento, o termo "tratamento" refere-se ao alívio, melhoria, e/ou estabilização de sintomas, bem como a um atraso na progressão dos sintomas de uma patologia específica. Por exemplo, o "tratamento" da AD inclui qualquer um ou mais de entre: eliminação de um ou mais sintomas da AD, diminuição de um ou mais sintomas da AD, estabilização dos sintomas da AD (por exemplo, ausência de progressão para estádios mais avançados da AD), e um atraso na progressão (isto é, agravamento) de um ou mais sintomas da AD.

Tal como se utiliza neste documento, a expressão "diferença em número de vezes" refere-se a uma representação numérica da grandeza da diferença entre um valor medido e um valor de referência para um biomarcador da AD. Calcula-se matematicamente a diferença em número de

vezes dividindo o valor numérico medido pelo valor numérico de referência. Por exemplo, no caso em que um valor medido para um biomarcador de AD seja de 20 nanograma/mililitro (ng/mL), e o valor de referência seja 10 ng/mL, a diferença em número de vezes é de 2 ($20/10 = 2$). Em alternativa, quando o valor medido para um biomarcador da AD for de 10 nanograma/mililitro (ng/mL), e o valor de referência for de 20 ng/mL, a diferença em número de vezes é de $10/20$ ou de $-0,50$ ou de -50%).

Tal como se utiliza neste documento, um "valor de referência" pode ser um valor absoluto; um valor relativo; um valor que apresente um limite superior e/ou um limite inferior; uma gama de valores; um valor médio; um valor mediano, um valor médio ou um valor comparado com um valor de um controlo específico ou de uma linha básica. Pode basear-se um valor de referência no valor de uma amostra individual, tal como por exemplo, um valor obtido a partir de uma amostra de um indivíduo com AD, MCI ou diminuição cognitiva, mas numa altura anterior, ou um valor obtido de uma amostra de um paciente com AD diferente do indivíduo que se está a testar, ou de um indivíduo "normal", isto é um indivíduo a quem não se diagnosticou AD. O valor de referência pode ser baseado num grande número de amostras, tal como de pacientes com AD ou de indivíduos normais, ou baseada num conjunto de amostras incluindo ou excluindo a amostra a testar.

Tal como se utiliza neste documento, "um", "uma", "o" e "a" podem referir singular ou plural (isto é, podem significar um, uma, uns ou umas) a não ser que se indique algo em contrário.

Métodos da invenção

Métodos para identificar biomarcadores

Descrevem-se neste documento métodos para identificar um ou mais biomarcadores úteis para o diagnóstico, para ajudar ao diagnóstico, para classificar, para avaliar o risco, monitorizar, e/ou prever uma doença neurológica. Em determinados aspectos da invenção, os teores de um conjunto de biomarcadores são obtidos para um conjunto de amostras de fluido biológico periférico tal como se definem nas reivindicações, provenientes de um ou mais indivíduos. Seleccionam-se as amostras de tal modo que se possam classificar em um ou mais subconjuntos com base na doença neurológica (por exemplo, amostras de indivíduos normais e amostras daqueles a quem foi diagnosticada esclerose lateral amiotrófica ou amostras de indivíduos com doença de Alzheimer ligeira e daqueles com doença de Alzheimer severa). Comparam-se os valores medidos das amostras uns com os outros, para se identificarem os biomarcadores que diferem significativamente entre os subconjuntos. Aquelos marcadores cujos valores diferem significativamente de subconjunto para subconjunto podem então ser utilizados nos métodos para ajudar a

diagnosticar, para diagnosticar, para classificar, para monitorizar, e/ou para prever a doença neurológica. Noutros aspectos da invenção, comparam-se os valores medidos para um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos tal como definidos nas reivindicações, obtidas de um ou mais indivíduos (em que as amostras podem ter sido agregadas em um ou mais subconjuntos com base numa doença neurológica), sendo os biomarcadores que diferem significativamente de subconjunto pra subconjunto uteis para ajudar no diagnóstico, para o diagnóstico, para a classificação, para a monitorização, e/ou para a previsão da doença neurológica. Em mais outros aspectos da invenção, medem-se os valores para um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos tal como se definem nas reivindicações, obtidas a partir de um ou mais indivíduos (em que as amostras podem ser separadas em um ou mias subconjuntos com base numa doença neurológica), para se obterem valores medidos, sendo os biomarcadores cujos valores diferem significativamente de subconjunto para subconjunto úteis para ajudar a diagnosticar, para o diagnóstico, para a classificação, para a monitorização, e/ou para a precisão da doença neurológica.

A invenção em apreço utiliza um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos, tal como se definem nas reivindicações, tais como amostras de sangue, que são obtidas a partir de um ou mais indivíduos. Selecciona-se o conjunto de amostras de tal modo que ele possa ser repartido em um ou mais subconjuntos com base

numa doença neurológica. A divisão em subconjuntos pode ser feita com base na presença/ausência de uma doença, na classificação da doença (por exemplo, ligeira vs. moderada), ou em subclasses da doença (por exemplo, recaída/reincidente vs. reincidência progressiva).

Os biomarcadores medidos na prática da invenção podem ser quaisquer marcadores proteicos biológicos que existam numa amostra de fluido biológico periférico. A Tabela 7 contém uma colecção de exemplos de biomarcadores. Estão descritos neste documento biomarcadores adicionais.

São portanto descritos métodos para identificar um ou mais biomarcadores que se podem utilizar para uma ajuda no diagnóstico, para diagnosticar, detectar, classificar, e/ou prever doenças neurológicas tais como as patologias neurodegenerativas. Os métodos da invenção são levados a cabo obtendo-se um conjunto de valores determinados para uma diversidade de biomarcadores, a partir de um conjunto de amostras de fluido biológico periférico, tal como se define nas reivindicações, em que o conjunto de amostras de fluido biológico periférico é classificável em pelo menos dois subconjuntos, em relação a uma doença neurológica, comparando-se os valores que se determinaram para cada biomarcador entre os subconjuntos, e identificando-se os biomarcadores cujos valores são significativamente diferentes de subconjunto para subconjunto.

O processo de comparação entre os valores determinados pode ser levado a cabo por qualquer método conhecido na técnica, incluindo Análise de Significância de Microconjuntos, Colheita em Árvores (*Tree Harvesting*), CART, MARS, Mapas Auto-Organizantes, Conjunto de Itens Frequentes, ou redes Bayesianas.

Num aspecto, são descritos métodos para se identificar um ou mais biomarcadores úteis para o diagnóstico de uma doença neurológica obtendo-se valores medidos a partir de um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos para diversos biomarcadores, em que o conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos seja divisível em subconjuntos com base numa doença neurológica, comparando os valores medidos em cada subconjunto relativos a pelo menos um biomarcador; e identificando pelo menos um biomarcador para o qual os valores medidos sejam significativamente diferentes nos diferentes subconjuntos. Em algumas concretizações, o processo de comparação é levado a cabo utilizando Análise de Significância de Microconjuntos. Em determinadas concretizações, a doença neurodegenerativa é selecionada de entre o conjunto constituído por doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, e esclerose lateral amiotrófica (ALS).

Noutro aspecto, são descritos métodos para identificar pelo menos um biomarcador útil para ajudar ao diagnóstico de uma doença neurológica obtendo-se valores

medidos a partir de um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos para uma série de biomarcadores, em que o conjunto de amostras de fluido biológico periférico seja divisível em subconjuntos com base numa doença neurológica, comparando os valores medidos para cada subconjunto para pelo menos um biomarcador; e identificando biomarcadores para os quais os valores medidos sejam significativamente diferentes entre os subconjuntos.

Num aspecto adicional, são descritos métodos para identificar pelo menos um biomarcador útil para a classificação de uma doença neurológica obtendo-se valores medidos a partir de um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos para uma série de biomarcadores, em que o conjunto de amostras de fluido biológico periférico seja divisível em subconjuntos com base nas classes de uma doença neurológica, comparando os valores medidos para cada subconjunto para pelo menos um biomarcador; e identificando biomarcadores para os quais os valores medidos sejam significativamente diferentes entre os subconjuntos.

Noutro aspecto, são descritos métodos para identificar pelo menos um biomarcador útil para a monitorização de uma doença neurológica obtendo-se valores medidos a partir de um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos para uma série de biomarcadores, em que o conjunto de amostras de fluido biológico periférico seja divisível em subconjuntos com base nas classes da doença neurológica, comparando os valores medidos para cada

subconjunto para pelo menos um biomarcador; e identificando biomarcadores para os quais os valores medidos sejam significativamente diferentes entre os subconjuntos.

Noutro aspecto ainda, são descritos métodos para identificar pelo menos um biomarcador útil para prever uma doença neurológica obtendo-se valores medidos a partir de um conjunto de amostras de fluidos biológicos periféricos para uma série de biomarcadores, em que o conjunto de amostras de fluido biológico periférico seja divisível em subconjuntos com base numa doença neurológica, comparando os valores medidos para cada subconjunto para pelo menos um biomarcador; e identificando biomarcadores para os quais os valores medidos sejam significativamente diferentes entre os subconjuntos.

Métodos para avaliar a função cognitiva

São descritos neste documento métodos para avaliar a função cognitiva, para avaliar a diminuição cognitiva, para diagnosticar ou ajudar no diagnóstico da diminuição cognitiva obtendo-se teores medidos de ou mais biomarcadores para diagnóstico da AD numa amostra de um fluido biológico proveniente de um indivíduo, tais como por exemplo, uma amostra de um fluido biológico periférico de um indivíduo, e comparando-se esses teores determinados com teores de referência. As referências a "marcadores para o diagnóstico da AD" neste documento são um termo de conveniência que se refere aos marcadores descritos neste

documento e à sua utilização, e que não se pretende que indique que os marcadores são apenas utilizados para diagnosticar a AD. Tal como esta especificação torna claro, estes biomarcadores são úteis para, por exemplo, avaliar a função cognitiva, avaliar a MCI, avaliar o risco de vir a ter AD, classificar a AD, etc. Incluem-se nos biomarcadores da AD, sem que a eles estes se limitem, proteínas segregadas ou metabolitos presentes nos fluidos biológicos de uma pessoa (isto é, numa amostra de fluido biológico), tal como por exemplo, sangue, incluindo sangue inteiro, plasma ou soro; urina; fluido cerebroespinal; lágrimas; e saliva. Incluem-se nas amostras de fluidos biológicos as amostras clínicas, e também as de soro, plasma, e outros fluidos biológicos. Tal como se descreve neste documento, a avaliação de resultados pode depender de se os dados foram obtidos pelos métodos qualitativos ou quantitativos descritos neste documento e/ou pelo tipo de ponto de referência que se utilizar. Por exemplo, tal como se descreve no Exemplo 4, a medição qualitativa dos teores em biomarcadores da AD em relação a outro teor de referência, que pode estar relacionado com o teor de outro biomarcador da AD, pode ser obtida. Noutros métodos descritos neste documento, tal como no Exemplo 7, podem obter-se valores quantitativos ou absolutos, isto é, níveis de concentração proteica numa amostra de fluido biológico. Um resultado ou dado "quantitativo" refere-se a um valor absoluto (veja-se o Exemplo 7), que pode incluir uma concentração num biomarcador em pg/mL ou em ng/mL da molécula na amostra. Um exemplo de um valor quantitativo é o da medição directa da

concentração de níveis proteicos, por exemplo usando ELISA. Um resultado ou dado "qualitativo" proporciona um valor relativo que é tal como comparado com um valor de referência. Em alguns exemplos neste documento (Exemplo 4), avaliam-se as medições qualitativas através da intensidade de um sinal num filtro. Em alguns exemplos neste documento, ligam-se múltiplos anticorpos específicos para biomarcadores da AD a uma superfície adequada, por exemplo uma placa ou um filtro.

Num aspecto, a invenção presente proporciona métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), obtendo-se teores medidos de um ou mais biomarcadores para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico tal como se define nas reivindicações, a partir de um indivíduo, comparando-se os teores medidos com os teores de referência tal como se define nas reivindicações, e em que um dos biomarcadores para diagnóstico da AD seja IGFBP-2. Em alguns exemplos, seleccionam-se mais biomarcadores para diagnóstico da AD de entre o conjunto ilustrado na Tabela 7. Noutros exemplos, seleccionam-se os biomarcadores adicionais para diagnóstico da AD de entre os elementos do conjunto GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF- β 3; TNF- β MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Noutros exemplos ainda, seleccionam-se

os biomarcadores para diagnóstico de AD de entre o conjunto constante da Tabela 3. Em exemplos adicionais (que não fazem parte da invenção presente), seleccionam-se os biomarcadores para diagnóstico da AD de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES. Tal como se mostra neste documento nos exemplos (não fazendo parte da invenção presente), os teores quantitativos em Leptina e em BDNF apresentam uma correlação positiva estatisticamente significativa com as classificações no MMSE; os teores quantitativos em PDGF-BB apresentam uma correlação negativa significativa com as classificações no MMSE em homens (não fazendo parte da invenção presente); e os teores quantitativos em RANTES apresentam uma correlação positiva significativa com os em PDGF-BB e em BDNF (não fazendo parte da invenção presente). Em alguns exemplos (não fazendo parte da invenção presente), os biomarcadores para diagnóstico da AD para utilização nos métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD") e para diagnosticar a AD incluem dois ou mais dos seguintes 4 biomarcadores: BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES. Em mais exemplos (não fazendo parte da invenção presente), os biomarcadores para diagnóstico da AD para utilização nos métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD") e para diagnosticar a AD incluem Leptina e RANTES; Leptina e BDNF; Leptina e PDGF-BB; Leptina, RANTES e BDNF; Leptina, RANTES e PDGF-BB; Leptina, BDNF e PDGF-BB; RANTES e BDNF; RANTES e PDGF-BB; RANTES, BDNF, e PDGF-BB; BDNF e PDGF-BB; ou Leptina, RANTES, BDNF e PDGF-BB. Em alguns exemplos que não fazem parte da invenção presente, os

biomarcadores para diagnóstico da AD para utilização em métodos para ajudar no diagnóstico da AD ou para diagnosticar a AD incluem Leptina, RANTES, BDNF e PDGF-BB. Em outros exemplos que não fazem parte da invenção presente, os biomarcadores para diagnóstico da AD para utilização em métodos para ajudar no diagnóstico da AD ou para diagnosticar a AD são constituídos essencialmente por, ou são constituídos por Leptina, RANTES, BDNF e PDGF-BB.

Os métodos de avaliar a função cognitiva, para ajudar no diagnóstico da AD e para diagnosticar a AD tal como se descrevem neste documento podem incluir qualquer um dos seguintes passos de se obter uma amostra de fluido biológico de um indivíduo, de se medir o teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD na amostra, e de se comparar o teor medido com uma referência apropriada; de se obterem teores medidos de pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra e de se comparar o teor medido com uma referência apropriada; de se compararem os teores medidos para pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD obtido a partir de uma amostra, com uma referência apropriada; de se medir o teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra; de se medir o teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra e se comparar o teor medido com uma referência apropriada; de se diagnosticar a AD com base na comparação dos teores medidos com uma referência apropriada; ou obter-se um valor medido para pelo menos um biomarcador para a AD a partir de uma amostra. Comparar-se

o valor de um biomarcador para diagnóstico da AD com um teor de referência ou obter-se um valor medido para um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra, pode ser levado a cabo para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais biomarcadores para diagnóstico da AD. Também se descrevem métodos para avaliar resultados dos métodos analíticos descritos neste documento. Uma avaliação deste tipo envolve em geral reverem-se esses resultados e pode ajudar, por exemplo, na elaboração de conselhos acerca das opções clínicas e/ou de diagnóstico que se deparam, e/ou de tratamentos. Descrevem-se também métodos para avaliar numa amostra de fluido biológico um indicador de uma ou mais de entre as seguintes: função cognitiva e/ou a sua diminuição; MCI; AD; extensão da AD, tal como, por exemplo, ligeira, moderada, severa; progressão da AD; por medição do teor ou obtenção do teor medido ou por comparação de um teor medido de um biomarcador para diagnóstico da AD tal como se descreve neste documento. Inclui-se nos métodos para avaliar a diminuição cognitiva o ADAS-COG, que é em geral aceite como sendo equivalente à classificação no MMSE.

Para os métodos de diagnóstico da AD tal como se descrevem neste documento, o teor de referência é em geral um valor previamente determinado que se considera 'normal' para cada biomarcador para diagnóstico da AD específico (por exemplo, um valor médio para indivíduos da mesma faixa etária aos quais não haja sido diagnosticada AD), embora também se contemplem valores de referência determinados na mesma altura (por exemplo, um valor de referência

determinado a partir de um conjunto de amostra incluindo a amostra em teste). Proporcionam-se também métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD") comparando um teor medido de pelo menos um biomarcador de diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico, tal como se define nas reivindicações, proveniente de um indivíduo, com um teor de referência.

Proporcionam-se também métodos tal como se definem nas reivindicações, para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), medindo um teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico de um indivíduo. Para os biomarcadores para diagnóstico da AD descritos neste documento, uma medição para um biomarcador que seja inferior ao teor de referência sugere (isto é, ajuda no diagnóstico de) ou indica um diagnóstico de AD.

Noutro aspecto, são descritos métodos de identificar indivíduos com diminuição cognitiva ligeira (MCI), obtendo-se um teor medido quantitativamente para RANTES numa amostra de um fluido biológico, tal como, por exemplo, uma amostra de um fluido biológico periférico de um indivíduo, comparando-se esse teor com um teor de referência. Em geral, o teor de referência para RANTES é um teor predeterminado que se considera 'normal' para RANTES, e pode ser um teor semelhante ao teor normal para RANTES em indivíduos com a mesma idade, embora os teores de referência que sejam determinados contemporaneamente (por

exemplo, um valor de referência derivados de um conjunto de amostras incluindo a amostra que está em teste) também possam ser contemplados. Também se descrevem métodos que ajudam no diagnóstico da MCI comparando um valor quantitativo medido para RANTES numa amostra de um fluido biológico, tal como, por exemplo, uma amostra de um fluido biológico periférico de um indivíduo, com um teor de referência. Também se descrevem métodos para ajudar no diagnóstico da MCI medindo um teor para RANTES numa amostra de um fluido biológico, tal como, por exemplo, uma amostra de um fluido biológico periférico de um indivíduo. Quando se verifica que um teor quantitativo em RANTES é baixo (inferior ao teor de referência) na amostra de fluido biológico, tal como, por exemplo, a amostra de fluido biológico periférico do indivíduo, isto sugere (isto é, ajuda no diagnóstico de) ou indica um diagnóstico de MCI. Estes métodos também incluem medir-se, obter-se, e/ou comparar-se o teor quantitativo em Leptina na amostra de fluido biológico, tal como, por exemplo, uma amostra biológica periférica. Quando tanto os teores em RANTES e em Leptina forem utilizados, verificar-se que o teor quantitativo em RANTES é baixo enquanto o teor quantitativo em Leptina não o é (isto é, é substancialmente o mesmo ou maior do que o valor de referência para Leptina) sugere (isto é, ajuda no diagnóstico de) ou indica um diagnóstico de MCI. Deste modo a descrição dos métodos presentes proporciona métodos para ajudar no diagnóstico de diminuição ligeira do conhecimento (MCI), que incluem comparar-se um teor medido para RANTES numa amostra de

fluido biológico obtida de um indivíduo, com um valor de referência. Em alguns exemplos, os métodos também incluem comparar-se um valor medido para a leptina na amostra de fluido biológico obtida do indivíduo, com um teor de referência. Noutros exemplos ainda, os métodos também incluem medir-se um teor para a leptina na referida amostra de fluido biológico, produzindo-se deste modo o referido valor medido para a leptina. Em ainda outros exemplos, os métodos incluem medir-se um teor para RANTES na referida amostra de fluido biológico, produzindo deste modo o valor medido para RANTES. Em ainda outros exemplos, a amostra de fluido biológico é uma amostra de fluido biológico periférico.

Num aspecto adicional, a invenção proporciona métodos tal como se definem nas reivindicações, para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD. Tal como se mostra no Exemplo 7, os inventores verificaram que os teores quantitativos em RANTES são menores nos pacientes com AD eventualmente portadores de AD (MMSE = 25-28); e que os teores quantitativos em RANTES são menores nos pacientes com AD portadores de AD ligeira (MMSE = 20-25), diminuindo os teores em RANTES ainda mais à medida que a severidade da AD aumenta. Um indivíduo com "AD questionável", tal como se utiliza neste documento para dados quantitativos (também denominados medições absolutas) é um indivíduo ao qual (a) foi diagnosticada AD ou foi atribuído um diagnóstico de AD provável, e (b) ou foi avaliado através do Mini-Exame do Estado Mental (MMSE) (referido em Folstein *et al.*, J.

Psychiatr. Res. 1975; **12**: 1289-198) em que obteve 25-28, ou conseguiria uma classificação de 25-28 num teste de MMSE. Portanto, "AD questionável" refere-se a uma AD num indivíduo classificado com 25-28 no MMSE e/ou que atingiria uma classificação de 25-28 no teste MMSE. O valor de referência pode ser um valor predeterminado que se considere 'normal' em particular para RANTES (por exemplo, um valor médio para indivíduos da mesma faixa etária a quem não tenha sido feito diagnóstico de AD nem de MCI), ou pode ser um teor de referência histórico para o paciente específico (por exemplo, um teor em RANTES que havia sido obtida de uma amostra proveniente do mesmo indivíduo, mas numa altura anterior). Também se contemplam valores de referência determinados contemporaneamente (por exemplo, um valor de referência que seja proveniente de um conjunto de amostras incluindo a amostra que se está a testar). Deste modo, os métodos tais como se descrevem neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD podem incluir obter-se um valor quantitativo para RANTES a partir de uma amostra de um fluido biológico periférico e comparar-se o valor medido com um valor de referência. Também se descrevem métodos para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD por comparação de um valor medido para a leptina numa amostra de fluido biológico periférico com um valor de referência, ou medindo um teor em leptina numa amostra de fluido biológico periférico. Uma diminuição do valor medido indica ou sugere (diagnostica ou sugere um diagnóstico) de progressão (por exemplo, um aumento da severidade) da AD no paciente com AD.

Num aspecto adicional, os inventores verificaram que os teores quantitativos em Leptina são menores em pacientes com AD sofrendo de AD Questionável; e que os teores quantitativos em Leptina decrescem nos pacientes com AD sofrendo de uma AD ligeira, e que os teores quantitativos em Leptina decrescem mais quando a severidade da AD se intensifica; e que os teores quantitativos em Leptina apresentam uma correlação positiva com as classificações no MMSE (tal como se descreve no Exemplo 7). O teor de referência pode ser um teor predeterminado considerado 'normal' para a Leptina específica (por exemplo, um valor médio para indivíduos da mesma faixa etária a quem não haja sido diagnosticada AD nem MCI), ou pode ser um teor de referência do historial específico daquele paciente (por exemplo, um teor em Leptina que houvesse disso obtido para o mesmo indivíduo, mas numa altura anterior). Os teores de referência quantitativos que sejam determinados contemporaneamente (por exemplo, um valor de referência que seja derivado de um conjunto de amostras incluindo a amostra em teste), também são contemplados. Portanto, os métodos tais como os descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD podem incluir obter-se um valor quantitativo medido para a Leptina a partir de uma amostra de um fluido biológico periférico, e comparar-se o valor medido com um valor de referência. Também se proporcionam métodos descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD por comparação de um

valor medido para a Leptina numa amostra de fluido biológico periférico, com um valor de referência. Também são proporcionados métodos tais como os descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD medindo o teor em Leptina numa amostra de fluido biológico periférico. Um decréscimo do valor quantitativo medido indica ou sugere (diagnostica ou sugere um diagnóstico) uma progressão (por exemplo, um aumento da severidade) da AD no paciente com AD.

Os inventores verificaram que os teores quantitativos em BDNF são menores em pacientes de AD com AD ligeira, e que os teores quantitativos em BDNF nas mulheres estão correlacionados com as suas classificações no MMSE e que os teores em BDNF diminuem mais à medida que a severidade da AD se intensifica (tal como se descreve no Exemplo 7). O teor de referência pode ser um teor predeterminado considerado 'normal' para a BDNF específica (por exemplo, um valor médio para indivíduos da mesma faixa etária a quem não haja sido diagnosticada AD nem MCI), ou pode ser um teor de referência do historial específico daquele paciente (por exemplo, um teor em BDNF que houvesse disso obtido para o mesmo indivíduo, mas numa altura anterior). Os teores de referência quantitativos que sejam determinados contemporaneamente (por exemplo, um valor de referência que seja derivado de um conjunto de amostras incluindo a amostra em teste), também são contemplados. Portanto, os métodos tais como os descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD

podem incluir obter-se um valor quantitativo medido para a BDNF a partir de uma amostra de um fluido biológico periférico, e comparar-se o valor medido com um valor de referência. Também se proporcionam métodos descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD por comparação de um valor medido para a BDNF numa amostra de fluido biológico periférico, com um valor de referência. Também são proporcionados métodos tais como os descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD medindo o teor em BDNF numa amostra de fluido biológico periférico. Um decréscimo do valor quantitativo medido indica ou sugere (diagnostica ou sugere um diagnóstico) uma progressão (por exemplo, um aumento da severidade) da AD no paciente com AD.

Os inventores verificaram que os teores quantitativos em PDGF-BB são menores nos pacientes com AD com uma AD Questionável; que os teores em PDGF-BB são menores na AD Questionável em comparação com os da AD ligeira; e que as classificações no MMSE para pacientes do sexo masculino com AD apresentam uma correlação negativa com os teores em PDGF-BB (tal como descritos no Exemplo 7). O teor de referência pode ser um teor predeterminado considerado 'normal' para a PDGF-BB específica (por exemplo, um valor médio para indivíduos da mesma faixa etária a quem não haja sido diagnosticada AD nem MCI), ou pode ser um teor de referência do historial específico daquele paciente (por exemplo, um teor em PDGF-BB que houvesse disso obtido para o mesmo indivíduo, mas numa

altura anterior). Os teores de referência quantitativos que sejam determinados contemporaneamente (por exemplo, um valor de referência que seja derivado de um conjunto de amostras incluindo a amostra em teste), também são contemplados. Portanto, os métodos tais como os descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD podem incluir obter-se um valor quantitativo medido para a PDGF-BB a partir de uma amostra de um fluido biológico periférico, e comparar-se o valor medido com um valor de referência. Também se proporcionam métodos descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD por comparação de um valor medido para a PDGF-BB numa amostra de fluido biológico periférico, com um valor de referência. Também são proporcionados métodos tais como os descritos neste documento para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD medindo o teor em PDGF-BB numa amostra de fluido biológico periférico. Um decréscimo do valor quantitativo medido indica ou sugere (diagnostica ou sugere um diagnóstico) uma progressão (por exemplo, um aumento da severidade) da AD no paciente com AD.

Adicionalmente, são descritos métodos de classificação para os indivíduos a quem se diagnosticou (ou a quem se fez um diagnóstico de probabilidade de) AD. Os inventores verificaram que uma análise dos teores em BDNF, ou em BDNF e PDGF-BB, em amostras de fluidos biológicos, tais como, amostras de fluidos biológicos periféricos, proporciona informação acerca da severidade da AD no

paciente com AD do qual se obteve a amostra de fluido biológico periférico. Os valores de referência para BDNF e para PDGF-BB que se utilizam nestes aspectos são mais em geral obtidos a partir de uma população de pacientes com AD diferentes do paciente com AD do qual provém a amostra em teste (por exemplo, um valor médio ou mediano calculado a partir de um grande número de pacientes com AD), embora também se contemplem teores de referência para BDNF e para PDGF-BB determinados contemporaneamente (por exemplo, valores de referência que sejam obtidos a partir de um conjunto de amostras que inclua a amostra em teste). Deste modo, são descritos métodos para classificar os pacientes com AD em AD ligeira, e em estádios de AD mais avançados (por exemplo, moderada e severa) ("divisão em estádios") obtendo um valor medido para a BDNF, e comparando o valor medido com um valor de referência para a BDNF. São portanto descritos métodos de classificar a AD num paciente com AD através da obtenção de um valor medido para BDNF, e, opcionalmente, para PDGF-BB, numa amostra de um fluido biológico, tal como uma amostra de um fluido biológico periférico, e comparando o teor medido com um teor de referência. São descritos métodos para se classificar a AD num paciente com AD por comparação de um valor medido para BDNF, e, opcionalmente, para PDGF-BB, numa amostra de fluido biológico tal como uma amostra de fluido biológico periférico, e um valor de referência. Também se descrevem métodos para se classificar a AD num paciente com AD medindo BDNF e opcionalmente PDGF-BB, numa amostra de fluido biológico tal como uma amostra de fluido biológico

periférico. Tal como se descreve no Exemplo 4, e nas condições experimentais descritas no Exemplo 4 que proporcionam resultados qualitativos, as amostras cujos teores em BDNF são menores do que o teor de referência sugerem ou indicam uma AD ligeira, enquanto as amostras com teores em BDNF maiores do que o teor de referência sugerem uma AD mais avançada (isto é, AD moderada ou severa). Entre estas amostras com teores em BDNF maiores do que o teor de referência, as que também têm teores em PDGF-BB inferiores ao teor de referência sugerem ou indicam uma AD moderada, enquanto aquelas amostras cujos teores em PDGF-BB também são superiores ao teor de referência sugerem ou indicam AD severa. Verificou-se que para a AD Questionável (classificação no MMSE na gama de 25-28), os teores em Leptina e em PDGF-BB aumentam significativamente enquanto os teores em BDNF e em RANTES não sofrem alterações significativas. Verificou-se que para a AD Ligeira (classificação no MMSE na gama de entre 20-25) a AD Moderada (classificação no MMSE na gama de 10-20), o teor em LEPTINA não declina enquanto os teores em RANTES, BDNF e PDGF-BB declinam. Deste modo, em algumas concretizações (tal como se definem pelas classificações no MMSE acima, do Exemplo 7), é indicada uma AD Ligeira em ensaios quantitativos quando os teores em Leptina e/ou PDGF-BB aumentam significativamente, enquanto os teores em BDNF e RANTES não sofrem alteração significativa em comparação com os da AD Questionável, utilizados como referência. Deste modo, em algumas concretizações, (tal como se definem pelas classificações no MMSE acima, do Exemplo 7), a AD Moderada

está indicada quando os teores em Leptina não declinam enquanto os teores para RANTES, BDNF e PDGF declinam, em comparação com os da AD ligeira a título de referência. Deste modo, proporcionam-se neste documento métodos que incluem compararem-se valores medidos para os teores em RANTS e em Leptina numa amostra de fluido biológico proveniente do paciente referido, com valores de referência para os teores em RANTES e em Leptina; comparando valores medidos para factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), Leptina, e RANTES, os teores numa amostra de um fluido biológico do paciente referido, com os valores de referência para os teores em BDNF, Leptina, e RANTES; comparando os valores dos teores medidos para Leptina e para o factor de crescimento homodimérico BB derivado de plaquetas (PDGF-BB) numa amostra de fluido biológico proveniente do paciente referido, com os valores de referência para a Leptina e para PDGF-BB. Deste modo, são descritos métodos para classificar a doença de Alzheimer (AD) num indivíduo, que incluem comparar os valores medidos para os teores em factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB), numa amostra de fluido biológico proveniente do referido paciente, com valores de referência para teores em BDNF e em PDGF-BB. Em alguns exemplos, os métodos também incluem comparar os valores medidos para teores em leptina e em Rantes, com os valores de referência para os teores em leptina e em Rantes, em que os valores de referência para os teores em BDNF, PDGF-BB, leptina e Rantes provêm de amostras de indivíduos com classificações

no MMSE de entre 25 e 28, sendo que um aumento dos teores em leptina e em PDGF-BB e uma manutenção substancial dos teores em BDNF e em RANTES, indicam uma AD ligeira, tal como será indicada por uma classificação de 20-25 no MMSE.

São descritos métodos que também incluem compararem-se valores medidos para teores em leptina e em Rantes com valores de referência para teores em leptina e em Rantes, em que os valores de referência para BDNF, PDGF-BB, leptina e Rantes provenham de amostras de indivíduos com classificações no MMSE de 20-25, sendo que uma diminuição dos valores para os teores em Rantes, BDNF, e PDGF mantendo-se os valores para a Leptina substancialmente constantes indicam uma AD moderada, tal como seria indicada por uma classificação no MMSE de 10-20. Um biomarcador da AD que permanece "substancialmente constante" significa que não existe uma sua alteração significativa, mantendo-se os valores substancialmente os mesmos. Em algumas concretizações, substancialmente constante significa uma alteração inferior a cerca de 12 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 %. Em algumas concretizações, uma alteração significativa significa não estatisticamente significativa utilizando os métodos padrão da técnica. Os métodos descritos acima também são aplicáveis a métodos para avaliar a progressão da AD. Entende-se que a função cognitiva indicada pelos marcadores neste documento pode provir de outras medições, com resultados ou indícios que correspondam a um nível de função cognitiva aproximadamente constante tal como aquele

que é proporcionado pelas classificações no MMSE que são proporcionadas neste documento.

A invenção presente também proporciona métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que incluem a comparação de um teor medido para pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD, numa amostra de fluido biológico periférico, tal como se define nas reivindicações, proveniente de um indivíduo, com um teor de referência para esse biomarcador correspondente ao medido, em que o pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD seja IGFBP-2 e mais qualquer uma ou mais das proteínas listadas na Tabela 7, e tenha uma correlação positiva estatisticamente significativa com as classificações no MMSE, que seja comparável à correlação de BDNF e/ou de Leptina com as classificações no MMSE, e em que o pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD não tenha uma correlação estatística com a idade. Afirmar que um biomarcador para diagnóstico da AD apresenta uma correlação positiva estatisticamente significativa com as classificações no MMSE que é comparável com a correlação entre os valores de BDNF e/ou de leptina e as classificações no MMSE, significa que este biomarcador é um marcador para o diagnóstico da AD. Em alguns exemplos, selecciona-se o biomarcador adicional para diagnóstico da AD de entre o conjunto de biomarcadores constituído por GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF;

BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF- β 3; TNF- β ; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R, e noutros exemplos ele é seleccionado de entre o conjunto de biomarcadores constituído por factor básico de crescimento de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento homodimérico BB derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa proteica estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases-2 (TIMP-2), factor beta 3 de crescimento transformante (TGF- β 3), e factor de necrose tumoral beta (TNF- β).

Os resultados da comparação entre o ou os valores medidos e o ou os valores das referências, são utilizados para diagnosticar ou para ajudar no diagnóstico da AD ou de MCI, para classificar os pacientes com AD de acordo com a severidade da sua doença, ou para monitorizar a progressão da AD num paciente com AD. Deste modo, quando a comparação indicar uma diferença entre o ou os valores medidos e o ou

os valores de referência que sugira/indique AD ou MCI, o diagnóstico apropriado fica feito ou foi ajudado. Ao invés, quando a comparação entre o ou os valores medidos e o ou os valores de referência não indicar diferenças que sugiram ou indiquem um diagnóstico de AD ou de MCI, então o diagnóstico apropriado não fica feito nem foi ajudado. De igual modo, quando a comparação entre um teor medido em Leptina numa amostra proveniente de um paciente com AD seja menor em comparação com o valor de referência, o diagnóstico da progressão da AD do paciente fica feito ou sofreu uma ajuda. À semelhança disto, quando a comparação do teores em BDNF e em PDGF-BB numa amostra obtida de um paciente com AD indicar ou sugerir um determinado estágio da AD, o diagnóstico do estágio específico de AD (ligeiro, moderado ou severo) sofre uma ajuda ou fica feito.

Tal como será entendido pelos especialistas da técnica, quando na prática dos métodos de diagnóstico de AD da invenção (isto é, métodos para o diagnóstico ou para ajudar no diagnóstico da AD), se utilizar mais do que um biomarcador para diagnóstico da AD mas os biomarcadores não sugerirem de um modo unânime um diagnóstico da AD, a sugestão ou indicação correspondente à 'maioria' (por exemplo, quando o método utilizar cinco biomarcadores para o diagnóstico da AD, 3 dos quais sugiram/indiquem AD, deve considerar-se o resultado como sugerindo ou indicando um diagnóstico da AD para o indivíduo) é considerada como sendo o resultado do ensaio. No entanto, em algumas concretizações nas quais os valores medidos para pelo menos

dois biomarcadores para o diagnóstico da AD forem obtidos, e em que um dos valores obtidos se refira à Leptina, o valor medido para a Leptina tem que ser menor do que o valor de referência para se indicar ou sugerir um diagnóstico de AD. Tal como será entendido por especialistas da técnica, os métodos descritos neste documento podem incluir quaisquer de entre uma variedade de marcadores biológicos (que podem ser biomarcadores da AD ou não) para determinar a integridade e/ou as características da ou das amostras biológicas. Por exemplo, os teores em Leptina, que são em geral mais elevados para indivíduos do sexo feminino, podem ser medidos a título de marcadores do género.

Em determinadas concretizações da invenção, obtêm-se os teores para os biomarcadores da AD a partir de um indivíduo em mais do que uma altura ao longo do tempo. Este tipo de amostragem "em série" adequa-se bem aos aspectos da invenção que se relacionam com a monitorização da progressão da AD num paciente com AD. Pode levar-se a cabo a amostragem em série em qualquer altura, por exemplo mensalmente ao trimestre (isto é, de três em três meses), duas vezes ao ano, anualmente, de dois em dois anos, ou menos frequentemente. A comparação entre os valores dos teores medidos e o teor de referência pode ser levada a cabo de cada vez que se obtiver uma nova amostra, ou podem guardar-se os dados relativos aos teores para se fazer uma análise menos frequente.

Tal como os entendidos na técnica compreenderão, obtêm-se habitualmente amostras de fluidos biológicos periféricos tal como se definem nas reivindicações, de indivíduos que se suspeita serem portadores de AD, ou de estarem a desenvolver AD ou MCI. A invenção também contempla amostras de indivíduos para os quais a avaliação cognitiva seja pretendida. Em alternativa, os indivíduos (ou outros envolvidos por exemplo em investigação e/ou médicos, podem pretender estas avaliações proporcionando nenhuma indicação de AD, suspeita de AD, em risco de AD. Por exemplo, um indivíduo normal pode pretender obter informação deste tipo. Tais indivíduos têm em geral idades de 65 anos, ou mais, embora os indivíduos a partir dos quais se obtêm amostras de fluidos biológicos, tais como amostras de fluidos biológicos periféricos, para utilização nos métodos da invenção, possam ter tão poucos como 35 a 40 anos de idade, quando se suspeitar AD de início precoce ou de AD familiar.

Também se descrevem métodos de despiste de candidatos a agentes para o tratamento da AD e/ou da MCI através do ensaio dos candidatos em perspectiva a agentes quanto à sua actividade na modulação dos biomarcadores da AD. Pode levar-se a cabo o ensaio de despiste *in vitro* e/ou *in vivo*. Os agentes candidatos identificados nos métodos de despiste descritos neste documento podem ser úteis a título de agentes terapêutico para o tratamento da AD e/ou da MCL

A probabilidade P de que um conjunto seja melhor agente de previsão do que qualquer subconjunto de biomarcadores presentes nesse conjunto pode exprimir-se matematicamente como:

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \dots (1 - P_n)$$

Em que as probabilidades P_1, P_2, P_n representem as probabilidades de os marcadores individuais serem capazes de prever fenótipos clínicos, e em que $1 - P_n$ represente o complemento dessa probabilidade. Qualquer subconjunto do compósito terá portanto um valor menor de P .

As concentrações relativas no soro, CSF, ou noutros fluidos, dos biomarcadores enumerados na Tabela 7 a título de um compósito, ou um colectivo, ou de um qualquer subconjunto de um tal compósito, constituído por 5 (cinco) ou mais elementos, é melhor agente de previsão do que a concentração absoluta de qualquer marcador individual, para a previsão de fenótipos clínicos, para a detecção de doenças, para a classificação das AD, para a monitorização, e para o tratamento da AD, da PD, da demência frontotemporal, de doença cerebrovascular, de esclerose múltipla, e de neuropatias.

Biomarcadores para diagnóstico da AD

Os mecanismos imunológicos são uma parte essencial do sistema de defesa do hospedeiro e figuram

tipicamente de um modo proeminente na reacção inflamatória. Um número crescente de estudos tem vindo a revelar ligações intrigantes entre o sistema imunológico e o SCN. Por exemplo, tornou-se claro que o SCN não se encontra completamente ao abrigo da vigilância imunológica e que diversas células imunológicas conseguem atravessar a barreira sangue-cérebro. Os leucócitos invasores conseguem atacar antígenos alvo no SCN, ou produzir factores de crescimento que poderiam proteger neurónios contra degeneração (Hohlfeld *et al.*, 2000, *J. Neuroimmunol.* **107**, 161-166). Estas reacções são suscitadas através de uma série de mediadores proteicos, incluindo mas não se limitando a citocinas, quimioquinas, factores neurotróficos, colectinas, quininas, e proteínas da fase aguda nos sistemas imunológico e inflamatório, em comunicação intercelular através de neurónios, células gliais, células endoteliais e leucócitos. Sem qualquer limitação por nenhuma teoria, tece-se a hipótese de que as citocinas, quimioquinas, factores neurotróficos, colectinas, quininas, e proteínas da fase aguda que se listam na Tabela 7 são expressas de um modo diferencial no soro associado a doenças neurodegenerativas e inflamatórias tais como as doenças de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose Múltipla, e nas neuropatias. As citocinas são um conjunto heterogéneo de mediadores polipeptídicos que têm disso associados à activação de numerosas funções, incluindo o sistema imunológico e as reacções inflamatórias. As citocinas periféricas também penetram através da barreira sangue-cérebro directamente recorrendo

a mecanismos de transporte activos ou indirectamente por intermédio de estimulação do nervo vago. As citocinas podem actuar de um modo autócrino, afectando o comportamento da célula que liberta a citocina, ou de um modo parácrino, afectando o comportamento das células adjacentes. Algumas citocinas conseguem actuar de um modo endócrino, afectando o comportamento de células distantes, embora tal dependa da sua capacidade de entrar na circulação, e da sua vida média. Incluem-se nas famílias das citocinas, sem que elas se limitem a estas, as interleuquinas (IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-1ra e IL-2 a IL-18), os factores de necrose tumoral (TNF-alfa e TNF-beta), os interferões (TNF-alfa, beta e gama), os factores de estimulação de colónias (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3 e algumas das outras IL), e os factores de crescimento (EGF, FGF, PDGF, TGF alfa, os TGF beta, BMP, GDF, CTGF, e ECGF).

Os inventores verificaram a existência de uma série de marcadores bioquímicos presentes nos fluidos periféricos do organismo, que se podem utilizar para avaliar a função cognitiva, incluindo diagnósticos ou ajudas no diagnóstico da AD. Estes "marcadores para o diagnóstico da AD" incluem, mas não se limitam a GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Noutros

exemplos, estes "biomarcadores para o diagnóstico da AD" são: factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 do crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor da interleuquina 6 solúvel (sIL-6R), Leptina (também denominada ob), proteína 1 beta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases-1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases-2 (TIMP-2), factor beta de crescimento transformante (TGF- β 3), factor beta de necrose tumoral (TNF- β). Noutros exemplos, incluem-se nos marcadores para diagnóstico da AD um ou mais de entre Leptina, RANTES, PDGF-BB e BDNF.

Os biomarcadores para diagnóstico da AD revelados pelos inventores são todos eles moléculas conhecidas. O factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) está descrito, por exemplo em Rosenthal et al., 1991, *Endocrinology* **129**(3): 1289-94. O factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) está descrito, por exemplo em Abraham et al., 1986, *EMBO J.* **5**(10): 2523-28. O factor de crescimento epidérmico (EGF) está descrito, por exemplo em Gray et al., 1983, *Nature* **303** (5919): 722-25. O factor 6 de

crescimento de fibroblastos (FGF-6) está descrito, por exemplo em Marics *et al.*, 1989, *Oncogene* **4**(3): 335-40. A interleuquina-3 (IL-3) está descrito, por exemplo em Yang *et al.*, 1986, *Cell* **47**(1): 3-10. O receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R) está descrito, por exemplo em Taga *et al.*, 1989, *Cell* **58**(3):573-81. A leptina (também denominada "ob") está descrito, por exemplo em Masuzaki *et al.* 1995, *Diabetes* **44**(7): 855-58. A proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ) está descrito, por exemplo em Wang *et al.*, 1998, *J. Clin. Immunol.* **18**(3): 214-22. A cadeia alfa de proteína estimulante de macrófagos (MSP- α) está descrito, por exemplo em Yoshimura *et al.*, 1993, *J. Biol. Chem.* **268**(21), 15461-68, e em Yoshikawa *et al.*, 1999, *Arch. Biochem. Biophys.* **363**(2): 356-60. O péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2) está descrito, por exemplo em Walz *et al.*, 1991, *Adv. Exp. Med. Biol.* **305**: 39-46. A neurotrofina-3 (NT-3) está descrito, por exemplo em Hohn *et al.*, 1990, *Nature* **344** (6264): 339-41. O factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB) está descrito, por exemplo em Collins *et al.*, 1985, *Nature* **316**(6030): 748-50. RANTES está descrita, por exemplo em Schall *et al.*, 1988, *J. Immunol.* **141**(3): 1018-25. O factor de células estaminais (SCF) está descrito, por exemplo em Zsebo *et al.*, 1990, *Cell* **63**(1): 213-24. O receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII) está descrito, por exemplo em Schall *et al.*, 1990, *Cell* **61**(2): 361-70. O factor de crescimento transformante beta 3 (TGF- β 3) está descrito, por exemplo em Dijke *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** (13): 4715-19. O

inibidor tecidual de metaloproteases-1 (TIMP-1) está descrito, por exemplo em Docherty *et al.*, 1985, Nature **318** (6041): 66-69 e em Gasson *et al.*, 1985, Nature **315** (6022): 768-71. O inibidor tecidual de metaloproteases-2 (TIMP-2) está descrito, por exemplo em Stetler-Stevenson *et al.*, 1190, J. Biol. Chem. **265**(23): 13933-38. O factor de necrose tumoral beta (TNF- β) está descrito, por exemplo em Gray *et al.*, 1984, Nature **312**(5996): 721-24. A trombopoietina (TPO) está descrita, por exemplo em Foster *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**(26): 13023-27.

Embora os inventores tenham conseguido níveis aceitáveis de sensibilidade e de especificidade utilizando um único biomarcador para diagnóstico da AD na prática dos métodos de diagnóstico da AD, a eficácia (por exemplo, a sensibilidade e/ou a especificidade) dos métodos do diagnóstico da AD da invenção em apreço sofre em geral um incremento quando se utilizam pelo menos dois biomarcadores para diagnóstico da AD. Em alguns exemplos, os métodos para diagnóstico da AD da invenção em apreço sofrem em geral um incremento quando se utilizam pelo menos quatro biomarcadores para diagnóstico da AD. Podem seleccionar-se diversos biomarcadores para diagnóstico da AD a partir dos biomarcadores para diagnóstico da AD descritos neste documento, por uma série de métodos, incluindo o do seu "valor de q" e/ou seleccionado para diversidade no conjunto. Podem seleccionar-se biomarcadores para o diagnóstico da AD com base no seu "valor de q", um valor estatístico que os inventores derivaram quando

identificaram os biomarcadores para diagnóstico da AD (veja-se a Tabela 3 no Exemplo 1). Os "valores de q" para a selecção dos biomarcadores para diagnóstico da AD variam entre menos do que cerca de 0,0001 e cerca de 0,05 e em alguns exemplos, variam entre cerca de 0,01 e cerca de 0,05. Em alternativa (ou adicionalmente), podem seleccionar-se os biomarcadores para o diagnóstico da AD de modo a conservar a diversidade do conjunto. Os inventores separaram os biomarcadores para o diagnóstico da AD em diversos conjuntos (veja-se a Tabela 1). Neste caso os conjuntos são formados através de medições qualitativas para cada um dos biomarcadores que se correlacionam entre si mais de perto. Tal como se utiliza neste documento, "correlaciona" ou "correlação" significa uma alteração em simultâneo dos valores de duas variáveis numéricas aleatórias tais como as classificações no MMSE e as concentrações quantitativas em proteínas ou as concentrações qualitativas em proteínas. Tal como se utiliza neste documento, "discriminar" ou "discriminatório" referem-se às diferenças quantitativas ou qualitativas entre duas ou mais amostras, no que toca a uma determinada variável. O conjunto que se aproxima doutro conjunto é o conjunto que mais de perto se correlaciona com o conjunto original. As correlações entre os biomarcadores e entre conjuntos, podem ser representadas por uma árvore hierárquica gerada por uma aglomeração não supervisionada utilizando um programa público baseado na internet que se denomina wCLUTO, disponível em: cluto.ccgb.umn.edu/cgi-bin/wCluto/wCluto.cgi. Quando se seleccionar mais do que um

biomarcador para diagnóstico da AD para ser testado, em alguns exemplos, os biomarcadores para diagnóstico da AD seleccionados apresentam pelo menos uma diferenciação parcial (isto é, os biomarcadores para do diagnóstico da AD representam pelo menos dois aglomerados diferentes, por exemplo, um conjunto de biomarcadores para diagnóstico da AD que inclui Leptina, BDNF e/ou PDGF-BB do aglomerado 4 na Tabela 1 e RANTES do aglomerado 3 da Tabela 1), e em alguns casos os biomarcadores para diagnóstico da AD são completamente diferentes (isto é, nenhum par de entre os biomarcadores para diagnóstico da AD que se seleccionaram pertence ao mesmo aglomerado). Deste modo, a invenção proporciona uma série de concretizações diferentes para ajudar no diagnóstico da AD.

TABELA 1

Aglomerado	Biomarcador
0	bFGF
1	TPO
2	FGF-6
	IL-3
	sIL-6R
	MIP-1d
	sTNF RII
	TNF-b
3	RANTES
	TIMP-1
	TIMP-2
4	BDNF

Aglomerado	Biomarcador
	EGF
	LEPTINA (OB)
	MSP- α
	NAP-2
	NT-3
	PDGF-BB
	SCF
	TGF-b3

Em algumas concretizações, obtém-se o teor em um único biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico, e compara-se o valor obtido com um valor de referência, para ajudar a diagnosticar a AD. Quando se obtém um valor medido para um único biomarcador para diagnóstico da AD na prática da invenção, este teor medido diz respeito a RANTES na amostra de fluido biológico periférico.

Noutras concretizações, determinam-se os teores em pelo menos dois biomarcadores para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico, e comparam-se com valores de referência para ambos os marcadores. Deste modo, a invenção proporciona métodos para ajudar no diagnóstico da AD pela medição dos teores em pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, ou 20 biomarcadores para diagnóstico da AD, comparando-se os teores medidos com os valores de referência tais como se definem nas reivindicações. Nas concretizações exemplificativas

utilizam-se 2, 3, 4, ou 5 biomarcadores para diagnóstico da AD. Também se descrevem neste documento métodos para ajudar no diagnóstico da AD medindo os teores em pelo menos Leptina, RANTES, BDGF, e PDGF-BB.

Para aquelas concretizações em que se utiliza mais do que um biomarcador para diagnóstico da AD (isto é, aquelas concretizações em que os valores medidos são obtidos para mais do que um biomarcador para diagnóstico da AD), incluem-se nas combinações exemplificativas de biomarcadores para diagnóstico da AD tais como os que se listam na Tabela 3, (1) Leptina em combinação com qualquer um dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD (isto é, Leptina e BDNF, Leptina e bFGF, Leptina e EGF, Leptina e FGF-6, Leptina e IL-3, Leptina e sIL-6R, Leptina e MIP-1 δ , Leptina e MSP- α , Leptina e NAP-2, Leptina e NT-3, Leptina e PDGF-BB, Leptina e RANTES, Leptina e SCF, Leptina e sTNR RII, Leptina e TGF- β 3, Leptina e TIMP-1, Leptina e TIMP-2, Leptina e TNF- β , e Leptina e TPO), (2) RANTES em combinação com qualquer um dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD (isto é, RANTES e BDNF, RANTES e bFGF, RANTES e EGF, RANTES e FGF-6, RANTES e IL-3, RANTES e sIL-6R, RANTES e Leptina, RANTES e MIP-1 δ , RANTES e MSP- α , RANTES e NAP-2, RANTES e NT-3, RANTES e PDGF-BB, RANTES e SCF, RANTES e sTNR RII, RANTES e TGF- β 3, RANTES e TIMP-1, RANTES e TIMP-2, RANTES e TNF- β , e RANTES e TPO); (3) PDGF-BB e qualquer um dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD (isto é, PDGF-BB e BDNF, PDGF-BB e bFGF, PDGF-BB e EGF, PDGF-BB e FGF-6, PDGF-BB e IL-3, PDGF-BB e sIL-6R, PDGF-BB e Leptin,

PDGF-BB e MIP-1 δ , PDGF-BB e MSP- α , PDGF-BB e NAP-2, PDGF-BB e NT-3, PDGF-BB e RANTES, PDGF-BB e SCF, PDGF-BB e sTNR RII, PDGF-BB e TGF- β 3, PDGF-BB e TIMP-1, PDGF-BB e TIMP-2, PDGF-BB e TNF- β , e PDGF-BB e TPO); (4) BDNF em combinação com qualquer um dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD (isto é, BDNF e bFGF, BDNF e EGF, BDNF e FGF-6, BDNF e IL-3, BDNF e sIL-6R, BDNF e Leptina, BDNF e MIP-1 δ , BDNF e MSP- α , BDNF e NAP-2, BDNF e NT-3, BDNF e PDGF-BB, BDNF e RANTES, BDNF e SCF, BDNF e sTNR RII, BDNF e TGF- β 3, BDNF e TIMP-1, BDNF e TIMP-2, BDNF e TNF- β , e BDNF e TPO); (5) RANTES, PDGF-BB, e NT-3; (6) Leptina, PDGF-BB, e RANTES; (7) BDNF, PDGF-BB, e RANTES; (8) BDNF, Leptina, e RANTES; (9) BDNF, Leptina, e PDGF-BB; (10) PDGF-BB, EGF, e NT-3; (11) PDGF-BB, NT 3, e Leptina; (12) BDNF, Leptina, PDGF-BB, RANTES; e (13) RANTES, PDGF-BB, NT-3, EGF, NAP-2, e Leptina. Incluem-se em combinações adicionais de biomarcadores para o diagnóstico da AD (14) Leptina em conjunto com qualquer dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD descritos neste documento (isto é, Leptina e GCSF, Leptina e IFN- γ , Leptina e IGFBP-1, Leptina e BMP-6, Leptina e BMP-4, Leptina e Eotaxina-2, Leptina e IGFBP-2, Leptina e TARC, Leptina e ANG, Leptina e PARC, Leptina e Acrp30, Leptina e AgRP(ART), Leptina e ICAM-1, Leptina e TRAIL R3, Leptina e uPAR, Leptina e IGFBP-4, Leptina e IL-1Ra, Leptina e AXL, Leptina e FGF-4, Leptina e CNTF, Leptina e MCP-1, Leptina e MIP1b, Leptina e VEGF-B, Leptina e IL-8, Leptina e FAZ, e Leptina e EGF-R), (15) RANTES em conjunto com qualquer dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD descritos neste documento (isto é,

RANTES e GCSF, RANTES e IFN- γ , RANTES e IGFBP-1, RANTES e BMP-6, RANTES, e BMP-4, RANTES e Eotaxina-2, RANTES e IGFBP-2, RANTES e TARC, RANTES e ANG, RANTES e PARC, RANTES e Acrp30, RANTES e AgRP(ART), RANTES e ICAM-1, RANTES e TRAIL R3, RANTES e uPAR, RANTES e IGFBP-4, RANTES e IL-1Ra, RANTES e AXL, RANTES e FGF-4, RANTES e CNTF, RANTES e MCP-1, RANTES e MIP1b, RANTES e VEGF-B, RANTES e IL-8, RANTES e FAZ, e RANTES e EGF-R), (16) PDGF-BB em conjunto com qualquer dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD descritos neste documento (isto é, PDGF-BB e GCSF, PDGF-BB e IFN- γ , PDGF-BB e IGFBP-1, PDGF-BB e BMP-6, PDGF-BB e BMP-4, PDGF-BB e Eotaxina-2, PDGF-BB e IGFBP-2, PDGF-BB e TARC, PDGF-BB e ANG, PDGF-BB e PARC, PDGF-BB e Acrp30, PDGF-BB e AgRP(ART), PDGF-BB e ICAM-1, PDGF-BB e TRAIL R3, PDGF-BB e uPAR, PDGF-BB e IGFBP-4, PDGF-BB e IL-1Ra, PDGF-BB e AXL, PDGF-BB e FGF-4, PDGF-BB e CNTF, PDGF-BB e MCP-1, PDGF-BB e MIP1b, PDGF-BB e VEGF-B, PDGF-BB e IL-8, PDGF-BB e FAZ, e PDGF-BB e EGF-R), (17) BDNF em conjunto com qualquer dos outros biomarcadores para o diagnóstico da AD descritos neste documento (isto é, BDNF e GCSF, BDNF e IFN- γ , BDNF e IGFBP-1, BDNF e BMP-6, BDNF e BMP-4, BDNF e Eotaxina-2, BDNF e IGFBP-2, BDNF e TARC, BDNF e ANG, BDNF e PARC, BDNF e Acrp30, BDNF e AgRP(ART), BDNF e ICAM-1, BDNF e TRAIL R3, BDNF e uPAR, BDNF e IGFBP-4, BDNF e IL-1Ra, BDNF e AXL, BDNF e FGF-4, BDNF e CNTF, BDNF e MCP-1, BDNF e MIP1b, BDNF e VEGF-B, BDNF e IL-8, BDNF e FAS e BDNF e EGF-R).

Medição dos teores em biomarcadores da AD

Existem diversos testes estatísticos para identificar biomarcadores que variam significativamente entre os subconjuntos, incluindo o teste t convencional. No entanto, à medida que aumenta o número de biomarcadores medidos, é em geral vantajoso utilizar uma *técnica mais sofisticada, tal como SAM* (veja-se Tusher et al., 2001, Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. **98**(9): 5116-21). Incluem-se em outras técnicas úteis a Colheita de Árvore (Hastie et al., Genome Biology 2001, **2**: research 0003.1-0003.12), Mapas Auto Organizantes (Kohonen, 1982b, Biological Cybernetics **43**(1): 59-69), Conjunto de Itens Frequentes (Agrawal et al., 1993 "*Mining association rules between sets of items in large databases*", em Proc. of the ACM SIGMOD Conference on Management of Data, páginas 207-216, Washington, D.C., Maio de 1993), Redes Bayesianas (Gottardo, Statistical analysis of microarray data, A Bayesian approach. Biostatistics (2001), **1**, 1, páginas 1-37), e os conjuntos de programas comercialmente disponíveis CART e MARS.

A técnica SAM atribui uma classificação a cada biomarcador, com base na alteração da expressão relativa ao desvio padrão em medições repetidas. Para biomarcadores com classificações maiores do que um limiar ajustável, o algoritmo utiliza permutações das medições repetidas para estimar a probabilidade de se haver identificado um biomarcador determinado ao acaso (calculado com um "valor de q "), ou uma taxa de falsos positivos que se utiliza para medir a exactidão. A técnica SAM pode ser levada a cabo utilizando um programa disponível ao público denominado

Significance Analysis of Microarrays (veja-se www-stat-class.stanford.edu/~tibs/clickwrap/sam.html).

Considera-se "identificado" como útil um biomarcador, para ajudar no diagnóstico, para o diagnóstico, para a classificação, para monitorizar, e/ou para prever uma doença neurológica, quando ele é significativamente diferente para diferentes subconjuntos das amostras biológicas periféricas que se testam. Os teores num biomarcador são "significativamente diferentes" quando a probabilidade de esse biomarcador específico ter sido identificado por acaso for inferior a um valor predeterminado. O método de calcular essa probabilidade dependerá do método exactamente utilizado para comparar os teores entre os diferentes subconjuntos (por exemplo, caso de utilize SAM, o valor de q dará a probabilidade de uma identificação errónea, e o valor de p dará essa probabilidade quando se utilizar o teste t (ou uma análise estatística semelhante). Tal como o entenderão os especialistas na técnica, o valor predeterminado variará dependendo do número de biomarcadores medidos por amostra e do número de amostras utilizadas. Deste modo, o valor predeterminado pode ser de entre tanto como 50 % e tão pouco como 20, 10, 5, 3, 2, ou 1 %.

Tal como se descreve neste documento, mede-se o teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra biológica de um indivíduo. Podem medir-se os teores nos biomarcadores para AD utilizando qualquer

tecnologia de medição que esteja disponível e seja capaz de determinar especificamente o teor do biomarcador da AD numa amostra biológica. A medição pode ser quer quantitativa, quer qualitativa, desde que a medição seja capaz de indicar se o teor do biomarcador da AD na amostra de fluido biológico periférico é maior ou menor do que o valor de referência.

O teor determinado pode corresponder a uma medida primária do teor de uma medição de um biomarcador específico, a uma medição da quantidade do biomarcador ele próprio (dados quantitativos, tal como no Exemplo 7), tal como detectando o número de moléculas de biomarcador na amostra) ou pode ser uma medição secundária do biomarcador (uma medição a partir da qual se possa deduzir a quantidade do biomarcador, embora não necessariamente (dados qualitativos, tal como no Exemplo 4), tal como uma medida da actividade enzimática (quando o biomarcador for um enzima) ou uma medição de um mARN que codifique para o biomarcador). Também se podem obter dados qualitativos, ou obter-se, a partir de medições primárias.

Embora alguns formatos de ensaio permitam que se testem amostras de fluido biológico periférico sem antes se processar a amostra, é expectável que a maior parte das amostras de fluido biológico periférico sejam processadas antes de se testarem. O processamento assume em geral a forma de uma eliminação de células (nucleadas e não nucleadas), tais como eritrócitos, leucócitos, e plaquetas

das amostras de sangue, e também pode incluir a eliminação de determinadas proteínas, tais como determinadas proteínas da cascata da coagulação do sangue. Em alguns exemplos, a amostra de fluido biológico periférico é recolhida num contentor que inclui EDTA.

Em geral, medir-se-ão os teores nos biomarcadores da AD utilizando uma tecnologia de medição baseada em afinidade. "Afinidade", tal como quando se relaciona com um anticorpo, é um termo bem compreendido na técnica e significa a extensão, ou a força, da ligação do anticorpo ao parceiro de ligação, tal como um biomarcador para diagnóstico da AD como se descreve neste documento (ou um seu epítopo). Pode medir-se a afinidade e/ou exprimir-se, de um certo número de maneiras conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, uma constante do equilíbrio de dissociação (K_D ou K_d), uma constante aparente do equilíbrio de dissociação (K_D' ou K_d'), ou o IC_{50} (quantidade necessária para levar a cabo uma inibição em 50 % num ensaio competitivo; utilizado intercambiavelmente neste documento com " I_{50} "). Entende-se que, para os objectivos desta invenção, uma afinidade é uma afinidade média para uma determinada população de anticorpos que se ligam a um epítopo. Os valores de K_D' reportados neste documento em termos de mg de IgG por mL, ou mg/mL, indicam mg de Ig por mL de soro, embora se possa utilizar plasma.

A tecnologia de medição baseada na afinidade utiliza uma molécula que se liga especificamente ao biomarcador da AD que se está a medir (um "reagente de afinidade", tal como um anticorpo ou um aptâmero), embora se possam utilizar outras tecnologias, tais como tecnologias baseadas em espectroscopias (por exemplo, espectroscopia de desorção por laser assistida pela matriz - tempo de voo, ou MALDI-TOF) ou ensaios medindo a bioactividade (por exemplo, ensaios medindo a mitogenicidade de factores do crescimento).

As tecnologias baseadas em afinidade incluem ensaios baseados em anticorpos (imunoensaios) e ensaios utilizando aptâmeros (moléculas de ácido nucleico que se ligam especificamente a outras moléculas), tais como ELONA. Além disto, ensaios que recorrem tanto a anticorpos como a aptâmeros também são contemplados (por exemplo, um ensaio em formato de sanduíche utilizando um anticorpo para a captura e um aptâmero para a detecção).

Caso se utilize tecnologia de imunoensaio, pode recorrer-se a qualquer tecnologia de imunoensaio que consiga medir quantitativamente ou qualitativamente o teor de um biomarcador de AD numa amostra biológica. Incluem-se nas tecnologias de imunoensaio adequadas o radioimunoensaio, o ensaio imunofluorescente, o imunoensaio enzimático, o ensaio quimioluminescente, o ELISA, a imuno-PCR, e o ensaio de transferência Western.

De igual modo, podem utilizar-se nos métodos da invenção ensaios baseados em aptâmeros que consigam medir quantitativamente ou qualitativamente o teor num biomarcador da AD numa amostra biológica. Podem em geral substituir-se anticorpos por aptâmeros em quase todos os formatos de imunoensaio, embora os aptâmeros permitam mais formatos adicionais de ensaio (tais como a amplificação de aptâmeros ligados utilizando tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos, tal como PCR (Patente U.S. No. 4.683.202) ou amplificação isotérmica com iniciadores compósitos (Patentes U.S. N^{os}. 6.251.39 e 6.692.918)).

É conhecida na técnica uma larga gama de ensaios baseados na afinidade. Os ensaios baseados na afinidade recorrerão a pelo menos um epítopo derivado do biomarcador da AD de interesse, e muitos ensaios baseados em afinidade utilizam mais do que um epítopo (por exemplo, dois ou mais epítopos estão envolvidos em ensaios em formato "sanduíche"; utiliza-se pelo menos um epítopo para se capturar o marcador, e utiliza-se pelo menos um epítopo diferente para detectar o marcador).

Os ensaios baseados em afinidade podem ter formato de competição ou de reacção directa, utilizar formatos de tipo sanduíche, e podem além disto ser heterogéneos (por exemplo, utilizar suportes sólidos) ou homogéneos (por exemplo, ocorrer numa única fase) e/ou utilizar imunoprecipitação. A maior parte dos ensaios envolve a utilização de um reagente de afinidade marcado

(por exemplo, anticorpo, polipéptido, ou aptâmero); os rótulos podem ser, por exemplo, enzimáticos, fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivos, ou moléculas corantes. Também são conhecidos ensaios em que se amplificam os sinais da sonda; exemplos dos quais são ensaios que utilizam biotina e avidina, e os imunoensaios marcados com enzimas e mediados, tais como os ensaios ELISA e ELONA. Neste documento, nos exemplos referidos como "dados quantitativos" as concentrações em biomarcador foram obtidas utilizando ELISA. Pode ligar-se quer o biomarcador, quer o reagente específico para o biomarcador, a uma superfície, e podem medir-se directamente ou indirectamente os teores.

Num formato heterogéneo, o ensaio utiliza duas fases (tipicamente uma líquida aquosa e um sólida). Tipicamente está ligado um reagente de afinidade específico para um biomarcador da AD ao suporte sólido para facilitar a separação do biomarcador da AD do granel da amostra biológica. Depois de a reacção decorrer durante um período de tempo suficiente para permitir a formação dos complexos entre o reagente de afinidade e o biomarcador da AD, lava-se tipicamente o suporte sólido ou a superfície contendo o anticorpo antes da detecção de polipéptidos ligados. O reagente de afinidade no ensaio para a medição dos biomarcadores da AD pode ser proporcionado sobre um suporte (por exemplo, sólido ou semi-sólido), são exemplos de suportes que se podem utilizar a nitrocelulose (por exemplo, sob a forma de membrana ou de poço de

microtitulação), o poli(cloreto de vinilo) (por exemplo, em folhas ou poços de microtitulação), o látex de poliestireno (por exemplo, em pérolas ou em poços de microtitulação), o fluoreto de polivinilidina, o papel diazotizado, as membranas em nylon, as pérolas activadas, vidro e pérolas em Proteína A. São conhecidos na técnica tanto ensaios em formato padrão como competitivo. Deste modo, são proporcionados neste documento complexos contendo pelo menos um biomarcador de AD ligado a um reagente específico +ara o biomarcador, em que o reagente referido esteja ligado a uma superfície. Também se proporcionam neste documento complexos que incluem pelo menos um biomarcados para o diagnóstico da AD ligado a um reagente específico para o biomarcador, em que o biomarcador referido esteja ligado a uma superfície.

Os ensaios heterogéneos em formato de conjuntos são adequados para medir teores em biomarcadores da AD quando se praticam os métodos da invenção utilizando múltiplos biomarcadores de AD. Os ensaios de tipo matriz utilizados na prática dos métodos da invenção utilizarão habitualmente um substrato sólido com dois ou mais reagentes de captura específicos para diferentes biomarcadores da AD ligados ao substrato num perfil pré-determinado (por exemplo, uma grelha). A amostra de fluido biológico periférico é aplicada sobre o substrato e os biomarcadores da AD na amostra ficam ligados aos reagentes de captura. Depois de se remover a amostra (e das lavagens apropriadas), detectam-se os biomarcadores da AD utilizando

uma mistura dos reagentes de detecção apropriados que se ligam especificamente aos diversos biomarcadores da AD. Consegue-se habitualmente a ligação do reagente de detecção utilizando um sistema visual, tal como um sistema baseado num corante fluorescente. Uma vez que os reagentes de captura se encontram dispostos no substrato com um perfil pré-determinado, os ensaios em formato de matriz proporcionam a vantagem de detecção de múltiplos biomarcadores da AD sem necessidade de um sistema de detecção multiplexado.

Num formato homogéneo, o ensaio ocorre numa única fase (por exemplo, uma fase líquida aquosa). Tipicamente, incuba-se a amostra biológica com um reagente de afinidade específico para o biomarcador de AD em solução. Por exemplo, pode estar em condições nas quais precipitem quaisquer complexos de reagente de afinidade com o seu anticorpo, que se formem. São conhecidos na técnica, para estes ensaios, tanto formatos padrão como formatos competitivos.

No formato padrão (reação directa), monitoriza-se directamente o teor do complexo entre o biomarcador de AD e o reagente de afinidade. Isto pode conseguir-se, por exemplo, determinando a quantidade de um reagente de detecção marcado que se forma ligado aos complexos do biomarcador da AD com o reagente de afinidade. Num formato competitivo, deduz-se a quantidade de biomarcador da AD na amostra monitorizando o efeito competitivo da ligação de

uma quantidade conhecida de biomarcador da AD (ou de outro ligando competitivo) no complexo. Podem determinar-se as quantidades de ligação ou de formação do complexo, quer qualitativamente, quer quantitativamente.

Os métodos descritos nesta patente podem ser implementados utilizando qualquer dispositivo capaz para implementar os métodos. Incluem-se nos exemplos de dispositivos que se podem utilizar, sem que eles se limitem a estes, dispositivos computacionais electrónicos, incluindo computadores de todos os tipos. Quando se implementam os métodos descritos nesta patente num computador, o programa de computador que se pode utilizar para configurar o computador de modo a levar a cabo os passos dos métodos, pode estar incluído num meio qualquer capaz para ser lido por um computador, e que contenha o programa para computador. Incluem-se nos exemplos de meios legíveis por um computador que se podem utilizar, mas não se limitando a estes, disquetes, CD-ROM, DVDs, ROM, RAM, e outros dispositivos de armazenagem de memória do computador. Pode utilizar-se o programa computacional para configurar o computador para levar a cabo os passos dos métodos usando uma rede electrónica, por exemplo, através da internet, da *world wide web*, de uma intranet, ou de outra rede.

Num exemplo, podem implementar-se os métodos descritos nesta patente num sistema que inclua um processador e um meio que possa ser lido por um computador

que tenha programado meios em código que sejam capazes de fazer com que o sistema leve a cabo os passos dos métodos descritos nesta patente. O processador pode ser qualquer processador capaz de levar a cabo as operações necessárias para implementar os métodos. Os meios de código programados podem ser um qualquer código que quando for implementado no sistema possa fazer o sistema levar a cabo os passos dos métodos descritos nesta patente. Incluem-se nos exemplos dos meios de código programado sem que eles se limitem a estes, instruções para levar a cabo os passos dos métodos descritos nesta patente numa linguagem computacional de alto nível, tal como C++, Java, ou Fortran; as instruções para levar a cabo os passos dos métodos descritos nesta patente escritas numa linguagem para computador com um nível baixo, tal como linguagem de assemblagem; ou instruções para levar a cabo os passos dos métodos descritos nesta patente sob uma forma executável pelo computador, tais como linguagem máquina compilada e ligada.

Detectam-se complexos formados que contenham biomarcador de AD e um reagente de afinidade por qualquer uma de uma série de metodologias que são conhecidas na técnica, consoante o formato do ensaio e a preferência do utilizador. Por exemplo, podem detectar-se reagentes de afinidade não marcados com tecnologia de amplificação de ADN (por exemplo, para aptâmeros e para anticorpos marcados com ADN) ou anticorpos "secundários" que se liguem ao reagente de afinidade. Em alternativa, pode marcar-se o reagente de afinidade, determinando-se directamente a

quantidade do complexo (por exemplo usando um corante (fluorescente ou visível), ou um reagente de afinidade ligado a pérolas ou marcado com um enzima) ou indirectamente (tal como para reagentes de afinidade "rotulados" com biotina, rótulos de expressão, e outros semelhantes). Neste documento os exemplos proporcionados que referem "dados qualitativos" envolvem matrizes de anticorpos baseadas em filtros utilizando quimioluminescência para se obterem medições dos biomarcadores.

Tal como será entendido pelos indivíduos com conhecimentos da técnica, o modo de detecção do sinal dependerá do sistema de detecção exacto que se utilizar no ensaio. Por exemplo, caso se utilize um reagente radiologicamente marcado, o sinal será medido utilizando uma tecnologia capaz de quantificar o sinal da amostra biológica ou de comparar o sinal da amostra biológica com o sinal de uma amostra de referência, tal como por contagem da cintilação, autorradiografia (tipicamente em combinação com densitometria de varrimento), e outros semelhantes. Caso se utilize um sistema de detecção quimioluminescente, então o sinal será tipicamente detectado utilizando um luminómetro. Os métodos para detectar o sinal dos sistemas de detecção são bem conhecidos na técnica e não necessitam de ser mais descritos neste documento.

Quando se medir mais do que um biomarcador de AD, pode dividir-se a amostra biológica numa série de

alíquotas, utilizando-se alíquotas diferentes para medir diferentes biomarcadores de AD (embora também seja contemplada a divisão da amostra biológica em diversas alíquotas para permitir múltiplas determinações dos teores em biomarcador de AD numa amostra específica). Em alternativa pode testar-se a amostra biológica (ou uma alíquota dela) para se determinarem os teores em múltiplos biomarcadores de AD numa única reacção, utilizando um ensaio capaz de medir os teores individuais de diferentes biomarcadores de AD num ensaio único, tal como um ensaio de conjuntos ou um ensaio utilizando tecnologia de detecção multiplexada (por exemplo, um conjunto utilizando reagentes de detecção marcados com diferentes corantes fluorescentes como marcadores).

É habitual na técnica levar-se a cabo medições em 'réplicas' quando se medem biomarcadores. As medições em réplicas são habitualmente obtidas separando uma amostra em múltiplas alíquotas, e medindo em separado o(s) biomarcador(es) em reacções em separado, do mesmo sistema de ensaio. As medições em réplicas não são necessárias para os métodos da invenção, mas muitas concretizações da invenção utilizarão testes em replicado, em especial testes em duplicado e em triplicado.

Teores de referência

O teor de referência utilizado para comparação com o teor medido para um biomarcador de AD pode variar,

dependendo do aspecto da invenção que se está a praticar, tal como se entenderá a partir da descrição acima. Para métodos de diagnóstico da AD, o "valor de referência" é tipicamente um valor de referência previamente determinado, tal como um valor médio de teores obtidos de uma população que não sofra de AD nem de MCI, mas em alguns casos, o teor de referência pode ser um teor médio ou mediano de um conjunto de indivíduos que inclua pacientes de AD. Em alguns casos, o teor de referência previamente determinado é derivado de (por exemplo, é a média ou a mediana de) teores obtidos de uma população da mesma faixa etária.

Para os métodos de diagnóstico da MCI (isto é, métodos de diagnosticar ou de ajudar o diagnóstico da MCI), o teor de referência é tipicamente um teor de referência previamente determinado, tal como uma média de teores obtidos de uma população que não sofra de AD nem de MCI, mas em alguns casos, o teor de referência pode ser um valor médio ou mediano de um conjunto de indivíduos incluindo pacientes com MCI e/ou AD. Em alguns casos, o teor de referência previamente determinado é derivado de (por exemplo, é a média ou a mediana de) teores obtidos de uma população da mesma faixa etária.

Para os métodos de monitorização da AD (por exemplo, métodos para diagnosticar ou ajudar no diagnóstico da progressão da AD num paciente com AD), o teor de referência pode ser um teor previamente determinado, tal como uma média dos teores obtidos a partir de uma população

que não sofra de AD nem de MCI, uma população à qual foi feito um diagnóstico de MCI ou AD, e, em alguns casos, o teor de referência pode ser um teor médio ou mediano de um conjunto de indivíduos incluindo pacientes com MCI e/ou AD. Em alternativa, o teor de referência pode ser um teor de referência histórico para o paciente específico (por exemplo, um teor em Leptina que se obteve de uma amostra proveniente do mesmo indivíduo, mas numa altura anterior). Em alguns casos o teor de referência previamente determinado é derivado de (por exemplo, é a média ou a mediana de) teores obtidos para uma população da mesma faixa etária.

Para métodos de classificação da AD (isto é, métodos para classificar os pacientes com AD em estádios ligeiro, moderado e severo da AD), o teor de referência é habitualmente um teor de referência previamente determinado que é o teor médio ou o mediano para uma população a que foi diagnosticada AD ou MCI (preferivelmente uma população a que foi diagnosticada AD). Em alguns casos, o teor de referência previamente determinado é derivado de (por exemplo, é a média ou a mediana de) teores obtidos para uma população da mesma faixa etária.

As populações da mesma faixa etária (das quais se podem obter valores de referência) são idealmente da mesma idade que o indivíduo que se está a testar, mas também são aceitáveis populações aproximadamente da mesma faixa etária. As populações aproximadamente da mesma faixa etária

podem diferir em 1, 2, 3, 4, ou 5 anos de idade, em relação ao indivíduo em teste, ou podem ser grupos com idades diferentes que incluam a idade do indivíduo em teste. As populações aproximadamente da mesma faixa etária podem ser obtida a incrementos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 nos de idade (por exemplo, um conjunto com um "incremento de 5 anos" que sirva de fonte para os valores de referência para um indivíduo com 62 anos de idade poderá incluir indivíduos com 58-62 anos de idade, indivíduos com 59-63 anos de idade, indivíduos com 60-64 anos de idade, indivíduos com 61-65 anos de idade, ou indivíduos com 62-66 anos de idade).

Comparação de teores em biomarcadores de AD

O processo de comparação entre um valor medido e um valor de referência pode ser levado a cabo de um modo conveniente qualquer que seja apropriado para o tipo de valor medido e para o biomarcador de AD em questão. Tal como se descreveu acima, a 'medição' pode ser levada a cabo utilizando técnicas quantitativas ou qualitativas de medição, e o modo de comparar um valor medido com um valor de referência pode variar dependendo da tecnologia de medição empregue. Por exemplo, quando se utiliza um ensaio colorimétrico qualitativo para medir os teores em biomarcador de AD, podem comparar-se os teores por comparação visual da intensidade da cor do produto reaccional corado, ou comparando dados de medições densitométricas ou espectrométricas do produto reaccional

corado (por exemplo, comparando dados numéricos ou dados gráficos, tais como gráficos de barras, derivados do dispositivo de medição). No entanto, espera-se que os valores medidos utilizados nos métodos da invenção sejam mais habitualmente valores quantitativos (por exemplo, medições quantitativas de concentração, tais como nanogramas de biomarcador de AD por mililitro de amostra, ou quantidades absolutas). Tal como com as medições qualitativas, pode fazer-se a comparação inspeccionando os dados numéricos, inspeccionando representações dos dados (por exemplo, inspeccionando representações gráficas tais como gráficos de barras ou de linhas).

Considera-se em geral que um valor medido é substancialmente igual a um valor de referência quando for pelo menos igual a 95 % do valor de referência (por exemplo, um valor medido de 1,71 será considerado substancialmente igual a um valor de referência de 1,80). Considera-se um valor medido como menor do que um valor de referência quando o valor medido for inferior a 95 % do valor de referência (por exemplo, um valor medido de 1,7 será considerado inferior a um valor de referência de 1,80).

O processo de comparar pode ser manual (tal como por inspeção visual pelo praticante do método) ou pode ser automatizado. Por exemplo, um dispositivo de ensaio (tal como um luminómetro para medir sinais quimioluminescentes) pode incluir circuitos e programas que lhe permitam para

comparar um valor medido com um valor de referência para um biomarcador de AD. Em alternativa, pode utilizar-se um dispositivo em separado (por exemplo, um computador digital), para comparar o ou os valores medidos com o ou os valores de referência. Podem incluir-se nos dispositivos automatizados para comparação valores de referência armazenados para o ou os biomarcadores de AD que se estão a medir, ou podem comparar-se os valores medidos com valores de referência derivados de amostras de referência quantificadas contemporaneamente.

Em algumas concretizações, os métodos da invenção utilizam uma comparação 'simples' ou 'binária' entre o ou os valores medidos e o ou os valores de referência (por exemplo, a comparação entre um valor medido e um valor de referência determina se o valor medido é maior ou menor do que o valor de referência). Para biomarcadores para o diagnóstico da AD, uma comparação que mostre que o valor medido para o biomarcador é menor do que o valor de referência indica ou sugere um diagnóstico de AD. Para métodos relacionados com o diagnóstico da MCI, uma comparação mostrando que o valor determinado para RANTES é menor do que o valor de referência indica ou sugere um diagnóstico de AD. Naquelas concretizações relativas ao diagnóstico da MCI que além disso utilizam um valor medido para a Leptina, uma comparação mostrando que o valor de RANTES é inferior ao valor de referência e o valor para Leptina é substancialmente igual ou maior do que o valor de referência sugere ou indica um diagnóstico da MCI.

Tal como se descreve neste documento, podem medir-se amostras biológicas fluidas quantitativamente (valores absolutos) ou qualitativamente (valores relativos). Os teores respectivos nos biomarcadores de AD para uma determinada avaliação podem ou não sobrepor-se. Tal como se descreve neste documento, para algumas concretizações, os dados qualitativos indicam um determinado nível de diminuição cognitiva (AD ligeira, moderada ou severa) (que se pode medir através das classificações no MMSE) e noutras concretizações, os dados quantitativos indicam um determinado nível de diminuição cognitiva. Tal como se mostra no Exemplo 4 e nas condições proporcionadas para o Exemplo 4 (dados qualitativos), nas concretizações relativas à AD, uma comparação que mostre teores em BDNF inferiores ao teor de referência sugere ou indica uma AD ligeira, enquanto uma comparação que mostre teores em BDNF maiores do que o valor de referência sugere uma AD mais avançada (isto é, uma AD moderada ou severa), e de entre as amostras que apresentem teores em BDNF maiores do que o teor de referência, as que também denotam teores em PDGF-BB inferiores ao teor de referência sugerem ou indicam uma AD moderada, enquanto aquelas amostras que também denotam teores em PDGF-BB acima do valor do teor de referência sugerem ou indicam uma AD severa. Nas concretizações relativas à classificação da AD ilustradas no Exemplo 7 (dados quantitativos), uma comparação que mostre teores em BDNF menores do que o teor de referência quando este teor de referência for Normal, sugerem ou

indicam uma AD ligeira, enquanto uma comparação mostrando teores em BDNF menores do que o teor de referência quando este for para AD Moderada sugere uma AD mais avançada (isto é, uma AD moderada ou severa), enquanto naquelas amostras em que os teores em leptina forem iguais ao teor de referência, quando este for para AD Ligeira, as que denotam teor em RANTES inferior ao teor de referência sugerem ou indicam uma AD moderada, enquanto naquelas amostras com teores em leptina iguais ao da referência sendo que o teor de referência seja para AD Moderada, as que apresentarem teores em PDGF-BB, RANTES, ou BDNF inferiores ao teor de referência sugerem ou indicam uma AD severa.

No entanto, em diversos aspectos da invenção, a leva-se a cabo uma comparação para determinar a dimensão da diferença entre os valores medidos e de referência (por exemplo, comparando o 'número de vezes' ou a percentagem de diferença entre o valor medido e o valor de referência). Uma diferença em número de vezes que seja quase igual ou maior do que a diferença mínima em número de vezes que se descreve neste documento sugere ou indica um diagnóstico de AD, MCI, progressão de MCI a AD, ou progressão de AD ligeira para AD moderada, tal como seja apropriado para o método específico que se está a praticar. Uma diferença em número de vezes pode se determinada medindo a concentração absoluta de uma proteína e comparando esse valor com o valor absoluto de uma referência, podendo medir-se uma diferença em vezes através da diferença relativa entre um valor de referência e o da amostra, em que nenhum dos

valores é uma medida da concentração absoluta, e/ou em que ambos os valores sejam medidos em simultâneo. Uma diferença em vezes que possa variar na gama de entre 10 % e 95 %. Um ELISA mede o conteúdo absoluto ou a concentração numa proteína a partir da qual se pode determinar uma diferença em vezes em comparação com a concentração absoluta dessa mesma proteína na referência. Um conjunto de anticorpos mede a concentração relativa a partir da qual se calcula uma alteração em vezes. Portanto, a dimensão da diferença entre o valor medido e o valor de referência que sugerirá ou indicará um diagnóstico específico dependerá do biomarcador de AD específico que se esteja a quantificar para se obter o valor medido e o valor de referência que se utilizarem (o que por sua vez dependerá do método que se estiver a praticar). As Tabelas 2A-2B listam valores mínimos de diferença em vezes para os biomarcadores de AD que se podem utilizar nos métodos da invenção nos quais se utilizará uma diferença em vezes para se fazer a comparação entre o valor medido e o valor de referência. Nas concretizações utilizando valores das diferenças, uma diferença em vezes de cerca de da diferença em vezes indicada na Tabela 2A sugere um diagnóstico de AD, em que a diferença em vezes seja um valor negativo. Por exemplo, tal como se descreve neste documento, os teores em BDNF (tal como medidos por ELISA) são menores em pacientes com AD moderada, e estes valores de BDNF vão diminuindo à medida que a severidade da AD progride. Tal como se mostra na Tabela 6, uma alteração em vezes para BDNF -46 % significa uma diminuição dos teores em BDNF em 46 %. Tal como se

mostra na Tabela 2A, para medições qualitativas utilizando anticorpos, uma alteração de BDNF de 0,60 significa uma diminuição nos teores em BDNF de cerca de 60 %. A Tabela 2B proporciona mais informação acerca de alterações em vezes.

TABELA 2A

Biomarcador	Alteração em Vezes (a título de valor negativo ou decréscimo)
BDNF	0,60
bFGF	0,75
EGF	0,60
FGF-6	0,70
IL-3	0,80
sIL-6 R	0,75
Leptina	0,55
MIP-1 δ	0,60
MSP- α	0,80
NAP-2	0,75
NT-3	0,75
PDGF-BB	0,60
RANTES	0,75
SCF	0,80
sTNF RII	0,75
TGF- β 3	0,80
TIMP-1	0,75
TIMP-2	0,80
TNF- β	0,70
TPO	0,75

Tabela 2B

Proteína	Alteração Relativa em Vezes (n=51)	Valor de q	Alteração Absoluta em Vezes (n=187)	valor de p
MJP-1d	-0,54291	0,0165		
PDGF-BB	-0,53687	0,0165	-0,135	0,891
LEPTINA (OB)	-0,47625	0,0165	-0,357	0,0018
IL-6 R	-0,6763	0,0165		
BDNF	-0,53628	0,0165	-0,355	0,0006
TIMP-1	-0,71622	0,0165		
RANTES	-0,68299	0,0165	-0,184	0,0144
EGF	-0,56182	0,0165		
TIMP-2	-0,75011	0,0165		
NAP-2	-0,67257	0,0165		
STNF RII	-0,70029	0,0165		
TNF-b	-0,64998	0,0165		
TPO	-0,71405	0,0165		
FGF-6	-0,66467	0,0165		

Proteína	Alteração Relativa em Vezez (n=51)	Valor de q	Alteração Absoluta em Vezez (n=187)	valor de p
NT-3	-0,69805	0,0165		
bFGF	-0,67351	0,0165		
IL-3	-0,75802	0,0165		
SCF	-0,73041	0,0165		
TGF-b3	-0,76912	0,0165		
MSP-a	-0,76466	0,0165		

Tal como será aparente para os especialistas da técnica, quando se fazem medições em replicado para o ou os biomarcador(es) testados, o valor medido que se compara com o valor de referência é um valor que leva em conta a medição para diversas réplicas. As medições em replicado podem ser levadas em conta utilizando-se quer o valor médio, quer o valor mediano, dos valores medidos, a título de "valor medido".

Agentes em perspectiva para o despiste de agentes biomarcadores da actividade de modulação da AD

Também se descrevem métodos de despiste de agentes candidatos para utilização no tratamento da AD e/ou da MCI, através de ensaios dos agentes candidatos em perspectiva quanto à sua actividade na modulação de biomarcadores de AD. O ensaio de despiste pode ser levado a cabo quer *in vitro*, quer *in vivo*. Os agentes candidatos que se identificarem usando os métodos de despiste descritos neste documento podem ser úteis a título de agentes terapêuticos para o tratamento da AD e/ou da MCI.

Os métodos de despiste recorrem aos biomarcadores de AD descritos neste documento e a polinucleótidos de biomarcadores de AD a título de "alvos do fármaco". Testam-se os agentes em perspectiva quanto à sua actividade na modulação de um fármaco alvo, num sistema para ensaio. Como será entendido pelos indivíduos com conhecimentos da técnica, o modo de testar a actividade moduladora dependerá do biomarcador de AD e da forma do fármaco alvo que se utilizarem (por exemplo, proteína ou gene). É conhecida na técnica uma larga variedade de ensaios adequados.

Quando a proteína biomarcadora de AD for ela própria o fármaco alvo, testam-se os agentes em perspectiva como moduladores do nível da actividade da própria proteína. Pode conseguir-se a modulação dos teores de um biomarcador de AD, por exemplo, através do aumento ou da diminuição da vida média da proteína biomarcadora. Pode conseguir-se uma modulação da actividade de um biomarcador de AD aumentando ou diminuindo a disponibilidade do biomarcador de AD para se ligar aos seus receptor(es) ou ligando(s) conhecidos.

Quando um polinucleótido biomarcador de AD for o fármaco alvo, testa-se o agente em perspectiva quanto à sua actividade moduladora da síntese do biomarcador de AD. O modo exacto de se testar a actividade moduladora de um agente em perspectiva dependerá, evidentemente, da forma do polinucleótido biomarcador de AD seleccionado para se testar. Por exemplo, quando o fármaco alvo for um

polinucleótido biomarcador de AD, testa-se tipicamente a actividade moduladora medindo quer o mRNA transcrito do gene (modulação transcricional), quer medindo a proteína produzida em consequência de uma tal transcrição (modulação da tradução). Tal como o entenderão os indivíduos com conhecimentos da técnica, muitos formatos de ensaio recorrerão à utilização de uma forma modificada do gene biomarcador de AD na qual se fundiu (ou mesmo se utilizou em substituição dele) uma sequência heteróloga (codificando por exemplo, para um marcador da expressão tal como um enzima ou um rótulo da expressão tal como a oligo-histidina, ou ainda uma sequência derivada de outra proteína, tal como a myc), com a sequência codificando para a proteína do biomarcador de AD. As sequências heterólogas como estas permitem uma detecção conveniente dos teores em proteína transcrita a partir do fármaco alvo.

Os agentes em perspectiva para utilização nos métodos de despiste podem ser compostos químicos e/ou complexos de um tipo qualquer, incluindo tanto moléculas orgânicas como inorgânicas (e os seus complexos). Tal como será entendido pelos indivíduos com conhecimentos da técnica, as moléculas orgânicas são em geral alvo de despistes como biomarcadores de actividade moduladora da AD. Em algumas situações, os agentes em perspectiva a testar excluirão o biomarcador de proteína AD alvo.

Os ensaios de despiste podem assumir qualquer formato conhecido na técnica, incluindo ensaios *in vitro*

isentos de células, ensaios em culturas de células, ensaios em cultura de órgãos, e ensaios *in vivo* (isto é, ensaios utilizando modelos da AD e da MCI em animais). Descrevem-se portanto diversos tipos de concretização para se testarem agentes em perspectiva, de modo a identificar agentes candidatos para o tratamento da AD e/ou da MCI.

Despistam-se os agentes em perspectiva para se identificarem agentes candidatos para o tratamento da AD e/ou da MCI num ensaio isento de células. Incuba-se cada um dos agentes em perspectiva com o fármaco alvo num ambiente isento de células, e mede-se a modulação do biomarcador da AD. Incluem-se nos ambientes isentos de células úteis para os métodos de despiste da invenção, lisados de células (especialmente úteis quando o fármaco alvo for um gene do biomarcador de AD) e fluidos biológicos tais como sangue integral ou fluidos fraccionados dele derivados, tais como plasma e soro (especialmente úteis quando uma proteína biomarcadora de AD for o fármaco alvo). Quando o fármaco alvo for um gene biomarcador de AD, a modulação que se mede pode ser a modulação da transcrição ou da tradução. Quando o fármaco alvo for uma proteína biomarcadora de AD, a modulação pode ser a da vida média da proteína ou a da disponibilidade da proteína biomarcadora de AD para se ligar ao seu receptor ou ligando conhecidos.

Despistam-se os agentes em perspectiva para se identificarem agentes candidatos para o tratamento da AD e/ou da MCI num ensaio baseado em células. Cada agente em

perspectiva é incubado com células em cultura, e a modulação do biomarcador de AD alvo é medido. As células em cultura são astrócitos, células neuronais (tais como de neurónios do hipocampo), fibroblastos, ou células gliais. Quando fármaco alvo for um gene de biomarcador de AD, pode medir-se a modulação transcricional ou da tradução. Quando o fármaco alvo for uma proteína biomarcadora de AD, também se adiciona a proteína biomarcadora de AD à mistura do ensaio, e mede-se a modulação da vida média da proteína, ou da disponibilidade da proteína biomarcadora de AD para se ligar ao seu receptor ou ligando conhecidos.

Além disto, aspectos dizem respeito ao despiste de agentes em perspectiva para se identificarem agentes candidatos para o tratamento da AD e/ou da MCI em ensaios baseados em culturas de órgãos. Neste formato, incuba-se cada um dos agentes em perspectiva quer com um órgão inteiro, quer com uma porção de um órgão (tal como uma porção de tecido celular, tal como uma fatia de cérebro) derivado de um animal não humano, e mede-se a modulação do biomarcador de AD alvo. Quando o fármaco alvo for um gene biomarcador de AD, pode medir-se a modulação da transcrição ou da tradução. Quando o fármaco alvo for uma proteína biomarcadora de AD, também se adiciona a proteína biomarcadora de AD à mistura do ensaio, e mede-se a modulação da vida média da proteína ou da disponibilidade da proteína biomarcadora de AD para se ligar ao receptor que se lhe conhece.

Aspectos adicionais dizem respeito ao despiste de agentes em perspectiva para se identificarem agentes candidatos para o tratamento da AD e/ou da MCI utilizando ensaios *in vivo*. Neste formato, administra-se cada um dos agentes em perspectiva a um animal não humano e mede-se a modulação do biomarcador de AD alvo. Consoante o alvo específico do fármaco e o aspecto do tratamento da AD e/ou da MCI que se pretende abordar, o animal utilizado nestes ensaios pode ser quer um animal "normal" (por exemplo, um murganho C57), quer um animal que seja um modelo da AD ou da MCI. São conhecidos diversos modelos da AD em animais, na técnica, incluindo o murganho 3xTg-AD (Caccamo *et al.*, 2003, *Neuron* **39**(3): 409-21), murganhos que sobre-expressam a proteína precursora de amilóide beta humana (APP) e genes da presenilina (Westaway *et al.*, 1997, *Nat. Med* **3**(1): 67-72), e outros (veja-se Higgins *et al.*, 2003, *Behav. Pharmacol.* **14**(5-6): 419-38). Quando o fármaco alvo for um biomarcador de um gene de AD, pode medir-se a modulação da transcrição ou da tradução. Quando o fármaco alvo for o biomarcador da proteína AD, pode medir-se a modulação da vida média do biomarcador de AD alvo ou a disponibilidade da proteína biomarcadora da AD ao receptor ou a um ligando que se lhe conhece. O modo exacto de medir a modulação do biomarcador alvo da AD será, evidentemente, dependerá da identidade do biomarcador de AD, do formato do ensaio, e da preferência do médico. São conhecidos muitos métodos, na técnica, para se medir a modulação, a tradução, a vida média da proteína, a disponibilidade da proteína, e outros aspectos que se podem medir. Atento o facto que estas

técnicas são habitualmente conhecidas, elas não precisam de ser mais descritas aqui.

Estojos

São descritos estojos para se levarem a cabo quaisquer dos métodos descritos neste documento. Os estojos podem incluir pelo menos um reagente específico para um biomarcador de AD, podendo também incluir instruções para levar a cabo um método descrito neste documento. Os estojos também podem incluir amostras de referência de biomarcador de AD, isto é, úteis como valores de referência. Incluem-se nos "biomarcadores para diagnóstico da AD" para utilização nos estojos proporcionados neste documento, embora se não limitem a GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b MIP-1d, IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Noutros exemplos, incluem-se nos "biomarcadores para o diagnóstico da AD" para utilização nos estojos proporcionados neste documento mas não se limitam a factor de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crescimento homodimérico BB derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina-6 solúvel (sIL-6R), Leptina (também

denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP- α), neurotrofina-3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases 1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases 2 (TIMP-2), factor de crescimento transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de necrose tumoral beta (TNF- β). Noutros exemplos, os estojos incluem quaisquer um, dois, três ou quatro dos marcadores para diagnóstico da AD, Leptina, RANTES, PDGF-BB e BDNF.

Mais habitualmente, os estojos incluem pelo menos dois biomarcadores de AD diferentes-reagentes de afinidade específicos, em que cada um dos reagentes seja específico para um biomarcador de AD diferente.

Os estojos incluem pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, ou pelo menos reagentes específicos para um biomarcador de AD. O ou os reagentes específicos para um biomarcador de AD são reagentes de afinidade.

Os estojos que incluem um único reagente específico para um biomarcador de AD terão em geral o reagente dentro de um contentor (por exemplo, um frasco, uma ampola, ou outro dispositivo contentor adequado para armazenagem), embora também se contemplem estojos contendo

o reagente ligado a um substrato (por exemplo, uma superfície interna de um vaso reaccional para o ensaio). De igual modo, os estojos que incluem mais do que um reagente também podem ter os reagentes em contentores (em separado ou numa mistura) ou podem ter os reagentes ligados a um substrato.

Os reagentes específicos para biomarcadores de AD serão marcados com um marcador detectável (tal como um corante fluorescente ou um enzima detectável), ou serão modificados para facilitar a sua detecção (por exemplo, biotinilados para permitir uma detecção com um sistema de detecção baseado em avidina ou em estreptavidina). O reagente específico para um biomarcador de AD não será directamente marcado nem modificado.

Determinados estojos também incluirão um ou mais agentes para a detecção do reagente específico ligado ao biomarcador de AD. Tal como será aparente para os indivíduos com conhecimentos da técnica, a identidade dos agentes de detecção dependerá do tipo de reagente ou reagentes específicos para o biomarcador de AD incluídos no estojo, e do sistema de detecção pretendido. Incluem-se nos agentes de detecção anticorpos específicos para o reagente específico para biomarcador de AD (por exemplo, anticorpos secundários), iniciadores para amplificação de um reagente específico para um biomarcador de AD que seja baseado em nucleótidos (por exemplo, um aptâmero) ou num 'rótulo' nucleotídico ligado ao reagente específico para o

biomarcador de AD, conjugados de avidina ou de estreptavidina para detecção de reagente ou reagentes específicos para biomarcador de AD modificado com biotina, e outros semelhantes. Os sistemas de detecção são bem conhecidos na técnica, e não é necessário descrevê-los mais em pormenor neste documento. Portanto, são descritos neste documento estojos para identificar um indivíduo com uma diminuição cognitiva ligeira (MCI), que incluem pelo menos um reagente específico para RANTES; e instruções para se levar a cabo o método. Em alguns exemplos, os estojos também incluem um reagente específico para a leptina. Em outros exemplos, são proporcionados neste documento estojos para monitorizar a progressão da doença de Alzheimer (AD) num paciente com AD, incluindo pelo menos um reagente específico para a leptina; e instruções para se levar a cabo o método. Também se descrevem neste documento estojos para classificar um paciente com doença de Alzheimer (AD), que incluem pelo menos um reagente específico para factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); pelo menos um reagente específico para factor de crescimento homodimérico BB derivado de plaquetas (PDGF-BB); e instruções para se levar a cabo o método.

Também se pode incluir nos estojos da invenção um substrato modificado ou outro sistema para a captura de biomarcadores de AD, em especial quando o estojo for concebido para utilização em ensaios em formato de sanduíche. O sistema de captura pode ser qualquer sistema de captura útil para um ensaio de um biomarcador de AD, tal

como uma placa com diversos poços revestidos com um reagente específico para um biomarcador de AD, pérolas revestidas com um reagente específico para um biomarcador de AD, e outros semelhantes. Os sistemas de captura são bem conhecidos na técnica e não é necessário fazer neste documento uma descrição mais pormenorizada.

Podem incluir-se os reagentes nos estojos sob a forma de um conjunto ordenado. Este conjunto incluirá pelo menos dois reagentes específicos para biomarcadores de AD (cada reagente específico para um biomarcador de AD diferente), ligados a um substrato constituindo um perfil previamente determinado (por exemplo, uma grelha). Portanto, a invenção presente proporciona conjuntos de "biomarcadores para diagnóstico da AD" incluindo, mas não se limitando a, GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1 α ; MSP-a; SCF; TGF- β 3; TNF- β MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Noutros exemplos, incluem-se nos "biomarcadores para o diagnóstico da AD" sem que se limitem a estes, o factor básico para o crescimento dos fibroblastos(bFGF), o factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB), o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o factor de crescimento epidérmico (EGF), o factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), a interleuquina-3 (IL-3), o receptor de

interleuquina 6 solúvel (sIL-6R), a Leptina (também denominada ob), a proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1δ), a cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP-α), a neurotrofina-3 (NT-3), o péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, o receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), o factor de células geminais (SCF), a trombopoietina (TPO), o inibidor tecidual de metaloproteases 1 (TIMP-1), o inibidor tecidual de metaloproteases 2 (TIMP-2), o factor de crescimento transformante beta 3 (TGF-β3), o factor de necrose tumoral beta (TNF-β). Noutros exemplos, os conjuntos incluem qualquer um, ou quaisquer dois, três ou quatro dos marcadores para diagnóstico da AD, Leptina, RANTES, PDGF-BB e BDNF. A localização dos reagentes específicos para os diferentes biomarcadores de AD (os "reagentes de captura") permite a medição dos teores em diversos biomarcadores de AD diferentes, numa só reacção. Os estojos incluindo os reagentes dispostos matricialmente em conjunto têm habitualmente um formato em sanduíche, e portanto estes estojos também podem incluir reagentes para detecção. Normalmente, o estojo incluirá diferentes reagentes para detecção, sendo cada reagente para detecção específico para um biomarcador de AD diferente. Os reagentes de detecção nestas concretizações são normalmente reagentes específicos para os mesmos biomarcadores de AD que os reagentes ligados ao substrato (embora os reagentes de detecção se liguem tipicamente a uma porção diferente ou a um local diferente do biomarcador de AD alvejado, daquelas a que os reagentes já ligados ao substrato se

ligam), e trata-se em geral de reagentes de detecção do tipo de afinidade. Tal como com reagentes para detecção para qualquer outro formato de ensaio, os reagentes de detecção podem ser modificados com uma espécie detectável, modificados para permitir a ligação de uma espécie detectável em separado, ou ser não modificados. Os estojos do tipo matricial incluindo reagentes de detecção que sejam quer não modificados, quer modificados para permitir a ligação de uma espécie detectável em separado, podem também conter espécies detectáveis adicionais (por exemplo, espécies detectáveis que se ligam ao reagente para detecção, tais como anticorpos marcados que se ligam a reagentes para detecção não modificados ou estreptavidina modificada com uma espécie detectável para detectar reagentes para detecção modificados com biotina).

As instruções relativas à utilização do estojos para levar a cabo a invenção descrevem em geral como utilizar o conteúdo do estojos para levar a cabo os métodos da invenção. Pode incluir-se nas instruções informação acerca das características das amostras utilizáveis (por exemplo, forma, processamento antes do ensaio, e dimensões), dos passos indispensáveis para se medir o ou os biomarcadores de AD, e da interpretação de resultados.

As instruções fornecidas nos estojos são tipicamente instruções escritas num rótulo ou inseridas numa embalagem (por exemplo, uma folha de papel incluída dentro do estojos), mas também são aceitáveis instruções que

possam ser lidas por máquinas (por exemplo, instruções contidas num disco de armazenagem, magnética ou óptica). Em algumas concretizações, as instruções legíveis por máquinas incluem programas para um computador digital programável, para comparar os valores medidos obtidos utilizando os reagentes incluídos no estojo.

Os Exemplos que se seguem são proporcionados para ilustrar a invenção, mas não se pretende que limitem de forma nenhuma o âmbito da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: biomarcadores para o diagnóstico da AD

Compararam-se os teores de expressão proteica no plasma para 120 proteínas em 32 casos de soro recolhido de pacientes com Doença de Alzheimer (com uma idade média de 74 anos) com os de 19 casos de soro recolhido de sujeitos de controlo (também com uma idade média de 74 anos). Os sujeitos com Doença de Alzheimer haviam sido previamente diagnosticados como portadores desta doença por um neurologista, e apresentavam classificações no Mini Exame de Estado Mental (MMSE) na gama de entre 26-14.

Ensaíaram-se as amostras de plasma utilizando um ELISA em formato sanduíche sobre um substrato que era um filtro em nitrocelulose. Diluíram-se as amostras de plasma a 1:10 num tampão fosfato e incubaram-se com o substrato de

captura (uma membrana em nitrocelulose com deposições pontuais de anticorpos para captura). Incubaram-se as amostras com o substrato para captura durante duas horas à temperatura ambiente, depois decantou-se para separar do substrato para captura. Lavou-se o substrato por duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem (1 X PBS; 0,05 % de Tween-20) à temperatura ambiente, e depois incubou-se com anticorpos biotinilados para detecção durante duas horas à temperatura ambiente. Decantou-se a solução dos anticorpos de captura e lavou-se o substrato por duas vezes durante 5 minutos com o tampão de lavagem. Incubou-se então o substrato lavado com um conjugado de peroxidase de raiz forte/estreptavidina durante 45 minutos, altura em que se decantou a solução do conjugado e se lavaram as membranas com tampão de lavagem por duas vezes durante 5 minutos. Transferiu-se o substrato para um pedaço de papel de filtro, incubou-se com solução de Tampão de Detecção Incrementada de quimioluminescência (ECL) adquirido à Raybiotech, Inc.. Detectou-se a quimioluminescência e quantificou-se com uma máquina fotográfica para se obterem imagens de quimioluminescência. Normalizaram-se as intensidades dos sinais às de proteínas padrão dispostas sobre o substrato, e utilizaram-se para calcular os teores relativos em biomarcadores. Noutros exemplos, normalizaram-se as intensidades dos sinais à sua mediana, e utilizaram-se para calcular os teores relativos nos biomarcadores.

Compararam-se os teores relativos nos biomarcadores em plasma entre os grupos de controlo e com AD, revelando

46 biomarcadores discriminatórios: GCSF; IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF- β 3; TNF- β MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R. Uma classificação não supervisionada (isto é, o algoritmo para aglomeração não sabe quais são os casos com AD e quais são os normais) dos resultados para os 46 marcadores discriminatórios resulta na aglomeração das amostras em 2 conjuntos, ou aglomerados, um conjunto com amostras de controlo, e um conjunto com amostras com AD. Calculou-se a sensibilidade das amostras com AD correctamente classificadas no conjunto de AD / número total de amostras com AD, que foi de 29/32 ou 90,6 %. Calculou-se a especificidade dividindo o número total de amostras de controlo correctamente classificadas como tal pelo número total de amostras de controlo, obtendo-se (14/19 = 73,6 %).

Compararam-se os teores nos biomarcadores entre os grupos de controlo e de AD, revelando 20 biomarcadores (listados na Tabela 3) que são diferencialmente regulados (todos eles são menores nas amostras de AD em comparação com as de controlo) nos dois conjuntos diferentes. Levou-se a cabo uma análise estatística para encontrar a probabilidade de que a determinação de teores diferenciais estivesse errada (o valor de "q") para cada um dos biomarcadores. Mostram-se na Tabela 3 os biomarcadores com

os seus teores diferenciais e os valores de q associados (sob a forma de valores percentuais), (a alteração em vezes indica a alteração quociente entre os teores nas amostras de controlo relativamente aos nas amostras de AD). Calculou-se a sensibilidade como o quociente do número de amostras de AD no conjunto AD a dividir pelo número total de amostras de AD, que era de 29/32 ou 90,6 %. Calculou-se a especificidade como sendo o quociente entre o número total de AD correctamente previsto, a dividir pelo número total de AD previsto (29/34 = 85 %).

Tabela 3

Biomarcador Qualitativo	Alteração em vezes (sob a forma de valor negativo ou diminuição)	valor de q (%)
Factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	0,536	1,656
Factor básico do crescimento epidérmico (bEGF)	0,673	1,656
Factor de crescimento epidérmico (EGF)	0,561	1,656
Factor-6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6)	0,664	1,656
Interleuquina-3 (IL-3)	0,758	1,656
Receptor de interleuquina 6 solúvel (sIL-6R)	0,676	1,656
Leptina (também denominada OB)	0,476	1,656
Proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1δ)	0,542	1,656
MSP-a	0,764	1,656
NAP-2	0,672	1,656
Neurotrofina-3 (NT-3)	0,698	1,656
Factor de crescimento derivado de plaquetas, dímero BB (PDGF-BB)	0,536	1,656

Biomarcador Qualitativo	Alteração em vezes (sob a forma de valor negativo ou diminuição)	valor de q (%)
RANTES	0,682	1,656
Factor de células estaminais (SCF)	0,730	1,656
sTNF RII	0,700	1,656
Factor de crescimento beta 3 transformante (TGF- β 3)	0,769	1,656
Inibidor tecidual de metaloproteases 1 (TIMP-1)	0,716	1,656
Inibidor tecidual de metaloproteases 2 (TIMP-2)	0,750	1,656
Factor de necrose tumoral beta (TNF- β)	0,649	1,656
TPO	0,714	1,656

Exemplo 2: Árvores de decisão a partir de dados de marcadores para diagnóstico de AD

Depois DE se analisarem em mais pormenor os dados do exemplo 1, formularam-se duas árvores de decisão diferentes para o diagnóstico para AD utilizando biomarcadores para o diagnóstico da AD.

A primeira árvore de decisão utiliza os teores em sIL-6R, IL-8, e TIMP 1. As regras que constituem a árvore de decisão são: (1) Quando sIL-6R $\leq$ 5,18 e IL-8 for $\leq$ 0,957, a indicação é normal; (2) quando sIL-6R $\leq$ 5,18 e IL-8 $>$ 0,957, a indicação é AD; (3) quando sIL-6R $>$ 5,18 e TIMP 1 $\leq$ 7,978, a indicação é AD; e (4) quando sIL-6R $>$ 5,18 e TIMP 1 for $>$ 7,978, a indicação é normal, em que os valores expressos são concentrações relativas.

Mediu-se a precisão desta árvore de decisão utilizando um dispositivo para validação cruzada a 10 vezes

no CART, para se gerarem taxas de classificação errada para amostras de aprendizagem e para amostras de teste. Calculou-se a sensibilidade a partir das classificações no teste, como sendo o número de amostras com AD correctamente classificadas como de AD / número total de amostras com AD ($29/32 = 0,906$). Calculou-se a especificidade a partir das classificações no teste, sob a forma de total de casos de AD correctamente previstos/ número total de casos de AD prevista ($29/33 = 0,878$).

Formulou-se uma segunda árvore de decisão utilizando os teores em BDNF, TIMP 1 e MIP-1 δ . As regras que constituem a árvore de decisão são: (1) quando $BDNF > 4,476$, a indicação é normal; (2) quando $BDNF \leq 4,476$ e $TIMP\ 1 \leq 8,942$, a indicação é AD; (3) quando $BDNF \leq 4,476$, $TIMP\ 1 > 8,942$, e $MIP-1\delta \leq 1,89$, a indicação é AD; e (4) quando $BDNF < 4,476$, $TIMP\ 1 > 8,942$, e $MIP-1\delta > 1,89$, a indicação é normal. Mediu-se a precisão desta árvore de decisão utilizando um dispositivo para validação cruzada a 10 vezes no CART, para se gerarem taxas de classificação errada para amostras de aprendizagem e para amostras de teste. Calculou-se a sensibilidade a partir das classificações no teste, como sendo o número de amostras com AD correctamente classificadas como de AD / número total de amostras com AD (0,875). Calculou-se a especificidade a partir das classificações no teste, sob a forma de total de casos de AD correctamente previstos/ número total de casos de AD prevista (0,82).

Exemplo 3: Diagnóstico de MCI (não fazendo parte da invenção presente)

Mediram-se os teores em RANTES e Leptina em 18 amostras de sujeitos de controlo (média de idades = 74) e em 6 amostras de pacientes diagnosticados com diminuição cognitiva ligeira (MCI). Os pacientes com MCI haviam sido diagnosticados medicinalmente por um neurologista, e tinham classificações no AULT-A7 inferiores a 5 e no Mini Exame do Estado Mental (MMSE) na gama de 30-28. Os sujeitos de controlo apresentavam classificações no AULT-A7 maiores ou iguais a 5 e classificações no MMSE na gama de 30-28.

Mediram-se os teores em RANTES e em Leptina utilizando um estojo de ELISA da R&D systems e seguindo as instruções do fabricante. Normalizaram-se os valores crus obtidos dos valores expressos em ELISA, dividindo cada valor pela mediana para todas as amostras. Por análise dos dados verificou-se que (a) a Leptina não decresce nos pacientes com MCI, em comparação com sujeitos de controlo (nas seis amostras de MCI, a Leptina era de facto 11 % mais elevada do que nos sujeitos de controlo), e (b) observa-se uma distribuição bimodal de RANTES, na qual os pacientes com MCI apresentavam teores em RANTES de entre 1,043 e 1,183 (os teores nos sujeitos de controlo eram quer $\leq 1,043$, quer $>1,183$). No entanto, uma inspecção mais pormenorizada dos dados levou-nos a crer que aqueles sujeitos de controlo com RANTES $\leq 1,043$ tinham sido

incorrectamente classificados como normais (e deveriam ter sido diagnosticados como MCI).

Uma reclassificação dos sujeitos de controlo com $RANTES \leq 1,043$ como pacientes com MCI permite a criação de uma regra simples: quando $RANTES \leq 1,183$ e $Leptina \geq 0,676$, a indicação é de MCI. A sensibilidade e a especificidade, calculadas tal como se descreveu no Exemplo 2, eram respectivamente de 83,3 % e de 88,88 %.

Exemplo 4: Monitorização e classificação de pacientes com AD (que não faz parte da invenção presente)

Mediram-se os teores em RANTES, Leptina, PDGF-BB, e BDNF em amostras de soro recolhidas de 36 pacientes a que se havia diagnosticado doença de Alzheimer. (média de idades de 74 anos) utilizando estojos para ELISA da R&D systems, seguindo as instruções do fabricante. Dividiram-se os valores em bruto obtidos como valores de expressão no ELISA, para se normalizarem, pela mediana de todas as amostras. Agruparam-se as amostras em três classes com base nas classificações dos pacientes por MMSE: Classe 1 (AD ligeira), MMSE 27-22; Classe 2 (AD moderada), MMSE 21-16; e Classe 3 (AD severa), MMSE 15-12.

Depois de se analisarem os dados de ELISA, formulou-se uma árvore de decisão utilizando BDNF e PDGF-BB. As regras utilizadas nesta árvore de decisão são: (1) quando $BDNF \leq 0,626$, a indicação é AD ligeira; (2) quando

BDNF $> 0,626$ e PDGF-BB $\leq 0,919$, a indicação é AD moderada; e (3) quando BDNF $> 0,626$ e PDGF-BB $> 0,919$, a indicação é AD severa. Os valores expressos são concentrações relativas que foram normalizadas à mediana. Os teores médios normalizados para a Leptina eram: Classe I = 0,886; classe II = 0,757; classe III = 0,589. Os valores normalizados médios para BDNF eram: Classe I = 0,595; classe II = 0,956; classe III = 1,23. Quando aplicada a um conjunto de dados de "teste", a árvore de decisão produziu uma classificação de 58 %, 47 %, e 57 % por cento correcta das amostras em teste pelas categorias ligeira, moderada, e severa.

**Exemplo 5: Quatro Marcadores Discriminatórios
(não formando parte da invenção presente)**

Mediram-se as concentrações absolutas no plasma para apenas 4 marcadores discriminatórios, BDNF, PDGF-BB, LEPTINA, e RANTES, por ELISA, e utilizaram-se para a classificação de amostras. Os estojos de ELISA foram adquiridos à R&D Systems, e obtiveram-se as medições seguindo as recomendações do fabricante. Por exemplo, para RANTES, seguiu-se o protocolo seguinte.

1. Adicionar padrões com 50 μ L, espécimenes ou controlos aos poços apropriados.
2. Adicionar 50 μ L de Conjugado de Biotina anti-RANTES a cada poço.
3. Incubar os poços a 37°C durante 1 hora.

4. Aspirar e lavar os poços 4 x com Tampão de Lavagem de Trabalho.
5. Adicionar 100 µL de Conjugado de Trabalho de Estreptavidina-HRP a cada poço.
6. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.
7. Aspirar e lavar os poços 4 x com Tampão de Lavagem de Trabalho.
8. Adicionar 100 µL de cromogénio Estabilizado a cada poço.
9. Incubar à temperatura ambiente durante 30 minutos às escuras.
10. Adicionar 100 µL de Solução de Paragem a cada poço.
11. Ler a absorvância a 450 nm.

Seguindo o protocolo acima, levou-se a cabo um agrupamento não supervisionado dos teores em BDNF, PDGF-BB, LEPTINA, e RANTES utilizando o programa de agrupamento disponível ao público na internet wCLUTO, em cluto.ccgb.umn.edu/cgi-bin/wCluto/wCluto.cgi. Neste caso o agrupamento das 4 proteínas resultou num agrupamento das amostras em 2 conjuntos ou agrupamentos, um conjunto com as amostras de controlo e um conjunto com as amostras de AD. Calculou-se a sensibilidade como sendo o número de amostras de AD correctamente classificadas no agrupamento da AD a dividir pelo número total de amostras de AD, o que é de 21/24 ou 87,5 %. Calculou-se a especificidade como o número total de amostras de controlo correctamente classificadas

no agrupamento de controlo, a dividir pelo número total de controlos, ou seja $20/24 = 83,3 \%$.

Além disto, correlacionaram-se os valores absolutos dos teores em biomarcadores no plasma (tal como medidos por ELISA) para BDNF, PDGF-BB, e LEPTINA, com as classificações no MMSE (na gama de 12-30). Podia identificar-se a AD nas classificações por MMSE na gama de 12-28 e podiam identificar-se as amostras de controlo nas classificações por MMSE na gama de 25-30. A Tabela 4 mostra as correlações e a sua significância estatística (valor de p). As correlações superior e inferior mostram se a parte superior das classificações por MMSE e as concentrações dos teores em biomarcadores ou a parte inferior da gama de classificações por MMSE e as concentrações em biomarcadores estão mais correlacionadas. Portanto, as correlações mostram que teores superiores em BDNF e Leptina se correlacionam significativamente com melhores classificações por MMSE, e que um aumento da concentração em BDNF e em Leptina a partir de um ponto de referência ou de uma amostra anterior é uma indicação de melhoria do conhecimento tal como medida por MMSE. Em simultâneo, ou por si só, as menores concentrações em PDGF-BB nos homens estão significativamente correlacionadas com melhores classificações por MMSE, e uma diminuição da concentração em PDGF-BB numa amostra do sexo masculino, em comparação com uma amostra anterior do mesmo indivíduo, é uma indicação de uma melhoria no conhecimento tal como quantificada pelo MMSE.

Os resultados mostram (Tabela 4) a correlação entre a concentração no plasma de 3 proteínas discriminatórias para a AD e as classificações por MMSE dos sujeitos, bem como a correlação entre as concentrações em proteínas que são discriminatórias para a AD. Não existia qualquer correlação entre a classificação por MMSE e a idade em pacientes com AD e não havia qualquer correlação entre a Idade e a concentração em BDNF, PDGF-BB, ou LEPTINA no plasma entre os sujeitos com AD. os valores de p mostram que as correlações são estatisticamente significativas. A contagem mostra o número de casos. A BDNF apresenta uma correlação estatisticamente significativa e positiva com as classificações por MMSE. A PDGF-BB apresenta uma correlação estatisticamente significativa e negativa com as classificações por MMSE em homens. A LEPTINA apresenta uma correlação estatisticamente significativa e positiva com as classificações por MMSE. Esta experiência demonstra que as concentrações no plasma de PDGF-BB, LEPTINA, e BDNF podem ser utilizadas para monitorizar a progressão do declínio cognitivo.

Tabela 4

	Correlação	Contagem	Valor de Z	Valor de p	95 % Inferiores	95 % Superiores
BDNF com MMSE	0,184	165	2,373	0,0176	0,032	0,328
BDNF com MMSE (Mulheres)	0,229	91	2,18	0,0289	0,024	0,415
PDGF-BB com MMSE (Homens)	-0,207	74	-1,769	0,0768	-0,416	0,023
LEPTIN com MMSE	0,193	164	2,478	0,0132	0,041	0,338
BDNF com PDGF-BB	0,700	181	11,575	0,0001	0,617	0,768
PDGF-BB com RANTES	0,563	181	8,5	0,0001	0,454	0,655
BDNF com RANTES	0,714	181	11,9	0,0001	0,634	0,779

Os controlos e os casos com AD eram da mesma faixa etária, com uma média de idades de 74. A classificação média por MMSE para os casos de AD (n= 24) era de 20, enquanto a classificação média por MMSE para os casos de controlo (n=24) era de 30. Levou-se a cabo a classificação as amostras por agrupamento não supervisionado da concentração proteica. A precisão total da classificação foi de 85,4 %. Estes resultados demonstraram que as concentrações proteicas no plasma para BDNF, PDGF-BB, LEPTINA, e RANTES, tal como medidas por ELISA, podem ser utilizadas para discriminar com precisão entre AD e controlos.

Exemplo 6: Validação das concentrações médias em AD e nos Controlos por ELISA (não formando parte da invenção presente)

Mostram-se as concentrações no plasma de proteínas, LEPTINA, BDNF e RANTES, em amostras de AD (n=95) em comparação com as de Controlos (n=88) da mesma faixa etária, nas Figuras 1A-1C. Uma das quatro proteínas quantificadas foi o Factor Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). A concentração média em BDNF no plasma de AD era de 8,1 ng/mL (EP +/- 0,4) comparada com a média no plasma dos controlos, de 10,8 ng/mL (EP +/- 0,68) e verificou-se que a diferença tinha uma elevada significância estatística (valor de $p = 0,0006$). Também se verificou que as concentrações no plasma de BDNF eram inferiores em outras

formas de demência (5,74 ng/mL, n=20) do que na AD. A concentração média de uma segunda proteína, a Leptina no plasma de AD era de 10,9 ng/mL (EP +/- 1,06) comparada com a média no plasma dos controlos 17,4 ng/mL (EP +/- 1,8) verificando-se que a diferença tinha uma elevada significância estatística (valor de $p = 0,0018$). A concentração média de uma terceira proteína, Rantes, no plasma de AD, era de 66,3 ng/mL (EP +/- 2,4) comparada com as amostras de controlo a 74,5 ng/mL (EP +/- 3,2) verificando-se que a diferença era estatisticamente significativa (valor de $p = 0,0403$). Não se observou nenhuma diferença entre as médias dos teores em RANTES, PDGF-BB, e BDNF entre os sujeitos com AD com classificações MMSE ≥ 20 (n=54) e as dos com <20 (n=41).

Exemplo 7: Concentrações absolutas dos biomarcadores no plasma (não formando parte da invenção presente)

Adicionalmente, mediram-se as concentrações absolutas em biomarcadores no plasma para BDNF, e compararam-se com a concentração média para Controlos na MCI (Diminuição Cognitiva Ligeira), MMSE 25-28, MMSE 20-25, e MMSE 10-20. Para os objectivos desta experiência, o índice que se utiliza no exemplo que se segue é: AD questionável é quando a classificação por MMSE está na gama de 25-28; AD ligeira é quando a classificação por MMSE é de 20-25; e AD moderada é quando a classificação por MMSE é de 10-20 sendo uma AD severa quando a classificação por MMSE é

de 10-20. Para os objectivos do Exemplo 7, todos os indivíduos avaliados como sendo portadores de uma AD Questionável foram diagnosticados por um médico como sendo portadores de AD. A Figura 2 mostra que as concentrações médias no plasma em BDNF para MMSE 25-28; MMSE 20-25; MMSE 10-20, são significativamente menores do que a concentração média no plasma para os Controlos (Normais, média de idades 74) e que a concentração média em BDNF nos MCI é significativamente maior do que nos Controlos e para todos os casos de AD. Fig. 2.

Teste t desemparelhado para BDNF no plasma Variável de Agrupamento: estágio Diferença Hipotética = 0 Critério de Inclusão: Faíscas de Centro All				
	Dif. Médias	de DF	valor de t	valor de p
MCI, ligeira	6349,252	47	3,050	0038
MCI, moderada	6828,574	31	2,651	0125
MCI, normal	3961,358	86	1,442	1529
MCI, questionável	7547,218	17	2,550	0207
ligeira, moderada	479,322	68	,460	6467
ligeira, normal	-2387,894	123	-2,270	0250
ligeira, questionável	1197,966	54	,969	,3369
moderada, normal	-2867,216	107	-2,175	0319
moderada, questionável	718,644	38	475	6372
normal, questionável	3585,860	93	1,993	0492

Informação para o Conjunto de BDNF no plasma

Variável de Agrupamento: estágio

Critério de Inclusão: Faíscas de Centro All

	Contagem	Média	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
MCI	6	14879,833	85932530,967	9269,980	3784 454
ligeira	43	8530,581	152991257,963	3911,421	596,487
moderada	27	8051,259	22317487 815	4724,139	909,161
normal	82	10918,476	39478328,993	6283,178	693,861
questionável	13	7332,615	15122872,923	3888,814	1078,563

Adicionalmente, compararam-se as concentrações absolutas em BDNF, em amostras de plasma recolhidas de quatro Centros de Alzheimer diferentes, quanto a diferenças por género, na média das concentrações entre pacientes com AD (sexo feminino) e Controlo (sexo feminino) e entre AD (sexo masculino) e Controlo (sexo masculino). A Fig. 3 mostra que existe uma diferença de 40 % na concentração em BDNF nos indivíduos do sexo feminino com AD em comparação com os indivíduos do sexo feminino de Controlo e que esta diferença é altamente significativa estatisticamente (valor de $p = 0,004$). A diferença entre a concentração média em BDNF para todos os casos de AD comparada com todos os casos de Controlo foi determinada como sendo extremamente significativa do ponto de vista estatístico (valor de $p = 0,0006$).

Teste t desemparelhado para BDNF no plasma				
Variável de Agrupamento: Doença				
Separados por: sexo				
Diferença Hipotética = 0				
Exclusão de linha: Centro All				
	Diferença de Médias	DF	valor de t	valor de p
AD, Controlo: Total	-2974,140	187	-3,482	0,0006
AD, Controlo: F	-3939,353	87	-2,924	0,0044
AD, Controlo: M	-1348,601	92	-1,165	0,2469

Os resultados para totais podem não concordar com os resultados para células individuais por causa de valor que faltam para variáveis divididas.

Informação sobre o Conjunto para BDNF plasma					
Variável de Agrupamento: Doença					
Separados por: sexo					
Exclusão de Linhas: Centro All					
	Contagem Média		Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
AD: Total	106	5596,113	24323422,844	4931,878	479,026
AD: F	38	5775,921	25121499,318	5012,133	813,076
AD: M	62	3396,774	24336564,079	4923,210	626,516
Controlo: Total	83	8570,253	46322420,606	6806,058	747,062
Controlo: F	51	9715,275	50173107,603	7003,298	991,860
Controlo: M	32	6745,375	36011373,274	6000,948	1060,828

Os resultados para totais podem não concordar com os resultados para células individuais por causa de valor que faltam para variáveis divididas.

Adicionalmente, mediram-se as concentrações absolutas em biomarcadores no plasma para RANTES em amostras de plasma obtidas em quatro Centros de Alzheimer diferentes, e compararam-se as médias das concentrações para Controlos com as dos MCI (Diminuição Cognitiva Ligeira), MMSE 25-28; (MMSE 20-25; MMSE 10-20; e MMSE 10-20. O índice foi descrito acima. Verificou-se que todas as diferenças, entre AD ligeira comparada com AD Moderada, AD ligeira comparada com Normal, AD ligeira comparada com AD Severa, AD Moderada comparada com Normal, AD Questionável

comparada com Normal, Normal comparado com AD Severa, eram todas estatisticamente significativas. Fig. 4.

Teste t Desemparelhado para RANTES ELISA Variável de Agrupamento: estágio Diferença Hipotética = 0 Exclusão de Linha: Centro All					
		Diferença entre Médias	DF	valor de t	valor de p
MCI, ligeira		84,789	64	007	,9945
MCI, moderada		12454,688	51	1,042	,3022
MCI, normal		-10422,892	106	-866	,3884
MCI, questionável		9682,438	29	682	,5007
MCI, severa		50349,200	10	1,647	,1305
ligeira, moderada		12369,899	97	1,814	,0728
ligeira, normal		-10507,681	152	-1,775	,0780
ligeira, questionável		9597,649	75	1,081	,2830
ligeira, severa		50264,411	56	2,031	,0470
moderada, normal		-22977,580	139	-3,606	,0004
moderada, questionável		-2772,250	62	-315	,7535
moderada, severa		37894,512	43	1,647	,1069
normal, questionável		20105,330	117	2,353	,0203
normal, severa		60772,092	98	2,395	,0185
questionável, severa		40666,762	21	1,624	,1192

Informação do Agrupamento RANTES ELISA Variável de Agrupamento: estágio Exclusão de Linha: Centro All					
		Contagem	Média	Variância	Desvio Erro
					Padrão Padrão
MCI	10	54919,200	1729660285,733	41589,185	13151,655
ligeira	56	54834,411	1203622609,701	34693,265	4636,082
moderada	43	42464,512	1036226732,256	32190,476	4909,002
normal	98	65342,092	1275358885,672	35712,167	3607,474
questionável	21	45236,762	1201710117,890	34665,691	7564,674

Informação do Agrupamento RANTES ELISA					
Variável de Agrupamento: estágio					
Exclusão de Linha: Centro All					
	Contagem	Média	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
severa	21	4570,000	2976800,000	1725,341	1220,000

Adicionalmente, mediram-se as concentrações absolutas de biomarcadores no plasma para a Leptina em amostras de plasma recolhidas junto de quatro Centros de Alzheimer diferentes, e compararam-se as concentrações médias para Controlos com as de MCI (Diminuição Cognitiva Ligeira); MMSE 25-28; MMSE 20-25; MMSE 10-20; e MMSE 10-20. Verificou-se que eram estatisticamente significativas as diferenças médias entre AD Questionável em comparação com MCI, AD Ligeira comparada com Normal, AD Ligeira comparada com AD Questionável, AD Questionável comparada com Normal, e AD Moderada comparada com Normal. Fig. 5.

Teste t desemparelhado para Leptina ELISA				
Variável de Agrupamento: estágio				
Diferença Hipotética = 0				
Exclusão de Linhas : Centro All				
	Diferença entre Médias	DF	valor de t	valor de p
MCI, ligeira	4164,889	64	1,338	,1856
MCI, moderada	4707,044	51	1,061	,2939
MCI, normal	-650,092	105	-123	,9022
MCI, questionável	7793,348	29	2,000	,0550
MCI, severa	8187,800	10	739	,4767
ligeira, moderada	542,155	97	,272	,7860
ligeira, normal	-4814,981	151	-2,117	,0359

ligeira, questionável	3628,458	75	1,897	,0617
ligeira, severa	4022,911	56	734	,4661
moderada, normal	-5351,136	138	-1,963	,0516
moderada, questionável	3086,303	62	1,085	,2822
moderada, severa	3480,756	43	,403	,6892
normal, questionável	8443,439	116	2,369	,0195
normal, severa	8837,892	97	778	,4383
questionável, severa	394,452	21	078	,9383

Informação sobre o Conjunto Leptina ELISA

Variável de Agrupamento: estágio

Exclusão de Linha: Centro All

		Contagem Média	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
MCI	10	15727,300	225300738,678	15010,021	4746,585
ligeira	56	11562,411	58790550,756	7667,500	1024,613
moderada	43	11020,256	145797834,909	12074,677	1841,371
normal	97	16377,392	255125297,032	15972,642	1621,776
questionável	21	7933,952	471333192,348	6916,154	1509,229
severa	2	7539,500	16125520,504	4015,659	2839,500

Além disto, mediram-se as concentrações absolutas em biomarcadores no plasma para PDGF-BB em amostras de plasma recolhidas em quatro Centros de Alzheimer, e compararam-se as médias das concentrações para Controlos com as relativas a MCI (Ligeira Diminuição Cognitiva); MMSE 25-28; MMSE 20-25; MMSE 10-20; e MMSE 10-20. As diferenças médias entre AD Questionável comparada com AD Ligeira, AD Ligeira comparada com AD Severa, AD Moderada comparada com AD Severa, Normal comparado com AD Questionável, e Normal

comparado com AD Severa eram todas estatisticamente significativas. Fig. 6.

Teste t desemparelhado para Agrupamento de PDGF-BB Variável de Agrupamento ELISA: estágio Diferença Hipotética = 0 Exclusão de Linha: Centro All					
	Diferença entre Médias	DF	valor de t	valor de p	
MCI, ligeira	-62,275	58	-286	7756	
MCI, moderada,	81,595	44	411	6831	
MCI, normal	-42,865	103	-,210	8343	
MCI, questionável	191,571	28	810	4246	
MCI, severa	637,000	9	1,072	3117	
ligeira, moderada	143,869	86	1,285	2023	
ligeira, normal	19,410	145	199	,8426	
ligeira, questionável	253,846	70	1,812	0742	
ligeira, severa	699,275	51	1,745	0871	
moderada, normal	-124,439	131	-1,201	2320	
moderada, questionável	109,977	56	,869	3885	
moderada, severa	555,405	37	1,716	0945	
normal, questionável	234,436	115	1,761	0799	
normal, severa	679,865	96	1,696	0931	
questionável, severa	445,429	21	1,278	2153	
Informação do Conjunto para PDGF-BB ELISA Variável para Agrupamento: estágio Exclusão de Linha: Centro All					
	Contagem	Média	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
MCI	9	731,000	650139,000	806,312	268,771
ligeira	51	793,275	315391,883	561,598	78,639
moderada	37	649,405	204231,470	451,920	74,295

Informação do Conjunto para PDGF-BB ELISA					
Variável para Agrupamento: estágio					
Exclusão de Linha: Centro All					
	Contagem	Média	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
normal	96	773,865	318171,171	564,067	57,570
questionável	21	539,429	233024,657	482,726	105,340
severa	2	94,000	648,000	25,456	18,000

Além disto, mediram-se concentrações absolutas de e biomarcadores no plasma para o BDNF em amostras de plasma recolhidas em quatro Centros de Alzheimer diferentes, e compararam-se as concentrações médias para os Controlos com MCI (Diminuição Cognitiva Ligeira), AD Questionável (MMSE 25-28), e AS Ligeira; verificou-se que a diferença de MCI comparada com AD Moderada, MCI comparada com AD Questionável, AD Ligeira comparada com Normal, AD Ligeira comparada com AD severa, Moderada com Normal, Normal com AD Questionável, e Normal com AD Severa, eram todas estatisticamente significativas. Fig. 7.

Teste t desemparelhado para BDNF plasma				
Variável para Agrupamento: estágio				
Diferença Hipotática = 0				
Exclusão de Linha: Centro All				
	Diferença entre Médias	DF	valor t	de valor p
MCI, ligeira	2819,186	64	1,433	,1568
MCI, moderada	4071,016	51	1,877	,0663
MCI, normal	124,278	106	,053	,9578
MCI, questionável	4535,757	29	1,806	,0813
MCI, severa	8660,400	10	1,202	,2370
ligeira, moderada	1251 831	97	1,262	,2098
ligeira, normal	-2694,908	152	-2,638	,0092
ligeira, questionável	1716,571	75	1,447	,1520
ligeira, severa	5841,214	56	1,726	,0898
moderada, normal	-3946,7391	139	-3,431	,0008

moderada, questionável	464,741	62	,360	,7199
moderada, severa	4589,384	43	1,265	,2128
normal, questionável	4411,480	117	2,868	,0049
normal, severa	8536,122	98	1,781	,0781
questionável, severa	4124,643	21	1,321	,2006

Informação sobre o Conjunto BDNF plasma					
Variável para Agrupamento: estágio					
Exclusão de Linha: Centro All					

	Contagem	Média	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
MCI	10	9511,900	96113654,322	9803,757	3100,220
ligeira	56	6692,714	22509096,208	4744,375	633,994
moderada	43	5440,884	25765123,534	5075,936	774,073
normal	98	9387,622	45504479,969	6745,701	681,419
questionável	21	4976,143	18681976,129	4322,265	943,196
severa	2	851,500	63724,500	252,437	178,500

Verificou-se que para AD Questionável (classificação MMSE na gama de 25-28), os teores em Leptina e PDGF-BB aumentam significativamente enquanto os em BDNF e RANTES não se alteram significativamente. Verificou-se que entre AD Ligeira (classificação MMSE na gama de 20-25) e AD Moderada (classificação MMSE na gama de 10-20), o teor em LEPTINA não declina, enquanto os teores em RANTES, BDNF e PDGF-BB declinam.

Exemplo 8 (não formando parte da invenção presente)

Numa tentativa para se identificarem proteínas que se alterem no sistema imunológico periférico numa AD, quantificaram-se os teores de expressão de 120 citocinas, quimioquinas, e factores de crescimento no plasma de 32 pacientes com AD e de 19 controlos da mesma faixa etária e não dementes, utilizando conjuntos de pontos de anticorpos sobre filtros. Uma análise estatística identificou 20 proteínas significativamente diferentes nos casos de AD e nos controlos. Seis delas, incluindo factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e NT-3, bem como PDGF-BB, EGF, FGF-6, bFGF, TGF- β 3 possuem actividades neurotróficas conhecidas e tinham diminuído apreciavelmente no plasma dos AD. Os teores em BDNF correlacionavam com melhor função cognitiva no mini exame do estado mental (MMSE). Medições do teor em BDNF no plasma para duzentos casos de AD e controlos, utilizando um ELISA comercial em sanduíche, denotaram uma diminuição altamente significativa em 25 % para os casos de AD. De um modo consistente com os dados do conjunto de biomarcadores, os teores menores em BDNF no plasma estavam associados com uma diminuição da função memória. A BDNF é crítica para a manutenção neuronal, a sobrevivência, e a função. Sem denotar nenhuma ligação a uma teoria qualquer, uma diminuição dos teores sanguíneos em neurotrofinas e em BDNF podem ser ligados à neurodegeneração e à patologia cognitiva na AD.

Exemplo 9: Biomarcadores Adicionais

Adicionalmente, correlacionaram-se teores qualitativos em biomarcadores para GDNF, SDF-1, IGFBP3, FGF-6, TGF- β 3, BMP-4, NT-3, EGF, BDNF, IGFBP-2 com as classificações por MMSE (gama de 12-30) para a AD (classificações MMSE na gama 12-28) e para amostras de controlo (classificações MMSE na gama 25-30). A Tabela 5 mostra as correlações e a sua significância estatística (valor de p). As correlações superior e inferior mostram se a parte superior da gama de classificações por MMSE e as concentrações em biomarcadores, ou a parte inferior das classificações por MMSE e as concentrações em biomarcadores, estão mais correlacionadas. Uma correlação negativa significa que as classificações por MMSE aumentam para teores decrescentes em biomarcador, e vice-versa. Uma correlação positiva significa que as classificações por MMSE aumentam quando aumentam os teores em biomarcador.

TABELA 5

	Correlação	Contagem	valor de Z	valor de p	95 % Inferiores	95 % Superiores
GDNF com MMSE	-0,258	42	-1,646	0,0997	-0,521	0,05
SDF-1 com MMSE	-0,363	42	-2,375	0,0175	-0,601	-0,066
IGFBP-3 com MMSE	0,293	42	1,886	0,0593	-0,012	0,548
FGF-6 com MMSE	0,471	42	3,192	0,0014	0,195	0,687
TGF- β 3 com MMSE	0,317	42	2,049	0,0405	0,014	0,566
BMP-4 com MMSE	0,294	42	1,845	0,0583	-0,011	0,545
NT-3 com MMSE	0,327	42	2,118	0,0342	0,025	0,574
EGF com	0,409	42	2,711	0,0067	0,12	0,634

					95 % Inferiores	95 % Superiores
	Correlação	Contagem	valor de Z	valor de p		
MMSE						
BDNF com	0,464	42	3,139	0,0017	0,187	0,673
MMSE						
IGFBP-2	0,498	24	2,5	0,0123	0,118	0,75
com MMSE						
(Mulheres)						

Exemplo 10

Este exemplo mostra a Tabela 6, um Resumo dos Marcadores Quantitativos para Identificação e Classificação da AD.

TABELA 6

Referências	Amostras	Biomarcador no Plasma	% de Diferença nas Amostras	valor de p
Normal	AD Questionável	BDNF	-46 %	0,0049
Normal	AD Questionável	Leptina	-52 %	0,0195
Normal	AD Questionável	RANTES	-31 %	0,0203
Normal	AD Questionável	PDGF-BB	-30 %	0,0799
Normal	AD Ligeira	BDNF	-29 %	0,0092
Normal	AD Ligeira	Leptina	-29 %	0,0359
Normal	AD Ligeira	RANTES	-16 %	0,0780
Normal	AD Moderada	BDNF	-42 %	0,0008
Normal	AD Moderada	Leptina	-33 %	0,0359
Normal	AD Moderada	RANTES	-35 %	0,0004
Normal	AD Severa	BDNF	-90 %	0,0781
Normal	AD Severa	RANTES	-93 %	0,0185
Normal	AD Severa	PDGF-BB	-89 %	0,0931
AD Questionável	AD Ligeira	Leptina	45 %	0,0617
AD Questionável	AD Ligeira	PDGF-BB	46 %	0,0742
AD Ligeira	AD Moderada	RANTES	-23 %	0,0780
AD Ligeira	AD Severa	BDNF	-87 %	0,0898
AD Ligeira	AD Severa	RANTES	-92 %	0,0470
AD Ligeira	AD Severa	PDGF-BB	-88 %	0,0871
AD Questionável	MCI	BDNF	91 %	0,0813
AD Questionável	MCI	Leptina	98 %	0,0550
MCI	AD Ligeira	BDNF	-42 %	0,0038

Portanto, a invenção presente descreve métodos para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que incluem comparar um teor medido em pelo menos 4 biomarcadores para o diagnóstico da AD, em que nos biomarcadores referidos se incluam BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES, numa amostra de um fluido biológico de um indivíduo, com um teor de referência para cada um dos biomarcadores para diagnóstico da AD. São portanto descritos métodos nos quais a BDNF diminui em pelo menos cerca de 10 %, cerca de 15 %, cerca de 20 %, cerca de 25 % ou cerca de 30 %, em comparação com um teor de referência em BDNF, indicando diminuição cognitiva, tal como por exemplo, sendo uma indicação de AD. São portanto descritos métodos nos quais a Leptina diminui em pelo menos cerca de 10 %, cerca de 15 %, cerca de 20 %, cerca de 25 % ou cerca de 30 %, em comparação com um teor de referência para a Leptina, indicando diminuição cognitiva, tal como por exemplo, sendo uma indicação de AD. São portanto descritos métodos nos quais a RANTES diminui pelo menos em cerca de 5 %, cerca de 10 %, ou cerca de 15 %, em comparação com m teor de referência para RANTES, indicando diminuição cognitiva, tal como por exemplo, sendo uma indicação de AD. São portanto descritos métodos nos quais a PDGF-BB diminui em pelo menos cerca de 80 %, cerca de 85 % ou cerca de 90 %, em comparação com um teor de referência para a PDGF-BB, indicando diminuição cognitiva, tal como por exemplo, sendo uma indicação de AD severa.

TABELA 7

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
glicoproteína ácida alfa-1		fase aguda	
antitripsina alfa-1		fase aguda	
Ceruloplasmina		fase aguda	
Haptoglobina		fase aguda	
Hemopexina		fase aguda	
Hemoxygenase		fase aguda	
inibidor 1 de activador de plasminogénio	PAI-1	fase aguda	
amilóide A do soro	SAA	fase aguda	
amilóide P do soro	SAP	fase aguda	
ligando 4-11313	4-1BBL/CD137L	apoptose	P41273
BAFF	TALL-1	apoptose	Q9I275
receptor 3 de TRAIL solúvel	TRAIL sR3/ TNFR S10C	apoptose	014755
receptor 4 de TRAIL solúvel	TRAIT sR4/TNFR S10D	apoptose	Q9UBN6
ligando Ia de morte relacionado com TNF	TRDL-Ia/ APRIL	apoptose	AF046888
TNFSF-14	LIGHT	apoptose	043557
TRAIL	Apo2L	apoptose	P50591
BCA-1	BLC	quimioquina	043927
CCL-28	CCK-1	quimioquina	
quimioquina cutânea atratora de células T	CTACK, CCL27	quimioquina	QgzIX0
ENA-78		quimioquina	P42830
Eotaxina-1		quimioquina	P51671
Eotaxina-2	MPIF-2	quimioquina	000175
Eotaxina-3	CCL26	quimioquina	Q9I258
Fractalquina	neurotactina	quimioquina	P78423
proteínas 2 quimiotáticas de Granulócitos	GCP-2	quimioquina	P80162
GRO alfa	MGSA	quimioquina	P09341
GRO beta	MIP-2alfa	quimioquina	P19875
GRO gama	MIP-2beta	quimioquina	P19876
quimioquina 1	HCC-1	quimioquina	Q16627
hemoinfiltrada CC			
quimioquina 4	HCC-4/ CCL16	quimioquina	015476
hemoinfiltrada CC			
I-309	TCA-3/ CCL-1	quimioquina	P22362
proteína-10 induzível por IFN gama	IP-10	quimioquina	P02778
quimioquina alfa de células T induzível por IFN	I-TAC/ CXCL11	quimioquina	AF030514
interlenquina-8	IL-8/NAP-1	quimioquina	P10145
quimiotaxina-2 derivada de células leucócito	LECT2	quimioquina	
Lungquina	CXCL-15/ WECHE	quimioquina	
Linfotactina	Lptn/ ATAC	quimioquina	P47992
proteína 1 alfa	CCL3	quimioquina	MIP-1alfa/pLD78/P10147

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
inflamatória de macrófagos			
proteína 1 beta	NIP-Ibeta/ ACT-2/ CCLA	quimioquina	P13236
inflamatória de macrófagos			
proteína 1 d	MIP-1d/ CCL15/ LKN-1	quimioquina	
inflamatória de macrófagos			
proteína 1 gama	MIP-1gamma/ CCL9/MIP-3alfa/ CCL20/	quimioquina	
inflamatória de macrófagos			
proteína 3 alfa	LARC	quimioquina	P78556
inflamatória de macrófagos			
proteína 3 beta	MIP-3beta/ ELC/CCL19	quimioquina	Q99731
inflamatória de macrófagos			
quimioquina derivada de macrófagos	MDC/STCP-1	quimioquina	000626
proteína-1	MCP-1/ CCL2	quimioquina	P13500
quimioatractora de monócitos			
proteína-2	MCP=2/ CCL8	quimioquina	P78388
quimioatractora de monócitos			
proteína-3	MCP-3/ CCL7	quimioquina	P80098
quimioatractora de monócitos			
proteína-4	MCP-4/ CCL13	quimioquina	Q99616
quimioatractora de monócitos			
proteína-5	MCP-5/ CCL12	quimioquina	
quimioatractora de monócitos			
monoquina induzida por IFN gama	MIG	quimioquina	Q07325
quimioquina associada a mucosa	MEC	quimioquina	AF266504
factor inibidor de progenitor mielóide	MPIF/ CKbeta8/ CCL23	quimioquina	
proteína básica de plaquetas	PBP/ CTAP-III/ NAP-2	quimioquina	P02775
factor 4 de plaquetas	PF-4/ CXCLA	quimioquina	P02776
quimioquina regulada de activação pulmonar	PARC/ CCL18/ MIP-4	quimioquina	
RANTES	CCL5	quimioquina	P13501
quimioquina secundária do tecido linfóide	SLC/ 6Cquina	quimioquina	000585
factor 1 derivado de células de estroma	SDF-1/CXCL12	quimioquina	P48061
quimioquina regulada de activação no timo	TARC/CCL174 :	quimioquina	Q92593
quimioquina expressa no timo	TECK/ CCL25	quimioquina	015444
Clq		colectina	
lectina de ligação a manose	MBL	colectina	

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
proteína A tensioactiva	SP-A	colectina	
proteína D tensioactiva	SP-D	colectina	
inibidor de C1		complemento	
C3a		complemento	
proteína de ligação a C5a	Cob C4BP	complemento	
C3 do complemento	C3	complemento	
C5 do complemento	C5	complemento	
C8 do complemento	C8	complemento	
C9 do complemento	C9	complemento	
factores aceleradores do decaimento	DAF	complemento	
Factor H		complemento	
inibidor membranar da lise reactiva	MIRL/ CD59	complemento	
Properdina		complemento	
receptor 1 solúvel do complemento	sCR1	complemento	
receptor 2 solúvel do complemento	sCR2	complemento	
cardiotrofina-1	CT-1	citoquina	Q16619
CD27		citoquina	P26842
CD27L	CD70	citoquina	P32970
CD30	Ki-1	citoquina	P28908
CD30L	TNFSF8	citoquina	P32971
CD40L	TRAP/CD154	citoquina	P29965
interferão alfa	IFNalfa	citoquina	P01562
interferão beta	IFNbeta	citoquina	P01574
interferão gama	IFNgamma	citoquina	P01579
interferão ómega	IFNomega	citoquina	P05000
gene 15 sensível a interferão	ISG-15	citoquina	P05161
Leptina	OB	citoquina	P41159
factor inibidor da leucemia	LIF/ CNDF	citoquina	P15018
Linfotoxina	LT/ TNF beta	citoquina	P01374
factor estimulante de colónias de macrófagos	M-CSF/ CSF-1	citoquina	P09603
proteína-alfa estimulante de macrófagos	MSPalfa/HGF1	citoquina	P26927
proteína-beta estimulante de macrófagos	MSPbeta/ HGF1	citoquina	P26927
factor inibidor da migração	MIF/GIF	citoquina	P14174
oncostatina M	OSM	citoquina	P13725
RANKL	TRANCE/TNFSF-11	citoquina	014788
complexo solúvel IL6 R	sIL6RC (gp130 + sIL6R)	citoquina	
ligando Fas solúvel	sCD95L	citoquina	P48023
receptor de TNF de tipo I	TNF-RI p55	citoquina	P19438
receptor de TNF de tipo II	TNF-R p75	citoquina	P20333
TNFSF-18	GITRL/AITRL	citoquina	095852
factor de necrose tumoral alfa	TNP-alfa/Apo3L/DR3-L/ TNFSF-12	citoquina	P01375

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
TWEAK		citoquina	043508
fator de crescimento	aFGF	fator de	P05230
ácido de fibroblastos		crescimento	
activina beta A		fator de	P08476
		crescimento	
proteína relacionada	AGRP	fator de	AAB52240
com agouti		crescimento	
Anfirregulina	AR/SDGF	fator de	P15514
		crescimento	
fator semelhante a	ALF	fator de	
angopoiatina		crescimento	
fator básico de	bFGF	fator de	P09038
crescimento de		crescimento	
fibroblastos			
Betacelulina		fator de	P35070
		crescimento	
proteína 2 morfogénica	BMP2	fator de	P12643
de ossos		crescimento	
proteína 4 morfogénica	BMP4	fator de	
de ossos		crescimento	
proteína 5 morfogénica	BMP5	fator de	
de ossos		crescimento	
proteína 6 morfogénica	BMP6	fator de	
de ossos		crescimento	
proteína 7 morfogénica	BMP7	fator de	
de ossos		crescimento	
cripto-1	CRGF	fator de	
		crescimento	
fator de crescimento	EGF	fator de	P01133
epidérmico		crescimento	
Eritropoietina	Epo	fator de	
		crescimento	
fator de crescimento	FGF-17	fator de	
17 de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento	FGF 18	fator de	
18 de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento	FGF-19	fator de	
19 de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento 2	FGF-2	fator de	
de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento 4	BGF-4	fator de	
de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento 6	FGF-6	fator de	
de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento 7	FGF-7/ KGF	fator de	
de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento 8	FGF-8	fator de	
de fibroblastos		crescimento	
fator de crescimento 9	FGF-9	fator de	
de fibroblastos		crescimento	
ligando Flt3	Flt L	fator de	P49771
		crescimento	
Folistatina	FSP	fator de	
		crescimento	
fator estimulante de	G-CSF	fator de	P09919
colónias de		crescimento	
granulócitos			

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
CSF de granulócitos/macrófagos	GM-CSF	factor de crescimento	P04141
factor de crescimento e diferenciação 11	GDF-11	factor de crescimento	
factor de crescimento e diferenciação 15	GDF-15	factor de crescimento	
gene específico de paragem do crescimento 6	Gas-6	factor de crescimento	
factor de crescimento epidérmico que se liga à heparina	HB-EGF	factor de crescimento	Q99075.
factor de crescimento de hepatócitos	HGF/SF	factor de crescimento	P14210
hepatopoietina A	HPTA/HRG alfa/neurregulina	factor de crescimento	
herregulina alfa	NDF/HRG beta/neurregulina/	factor de crescimento	
herregulina beta	NDF	factor de crescimento	
proteína-1 de ligação a IGF	IGFBP-1	factor de crescimento	
proteína-2 de ligação a IGF	IGFBP-2	factor de crescimento	
proteína-3 de ligação a IGF	IGFBP-3	factor de crescimento	
proteína-4 de ligação a IGF	IGFBP-4	factor de crescimento	
inibina A		factor de crescimento	
inibina B		factor de crescimento	
factor de crescimento IA semelhante à insulina	IGF-IA	factor de crescimento	P01343
factor de crescimento IB semelhante à insulina	IGF-IB	factor de crescimento	P05019
factor de crescimento IA semelhante à insulina	IGF-II	factor de crescimento	P01344
lectina 1 de macrófagos específica para galactose	MAC-1	factor de crescimento	
Neuritina		factor de crescimento	
Neurturina		factor de crescimento	
orexina A		factor de crescimento	
Osteonectina	SPARC	factor de crescimento	
Osteoprotegrina	TNFRSF11B	factor de crescimento	
factor de crescimento da placenta	PGIF	factor de crescimento	
factor de crescimento	PDGF-A	factor de	P04085

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
alfa derivado de plaquetas		crescimento	
factor de crescimento beta derivado de plaquetas	PDQF-B	factor de crescimento	P01127
proteína da zona de gravidez		factor de crescimento	
factor sensorial a prolactina e derivado de neurónio motriz	PRL SMDF	factor de crescimento factor de crescimento	P01236
receptor solúvel GM-CSF	sGM-CSF R	factor de crescimento	P15509
factor de células estaminais	SLF/SCF/kit/ligando/MGF	factor de crescimento	P21583
Trombopoietina	TPO/c-MPL ligando	factor de crescimento	P40225
linfoproteína estromal do timo	TSLP	factor de crescimento	
Timopoietina	Tpo	factor de crescimento	
factor de crescimento alfa transformante	TGF-alfa	factor de crescimento	P01135
factor de crescimento beta 1 transformante	TGF-beta1	factor de crescimento	P01137
factor de crescimento beta 2 transformante	TGF-beta2	factor de crescimento	P08112
factor de crescimento beta 3 transformante	TGF-beta3	factor de crescimento	P10600
factor de crescimento vascular endotelial	VEGF	factor de crescimento	P15692
antagonista do receptor de interleuquina-1	ILiRa	interleuquina	P18510
interleuquina-10	IL-10	interleuquina	P22301
interleuquina-11	IL-11	interleuquina	P20809
interleuquina-12p35	IL-12p35	interleuquina	P29459
interleuquina-12p40	IL-12p40	interleuquina	P29460
interleuquina-13	IL-13	interleuquina	P35225
interleuquina-14	IL-14	interleuquina	L15344
interleuquina-15	IL-15	interleuquina	P40933
interleuquina-16	IL-16	interleuquina	Q14005
interleuquina-17	IL-17	interleuquina	Q16552
interleuquina-18	IL-18	interleuquina	Q14116
interleuquina-1alfa	IL-1alfa	interleuquina	P01583
interleuquina-1beta	IL-1beta	interleuquina	P01584
interleuquina-2	IL-2	interleuquina	P01585
interleuquina-3	IL-3	interleuquina	P08700
interleuquina-4	IL-4	interleuquina	P05112
interleuquina-5	IL-5	interleuquina	P05113
interleuquina-6	IL-6	interleuquina	P05231
interleuquina-7	IL-7	interleuquina	P13232
interleuquina-9	Sir9	interleuquina	P15248
receptor I solúvel de interleuquina-1	sIL1R/ CD121a	interleuquina	P14778
receptor II solúvel de interleuquina-1	sIL1R/CD121b	interleuquina	P27930

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
receptor solúvel de interleuquina-2	IL-2R /CD25	interleuquina	P01589
receptor solúvel de interleuquina-5	sIL-5R/ CD125	interleuquina	Q01344
receptor solúvel de interleuquina-6	sIL-6R/ CD126	interleuquina	P08887
receptor solúvel de interleuquina-7	sIL-7R/ CD127	interleuquina	P16871
receptor solúvel de interleuquina-9	sIL-9R	interleuquina	PQ01113
AD7C	NTP	neuronal	AF010144
alfa sinucleína		neuronal	AAH13293
GAP-43		neuronal	
Neurofilamento		neuronal	
Sinaptogamina		neuronal	
Sinaptofisina		neuronal	
tau P199		neuronal	
fator neurotrófico derivado do cérebro	BDNF	neurotrofina	P23560
fator neurotrófico ciliar	CNTF	neurotrofina	P26441
fator neurotrófico derivado glial	GDNF	neurotrofina	P39905
fator de crescimento dos nervos	NGF	neurotrofina	P01138
neurotrofina 3	NT-3	neurotrofina	P20783
neurotrofina 4	NT-4	neurotrofina	P34130
receptor solúvel de CNTF	sCNTFR	neurotrofina	P26992
alfa2-macroglobulina	alfa 2M	outros	
proteína associada a Alzheimer	ALZAS	outros	
proteína amiloide beta	Abeta 1-x	outros	
apolipoproteína A	apoA	outros	
apolipoproteína B	apoB	outros	
apolipoproteína D	apoD	outros	
apolipoproteína E	apoE	outros	
apolipoproteína J	apoD/clusterina	outros	
proteína C reactiva	CRP	outros	
proteína celular clara	CC16	outros	
proteína ácida glial fibrilar	GFAP	outros	
Melanotransferrina		outros	
receptor solúvel de transferência	TfR	outros	
Trombomodulina		outros	

Proteína	Nomes Alternativos	Classe	ID da Proteína
Trombospondina	Tsp	outros	
transglutaminase tecidual		outros	
Transferrina		outros	
alfa 1-antitripsina	ACT	protease	NP001076
Clr		protease	
ClS		protease	
C2 do complemento	C2	protease	
Factor B		protease	
Factor D	adipsina	protease	
Factor I		protease	
Calicreína		protease	
protease 1 de serina associada a MBL	MASP-1	protease	
protease 2 de serina associada a MBL	MASP-2	protease	
Neuroserpina		protease	AAH18043
inibidor de protease de leucócito secretório	SLPI	protease	
Angiogenina			
Angiostatina		vascular	P00747
Endostatina		vascular	
Endotelina		vascular	
selectina solúvel B	s E selectina	vascular	
inibidor do crescimento vascular endotelial	VEGI	vascular	

Descrevem-se neste documento os seguintes aspectos:

1. Um método para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que inclui comparar-se um teor medido de pelo menos um biomarcador para o diagnóstico da AD numa amostra de um fluido biológico de um indivíduo com um teor de referência para o biomarcador, em que o biomarcador para o diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6;

BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP- 2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTIN (OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R.

2. O método do aspecto 1 em que o referido biomarcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído factor de crescimento básico de fibroblastos(bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina-3 (IL-3), receptor de interleuquina 6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1δ), cadeia alfa da proteína estimulante de macrófagos (MSP-α), neurotrofina 3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases 1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases 2 (TIMP-2), factor beta 3 de

crescimento transformante (TGF- β 3), e factor de necrose tumoral beta (TNF- β).

3. O método do aspecto 1, em que o referido biomarcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por BDNF, sIL-6R, IL-8, leptina, MIP-1 δ , PDGF-BB, e TIMP-1.

4. O método do aspecto 3, em que o referido biomarcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por sIL-6R, IL-8, e TIMP-1.

5. O método do aspecto 3, em que o referido biomarcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por BDNF, MIP-1 δ , e TIMP-1.

6. O método do aspecto 1 em que o referido biomarcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

7. O método do aspecto 1, que inclua comparar os teores medidos em pelo menos dois biomarcadores para o diagnóstico da AD com valores de referência para os biomarcadores.

8. O método do aspecto 7, em que um dos pelo menos dois biomarcadores para o diagnóstico da AD seja a leptina.

9. O método do aspecto 7, em que um dos pelo menos dois biomarcadores para o diagnóstico da AD seja BDNF.

10. O método do aspecto 7, em que os biomarcadores para o diagnóstico da AD sejam seleccionados de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

11. O método do aspecto 1, que inclua comparar os teores medidos em pelo menos três biomarcadores para o diagnóstico da AD com valores de referência para os biomarcadores.

12. O método do aspecto 1, que inclua comparar os teores medidos em pelo menos quatro biomarcadores para o diagnóstico da AD com valores de referência para os biomarcadores.

13. O método do aspecto 12, que inclua comparar os teores medidos em pelo menos BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES com valores de referência para os biomarcadores.

14. O método do aspecto 1, no qual a comparação do valor medido com um valor de referência para cada um dos biomarcadores para diagnóstico da AD incluía calcular-se a diferença em vezes entre o valor medido e o valor de referência.

15. O método do aspecto 14, incluindo também comparar-se a diferença em vezes para cada um dos biomarcadores para diagnóstico da AD quantificados, com um valor mínimo para a diferença em vezes.

16. Um método para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que incluía: compararem-se valores medidos para pelo menos 4 biomarcadores para o diagnóstico da AD, em que os biomarcadores referidos incluíam BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES, numa amostra de fluido biológico de um indivíduo, com um teor de referência para cada biomarcador para diagnóstico da AD.

17. O método do aspecto 16 no qual BDNF diminua em cerca de 20 % quando comparado com um teor de referência para BDNF.

18. O método do aspecto 16 no qual leptina diminua em cerca de 25 % quando comparado com um teor de referência para Leptina.

19. O método do aspecto 16 no qual RANTES diminua em cerca de 16 % quando comparado com um teor de referência para RANTES.

20. O método do aspecto 16 no qual PDGF-BB diminua em cerca de 85 % quando comparado com um teor de referência para PDGF-BB num indivíduo normal está associado com AD severa.

21. O método do aspecto 1, no qual a referida amostra de fluido biológico seja uma amostra de um fluido biológico periférico.

22. O método do aspecto 16 ou do 21, no qual a referida amostra de fluido biológico periférico seja sangue, soro ou plasma.

23. O método do aspecto 16 ou do 21, incluindo além disto obter-se um valor medido para o referido biomarcador de AD na referida amostra de fluido biológico.

24. Um método para monitorizar a progressão da doença de Alzheimer (AD) num paciente com AD, que inclua: comparar-se um teor quantificado de pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de um fluido biológico de um indivíduo com um teor de referência para o

biomarcador, em que o biomarcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA (OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R.

25. O método do aspecto 24, em que o referido biomarcador para o diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por factor básico de crescimento de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina 3 (IL-3), receptor de interleuquina 6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1δ), cadeia alfa de proteína estimulante de macrófagos (MSP-a), neurotrofina 3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel

(sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidual de metaloproteases 1 (TIMP-1), inibidor tecidual de metaloproteases 2 (TIMP-2), factor beta 3 de crescimento transformante (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β).

26. O método do aspecto 24 no qual o marcador para diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

27. O método do aspecto 24 no qual o marcador para o diagnóstico da AD seja a leptina.

28. O método do aspecto 27, incluindo também medir-se um teor para a leptina na referida amostra de fluido biológico, obtendo-se deste modo o referido valor quantificado para a leptina.

29. O método do aspecto 24, no qual o referido valor de referência seja um valor obtido a partir de uma amostra de fluido biológico do mesmo paciente com AD numa altura anterior.

30. O método do aspecto 24 no qual a amostra de fluido biológico seja uma amostra de fluido biológico periférico.

31. Um método para classificar a doença de Alzheimer (AD) num indivíduo, que inclua: compararem-se valores medidos de teores em factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB) numa amostra de fluido biológico do referido paciente, com valores de referência para BDNF e para PDGF-BB.

32. O método do aspecto 31 no qual a referida amostra de fluido biológico seja uma amostra de fluido biológico periférico, incluindo sangue, soro ou plasma.

33. O método do aspecto 31, incluindo também compararem-se valores quantificados para teores em leptina e Rantes com valores de referência para teores em leptina e Rantes, em que os valores de referência para os teores em BDNF, PDGF-BB, leptina e Rantes provenham de amostras de indivíduos com classificações no MMSE de entre 25 e 28, em que um aumento nos teores em leptina e em PDGF-BB e em que os teores em BDNF e em RANTES permaneçam substancialmente constantes, indica uma AD ligeira, tal como indicada por uma classificação por MMSE de 20-25.

34. O método do aspecto 31, incluindo também compararem-se os teores em leptina e em Rantes com valores de referência para teores em leptina e em Rantes, em que os valores dos teores de referência em BDNF, PDGF-BB, leptina e em Rantes provenham de amostras de indivíduos com classificações por MMSE de 20-25, em que uma diminuição nos teores em Rantes, BDNF, e PDGF e em que os teores em Leptina permaneçam substancialmente constantes, indique uma AD moderada tal como é indicada por uma classificação no MMSE de 10-20.

35. Um método para identificar um agente candidato para o tratamento da Doença de Alzheimer, que incluía: ensaiar-se um candidato a agente em perspectiva quanto à sua actividade na modulação de um biomarcador de AD, sendo o biomarcador de AD referido seleccionado de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA (OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R.

36. O método do aspecto 35, em que o biomarcador de AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por factor básico de crescimento de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina 3 (IL-3), receptor de interleuquina 6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa de proteína estimulante de macrófagos (MSP-a), neurotrofina 3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidular de metaloproteases 1 (TIMP-1), inibidor tecidular de metaloproteases 2 (TIMP-2), factor beta 3 de crescimento transformante (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β).

37. O método do aspecto 35 que inclua ensaiar-se o candidato a agente em perspectiva quanto à sua actividade de modulação de um conjunto de biomarcadores de AD, em que o referido conjunto inclua BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

38. O método do aspecto 35, em que o referido ensaio seja levado a cabo *in vivo*.

39. Um estojo incluindo:

pelo menos um reagente específico para pelo menos um biomarcador para o diagnóstico da AD, sendo o referido pelo menos um biomarcador para o diagnóstico da AD seleccionado de entre o conjunto constituído por GCSF; IFN-g; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-2; IGFBP-2; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP (ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA (OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP-a; SCF; TGF-b3; TNF-b; MIP-1d; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1b; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; EGF-R; e

instruções para levar a cabo o método do aspecto 1.

40. O estojo do aspecto 39 em que o referido biomarcador para o diagnóstico da AD seja seleccionado de entre o conjunto constituído por factor básico de crescimento de fibroblastos (bFGF); factor de crescimento BB homodimérico derivado de plaquetas (PDGF-BB); factor

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); factor de crescimento epidérmico (EGF), factor 6 de crescimento de fibroblastos (FGF-6), interleuquina 3 (IL-3), receptor de interleuquina 6 solúvel (sIL-6R), leptina (também denominada ob), proteína 1 delta inflamatória de macrófagos (MIP-1 δ), cadeia alfa de proteína estimulante de macrófagos (MSP-a), neurotrofina 3 (NT-3), péptido 2 activante de neutrófilos (NAP-2), RANTES, receptor 2 de factor de necrose tumoral solúvel (sTNF RII), factor de células estaminais (SCF), trombopoietina (TPO), inibidor tecidual de metaloproteases 1 (TIMP-1), inibidor tecidual de metaloproteases 2 (TIMP-2), factor beta 3 de crescimento transformante (TGF- β 3), e factor beta de necrose tumoral (TNF- β).

41. O estojo do aspecto 39 incluindo pelo menos um reagente específico para cada um de entre pelo menos dois marcadores para o diagnóstico da AD.

42. O estojo do aspecto 39 incluindo pelo menos um reagente específico para cada um de entre pelo menos três marcadores para o diagnóstico da AD.

43. O estojo do aspecto 39 incluindo pelo menos um reagente específico para cada um de entre pelo menos quatro marcadores para o diagnóstico da AD.

44. O estojo de qualquer um dos aspectos 41, 42 ou 43, no qual os marcadores para diagnóstico da AD sejam seleccionados de entre o conjunto constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

45. O estojo do aspecto 44, no qual o reagente específico para o biomarcador para diagnóstico da AD seja um anticorpo, ou um seu fragmento, que seja específico para o referido biomarcador para o diagnóstico da AD.

46. O estojo do aspecto 39, incluindo também pelo menos um reagente específico para um biomarcador capaz de medir características da amostra.

47. Uma superfície que contenha ligados a ela, pelo menos um reagente específico para cada um dos biomarcadores para diagnóstico da AD de entre um conjunto de biomarcadores para o diagnóstico da AD, em que o referido conjunto de biomarcadores para o diagnóstico da AD inclua BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES.

48. Uma superfície incluindo, ligados a ela,

a. pelo menos um reagente específico para cada um dos biomarcadores para diagnóstico da AD de um conjunto de biomarcadores para o diagnóstico da AD, em que o referido conjunto de biomarcadores para o diagnóstico da AD seja constituído por BDNF, PDGF-BB, leptina e RANTES; e

b. pelo menos um reagente específico para um biomarcador capaz de medir características da amostra.

49. A superfície dos aspectos 47 ou 48, em que o referido reagente específico para o referido biomarcador para o diagnóstico da AD seja um anticorpo, ou um seu fragmento, que seja específico para o referido biomarcador para o diagnóstico da AD.

50. Uma combinação que inclua a superfície dos aspectos 48 ou 49 e uma amostra de um fluido biológico periférico de um indivíduo.

51. A combinação do aspecto 50, em que o indivíduo referido tenha uma idade de pelo menos 60, 65, 70, 75, 80, ou 85 anos.

52. O método do aspecto 1, incluindo também o passo de se obter um valor para a comparação entre o teor quantificado e o teor de referência.

53. O método do aspecto 13, incluindo também o passo de se obter um valor para a comparação entre o teor quantificado e o teor de referência.

54. Um formato legível por um computador, que inclua os valores obtidos pelo método do aspecto 52 ou do 53.

55. Um conjunto de valores de referência para os biomarcadores para o diagnóstico da AD que inclua BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES.

56. Um conjunto de reagentes específicos para biomarcadores para o diagnóstico da AD, em que nestes biomarcadores se incluam BDNF, PDGF-BB, Leptina e RANTES.

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para ajudar no diagnóstico da doença de Alzheimer ("AD"), que inclua comparar-se um valor medido de pelo menos um teor num biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico de um indivíduo, com um teor de referência para esse biomarcador, que o biomarcador para diagnóstico da AD seja IGFBP-2 (proteína 2 de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina), em que o teor de referência citado inclua:

- (a) um valor de referência proveniente de uma população que não sofra de AD; ou
- (b) um teor médio ou mediano de um conjunto de indivíduos no qual se incluam pacientes com AD;

e em que a amostra de fluido biológico periférico citada seja uma amostra de sangue ou de urina.

2. Um método de acordo com a reivindicação 1, em que o pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD seja IGFBP-2 e um ou mais de entre (a) IFN- γ (interferão gama); IGFBP-1 (proteína 1 de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina); BMP-6 (proteína 6 morfogénica dos ossos); BMP-4 (proteína 4 morfogénica dos ossos); Eotaxina-2; GCSF (factor estimulante de colónias de granulócitos); TARC (quimioquina do timo e com activação

regulada); RANTES; ANG (angiotensinogénio); PARC (quimioquina pulmonar e com activação regulada); Acrp30 (proteína de adipócito relacionada com o complemento, com 30 kDa); AgRP(ART) (proteína relacionada com agouti (transcrito relacionado com agouti)); TIMP 1 (inibidor tecidual da metaloproteinase 1); TIMP 2 (inibidor tecidual da metaloproteinase 2); ICAM-1 (molécula intercelular de adesão 1); TRAIL R3 (receptor 3 do ligando indutor de apoptose relacionado com factor de necrose tumoral); uPAR (receptor de activador de plasminogénio do tipo da uroquinase); IGFBP-4 (proteína 4 de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina); LEPTINA (OB); PDGF-BB (factor de crescimento BB derivado de plaquetas); EGF (factor de crescimento epidérmico); BDNF (factor neurotrófico derivado do cérebro); NT-3 (neurotrofina 3); NAP-2 (péptido 2 activante de neutrófilos); IL-1ra (antagonista do receptor de interleuquina 1); MSP- α (proteína alfa estimulante de macrófagos); SCF (factor de células estaminais); TGF- β 3 (factor de crescimento transformante, beta 3); TNF- β (factor de necrose tumoral beta); MIP-1 δ (proteína 1 delta inflamatória de macrófagos); IL-3 (interleuquina 3); FGF-6 (factor 6 de crescimento de fibroblastos); IL-6 R (receptor de interleuquina 6); sTNF RII (receptor II de factor de necrose tumoral solúvel); AXL; bFGF (factor de crescimento básico de fibroblastos); FGF-4 (factor 4 de crescimento de fibroblastos); CNTF (factor neurotrófico ciliar); MCP-1 (proteína 1 quimioatractora de monócitos); MIP-1 β (proteína 1 beta inflamatória de macrófagos); TPO (trombopoietina);

VEGF-B (factor B de crescimento endotelial vascular); IL-8 (interleuquina 8); FAS; e EGF-R (receptor de factor de crescimento epidérmico), ou (b) qualquer uma, ou mais, das proteínas listadas na Tabela 7.

3. Um método para monitorizar a progressão da doença de Alzheimer (AD) num paciente com AD, que incluía comparar-se um teor medido para pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD numa amostra de fluido biológico periférico de um indivíduo com AD, com um teor de referência para o biomarcador, em que o biomarcador para o diagnóstico da AD seja IGFBP-2, em que o teor de referência referido:

(a) também incluía um valor obtido a partir de uma amostra de um fluido biológico periférico proveniente do mesmo paciente com AD numa altura anterior; ou

(b) seja determinado contemporaneamente utilizando um conjunto de amostras provenientes de indivíduos com AD nas quais se incluía a amostra do indivíduo;

e em que a referida amostra de fluido biológico periférico seja uma amostra de sangue ou de urina.

4. O método da reivindicação 3, em que o pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD seja IGFBP-2 e um ou mais de entre IFN- γ ; IGFBP-1; BMP-6; BMP-4; Eotaxina-

2; GCSF; TARC; RANTES; ANG; PARC; Acrp30; AgRP(ART); TIMP-1; TIMP-2; ICAM-1; TRAIL R3; uPAR; IGFBP-4; LEPTINA(OB); PDGF-BB; EGF; BDNF; NT-3; NAP-2; IL-1ra; MSP- α ; SCF; TGF- β 3; TNF- β ; MIP-18; IL-3; FGF-6; IL-6 R; sTNF RII; AXL; bFGF; FGF-4; CNTF; MCP-1; MIP-1 β ; TPO; VEGF-B; IL-8; FAS; e EGF-R.

5. O método da reivindicação 3 ou da 4, em que o indivíduo com AD:

(i) seja um indivíduo com uma AD questionável, e que tenha obtido ou que conseguisse obter uma classificação de 25-28 no teste MMSE;

(ii) seja um indivíduo com AD ligeira, e que tenha obtido ou que conseguisse obter uma classificação de 22-27 no teste MMSE;

(iii) seja um indivíduo com AD moderada, e que tenha obtido ou que conseguisse obter uma classificação de 16-21 no teste MMSE; e

(iv) seja um indivíduo com AD severa, e que tenha obtido ou que conseguisse obter uma classificação de 12-15 no teste MMSE.

6. O método da reivindicação 1 ou da 2, que inclua compararem-se os teores medidos para pelo menos dois, três, quatro, cinco, dez, quinze ou vinte

biomarcadores para o diagnóstico da AD com teores de referência para os biomarcadores.

7. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a amostra de sangue referida seja uma amostra de soro ou de plasma.

8. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, incluindo também obter-se um teor medido do referido pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD na referida amostra de fluido biológico periférico.

9. O método da reivindicação 1 ou da 2, incluindo também o passo de se obter um valor para a comparação entre o teor medido e o teor de referência.

10. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, no qual a diferença entre os valores medidos do pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD em amostras de indivíduos com AD, em relação a amostra de indivíduos sem AD, seja determinada por um método que inclua Análise de Significância em Microconjuntos (SAM), preferivelmente em que a diferença entre os valores medidos para o um ou mais biomarcadores para o diagnóstico da AD que se determinar por SAM apresente um valor de q na gama de entre 0,0001 e 0,05.

11. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, no qual a diferença entre os valores medidos do pelo

menos um biomarcador para diagnóstico da AD em amostras de indivíduos com AD, em relação a amostra de indivíduos sem AD, seja determinada por um método que inclua o teste t, preferivelmente em que se meça a diferença em termos de um valor de p.

12. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a comparação dos valores medidos inclua um método seleccionado de entre o conjunto constituído por Análise de Significância de Microconjuntos, Colheita de Árvores, CART, MARS, Mapas Auto-Organizantes, Conjunto de Itens Frequentes, e Redes Bayesianas.

13. O método de qualquer uma das reivindicações anteriores, no qual a determinação do teor de referência inclua:

determinar-se um valor médio dos valores medidos para o teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD nas amostras de fluido biológico periférico de um conjunto de indivíduos com AD;

determinar-se um valor médio dos valores medidos para o teor em pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD nas amostras de fluido biológico periférico de um conjunto de indivíduos sem AD; e

encontrar-se uma diferença estatisticamente significativa entre os valores médios dos valores medidos para o pelo menos um biomarcador para diagnóstico da AD nas amostras de fluido biológico periférico, entre os dois conjuntos.

14. O método da reivindicação 13, no qual o conjunto de indivíduos com AD e o conjunto de indivíduos sem AD sejam populações da mesma faixa etária.

Lisboa, 24 de Maio de 2013.

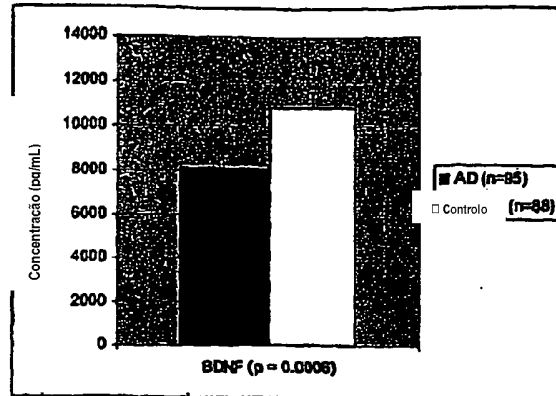


Figura 1A

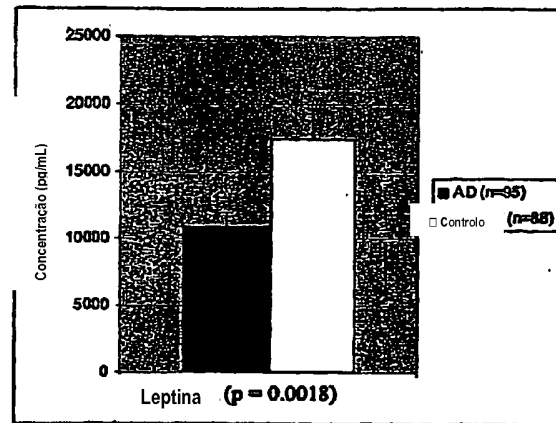


Figura 1B

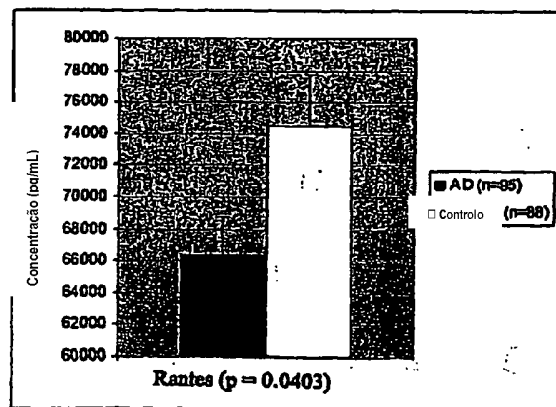


Figura 1C

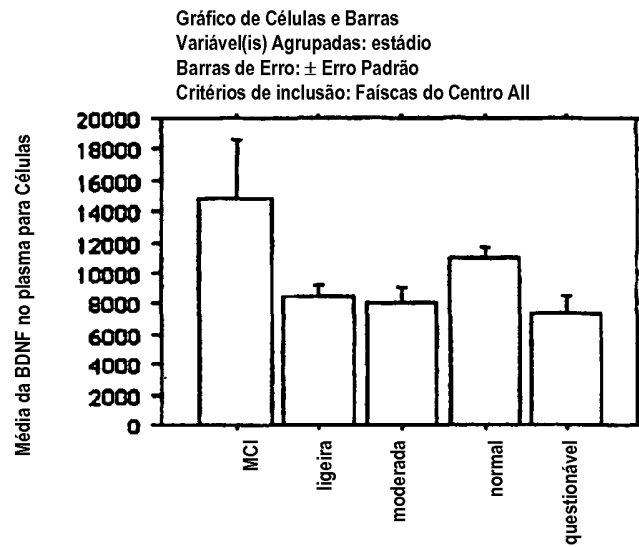


Fig. 2

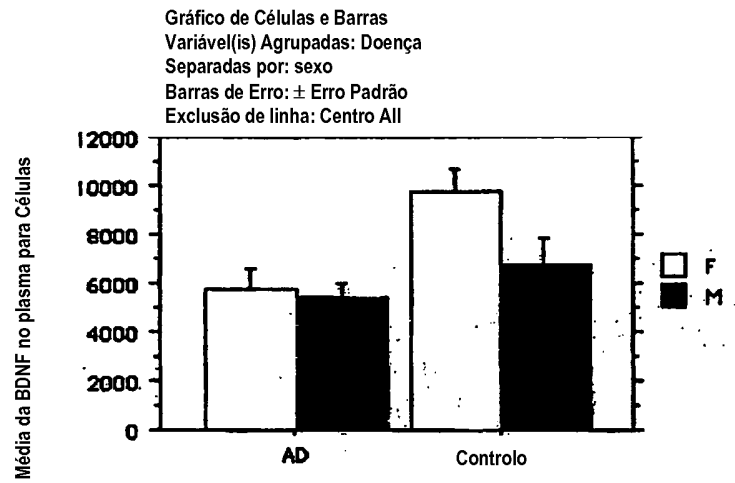


Fig. 3

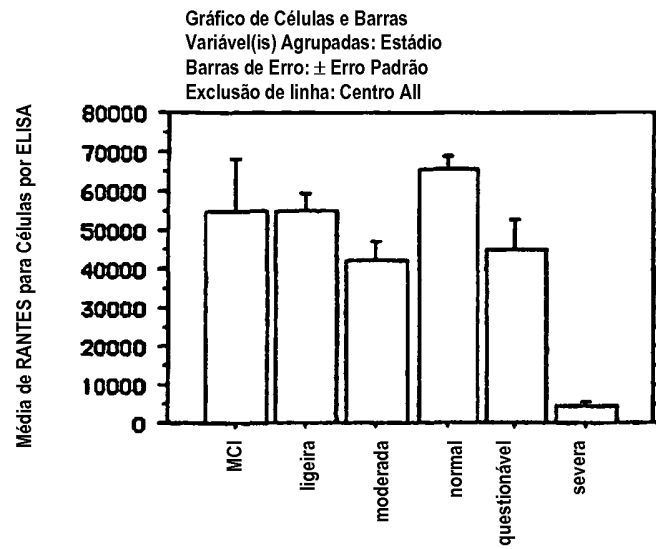


Fig. 4

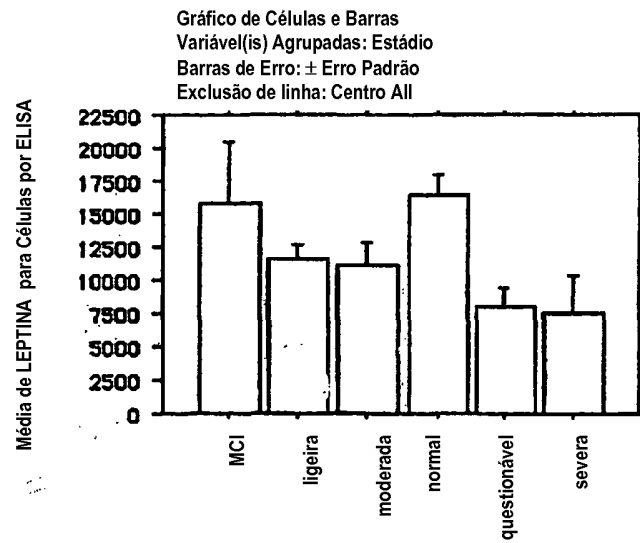


Fig. 5

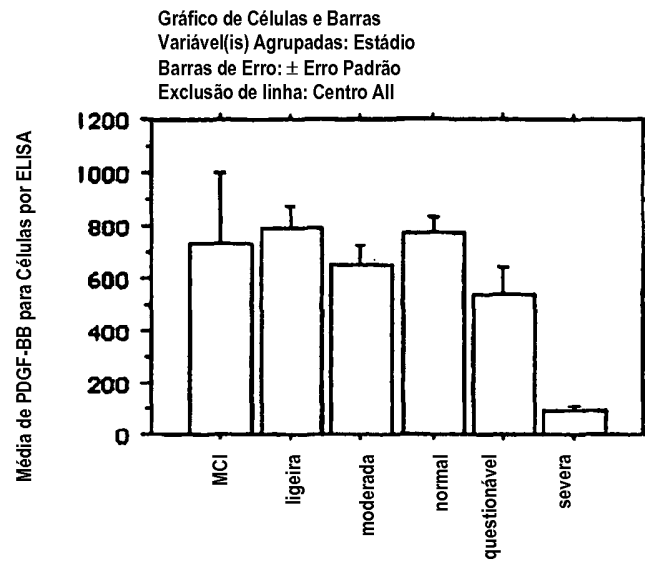


Fig. 6

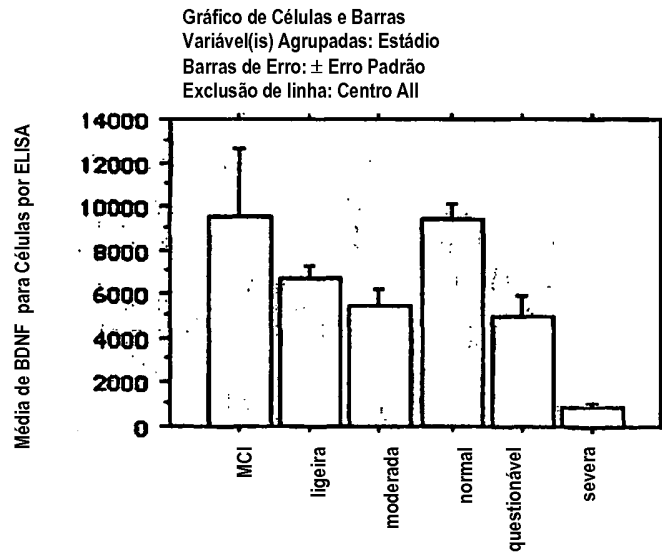


Fig. 7