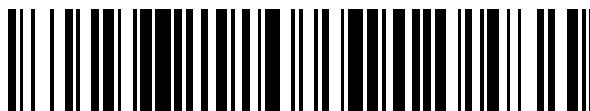


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 341**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2011** **E 11183842 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014** **EP 2579042**

54 Título: **Procedimiento para detectar anticuerpos A β -específicos en una muestra biológica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2014

73 Titular/es:

AFFIRIS AG (100.0%)
Karl-Farkas-Gasse 22
1030 Wien, AT

72 Inventor/es:

STAFFLER, GÜNTHER;
MAIRHOFER, ANDREAS;
SCHNEEBERGER, ACHIM;
LUTTEROVA, MARTINA;
SCHMIDT, WALTER y
MATTNER, FRANK

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 496 341 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para detectar anticuerpos A β -específicos en una muestra biológica.

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos para detectar anticuerpos específicos A β en muestras biológicas, especialmente en relación con y para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD).

10 AD constituye una alteración compleja progresiva que implica la interacción de cascadas patológicas, que incluyen la agregación del β -amiloide y la formación de placas cerebrales, la hiperfosforilación de la proteína tau con la formación de marañas intraneuronales. Concomitante con la agregación y la hiperfosforilación de estas proteínas cerebrales, procesos inflamatorios contribuyen a la pérdida de la integridad sináptica y a la neurodegeneración progresiva.

15 La conversión del péptido β amiloide (A β o A-beta) a partir de una forma soluble con una estructura principalmente alfa-helicoidal o secundaria enrollada al azar, a una forma agregada con una estructura secundaria en forma de láminas beta, que forma finalmente placas amiloides en el cerebro, representa una de las primeras características de la patología AD. Varias formas de A β , C-, así como de los péptidos modificados o truncados N-terminalmente, contribuyen a la formación de las placas A β en el cerebro. Las tres variantes mayores C-terminales de A β , incluyen los péptidos A β 1-40 (que están formados por 40 aminoácidos (aa) con sal-40 como último aa), A β 1-42 y A β 1-43. Además de estas formas importantes de péptidos truncados C-terminales, existen también otras formas truncadas que aparecen menos frecuentemente, principalmente A β 1-37, A β 1-38 y A β 1-39. Las variantes N-terminales de A β consisten en A β 3-40/42/43 y A β 11-40/42/43. En todas estas formas truncadas N-terminales el ácido glutámico mantiene la primera posición. Este aa no es estable, pero experimenta más bien un cambio para transformarse en el piroglutamato (pE), dando lugar a la formación de A β p(E)3-40/42 y A β p(E)11-40/42. Los residuos de pE se forman, bien espontánea o enzimáticamente, mediante enzimas conocidos como glutaminil ciclasas.

30 Hasta recientemente, el diagnóstico de AD era uno puramente clínico, basado en la aparición gradual de déficits cognitivos en, por lo menos, dos ámbitos (por ejemplo, de comprensión, y funcional), que afectan negativamente a la vida diaria del paciente, sin que se encontrara otra causa que los provoque (por ejemplo, vascular). La limitación del diagnóstico clínico de AD consistió en altas tasas de diagnóstico equivocado (especificidad diagnóstica del 80% por los expertos), y en el hecho de que el diagnóstico se pudiera realizar solamente en un momento tardío, cuando la enfermedad había causado una pérdida neuronal sustancial, que ha producido ya déficits funcionales.

35 Basándose en el conocimiento reunido durante las dos últimas décadas, la forma de diagnosticar AD está cambiando rápidamente. Un grupo de investigadores comandado por B. Dubois, Paris, fue el primero en integrar datos que se habían puesto de manifiesto a partir de las investigaciones subyacentes a la patología AD, en el algoritmo diagnóstico (Dubois et al., Lancet Neurol. 9 (2010): 1118-1127). Según los autores, el diagnóstico de AD se basa en un déficit cognitivo específico (una alteración de la memoria episódica), que tiene que producirse combinada con un cambio en los biomarcadores específicos de la enfermedad (atrofia hipocámpica detectada mediante MRI estructural; típica de AD del líquido cerebroespinal) A42 bajo, tan total alta, alta fosfoTau; imagen amiloidea positiva; riesgo genético definido). Recientemente, este algoritmo diagnóstico conducido patofisiológicamente ha sido adoptado ampliamente por el grupo de trabajo NIH-NINCDS (McKhann et al., Alzheimer's & Dementia 7 (2011): 263-269). Con propósitos principalmente prácticos, el grupo de trabajo NIH-NINCDS mantuvo el diagnóstico del MCI (alteración cognitiva leve del tipo AD como un estadio temprano de AD).

45 El concepto de potenciación del diagnóstico clínico de AD mediante biomarcadores, que reflejen la patología de la enfermedad, ha sido adoptado por un grupo de trabajo propiciado por el Instituto Nacional del Envejecimiento (NIA, NIH, USA) y la Asociación Alzheimer, llevando esto a cabo, AD no constituye ya un diagnóstico por exclusión, sino que empieza a ser ya uno positivo. El hecho de que NIA y AA no sigan completamente el algoritmo conducido (gobernado) por los biomarcadores, propuesto por Dubois y colaboradores, refleja las limitaciones de los biomarcadores habitualmente disponibles. El distintivo del líquido cefalorraquídeo (CSF) de AD, puede ponerse como ejemplo. El CSF de los pacientes de AD muestra un patrón típico, principalmente la reducción de A β 1-42 y la elevación de la Tau total (tTau) y de la fosfoTau (pTau). El distintivo se encuentra en los pacientes AD, pero no detecta un cambio a lo largo del tiempo. De hecho, en una población de pacientes con riesgo de AD (es decir, pacientes MCI), identifica aquellos que van a desarrollar los síntomas clínicos. Ya en este estadio, el CSF muestra idéntico patrón de expresión y cambio que en los pacientes con AD pleno. De este modo, mientras que no sea posible definir un intervalo normal para A β 1-42, tTau y pTau, no existe definición de los momentos cruciales, es decir, del momento en un paciente dado cuando por ejemplo, la fisiología de A β cambia de normal a patológica. Lo mismo es cierto para cualquiera de los biomarcadores habitualmente seguidos y que todavía no se han validado. La razón principal para esto es que sólo existen pocos estudios longitudinales que evalúan esta cuestión, a causa de que no es posible fácilmente repetir CSF-, MRI, exámenes de imagenología amiloide, a causa del riesgo que imponen a los pacientes y a los costes que con ellos se asocian.

65 De este modo, falta todavía un biomarcador fiable que pueda aplicarse repetitivamente, con costes y riesgos bajos. Es verdad especialmente que todos los esfuerzos que se han llevado a cabo hasta la fecha para desarrollar biomarcadores AD basados en la sangre, fallaron (Hampel et al., Nat. Rev. Drug Discov. 9 (2010): 560-574). La

disponibilidad de tales biomarcadores deberá ser de la mayor importancia para el desarrollo de terapias modificadoras de enfermedades. Cuanto más pronto se administren dichas terapias, más grandes serán las posibilidades de suerte. Y, se pueden limitar dichos esfuerzos a los casos verdaderos de AD, con la ayuda de un biomarcador específico.

5 Así hasta ahora, A β (varias especies de A β y estados de agregación), se han evaluado en AD y MCI, el estadio pre-demencia de AD. Hallazgos recientes muestran que existe una actividad amiloidogénica de IgG e IgM contenidos en el plasma y en el líquido cerebroespinal de los pacientes AD y en los controles sanos (O'Nuallain et al., J. Clin. Immunol. 30 (2010) Suppl.1: S37-S42; Marcello et al., J. Neural. Transm. 116 (2009): 913-920). Resultados
10 obtenidos mediante ELISA, o ensayos de inmunoprecipitación que evalúan IgG y/o IgM específicos para varios de los estados de agregación/formas de A β , mostraron que los pacientes AD- y MCI mostraron niveles más bajos de auto-anticuerpos A β séricos que los controles sanos. Aunque estos estudios mostraron una diferencia en la concentración de auto-anticuerpos, los procedimientos que se utilizaron adolecieron de la sensibilidad y especificidad que hubieran sido necesarias para utilizarlos como herramientas de diagnóstico predictivo para
15 identificar pacientes AD o MCI con alta selectividad y especificidad. La mayoría de los procedimientos utilizados hasta la fecha, se basan en la tecnología ELISA. Para aumentar la sensibilidad en estos ensayos, algunos utilizan marcaje radioactivo del péptido A β 1-42. El análisis ROC (receptor característico operacional) de Brettschneider et al., (Brettschneider et al., Biol. Psychiatry 57 (2005): 813-817), alcanzó una especificidad del 46,7% cuando la sensibilidad se fijó al 81,3%, utilizando un ensayo de inmunoprecipitación con A β 1-42 marcada con cloramina T, para mediar la diferencia entre los controles sanos y los pacientes AD. Al contrario que esto, Bayer et al. (WO 2010/128139 A1; Marcello et al., J Neural. Transm. 116 (2009): 913-920), utilizaron un procedimiento basado en
20 ELISA, en el que la placa se revistió con un fragmento de piroglutamato-A β . En este caso, la detección de los auto-anticuerpos IgM anti A β específicos en los controles sanos y en los pacientes AD con anticuerpos anti-IgM-HRP mostró que la especificidad era del 60% cuando la sensibilidad se fijó en 80%. Hasta ahora, ninguno de estos procedimientos cumplió los criterios que los hubiera calificado como biomarcadores predictores (>80% especificidad) para AD.

No se conoce la razón para la reducida concentración sérica de los anticuerpos A β específicos en estos dos grupos de pacientes. Existen dos explicaciones generales y no mutuamente exclusivas: producción reducida (pato-
30 específica con respecto a la inmunosenescencia general), y redistribución (los anticuerpos son atrapados en los depósitos amiloides que se encuentran, por ejemplo, en el cerebro). El soporte para una función potencial de estos (auto) anticuerpos A β específicos proviene de estudios recientes que demuestran que productos sanguíneos disponibles comercialmente, principalmente la fracción IgG asociada extraída del plasma derivado de donantes sanos, se ha mostrado que contiene anticuerpos específicos para los péptidos A β . Dos de dichos productos, las
35 preparaciones de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) de dos compañías diferentes, están experimentando habitualmente ensayos clínicos para evaluar su potencial para interferir con o evitar la patología AD.

Otra cuestión no resuelta es si el nivel de anticuerpos A β específicos está reducido en entidades patológicas con un componente A β en su patofisiología, principalmente en la demencia parkinsoniana (PDD), demencia con cuerpos de
40 Lewy (DLB), angiopatía amiloide cerebral (CAA), trauma cefálico crónico (por ejemplo, boxeo).

La investigación del nivel de anticuerpos en estas enfermedades podría añadir a la comprensión actual de los procesos que dan lugar a la reducción de la concentración sérica de los anticuerpos específicos A β agregados en AD. La investigación de los sueros de pacientes con estas enfermedades podría clarificar la cuestión de si los
45 resultados de AD a partir de una inmunodeficiencia específica (en el caso de si los títulos de anticuerpo A β específicos se reducen sólo en AD, pero no en otras patologías caracterizadas por la patología A β), o si los niveles reducidos de los anticuerpos A β -específicos provienen de la redistribución debida a la amplia patología A β . En el primer caso, el ensayo debería consistir en un biomarcador altamente específico de la enfermedad, y, como resultado, debería ser de ayuda para diferenciar AD de las entidades patológicas anteriormente mencionadas.
50 Asumiendo la segunda posibilidad, el ensayo podría calificar la identificación de pacientes cuya enfermedad sea gobernada por la patología A β .

En WO 2010/128139, se dan a conocer biomarcadores y procedimientos para diagnosticar AD, especialmente, anticuerpos contra pGlu A β . Funke et al. (Curr. Alz. Res., 6 (3) (2009): 285-289) consideró si la detección de los
55 agregados A β en los fluidos corporales constituye un procedimiento apropiado para el diagnóstico temprano de AD. Maetzler et al. (J. Alz. Dis. 26 (1) (2011): 171-179) informó que los auto-anticuerpos contra antígenos amiloides y derivados de la glía, aumentan en el suero y líquido cerebroespinal de las demencias asociadas a los cuerpos de Lewy. Funke et al. (Rejuv. Res. 13 (2-3) (2010): 206-209) dio a conocer un sistema de detección de partículas unitarias para los agregaros A β . Fukumoto et al. (Faseb J., 1 (24) (2010): 2716-2726), dio a conocer que oligómeros
60 β -amiloides de alto peso molecular se elevan en el líquido cefalorraquídeo de pacientes AD.

Constituye un objeto de la presente invención proporcionar medios para mejorar el diagnóstico de AD, especialmente para detectar los estados iniciales de la enfermedad y para observar el desarrollo de ensayos clínicos para medicamentos que traten AD. Constituye otro objeto de la invención, proporcionar herramientas... para la
65 detección de anticuerpos anti-A β en muestras biológicas, especialmente en las de pacientes humanos con AD, o en las de individuos humanos de los que se sospecha que presentan o están en riesgo de desarrollar AD.

Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar anticuerpos específicos A β en una muestra biológica que comprende las fases siguientes:

- 5 - poner en contacto la muestra con agregados A β , o con perlas con agregados A β inmovilizados en su superficie, y que permitan que los anticuerpos A β específicos se unan a los agregados A β , y
- detectar los anticuerpos A β específicos unidos a los agregados A β mediante una técnica de detección de partículas individuales, preferentemente mediante FACS clasificación de células activadas por fluorescencia.

10 Con la presente invención, se da a conocer un nuevo procedimiento para detectar auto-anticuerpos A β -específicos, que puede utilizarse como una herramienta diagnóstica, que ayuda extremadamente en el diagnóstico de AD, monitorizando el desarrollo de ésta. Este procedimiento se basa en la invención de que no se utilizan justamente los péptidos A β únicos como herramientas de captura para los anticuerpos A β -específicos sin que en vez de ello se emplean agregados A β , detectándose un tanto complejos de agregados anticuerpos A β utilizando una técnica de detección de partículas individuales. Brevemente, los agregados A β (derivados de diferentes A β truncados y versiones modificadas) se generan, por ejemplo, mediante incubación nocturna. Subsiguientemente, los agregados A β se incluyen con muestras séricas derivadas, bien de donantes sanos (HD) o de pacientes AD, para permitir la unión de estos anticuerpos (tanto IgG como IgM). Los anticuerpos unidos a los agregados A β pueden detectarse mediante cualquier procedimiento disponible para el experto en la técnica, por ejemplo, utilizando un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo A β específico unido a los agregados A β . Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo secundario marcado con ficoeritrina (PE). Entonces, a continuación los complejos inmunes que incluyen el anticuerpo A β -específico unido a los agregados A β (y opcionalmente uno o más agentes de detección, tales como anticuerpos secundarios), se miden utilizando una técnica de detección de partículas individuales tal como el análisis FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) también conocido como citometría de flujo. Utilizado el procedimiento según la presente invención, pudo mostrarse que los pacientes AD contienen menos inmunoglobulinas A β -específicas que reaccionan respecto a los agregados A β (inmunoglobulinas libres A β -específicas) proporcionados según la presente invención, comparados con los individuos sanos. Además, utilizando el procedimiento según la presente invención pudo mostrarse que la reactividad de las inmunoglobulinas A β - específicas (con respecto a los agregados A β proporcionados según la presente invención) derivadas de los pacientes AD, pueden aumentarse mediante un procedimiento conocido como desmascaramiento (eliminación de antígenos A β unidos potencialmente a partir de los auto-anticuerpos). Esto es en contraste a la reactividad de inmunoglobulina A β -específicas de individuos sanos en los que tal aumento de reactividad con respecto a los agregados A β no puede detectarse después del tratamiento de esos sueros de una forma especial. Por otra parte, la reactividad de los anticuerpos IgM después de desmascaramiento (disociación de A β ya unido en el suero), reveló un aumento del nivel de IgM en los pacientes AD. Adicionalmente, también se determinó la diferencia entre los niveles de IgG con y sin desmascaramiento (valores delta (Δ)). Este parámetro también se elevó en pacientes AD, comparándolo con controles sanos que mostraban una ocupación más alta de los anticuerpos por A β , de los anticuerpos en el estado patológico de la enfermedad. Además, con la presente invención, se proporcionan datos que muestran que este procedimiento tiene una capacidad mucho mayor para detectar anticuerpos A β -específicos, y por tanto, posee un poder mucho más alto para diagnosticar AD, comparado con los procedimientos publicados hasta ahora. Dados estos hechos, el procedimiento según la presente invención, cumple con los pre-requisitos teóricos de una herramienta para predecir el diagnóstico, para identificar AD y para seguir la respuesta clínica al tratamiento de un paciente dado.

45 Esta invención se desarrolló para el análisis de anticuerpos específicos A β en muestras humanas. Constituye, por tanto, una forma de realización preferida para detectar anticuerpos humanos A β -específicos, preferentemente anticuerpos IgG o IgM humanos, especialmente anticuerpos IgG humanos. Como ya se ha mencionado, la detección de anticuerpos A β específicos en el hombre se conoce en principio en la técnica; sin embargo, no se ha podido comprobar su papel como posible biomarcador. Tal como se muestra con la presente invención, esto se debió también a la insuficiencia analítica de los procedimientos de detección disponibles en la técnica. Debido a la superioridad del procedimiento según la presente invención, se acepta la disponibilidad de estos anticuerpos en las muestras humanas como biomarcadores. Este procedimiento está (dotado) específicamente para detectar auto-anticuerpos en muestras biológicas. De acuerdo con esto, en una forma de realización preferida de este procedimiento, los anticuerpos A β -específicos que van a detectarse y cuantificarse, son auto-anticuerpos.

60 Contrariamente a los procedimientos de la técnica anterior, este procedimiento utiliza agregados A β como sonda para unir los anticuerpos A β específicos a partir de las muestras. Aunque dichos agregados son conocidos en principio en la técnica, no se constató que la utilización de dichos agregados en el análisis de anticuerpos A β -específicos, especialmente en muestras humanas, podría mejorar dichos procedimientos significativamente, también combinadamente con las técnicas de detección de partículas individuales, tales como FACS. Debido a la utilización de dichos agregados, la detección con técnicas de detección de partículas individuales (que constituyen técnicas establecidas en varios distintos campos, y para diversas cuestiones), es posible para analizar anticuerpos A β -específicos en muestras humanas (tales como sangre), que son habitualmente muy complejas y difíciles de llevar a cabo.

65

Preferentemente, las dimensiones de los agregados que van a utilizarse según la presente invención, están estandarizadas para uso analítico. Esto puede realizarse estableciendo ciertos parámetros durante la producción de los agregados. Dependiendo de las condiciones que se aplican durante la generación de los agregados, el tamaño de éstos puede ajustarse. Los tamaños preferidos de los agregados A β según la presente invención, son de entre 50 nm a 15 μ m, preferentemente de entre 100 nm a 10 μ m, especialmente entre 200 nm y 5 μ m (definidos por la longitud de los agregados (es decir, la extensión más larga).

Un procedimiento preferido para proporcionar agregados, apropiado para la presente invención, incluye la etapa de incubación de péptidos A β -1-42, A β -1-43, A β -3-42 o A β -p(E)-3-42, o menos preferentemente péptidos A β que estén truncados en el extremo C, tal como el péptido A β -1-40, a un pH de entre 2 y 9 durante por lo menos 20 minutos, preferentemente de 1 hora por lo menos, especialmente, por lo menos, de 4 horas. La duración de incubación es uno de los parámetros para ajustar el tamaño de los agregados: cuando más duradera sea la incubación, mayores son los agregados. Los tiempos típicos de incubación son de entre 10 minutos a 24 horas. Tiempos de incubación más cortos dan lugar habitualmente a sólo agregados muy cortos y a un escaso número de éstos; los agregados producidos con tiempos de incubación significativamente más largos a 48 horas, no se prefieren habitualmente en este procedimiento. Por supuesto, los agregados pueden también clasificarse y cribarse para conseguir el tamaño deseado, si es necesario, por ejemplo, mediante centrifugación fraccionada y técnicas similares.

Según este procedimiento, las muestras en las que los anticuerpos específicos A β van a detectarse y ponerse en contacto con los agregados A β para conseguir la unión de los anticuerpos A β específicos posiblemente presentes y reactivos vis a vis de los A β agregados en las muestras. La concentración de los agregados A β tiene, por tanto, que ajustarse para proporcionar bastantes posiciones de unión para los anticuerpos. De acuerdo con esto, la concentración de los agregados A β para la unión de los anticuerpos en la muestra es preferentemente del orden comprendido entre 0,001 y 1 μ M, preferentemente entre 0,01 y 0,1 μ M. La concentración óptima depende también de la naturaleza de los anticuerpos que van a unirse, de la naturaleza de la muestra del tiempo planeado de contacto y del tamaño de los agregados.

Este procedimiento tiene principalmente como objetivo la aplicación en las muestras humanas. Se prefiere, pues, que la muestra biológica sea sangre humana o una muestra derivada de ésta, preferentemente suero o plasma humano; líquido cerebrospinal humano o linfa humana. Con tales fuentes de muestras, pueden también establecerse ensayos rutinarios y en serie (especialmente para las muestras derivadas de la sangre).

Los tiempos preferidos de contacto que permiten una unión apropiada de los anticuerpos en la muestra a los agregados, son por lo menos de 10 minutos (por ejemplo, de 10 minutos a 48 h), preferentemente de 15 min a 24 horas, especialmente de 30 min a 2 h.

Si la muestra biológica no es pre-tratada específicamente, los anticuerpos A β -específicos que poseen una capacidad de unión a los agregados A β , se unirán durante el contacto con los agregados A β . Los anticuerpos específicos A β que están enmascarados en la muestra (es decir, aquellos que ya están unidos a un asociado de unión (por ejemplo, una estructura que comprende A β , o péptidos A β endógenos), no serán detectados mediante el procedimiento según la presente invención (estando ausente dicha muestra específica pre-tratamiento). Mientras que la identificación y cuantificación de sólo anticuerpos reactivos será en muchos casos suficiente y deseada, pueden existir situaciones o cuestiones diagnósticas en las que la cantidad total de anticuerpos A β -específicos en la muestra podrá detectarse (reactivos o no reactivos), o todos, el número de anticuerpos A β -específicos reactivos, el número de no reactivos enmascarados, y el número total de anticuerpos A-específicos.

Por tanto, según otra forma de realización preferida de la presente invención, las muestras se desenmascaran, es decir, los anticuerpos A β -específicos son "liberados" desde cualquier unión a asociados de unión, que están presentes en la muestra previa al contacto con los agregados A β , según la presente invención. Esto permite la detección de todos los anticuerpos A β -específicos que no se unen a un asociado de unión en la muestra (anticuerpos "libres" o "reactivos"). Durante la presente invención se determinó que la cantidad de los anticuerpos A β -específicos reactivos, especialmente de IgG A β -específico reactivo, constituyó un marcador clave para el diagnóstico y desarrollo de AD. Este procedimiento es, tal como se ha establecido anteriormente, también apropiado para determinar la cantidad total de anticuerpos A β -específicos en una muestra, es decir, los anticuerpos libres (o "reactivos"), así como aquellos antióxicos que ya están unidos (por ejemplo, a las estructuras A β) en la muestra. Esto puede ser de ayuda para establecer la diferencia (Δ) de anticuerpos reactivos con respecto a los no reactivos en una muestra, un parámetro que es también de importancia significativa para el diagnóstico de AD. Mientras que dicha diferencia no se encuentra presente (o baja) en individuos "sanos" con respecto a AD, esta diferencia es crucial para la función de los marcadores en AD, con respecto tanto para IgG A β -específicos como para IgM A β -específicos. Para utilizar el IgM A β -específico como parámetro para el diagnóstico de AD, se prefiere particularmente una etapa de desenmascaramiento antes de llevar a cabo este procedimiento, y de este modo, la diferencia (Δ) de los anticuerpos reactivos con respecto a los no reactivos en la muestra, se definirá y utilizará como parámetro relevante.

El procedimiento según la presente invención utiliza una técnica de detección de una partícula individual. Dichas técnicas permiten la identificación y cuantificación ("contaje") del número y cantidad de resultados de unión "positiva"

del anticuerpo A β -específico a los agregados A β . Una forma de realización preferida de esta tecnología la constituye FACS, que es una técnica establecida en este campo. Otros procedimientos de detección que van a utilizarse para detectar los anticuerpos que se unen a los agregados A β , son, por ejemplo, Luminex o la citometría de masas.

5 Según la tecnología Luminex, la preparación de la muestra puede llevarse a cabo tal como se describe en "Material y Métodos". Siguiendo la preparación de la muestra, los agregados A β reconocidos por los anticuerpos específicos A β -específicos pueden detectarse mediante un anticuerpo secundario unido a microesferas teñidas fluorescentes, que pueden detectarse en sistemas multiplex de detección, por ejemplo, en un lector Luminex (Binder et al., Lupus15 (2005): 412-421).

10 Si la citometría de masas se utiliza como técnica de detección de partículas individuales, la preparación de la muestra puede también llevarse a cabo tal como se describe en "Material y Método" de la sección de Ejemplos que se muestra a continuación. La preparación de las muestras se lleva a cabo tal como se va a describir. Siguiendo esta preparación, los agregados A β reconocidos por los Abs específicos pueden detectarse mediante un anticuerpo secundario unido a isótopos estables de elementos de transición, que pueden detectarse mediante espectrometría de masas. La muestra puede entonces rociarse mediante una bobina inductora rellena de plasma de argón, calentado a una temperatura de >5,500 K. La muestra se vaporiza e ioniza en sus constituyentes atómicos, cuantificándose el número de anticuerpos marcados isotópicamente mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo (Janes et al., Nat. Biotechnol. 29 (2011): 602-604).

20 Alternativamente, también es posible aplicar técnicas de detección de partículas individuales donde un asociado de unión (agregados A β o anticuerpo/suero) son inmovilizados, pero la unión se evalúa mediante condiciones de flujo. Ejemplos son la tecnología Hybcell y la de Resonancia Plasmónica Superficial Utilizando la Tecnología Hybcell en la presente invención, las muestras séricas pueden motearse sobre la superficie de Hybcell (un cilindro rotatorio), llevándose a cabo la incubación con agregados A β directamente preincubados y marcados fluorescentemente, o, 25 alternativamente, con un segundo anticuerpo monoclonal A β -específico marcados fluorescentemente. Los anticuerpos que se unen a los agregados A β se detectan mediante un láser (Ronacher, Anagnostics Technical Note ANA-TN-005 (2010)). Si se utiliza la Resonancia Plasmónica de superficie en el procedimiento según la presente invención, puede aplicarse un programa de instalación inverso: los agregados A β preincubados pueden 30 inmovilizarse sobre la superficie de un chip. La unión de los anticuerpos A β específicos del suero a los agregados A β en el chip, puede detectarse aumentando la masa en la superficie del chip, no siendo, por tanto, necesario marcar entonces, los asociados de unión. Para aumentar la sensibilidad o determinar los subtipos IgG, es posible una inyección seriada de anti-IgG-AB (Cannon et al., Anal. Biochem. 328 (2004): 67-75). En vez de inmovilizar directamente los agregados A β a la superficie del chip, puede utilizarse un anticuerpo de captura. Para este 35 programa de instalación inversa, se inmoviliza sobre la superficie del chip, un anticuerpo A β -específico, seguido por la inyección de agregados A β preincubados. Después de la captación de los agregados, el suero se inyecta, midiéndose la reactividad por el aumento de la masa.

40 La detección de la unión de anticuerpos A β -específicos a los agregados A β , según la presente invención, puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento conocido apropiado, por ejemplo la Espectroscopia de Fluorescencia (Missailidis et al., Methods in Molecular Biology 248 (2003): 431-441), para detectar los anticuerpos A β -específicos unidos a los agregados A β mediante un anticuerpo secundario (por ejemplo, un anticuerpo secundario marcado anti-IgG o anti-IgM).

45 La detección de los auto-anticuerpos unidos a los agregados puede también realizarse utilizando anticuerpos que se unan específicamente a sustratos tales como la Proteína A o la Proteína G. Otra posibilidad es precipitar auto-anticuerpos A β -agregados específicos utilizando los A β -agregados, lavando el complejo y biotinilando los anticuerpos. Subsiguientemente, puede utilizarse entonces estreptavidina como reactivo en la segunda etapa.

50 Según una forma de realización preferida de la presente invención, las partículas con superficies tipo A β -agregado son perlas con A β -agregados inmovilizados en su superficie, especialmente por las magnéticas.

Este procedimiento está específicamente adaptado para utilizarlo con relación al diagnóstico de AD. Con la presente invención, los auto-anticuerpos A β -específicos en pacientes humanos se proporcionan como marcadores para la 55 condición de AD. La gente con un nivel "normal" de anticuerpos A β -específicos en su sangre "están sanos" con respecto a AD. Si este nivel se modifica en un paciente con AD o en individuos con un riesgo de desarrollo AD o son sospechosos de tener AD, tal nivel de modificación se correlaciona con AD. Un nivel "modificado" puede consistir en una modificación del número absoluto de los anticuerpos A β -específicos o de una modificación de la reactividad de la totalidad de los anticuerpos A β -específicos (por ejemplo, de un tipo dado de anticuerpos A β -específicos (IgG, IgM, etc.). Por ejemplo, el IgG A β -específico reactivo disminuido, se correlaciona con, y constituye un marcador para AD. 60 Por otra parte con IgM, cambios del nivel de IgM A β -específico (no reactivo, es decir, unido o enmascarado, en la otra dirección, poseen una función marcadora con respecto a AD. Con este procedimiento, cuando el nivel "sano" de IgG reactivo A β -específico se fija al 100% una disminución significativa el IgG reactivo A β -específico, por ejemplo, una disminución del 70%) e inferior, del 50% e inferior, y del 30% e inferior, indica el desarrollo de AD. Por otra 65 parte, cuando el nivel "sano" del IgM A β -específico se fija al 100% un aumento del IgM total (reactivo + no reactivo)

de por lo menos el 30%, por ejemplo, por lo menos del 50% por lo menos del 100%, en una muestra sanguínea, indica el desarrollo de AD.

De acuerdo con esto, un campo preferido de utilización de la presente invención, lo constituye el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD). Sin embargo, la presente invención puede utilizarse para todas las patologías conectadas a o relacionadas con A β ("patologías A β "), especialmente a las patologías en las que los depósitos A β se producen durante la enfermedad. Ejemplos de dichas patologías A β son la demencia de Parkinson (PDD), la Demencia con los Cuerpos de Lewy (DLB), la Angiopatia Amiloide Cerebral (CAA), los Miositos de cuerpos de inclusión (IBM; especialmente la IBM esporádica), o el trauma cefálico crónico (por ejemplo, el boxeo).

Ya que esta invención proporciona un marcador para AD e, incluso, para el desarrollo de AD, es posible utilizar este procedimiento para observar el desarrollo de la enfermedad y la realización de posibles procedimientos de tratamiento, especialmente si el procedimiento de tratamiento permite establecer niveles "sanos" o "más sanos" de anticuerpos A β -específicos, especialmente IgG o IgM.

Este procedimiento se utiliza, por tanto, preferentemente para la monitorización de los pacientes AD especialmente de los pacientes AD que son tratados con medicamentos para curar o mejorar AD. Este procedimiento puede aplicarse satisfactoriamente para observar pacientes en ensayos clínicos para vacunas AD (por ejemplo, con mimotopos AD según WO 2004/062556 A, WO 2006/005707 A, WO 2009/149486 y WO 2009/149485; o con vacunas derivadas de A β según WO 99/27944 o medicamentos que hacen diana en A β y modifican la patología.

El procedimiento según la presente invención puede utilizarse también para evaluar el riesgo de desarrollo de AD o para detectar las etapas tempranas de AD. Con la presente invención se ha hecho posible, en principio, detectar cambios en el "acomodo" inmunológico de los pacientes, con respecto a los auto-anticuerpos A β -específicos en un punto significativamente temprano en el tiempo que en el los déficits cognitivos. Esto podría permitir una mejoría significativa del diagnóstico temprano de AD, con respecto a una parte mucho más amplia de la población, si se establece en un formato rutinario de ensayo. Esto hace que los pacientes puedan elegirse para regímenes de tratamiento en un estadio temprano y/o estrategias de prevención (o retraso) para AD, especialmente vacunaciones.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento según la presente invención, que comprende:

- agregados A β , y
- un contenedor de muestras, especialmente para las muestras humanas (por ejemplo, sangre, suero, plasma).

Preferentemente, el kit según la presente invención, puede contener además medios para detectar agregados A β que se unan a anticuerpos A β específicos preferentemente anticuerpos secundarios, especialmente anticuerpos secundarios marcados, por ejemplo, anticuerpos anti-IgG o anti-IgM. Otros componentes pueden ser muestras estándar, controles positivos y/o negativos, instrucciones para el uso, y medios apropiados de empaquetamiento (por ejemplo, recipientes estables, viales coloreados, etc.).

La presente invención se ilustra además por los Ejemplos y las figuras acompañantes, sin que estén restringidos.

La Figura 1 muestra la determinación del tamaño de los agregados A β , utilizando el análisis FACS. Los agregados Tioflavina T positivos A β 1-42 pueden detectarse utilizando citometría de flujo y se muestran como una población homogénea en el canal FL1-FITC A (escala-logarítmica) – y FSC-A (escala log) en la transferencia por puntos (A). La distribución del tamaño (definida por la señal FCS-A) de los agregados A β se determinó utilizando perlas disponibles comercialmente de tamaño calibrado (1, 2, 4, 6, 10 y 15 μ m), tal como se muestra en el histograma FSC-A (B).

La Figura 2 muestra la detección de la reactividad de los anticuerpos monoclonales respecto a los agregados A β , utilizando un ensayo basado en FACS. El anticuerpo 3A5 monoclonal A β 1-42 se une específicamente a los agregados A β 1-42 (A), pero no interacciona con los agregados A β p(E)3-42 (C). Contrariamente, el anticuerpo D129 específico se une a A β p(E)3-42, pero no a los agregados A β 1-42 (B+D). Se determinó la reactividad utilizando un anticuerpo secundario marcado con anti-inmunoglobulina-PE en el canal FL2-PE. La intensidad fluoresceínica tal como se muestra en B y C, representa una tinción anterior, tal como se ve cuando los agregados se incuban con sólo el anticuerpo secundario marcado con PE.

La Figura 3 muestra la comparación de sensibilidad del ensayo para tres procedimientos distintos. (A) Los agregados A β 1-42 se incubaron en una serie de diluciones de IVIG, determinándose la reactividad en el canal FL-2, utilizando la citometría de flujo. (B) titulación de IVIG sobre placas ELISA Maxisorp, revestidas con A β 1-42 durante la noche con un pH de 9,2. (C) Detección sin marcadores de concentraciones diferentes de IVIG, interaccionando con, principalmente A β 1-42 inmovilizado y biotinilado, sobre chip-SA, utilizando resonancia superficial plasmónica (BiaCore). Por favor, téngase en cuenta que para comparación, todos los resultados se dan en una señal anterior amplificada.

La Figura 4 muestra la determinación de la reactividad del auto-anticuerpo IgG A β -específico, en las muestras de suero que se indican. Los sueros de control de los donantes sanos (de 30 a 50 años de edad), o los sueros derivados de los pacientes AD, se sometieron al ensayo FACS descrito. La intensidad fluoresceínica de los agregados A β , se evaluó en el canal FL2-PE, y se expresa como Intensidad Fluoresceínica Media (MFI).

La figura 5 muestra un análisis de curva ROC. Se comparó la reactividad anti-A β 1-42 IgG específica de los sueros derivados de pacientes AD, con los sueros derivados de donadores sanos.

La Figura 6 muestra la correlación de la reactividad de IgG con los parámetros del examen del Estado Mini-Mental (MMSE), 24 pacientes de AD se examinaron en cuanto al estado MMSE, sometiéndose los sueros de estos pacientes al ensayo FACS descrito, y se determinó la FI Media. Se muestra una correlación de los datos recogidos en los resultados y en las figuras previas.

La Figura 7 muestra un análisis de la curva ROC. Se comparó la reactividad anti-A β 3-42 específica de IgG de los sueros derivados de los pacientes AD, con los sueros derivados de donadores sanos.

La Figura 8 muestra un análisis de la curva ROC. Se comparó la reactividad anti-A β p(E)3-42 específica de IgG de los sueros derivados de los pacientes AD, con los sueros derivados de donadores sanos.

La Figura 9A muestra la determinación de la reactividad del auto-anticuerpo IgM A β -específico en las indicadas muestras séricas. Los sueros de control de los donadores sanos, o de los sueros derivados de los pacientes AD, se sometieron al ensayo FACS descrito. La intensidad fluoresceínica de los agregados A β se evaluó en el canal FL2-PE y se expresa como Intensidad Media de fluorescencia (MFI). La Figura 9B muestra un análisis de la curva ROC. Se comparó la reactividad IgM-específica anti-A β 1-42 de los sueros derivados de los pacientes AD, con los sueros derivados de donadores sanos.

La Figura 10 muestra la determinación de la reactividad del auto-anticuerpo IgM A β -específico en las muestras séricas indicadas después del desenmascaramiento del anticuerpo. Los sueros de control de los donadores sanos (HI) o los sueros derivados de los pacientes AD se sometieron al descrito procedimiento de desenmascaramiento, y al ensayo FACS subsiguiente. La intensidad fluoresceínica de los agregados A β se evaluó en el canal FL2-PE, expresándose como la Intensidad Fluoresceínica Media (MFI).

La Figura 11 muestra un análisis de la curva ROC. La reactividad anti-A β 1-42 IgM-específica de los sueros derivados de los pacientes AD con sueros derivados de donadores sanos, se comparó después de desenmascaramiento del auto-anticuerpo.

La Figura 12 muestra un análisis de la curva ROC. La reactividad anti-A β 1-42 IgG específica de los sueros derivados de los pacientes AD, y de los sueros derivados de los individuos sanos, se analizaron antes y después de la disociación antigénica. Los valores delta se utilizaron para calcular la curva ROC.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Detección de los anticuerpos A β -específicos que utilizan la resonancia plasmónica superficial (SPR-Biacore).

El sistema Biacore ofrece distintos chips que pueden utilizarse para la inmovilización. Para este experimento, se utilizó un chip revestido con estreptavidina (SA). Para evitar la unión inespecífica del ligando, mediante las cadenas laterales, a la superficie del chip, se utilizaron péptidos A β C-terminalmente biotinilados (obtenidas de Anaspec). Ya que el complejo biotina-estreptavidina es extremadamente estable, es el más apropiado para experimentos seriados extendidos. Para optimizar la robustez del chip, y por tanto, la reproductibilidad, se inmovilizó un máximo de unidades de respuesta (~1500RU) sobre células de flujo, mientras la célula 1 de flujo se dejó vacía y se utilizó como referencia. Para evitar la unión no específica sobre la superficie del chip, se utilizó biotina libre para saturar sitios libres de unión SA sobre la totalidad de las cuatro células de flujo. Las muestras humanas se han diluido 1:10 a 1:100 en HBS pH 7,4, y se midió (diluida en HBS pH 7,4, también) una serie de diluciones de IVIG desde 1 mg/ml a 10 μ g/ml. La superficie del chip se regeneró después de cada inyección de la muestra con 10 mM glicina-HCl (pH 1,8). Todos los experimentos se realizaron a 25°C. Se utilizó un protocolo estandarizado para el comienzo de las inyecciones con etapa de asociación de 200 segundos, seguida por una de disociación de 600 segundos. El valor R_{max} se define como el nivel de respuesta (medido en RU) al final de la inyección de la muestra. Para la evaluación de la señal, los valores R_{max} se determinaron utilizando el programa BIA-evaluación integrado.

Detección de los anticuerpos A β -específicos utilizando ELISA.

Distintos péptidos A β (obtenidos de rPeptide) se diluyeron en 100 mM NaHCO₃ (pH 9,2) a una concentración de 5 μ g/ml, revistiéndose sobre placas Maxisorp de 96 pocillos por la noche. Para evitar la unión inespecífica, las placas de unión se bloquearon utilizando BSA al 1%/PBS a 37°C durante 1 hora. Se llevó a cabo ELISA con una dilución en

serie de muestras de seres humanos (que empezaba con una dilución de 1:10), o añadiendo IVIG en concentraciones que oscilaban entre 1 mg/ml y 10 µg/ml, diluidas en tampón de unión (PBS/0,1% BSA/0,1% Tween20), a 37°C durante 1 hora. Después de etapas repetidas de lavado (3x) con PBS/0,1% Tween20, se añadió durante 1 hora a 37°C el anticuerpo de detección secundario Ig HRP (0,5 µg/ml) anti-humano. Las muestras se lavaron otra vez 3x, añadiendo durante 30 minutos ABTS (0,68 nM en 0,1 M ácido cítrico pH 4,3) para el desarrollo del ensayo, antes de la medición-OD sobre el lector de la placa (Programa Biotek-Gen5) a una longitud de Onda de 405 nm.

5 **Detección de los anticuerpos Aβ-específicos utilizando el análisis FACS**

10 Antes del análisis los péptidos β-amiloides liofilizados se sometieron a un procedimiento de desagregación. Con este propósito, especies Aβ liofilizadas se disolvieron en NH₄OH al 1% (pH11). Los péptidos Aβ disueltos alícuotamente se conservaron a -20°C. Para inducir la formación de agregados, las distintas especies Aβ se incubaron a una concentración de 20 µM en una solución acuosa (pH 5) a 37°C en una agitadora (a 350 rpm) durante la noche en un tubo Eppendorf. La formación de los agregados Aβ pudo confirmarse mediante tinción con Tioflavina T (ThT) en FACS (FSC/FL1). Las especies Aβ agregadas se diluyeron a 0,15 µM en medio estéril, se filtraron con BSA al 0,5% y se pre-incubaron durante 30 minutos en un volumen final de 95 µl, en una placa de 96 pocillos. 5 µl del plasma humano prediluido a Abs (en 0,5% BSA/PBS), se añadió a 95 µl de solución Aβ-agregados. La dilución final de plasma osciló entre 1:1.000 y 1:10.000. Para los anticuerpos monoclonales, se utilizaron concentraciones inferiores a 0,5 µg/ml. Después de 45 o 60 minutos de incubaron a una temperatura ambiente (RT) en la agitadora (350 rpm), se añadieron a cada pocillo 200 µl de BSA/PBS al 0,5%, centrifugándose durante 5 minutos a 3.000 rpm (placa de 96 pocillos-centrífuga). Se eliminó el sobrenadante, repitiéndose una etapa de lavado otra vez con 200 µl de BSA/PBS al 0,5%. Después del segundo lavado, se descartó el SN, volviéndose a suspender el sedimento en 100 µl de BSA/PBS al 0,5%, que contenía una dilución 1:1.000 de anti-IgG (H+L)-PE secundario marcado, o una dilución 1:500 de anticuerpo Fc5µ anti-IgM (ambos Jackson Immuno Research). Las muestras se incubaron durante otros 45 o 60 minutos a RT en la agitadora (350 rpm), y realizándose la medición en FACS Canto equipado con un muestreador de alta capacidad de procesamiento (HTS). Los agregados se... en FSC/SSC, midiéndose y evaluándose en el canal FL2-PE, respectivamente, la intensidad fluoresceínica media (MFI), y la reactividad de ThT a los agregados Aβ, en el canal FL1-FITC, utilizando el programa FACS Diva.

30 **Desenmascaramiento**

35 Para interrumpir la unión de los auto-anticuerpos Aβ-específicos a Aβ, tal como se encuentra presente en el suero del paciente y, por tanto, para evitar la detección de estos auto-anticuerpos unidos a Aβ, mediante procedimientos basados en los antígenos (como ELISA o FACS), se prediluyeron los sueros en 10 mM de Glicina pH 2,6, con una dilución de 1:16,7 durante 5 minutos.

40 Para interrumpir la unión potencial de los antígenos Aβ a los sueros de auto-anticuerpos, se prediluyeron en 10 mM Glicina pH 2,6 con una dilución de 1:16,7 durante 5 minutos. 5 µl de suero acidificado se co-incubaron entonces con 3 µl de Aβ1-42 (100 µg/ml) durante otros 5 minutos. Entonces, la mezcla se neutralizó añadiendo 92 µl de 0,5% BSA/PBS), incubándose durante 20 a 60 minutos. Las etapas de lavado e incubación con el anticuerpo secundario, se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente para el suero no desenmascarado.

45 **Resultados**

Agregados Aβ: oligomerización y formación fibrilar

50 La formación de agregados Aβ (incluyendo oligómeros Aβ, fibrillas y agregados fibrilares), a partir de Aβ monomérico, se ha investigado intensivamente bajo múltiples condiciones, recientemente. Se encontró que la agregación de péptidos Aβ depende mucho de distintas condiciones que incluyen pH, temperatura, composición del tampón, y concentración proteica. La agregación empieza con la formación de β-horquillas a partir de monómeros, lo que conduce a oligómeros solubles. La transición conformacional a láminas β, lleva entonces a la formación de fibrillas y de agregados fibrilares, lo que puede precipitarse mediante centrifugación. Hallazgos recientes han mostrado que los agregados Aβ40 y Aβ42 producidos a pH 7,4, incluyen fibrillas con un filamento de 5 nm de anchura, con una ligera tendencia a asociarse lateralmente en haces (con filamentos de 15 a 25 nm de ancho). La longitud de dicha única fibrilla es del orden de los sub-micrómetros (50-100 nm), hasta 10-15 µm, tal como se determina mediante microscopía electrónica de transmisión. Una característica de estas fibrillas Aβ es que se intercalan específicamente con un colorante fluorescente, la tioflavina T (ThT).

60 Según la presente invención, se generaron los agregados Aβ de distintas variantes Aβ peptídicas (Aβ1-42, Aβ-40 y Aβp(E)3-40, que se intercalan con ThT. Estos agregados-Aβ, pueden detectarse utilizando análisis FACS. Tal como se describe en MM, con este propósito, péptidos Aβ solubles sin semillas, se incubaron durante 20 h a 37°C, a una concentración de 20 µM. Tal como se muestra en la Figura 1A (cuadro superior), una población homogénea clara de ThT positivas (medidas como señales positivas FL1 (FITC) a las que el ensayo FACS dio lugar según la presente invención, permite el análisis de los agregados Aβ generados *in vitro*. La distribución del tamaño de los agregados Aβ (definida mediante dispersión avanzada FSC-A, se analizó utilizando perlas de tamaño calibrado del orden de 1 a

15 μm (Kit de Calibración el Tamaño mediante Citometría de Flujo (Cat.# F-13838) mediante sondas moleculares) (Figura 1 cuadro inferior). Utilizando este análisis, se mostró que el tamaño de los agregados A β generados, era del orden, tal como se esperaba, del sub-micrométrico hasta 10 μm , en el que la mayoría de los agregados generados es del orden de \sim 200 nm hasta 3 μm .

5

Reactividad de mAbs con os agregados A β

Para definir si los agregados A β permiten la unión de los anticuerpos A β -específicos y determinar si dicha interacción puede monitorizarse utilizando el ensayo basado en FACS que se describe en esta Memoria, se emprendió otro conjunto de experimentos. Para esto, se generaron los agregados A β 1-42 así como A β p(E)3-42, incubándose con anticuerpos monoclonales específicos para A β 1-42, (3A5) o específicos para A β p(E)3-42 (D129). Tal como se muestra en los histogramas de FACS, en la Figura 2, el anticuerpo monoclonal 3A5 se une exclusivamente a los agregados A β 1-42 mientras que mAb D129 interacciona sólo con la especie piroglutamizada A β truncada N-terminalmente. Esto muestra que el ensayo basado en FACS descrito, permite la detección de anticuerpos A β -específicos de una manera específica.

10

15

Definiendo la sensibilidad de distintos procedimientos de detección para la unión de A β de los auto-anticuerpos humanos, utilizando IVIG.

20

IVIG (inmunoglobulina intravenosa) es un producto sanguíneo comercialmente disponible. Contiene el conjunto de la fracción IgG extraída del plasma derivado de donadores sanos (plasma humano de, por lo menos, 1.000 donantes). Se ha mostrado que las preparaciones de IVIG contienen anticuerpos que se encuentran de forma natural (auto-anticuerpos) específicos para los péptidos A β .

25

30

35

40

45

La finalidad de este experimento fue definir y comparar los límites de detección de tres procedimientos independientes de detección (Biacore, ELISA y el ensayo basado en FACS) para la reactividad A β de IVIG (IVIG Subcuvia, obtenido de Baxter, Austria). A β 1-42 se inmovilizó entonces, bien sobre la superficie del chip, o sobre las placas Maxisorp de microtitulación para las mediciones de ELISA o de SPR, respectivamente. Alternativamente, los agregados A β 1-42 se generaron para análisis FACS. Subsiguientemente se aplicaron distintas diluciones IVIG a los sistemas individuales, definiéndose los valores R_{max} en el caso de SPR, los valores OD en el caso de ELISA, o los valores MFI (intensidad fluoresceínica) en el caso del ensayo FACS. Por razones comparativas, la señal para la proporción de ruido, se evaluó para todas las concentraciones de IVIG, expresándose las señales como señales ampliadas del ruido de fondo (xBG) (Figura 3). En el caso de la medición de SPR, ninguna de las concentraciones IVIG dio lugar a una señal superior al ruido de fondo (Figura 3C). Contrariamente a que el anticuerpo 3A5 de control diera lugar a una señal fuerte, indicando que A β 1-42 se había inmovilizado con éxito en la superficie del chip, y que los péptidos A β , en principio, pueden reconocerse sobre la superficie del chip mediante anticuerpos. Utilizando ELISA como procedimiento de detección, 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IVIG dieron lugar a una señal clara sobre el ruido de fondo (7 veces BG), mientras que la señal inducida por 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IVIG fue sólo de 2 veces el ruido de fondo, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IVIG no dieron lugar a una señal mayor que el ruido de fondo (Figura 3B). Tal como se muestra en la IA, el ensayo basado en FACS proporcionó señales que fueron mucho más altas que las proporcionadas por los otros dos procedimientos de detección. No sólo los 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (24 veces BG), o 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (11 veces BG), sino también 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5 veces BG), y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (casi 2 veces BG) de la dilución de IVIG dieron lugar a una señal que se encontraba claramente por encima del ruido de fondo. Esto indica que el nuevo ensayo basado en FACS desarrollado recientemente para detectar auto-anticuerpos A β -específicos, es, por lo menos, 100 veces más sensible que los ensayos convencionales tales como ELISA o Biacore.

Definición de anticuerpos amiloides anti-beta en la sangre humana derivados de donantes sanos y de pacientes AD.

50

a. Reactividad de IgG para A β 1-42

55

Muestras séricas derivadas, bien de individuos sanos ($n = 13$, \approx 30 a 50 años de edad) o de pacientes AD ($n = 48$, \sim 70 años de edad), se analizaron con respecto al contenido de anticuerpos A β -específicos encontrados naturalmente, utilizando agregados A β y análisis FACS tal como se ha descrito anteriormente. Tal como se muestra en la Figura 4, los anticuerpos que se encuentran de forma natural que son específicos para los agregados A β . Se detectaron en todas las muestras ensayadas. Sin embargo la concentración de dichos anticuerpos fue significativamente más baja en las muestras sanguíneas derivadas de los pacientes AD, cuando se compararon con las muestras séricas derivadas de individuos sanos.

60

Para definir la sensibilidad y especificidad del presente ensayo FACS, para identificar individuos que padecen AD, la reactividad de IgG para los agregados A β 1-42 de los sueros indicados en la Figura 4, se repitieron 2 veces, habiéndose sumariado los resultados en las curvas ROC (Figura 5). Este análisis de la curva ROC mostró que la especificidad fue del 100% cuando la sensibilidad era del 81% y la sensibilidad era del 100% cuando la especificidad era del 77%, con un área bajo la curva (AUC) de 0,9679.

65

En un intento de definir una correlación entre datos cognitivos e inmunológicos, la reactividad IgG medida para los agregados A β de los sueros de los pacientes AD ($n=24$), se correlacionó con índices del examen del estado Mini-

Mental (MMSE) de los pacientes, cuando se llevó a cabo el muestreo del suero. Esta correlación reveló que los pacientes con un rendimiento débil del ensayo, muestran una tendencia a una reactividad IgG reducida, tal como se muestra en la Figura 6. Esta disminución de la reactividad IgG A β -específica, refleja por tanto la progresión de AD.

5 En un intento para definir una correlación entre datos inmunológicos y cognitivos, la reactividad IgG medida de los sueros de pacientes AD (n=24), se correlacionó con resultados del examen del estado Mini-Mental (MMSE) de los pacientes. Esta prueba se utiliza habitualmente para detectar la alteración y demencia cognitiva, estimando la gravedad de dicha alteración cognitiva, en un individuo y en un momento determinado. La correlación de MFI con los parámetros MMSE reveló que los pacientes con un rendimiento débil de la prueba, mostraron una tendencia a una reactividad IgG reducida tal como se muestra en la Figura 6.

b. Reactividad de IgG con respecto a A β 3-42 y A β p(E)3-42

15 Además de definir la reactividad de las inmunoglobulinas que están presentes habitualmente en los sueros de los pacientes AD y de los individuos sanos para los agregados A β 1-42, la reactividad de estos sueros se definió también contra A β 3-42, así como para A β p(E)3-42. Las curvas ROC a partir de estos análisis, se muestran en las Figuras 7 y 8. En el caso de A β 3-42 (Figura 7), el análisis de la curva ROC mostró que la especificidad fue del 92% cuando la sensibilidad era del 77%, con un área bajo la curva (AUC) de 0,859.

20 En el caso de A β p(E)3-42 (Figura 8), el análisis de la curva ROC mostró que la especificidad fue de 85%, cuando la sensibilidad era del 93%, con un área bajo la curva (AUC) de 0,928.

c. Reactividad de IgM para distintos agregados A β

25 En un conjunto de experimentos llevados a cabo a continuación, de la reactividad IgM específica respecto a los agregados A β , esta reactividad se definió en muestras séricas derivadas, bien de individuos sanos, o de pacientes AD, utilizando idénticos sueros que los anteriormente descritos. Como puede apreciarse en la Figura 9A, anticuerpos de isotipo IgM que se encuentran naturalmente, y que son específicos para los agregados A β , se detectaron en todas las muestras que se ensayaron. Pero, a diferencia de la reactividad IgG, las muestras séricas derivadas de controles sanos no parecen tener una reactividad IgM superior a los agregados A β , que las muestras séricas derivadas de los pacientes AD. Por tanto, el análisis de la curva ROC no dio lugar a curvas que mostraron sensibilidad o especificidad (Figura 9B).

d. Reactividad de IgG e IgM respecto a los agregados A β después de desenmascaramiento.

35 En estudios previos, se ha mostrado que los auto-anticuerpos A β -específicos, principalmente del isotipo IgM, pueden ocuparse con el antígeno A β para construir un complejo inmune que es estable y circula en la sangre humana (WO 2010/128139 A1; Marcello et al., 2009; Lindhagen-Persson et al., PLoS ONE 5 (2010): e13928). Para definir si los antígenos A β potencialmente unidos a los auto-anticuerpos, pueden bloquear la reactividad de estos anticuerpos para los A β -agregados generados *in vitro*, los sueros individuales se sometieron a un procedimiento de desenmascaramiento, tal como se describe en Material y Métodos. Utilizando un pH bajo, los complejos inmunes potenciales se rompen, dando lugar a la eliminación de antígenos A β , a partir de dominios que se unen a anticuerpos (disociación de antígenos). De este modo, un procedimiento de desenmascaramiento podría dar lugar a señales más intensas de auto-anticuerpos en el ensayo basado en FACS, si los complejos inmunes están en las muestras séricas. De forma interesante, tal como se muestra en la Figura 10, la reactividad IgM de los sueros del paciente AD aumentó significativamente después de desenmascaramiento, mientras que la reactividad de sueros de control sanos no cambió, comparada con los sueros no tratados (compárese Figura 9A). Esto representa un contraste con lo que se midió en caso de reactividad IgG para los agregados A β . Tal como se muestra en la Figura 4, los sueros derivados de los individuos sanos, mostraron, una superior reactividad IgG con respecto a los agregados A β , que los sueros derivados de los pacientes AD (en este caso, los sueros no se trataron con un pH bajo).

50 Los resultados de la Figura 11 que se muestran en la Figura 10, se han resumido en curvas ROC. Este análisis de la curva ROC, mostró que la especificidad fue del 84% cuando la sensibilidad fue del 78% con un área bajo la curva (AUC) de 0,822.

60 Para completar este conjunto de experimentos, se llevó también a cabo un experimento de desenmascaramiento, para detectar si también los auto-anticuerpos del subtipo IgG podrían ser ocupados por antígenos A β . Con esta finalidad, todos los sueros se trataron otra vez con pH bajo, para romper complejos inmunes potenciales y subsiguientemente, se analizó la reactividad IgG de los sueros con respecto a los agregados-A β . Como se muestra antes en el experimento de desenmascaramiento de IgM, también en este experimento de reactividad IgG con respecto a los agregados A β de los sueros derivados de los individuos sanos, no difirió entre los sueros no tratados y los desenmascarados. En contraste con esto, los sueros derivados de pacientes AD, mostraron otra vez un aumento significativo en la reactividad A β , después del procedimiento de desenmascaramiento. Se compararon las señales derivadas de la unión de los auto-anticuerpos IgG séricos, a los agregados A β (en este caso A β 1-42) antes y después de la disociación de los antígenos. La diferencia entre los valores MFI derivados de las distintas

mediciones (no tratados respecto a desenmascarados), se definieron como la delta de disociación (Δ). En la Figura 11, los valores Δ de los sueros derivados de los controles sanos, y los valores Δ de los sueros derivados de los pacientes AD, se sumarian en una curva ROC. Como puede apreciarse, los vales Δ derivados de la reactividad IgG, pueden utilizarse también como parámetro para identificar los pacientes AD. Este análisis de la curva ROC mostró que la especificidad fue del 85%, cuando la sensibilidad fue del 79% con un área bajo la curva (AUC) de 0,862.

Conclusiones

Basándose en estos resultados, puede establecerse que la sensibilidad más acusada del ensayo de agregación FACS según la presente invención, está conectada directamente los distintos estados de agregación de A β 1-42. Para el análisis BIAcore se utilizó un A β 1-40 biotinilado y recién disuelto para la inmovilización sobre un chip de estreptavidina. Este procedimiento favorece la unión de A β 1-42 monomérico sobre la superficie del chip, porque el péptido se inmoviliza inmediatamente sin preincubación, decelerando también la formación de agregados de Biotina marcada. También, el revestimiento de A β 1-42 a pH9 sobre las placas Maxisorp parece favorecer la forma monomérica de A β , aunque el revestimiento de algunos agregados no puede excluirse. En este ensayo, las afinidades entre anticuerpos y el péptido A β 1-42 son responsables del límite de detección.

En contraste con estos dos procedimientos para el ensayo basado en FACS, según la presente invención, los agregados A β 1-42 se indujeron y utilizaron específicamente para la detección de anticuerpos para A β presente en IVIG. Estas moléculas más grandes ofrecen múltiples sitios de unión a los anticuerpos. El efecto resultante de avidéz (la suma de múltiples interacciones sinérgicas antígeno-anticuerpo), puede considerar la sensibilidad más alta de este ensayo, conduciendo a la detección de anticuerpos poco afines dentro de la fracción IVIG. La reactividad de IVIG para los agregados A β , puede explicarse también por la existencia de un epitopo que sólo se encuentre presente en la forma agregado de A β .

Los ejemplos muestran claramente la superioridad de este procedimiento con respecto a los procedimientos que están disponibles habitualmente en el campo, especialmente con respecto a propiedades analíticas, tales como especificidad y selectividad.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar anticuerpos A β -específicos en una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes:
- poner en contacto la muestra con agregados A β o con perlas con agregados A β inmovilizados en su superficie, y permitir que los anticuerpos A β específicos se unan a los agregados A β , y
 - detectar los anticuerpos A β -específicos que están unidos a los agregados A β , mediante una técnica de detección de partículas individuales, preferentemente mediante la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los anticuerpos A β -específicos son anticuerpos humanos, preferentemente anticuerpos IgG o IgM humanos, especialmente anticuerpos IgG humanos.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que los anticuerpos A β -específicos son auto-anticuerpos.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los agregados A β tienen un tamaño de 50 nm a 15 μ m, preferentemente de 100 nm a 10 μ m, especialmente de 200 nm a 5 μ m.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que los agregados A β se han preparado incubando los péptidos A β -1-42, A β -1-43, A β -3-42 o A β -p(E)3-42, a un pH de 2 a 9, durante por lo menos 20 minutos, preferentemente por lo menos durante 1 hora, y especialmente por lo menos durante 4 horas.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que los agregados A β están presentes para poner en contacto la muestra con los agregados A β en una cantidad comprendida entre 0,001 y 1 μ m, preferentemente entre 0,01 y 0,1 μ M.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la muestra biológica es sangre humana o una muestra derivada de sangre humana, preferentemente suero humano o plasma humano; líquido cefalorraquídeo humano o linfa humana.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que los agregados A β se ponen en contacto con la muestra durante por lo menos 10 minutos, preferentemente entre 10 minutos y 24 horas, y especialmente entre 20 minutos y 2 horas.
- 45 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que se lleva a cabo una etapa de desenmascaramiento sobre los anticuerpos A β en la muestra, antes de poner en contacto la muestra con los agregados A β , especialmente si se detectan anticuerpos IgM.
- 50 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que las perlas son especialmente perlas magnéticas.
- 55 11. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (AD).
- 60 12. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la monitorización de pacientes AD, especialmente pacientes AD que sean tratados con medicamentos para la curación o la mejora de AD.
- 65 13. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para evaluar el riesgo de desarrollar AD o para detectar un estadio temprano de AD.
14. Utilización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el diagnóstico de la demencia de Parkinson (PDD), Demencia con cuerpos de Lewy (DLB), Angiopatia Amiloide Cerebral (CAA), miositis de cuerpos de inclusión (IBM), o trauma cefálico crónico.
15. Utilización de un kit, que incluye:
- unos agregados A β , y
 - un contenedor de muestras
- para llevar a cabo el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

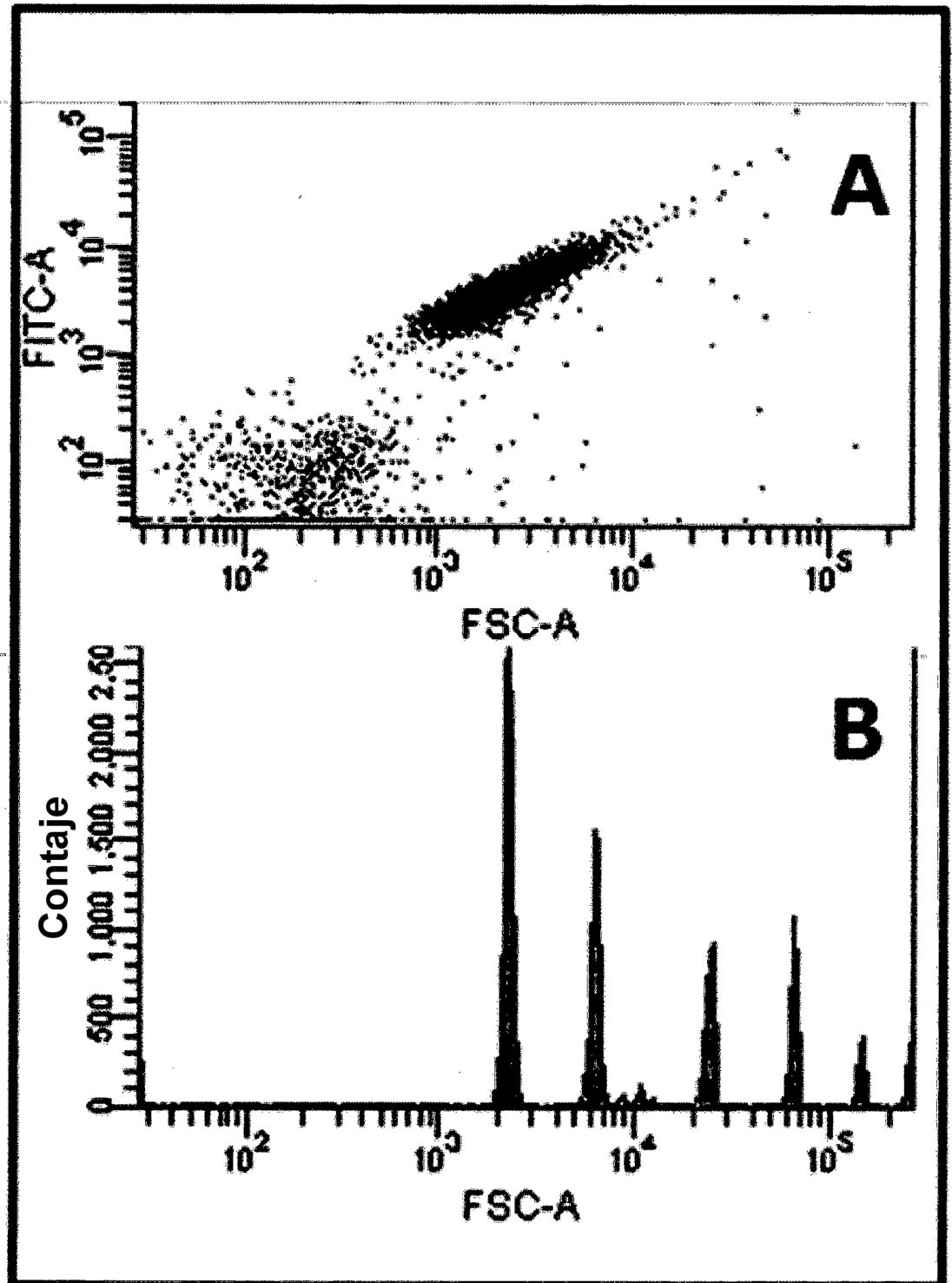


Fig.1

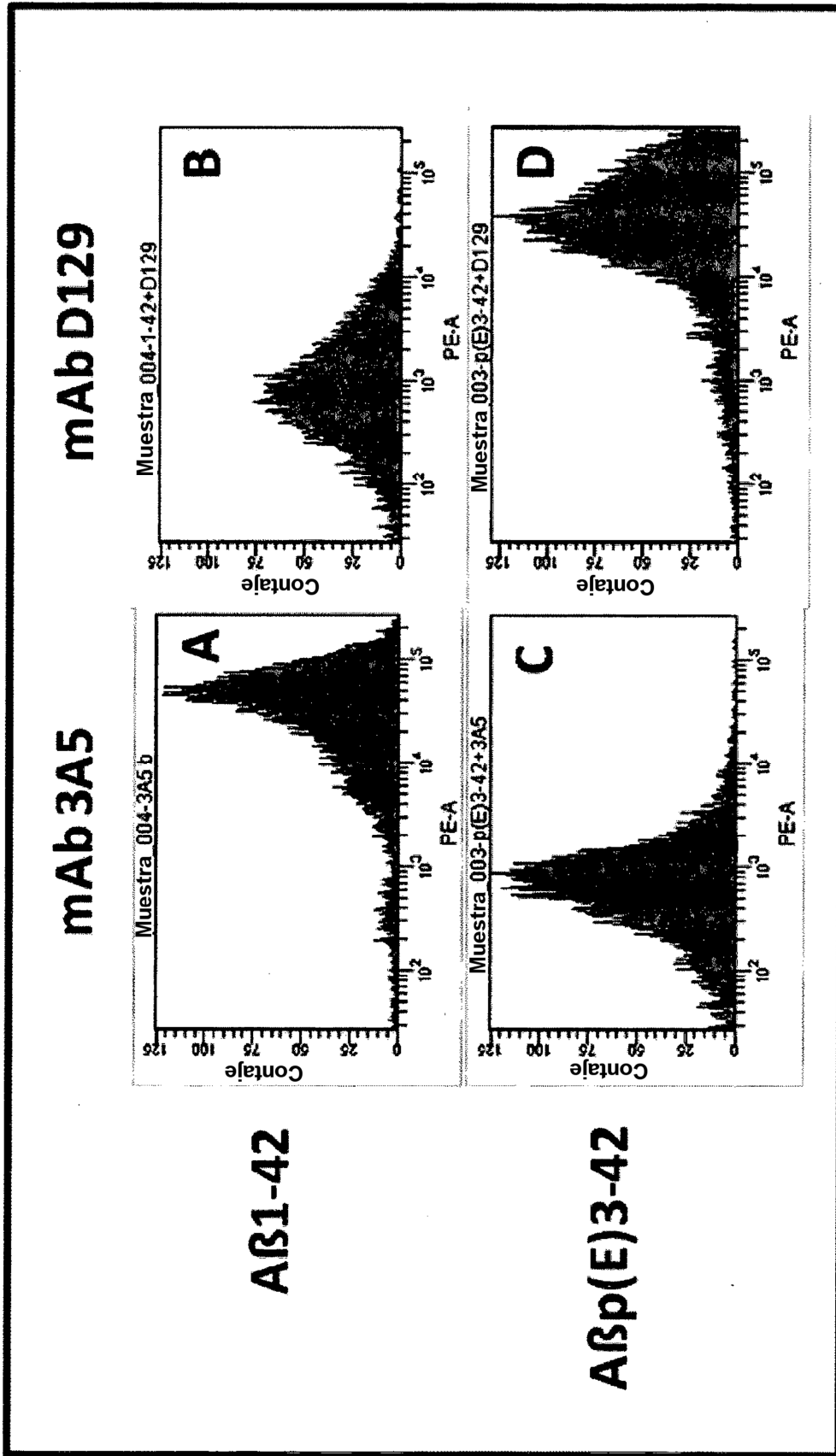
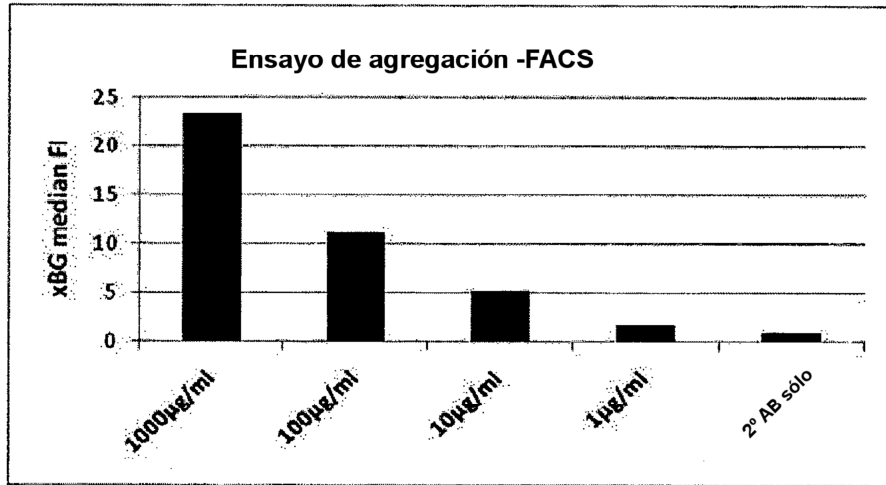
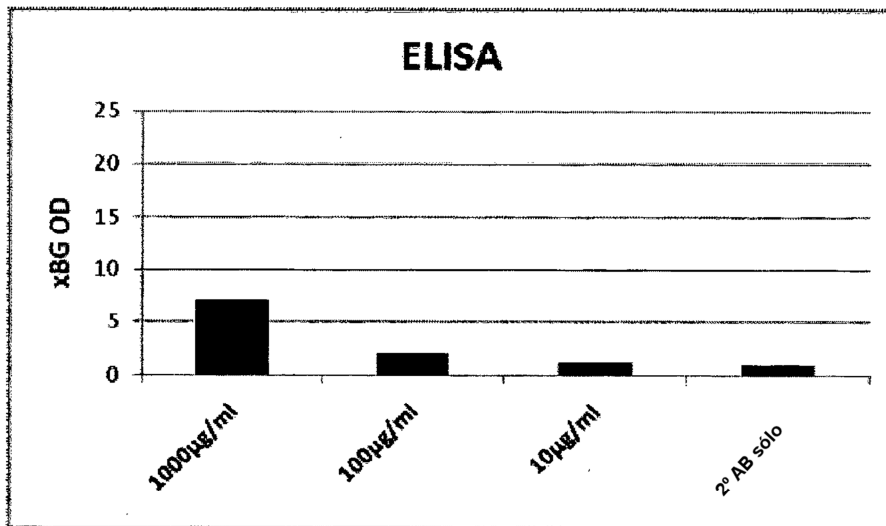


Fig. 2

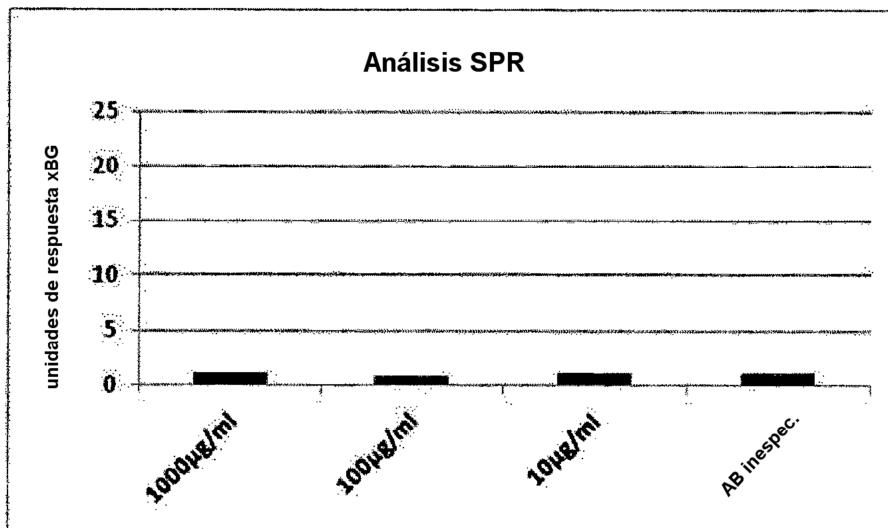
Fig.3



A



B



C

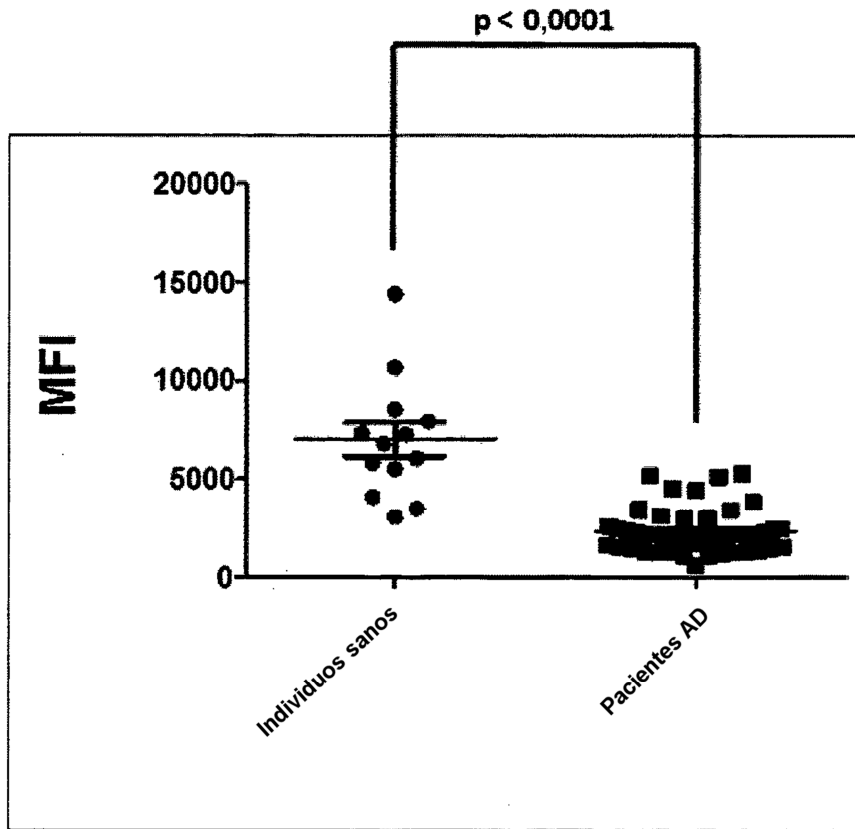


Fig.4

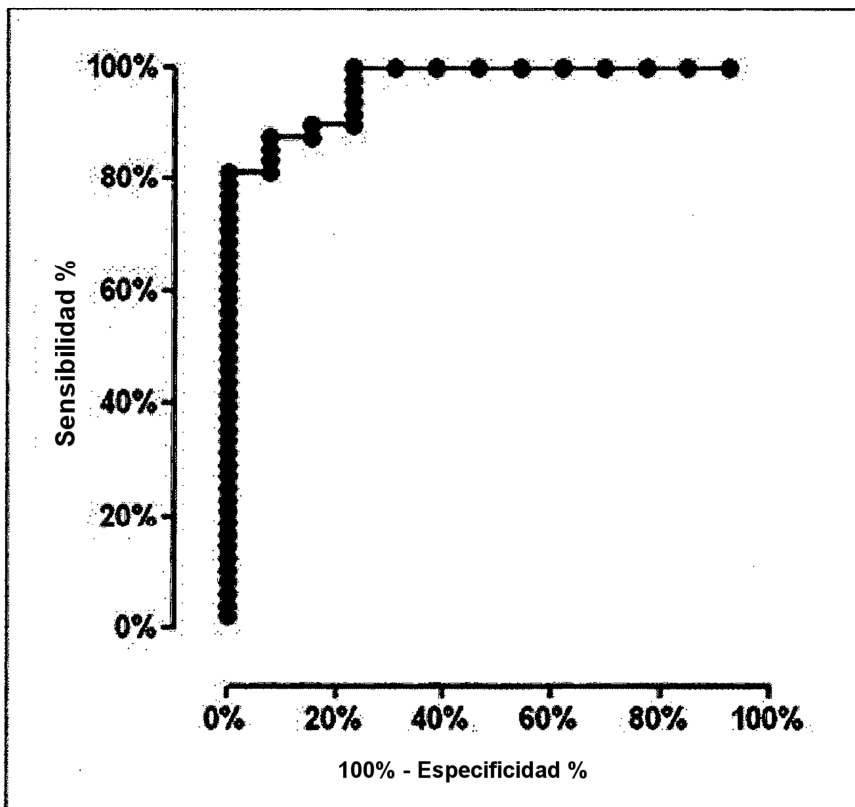


Fig.5

Fig.6

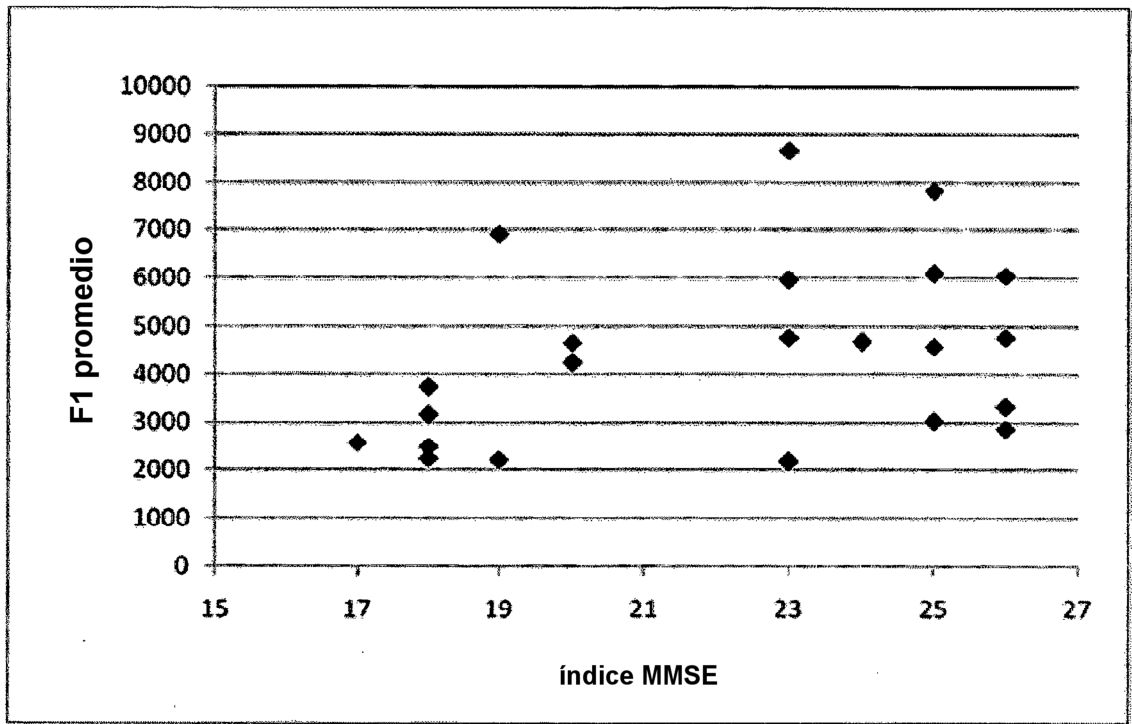
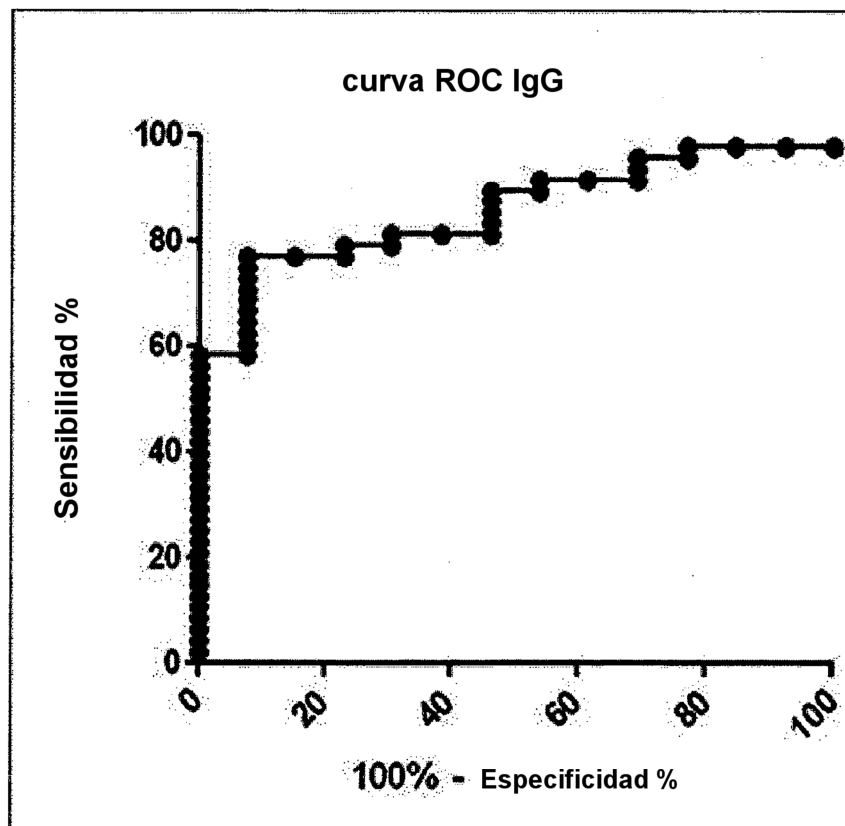


Fig.7



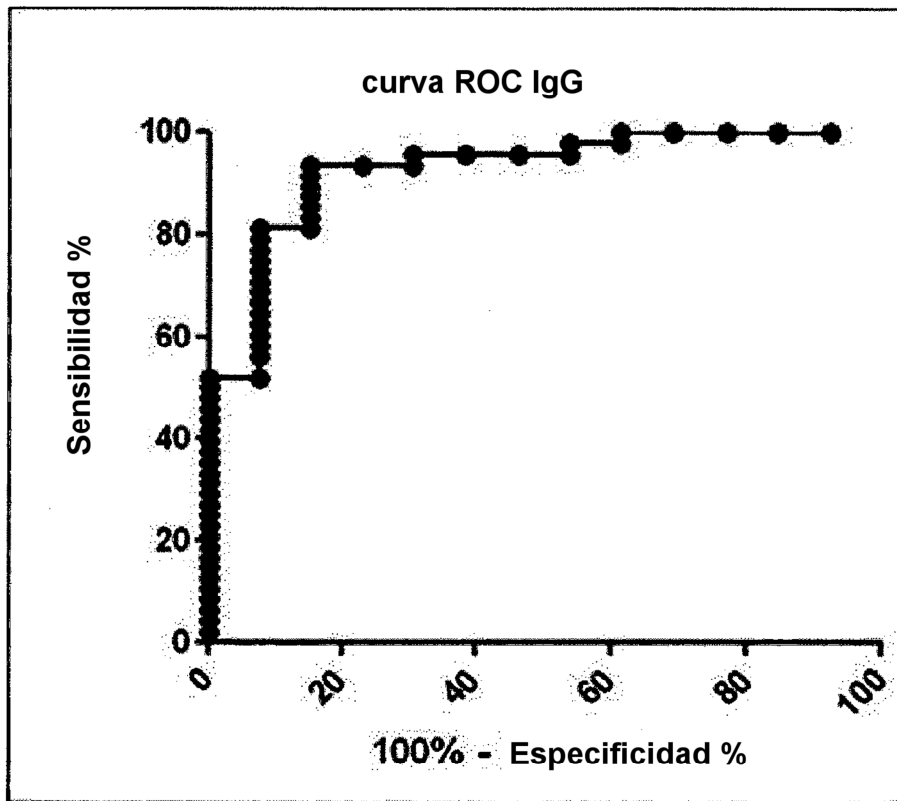


Fig.8

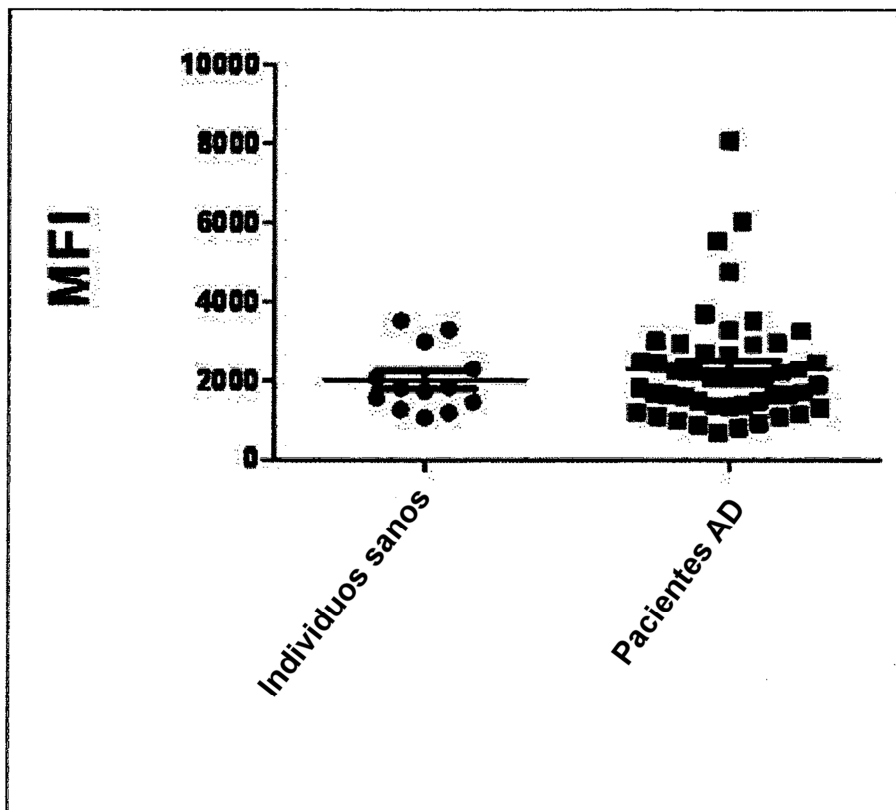


Fig.9A

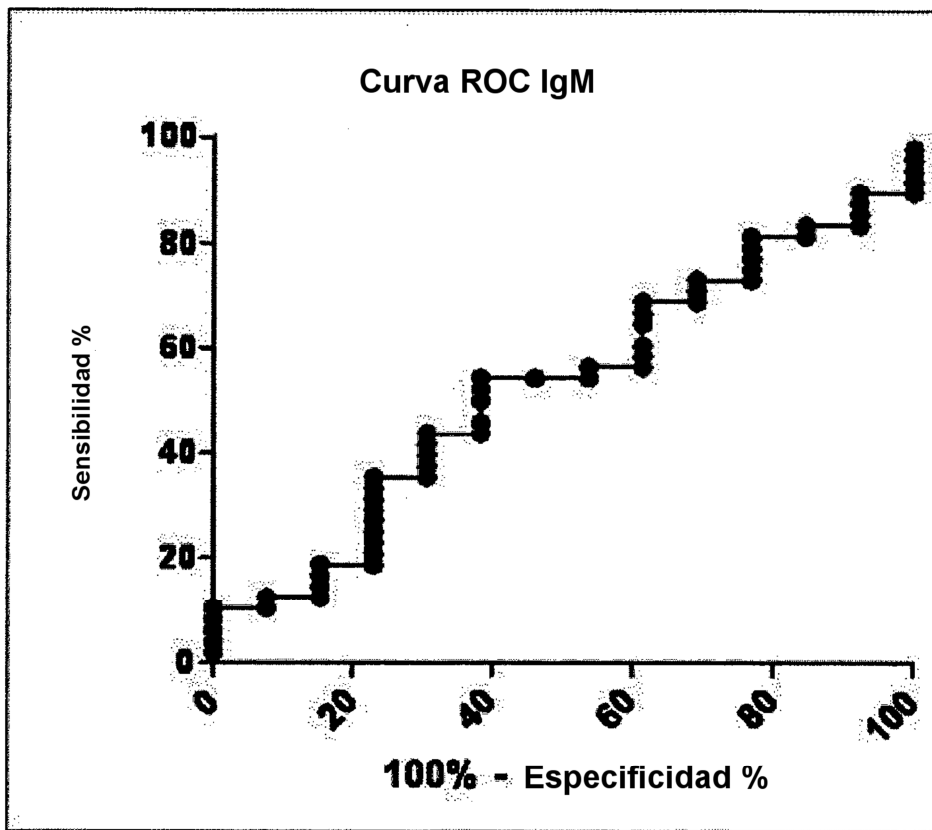


Fig.9B

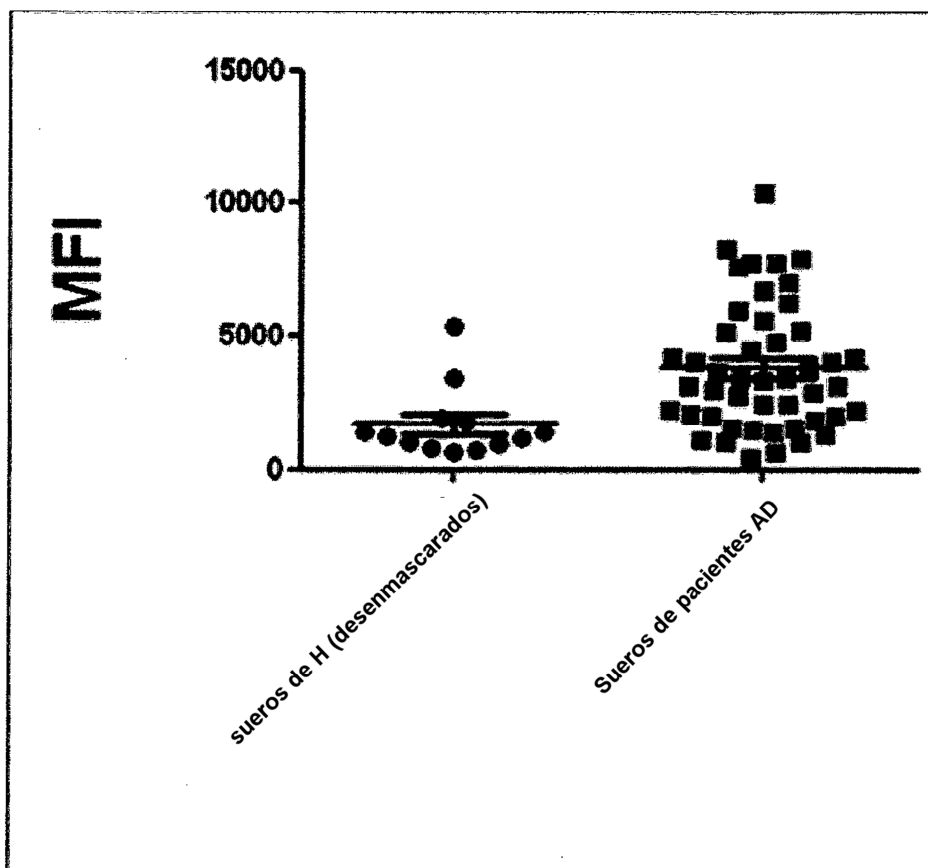


Fig.10

