



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021000895-0 A2



(22) Data do Depósito: 17/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) **Título:** MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM INDIVÍDUO COMO POSSUINDO OU ESTANDO EM RISCO DE DESENVOLVER UMA DEMÊNCIA POSITIVA PARA AMILÓIDE E PARA DETECTAR UM INDIVÍDUO COM UM VALOR AUMENTADO PARA UMA COMBINAÇÃO DE MARCADORES E USO DE ASS40, ASS42 E TTAU

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/68.

(30) **Prioridade Unionista:** 19/07/2018 US 16/039,376.

(71) **Depositante(es):** GENENTECH, INC.; F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

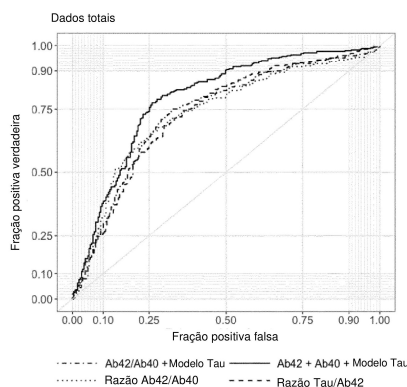
(72) **Inventor(es):** TOBIAS BITTNER; JOHANN KARL; VALERIA LIFKE; VERENA STEFFEN; MARTINA JOCHAM.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2019069257 de 17/07/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/016304 de 23/01/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 18/01/2021

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se à identificação de um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide com base em moléculas marcadoras de amilóide  $\beta$ 40 (A $\beta$ 40), amilóide  $\beta$ 42 (A $\beta$ 42) e Tau total (tTau), o uso das moléculas marcadoras para a identificação de um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide e um método para detectar um indivíduo com um valor aumentado para a combinação das moléculas marcadoras.



**“MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM INDIVÍDUO COMO POSSUINDO OU ESTANDO EM RISCO DE DESENVOLVER UMA DEMÊNCIA POSITIVA PARA AMILÓIDE E PARA DETECTAR UM INDIVÍDUO COM UM VALOR AUMENTADO PARA UMA COMBINAÇÃO DE MARCADORES E USO DE A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 E tTAU”**

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se à identificação de um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide com base em moléculas marcadoras amilóide  $\beta$ 40 (A $\beta$ 40), amilóide  $\beta$ 42 (A $\beta$ 42) e tau total (tTau), o uso das moléculas marcadoras para a identificação de um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide e um método para detectar um indivíduo com um valor aumentado para a combinação das moléculas marcadoras.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[002] A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica que de forma geral começa lentamente e piora com o tempo. É a causa de 60–70% dos casos de demência. O sintoma inicial mais comum é a dificuldade de se lembrar de eventos recentes (perda de memória de curto prazo). À medida que a doença avança, os sintomas podem incluir problemas de linguagem, desorientação (incluindo se perder facilmente), alterações de humor, perda de motivação, falta de autocuidado e problemas comportamentais. À medida que a condição de uma pessoa diminui, ela frequentemente se afasta da família e da sociedade. Gradualmente, as funções corporais são perdidas, levando à morte. Embora a velocidade de progressão possa variar, a expectativa de vida típica após o diagnóstico é de três a nove anos.

[003] A doença de Alzheimer é de forma geral diagnosticada com

base no histórico médico da pessoa, na história de parentes e em observações comportamentais. A presença de características neurológicas e características neuropsicológicas e a ausência de condições alternativas são favoráveis. Imagens médicas avançadas com tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (MRI) e com tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) ou tomografia por emissão de pósitrons (PET) podem ser usadas para ajudar a excluir outra patologia cerebral ou subtipos de demência. Além disso, pode prever a conversão de estágios prodrômicos (comprometimento cognitivo leve) para a doença de Alzheimer. A avaliação do funcionamento intelectual, incluindo testes de memória, pode caracterizar ainda mais o estado da doença. Organizações médicas criaram critérios diagnósticos para facilitar e padronizar o processo diagnóstico para os médicos em atividade. O diagnóstico pode ser confirmado post-mortem com altíssima precisão quando o material do cérebro está disponível e pode ser examinado histologicamente.

[004] A assinatura patológica mais antiga da doença de Alzheimer é a deposição das proteínas  $\beta$  amilóides, como A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 no cérebro e os únicos métodos validados para identificar as mesmas são imagens de tomografia por emissão de pósitrons (PET)  $\beta$  amilóide ou medição de  $\beta$  amilóide em líquido cefalorraquidiano.

[005] Também o teste de sangue foi sugerido na técnica a fim de identificar pacientes positivos para amilóide. A medição de biomarcadores de  $\beta$  amilóide plasmático de alto desempenho por imunoprecipitação acoplada com espectrometria de massa foi descrita, em que a proteína precursora de  $\beta$  amilóide (APP) 669-711/ A $\beta$ 42 e as razões A $\beta$ 40/ A $\beta$ 42 foram usadas para prever as proporções do estado positivo para  $\beta$  amilóide ou negativo para  $\beta$  amilóide cerebral individual de um paciente (Nakamura et al., 2018, Nature 554: 249-254).

[006] No entanto, os testes in vitro sugeridos atualmente não atendem aos padrões definidos pelo requerente. Particularmente, a alta sensibilidade pretendida (proporção de positivos reais que são corretamente identificados como tais) e alta especificidade (proporção de negativos reais que são identificados corretamente como tais) não são alcançadas.

[007] Consequentemente, ainda existe a necessidade de um método adequado para identificar um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amiloide. De preferência, os métodos devem ser baratos, robustos e fáceis.

#### **DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO**

[008] Surpreendentemente, os inventores descobriram que o uso de uma combinação das moléculas marcadoras amiloide  $\beta$ 40 ( $A\beta$ 40), amiloide  $\beta$ 42 ( $A\beta$ 42) e Tau total (tTau) aumentaram a qualidade da análise. Isso é particularmente verdadeiro, se um cálculo ponderado da quantidade ou concentração das moléculas marcadoras determinadas nas amostras de um indivíduo for usado. Diferentes populações foram utilizadas para determinar os fatores de pesagem dos modelos de regressão. Pode ser mostrado que dois modelos da combinação dos marcadores acima  $A\beta$ 40,  $A\beta$ 42 e tTau ( $v = a * [A\beta 40] + b * [A\beta 42] + c * [tTau] + d$  (modelo 1) e  $v = e * [A\beta 42] / [A\beta 40] + f * [tTau] + g$  (modelo 2)) foram superiores ao padrão estabelecido ( $[A\beta 42] / [A\beta 40]$ ) (ver Tabela de Resumo 5).

[009] Consequentemente, em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um método para identificar um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amiloide, o método compreendendo:

a) medir em uma amostra obtida do indivíduo a quantidade ou concentração das moléculas marcadoras amiloide  $\beta$ 40 ( $A\beta$ 40), amiloide  $\beta$ 42 ( $A\beta$ 42) e Tau total (tTau), e

b) identificar o indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide, comparando o valor combinado para os marcadores determinados na etapa (a) com um valor de controle, em que um valor combinado aumentado em relação ao valor de controle é indicativo da demência positiva para amilóide,

em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou uma amostra do fluido cefalorraquidiano.

[010] Demência é um termo geral para perda de memória e outras habilidades mentais graves o suficiente para interferir na vida diária. É causado por mudanças físicas no cérebro. Existem diferentes tipos de demência, como doença de Alzheimer, demência vascular, demência do corpo de Lewy ou demência do lobo frontotemporal. As demências podem ser divididas em dois grupos, demências positivas para amilóide e negativas para amilóide. As demências positivas para amilóide são caracterizadas por placas amilóides no cérebro, em que a doença de Alzheimer é a forma mais proeminente.

[011] A doença de Alzheimer foi identificada como uma doença de dobramento incorreto de proteínas (proteopatia), causada por placas de proteína  $\beta$  amilóide anormalmente dobrada e emaranhados de proteína tau no cérebro. As placas são constituídas por pequenos peptídeos, com 39 a 43 aminoácidos de comprimento, chamados de peptídeos  $\beta$  amilóides ( $A\beta$ ).  $A\beta$  refere-se a um grupo de fragmentos da proteína precursora  $\beta$  amilóide maior (APP), uma proteína transmembranar que penetra através da membrana do neurônio. A APP é crítica para o crescimento, sobrevivência e reparo pós-lesão dos neurônios. Na doença de Alzheimer, a gama secretase e a beta secretase atuam juntas em um processo proteolítico que faz com que a APP seja dividida em fragmentos menores. Um desses fragmentos dá origem a fibrilas de  $\beta$  amilóide, que então formam aglomerados que se depositam fora dos neurônios

em formações densas conhecidas como placas senis. Os emaranhados são causados pela agregação anormal da proteína tau, que de forma geral estabiliza os microtúbulos do citoesqueleto quando fosforilada. Na doença de Alzheimer, Tau torna-se hiperfosforilada e começa a se emparelhar com outros fios, criando emaranhados neurofibrilares e desintegrando o sistema de transporte do neurônio.

[012] Não se sabe exatamente como os distúrbios de produção e agregação do peptídeo  $\beta$  amilóide dão origem à patologia da doença de Alzheimer. A hipótese amilóide tradicionalmente aponta para o acúmulo de peptídeos  $\beta$  amilóide como o evento central desencadeador da degeneração neuronal. O acúmulo de fibrilas amilóides agregadas, que se acredita ser a forma tóxica da proteína responsável por interromper a homeostase do íon cálcio da célula, induz a morte celular programada (apoptose). Também é conhecido que  $A\beta$  se acumula de forma seletiva nas mitocôndrias nas células de cérebros afetados por Alzheimer e também inibe certas funções enzimáticas e a utilização de glicose pelos neurônios.

[013] O objetivo da presente invenção é fornecer um método para identificar com segurança um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide. Consequentemente, o indivíduo pode já apresentar sinais e sintomas de demência e o método pode ser usado para identificar a demência presente como positiva para amilóide ou negativa para amilóide. De forma alternativa, o indivíduo pode ainda não apresentar sinais e sintomas de demência. Neste caso, o método pode ser usado para identificar o indivíduo como estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide.

[014] A fim de identificar um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide, como doença de Alzheimer ou demência mista, uma amostra é obtida do indivíduo,

em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou uma amostra de líquido cefalorraquidiano. O indivíduo de acordo com a presente invenção pode ser qualquer animal humano ou não humano, particularmente um mamífero, especialmente um humano.

[015] Na presente invenção, é usada uma amostra obtida do indivíduo. A amostra pode ser qualquer amostra adequada para medir os marcadores de acordo com a presente invenção e refere-se a uma amostra biológica obtida para fins de avaliação in vitro. No entanto, a amostra não é uma amostra do cérebro ou de líquido cefalorraquidiano. Compreende material que pode ser de forma específica relacionado ao indivíduo e a partir do qual informações específicas sobre o indivíduo podem ser determinadas, calculadas ou inferidas. Uma amostra pode ser composta total ou parcialmente por material biológico do indivíduo. Uma amostra também pode ser material que entrou em contato com o indivíduo de uma forma que permite que testes sejam realizados na amostra que fornece informações sobre o indivíduo (por exemplo, cotonete). A amostra pode compreender de forma preferencial qualquer fluido corporal. De preferência, a amostra é facilmente acessível, para permitir testes baratos, robustos e fáceis. Amostras de teste exemplares incluem sangue, soro, plasma, urina e saliva. A amostra pode ser fluida ou sólida, por exemplo, uma amostra de sangue pode ser fluida ou pode ser uma mancha de sangue seco. A amostra pode ser retirada do indivíduo e usada imediatamente ou processada antes da etapa de medição a). O processamento pode incluir purificação (por exemplo, separação, como centrifugação), concentração, diluição, eluição (por exemplo, de material transportador sólido), lise de componentes celulares, congelamento, acidificação, conservação etc. As amostras altamente preferidas são sangue total, soro ou plasma, com plasma representando o tipo de amostra mais preferido.

[016] Como uma primeira etapa no método da invenção, a

quantidade ou concentração das moléculas marcadoras amilóide  $\beta$ 40 ( $A\beta$ 40), amilóide  $\beta$ 42 ( $A\beta$ 42) e Tau total (tTau) é medida na amostra.

[017] As duas aloformas mais abundantes do peptídeo  $\beta$  amilóide (encontradas em depósitos de amilóide no cérebro têm 40 e 42 aminoácidos de comprimento (designadas  $A\beta$ 40 e  $A\beta$ 42, respectivamente). Apesar da pequena diferença estrutural entre esses dois peptídeos, eles apresentam características clínicas, biológicas distintas, e comportamento biofísico.

[018]  $A\beta$ 40 e  $A\beta$ 42 humanos consistem nos aminoácidos 672-711 e 672-713, respectivamente, da proteína APP (ver banco de dados UniProtKB número de acesso: P05067). A diminuição estatisticamente significativa das concentrações de  $A\beta$ 42 no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DA foi confirmada em vários estudos. Uma diminuição de  $A\beta$ 42 no LCR também foi observada em pacientes com comprometimento cognitivo leve (MCI). Vários estudos mostraram que não há alteração no nível de  $A\beta$ 40 no LCR na DA. Outros relataram que um valor da razão de  $A\beta$  no LCR ( $A\beta$ 40/ $A\beta$ 42) fornece uma melhor discriminação entre pacientes com DA e controles ou outras demências. As duas proteínas também foram sugeridas como biomarcadores candidatos em amostras de plasma (Okereke et al., 2009, J Alzheimers Dis 16 (2): 277-285). Normalmente, a proporção das proteínas é usada na caracterização de Alzheimer (Spies et al, 2010, Curr Alzheimer Res 7 (5): 470-476) (Janelidze et al., 2016, Scientific Reports 6. Número do artigo: 26801; doi: 10.1038/ srep26801).

[019] As proteínas tau são proteínas que estabilizam os microtúbulos. Eles são abundantes em neurônios do sistema nervoso central e são menos comuns em outros lugares, mas também são expressos em níveis muito baixos em astrócitos e oligodendrócitos do SNC. Patologias e demências do sistema nervoso, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson,



estão associadas a proteínas tau que se tornaram defeituosas e não estabilizam mais os microtúbulos adequadamente. As proteínas tau são produtos de splicing alternativo de um único gene que em humanos é denominado MAPT (proteína associada a microtúbulos Tau) e está localizado no cromossomo 17. Até agora, seis isoformas de tau foram identificadas no tecido cerebral humano, e são distinguidas por seu número de domínios de ligação. Os detalhes sobre as isoformas de Tau são fornecidos em Hampel et al, 2010, Exp Gerontol 45: 30-44. Três isoformas têm três domínios de ligação e as outras três têm quatro domínios de ligação. As isoformas com quatro domínios de ligação são melhores na estabilização de microtúbulos do que aquelas com três domínios de ligação. As isoformas são um resultado de splicing alternativo nos exons 2, 3 e 10 do gene tau. Tau é uma fosfoproteína com 79 potenciais locais de fosforilação de Serina (Ser) e Treonina (Thr) na isoforma Tau mais longa. A fosforilação foi relatada em aproximadamente 30 desses locais em proteínas Tau normais. O grau de fosforilação em todas as seis isoformas diminui com a idade devido à ativação das fosfatases. A hiperfosforilação da proteína Tau (inclusões de Tau, pTau) pode resultar na automontagem de emaranhados de filamentos helicoidais emparelhados e filamentos retos, que estão envolvidos na patogênese da doença de Alzheimer, demência frontotemporal e outras tauopatias. Todas as seis isoformas tau estão presentes em um estado frequentemente hiperfosforilado em filamentos helicoidais emparelhados do cérebro com doença de Alzheimer. Quando mal dobrada, esta proteína muito solúvel pode formar agregados extremamente insolúveis que contribuem para uma série de doenças neurodegenerativas. As proteínas tau têm um efeito direto na degradação de uma célula viva causada por emaranhados que se formam e bloqueiam as sinapses nervosas. Emaranhados são aglomerados de proteínas Tau que se unem e bloqueiam os nutrientes essenciais que precisam ser distribuídos às células do cérebro,

causando a morte das células. Por conseguinte, Tau total (tTau), que se refere a todas as isoformas fosforiladas e não fosforiladas de tau e tau hiperfosforilada (p-Tau), bem como A $\beta$ 42 no líquido cefalorraquidiano, foram recomendados como biomarcadores no diagnóstico de Alzheimer, incluindo sua pré-demência e estágios pré-clínicos (Jack et al., 2011, Alzheimer's & Dementia 7: 257-262).

[020] De acordo com a presente invenção, a quantidade ou concentração dos marcadores é determinada de modo a identificar um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide. A quantidade de uma substância é uma quantidade definida por padrões que mede o tamanho de um conjunto de entidades elementares, como átomos, moléculas, elétrons e outras partículas. Às vezes é referido como quantidade química. O Sistema Internacional de Unidades (SI) define a quantidade de substância a ser proporcional ao número de entidades elementares presentes. A unidade SI para a quantidade de substância é o mol. Possui o símbolo de unidade mol. A concentração de uma substância é a quantidade de um constituinte dividido pelo volume total de uma mistura. Vários tipos de descrição matemática podem ser distinguidos: concentração de massa, concentração molar, concentração de número e concentração de volume. O termo concentração pode ser aplicado a qualquer tipo de mistura química, mas na maioria das vezes se refere a solutos e solventes em soluções. A concentração molar (quantidade) tem variantes, como concentração normal e concentração osmótica.

[021] Uma variedade de métodos para medir uma molécula de marcador (particularmente A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau) são conhecidos na técnica e qualquer um deles pode ser usado. Métodos exemplares são descritos nos Exemplos. De preferência, o (s) marcador (es) é/ são medidos de forma específica a partir de uma amostra de líquido pelo uso de um agente de ligação

específico.

[022] Um agente de ligação específico é, por exemplo, um anticorpo para o marcador ou um ácido nucleico complementar ao ácido nucleico relacionado à proteína marcadora (por exemplo, um ácido nucleico complementar ao mRNA de um marcador ou parte relevante do mesmo). De preferência, a (s) molécula (s) marcadora (s) é/ são medidas ao nível da proteína.

[023] A determinação de proteínas como parceiros de ligação de um polipeptídeo marcador pode ser realizada usando qualquer um de uma série de métodos conhecidos para identificar e obter proteínas que interagem de forma específica com proteínas ou polipeptídeos, por exemplo, um sistema de triagem de dois híbridos de levedura, tal como o descrito em Patente U.S. No. 5.283.173 e Patente U.S. No. 5.468.614, ou equivalente. Um agente de ligação específico tem de preferência pelo menos uma afinidade de  $10^7$  l/ mol para a sua molécula alvo correspondente. O agente de ligação específico tem de forma preferencial uma afinidade de  $10^8$  l/ mol ou ainda mais preferido de  $10^9$  l/ mol para a sua molécula alvo. Como o técnico no assunto apreciará, o termo específico é usado para indicar que outras biomoléculas presentes na amostra não se ligam significativamente ao agente de ligação específico para o marcador. De preferência, o nível de ligação a uma biomolécula diferente da molécula alvo resulta em uma afinidade de ligação que é apenas 10% ou menos, de forma mais preferencial apenas 5% ou menos da afinidade para a molécula alvo, respectivamente. Um agente de ligação específico preferido irá cumprir os critérios mínimos acima para afinidade, bem como para especificidade.

[024] Um agente de ligação específico é de forma preferencial um anticorpo reativo com qualquer um dos marcadores A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 ou tTau. O termo anticorpo refere-se a um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal,

fragmentos de ligação ao antígeno de tais anticorpos, anticorpos de cadeia simples, bem como a construções genéticas compreendendo o domínio de ligação de um anticorpo.

[025] O termo “anticorpos” inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, fragmentos dos mesmos, tais como F(ab')<sub>2</sub> e fragmentos Fab, bem como quaisquer parceiros de ligação de ocorrência natural ou produzidos de forma recombinante, que são moléculas que se ligam de forma específica a A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 ou polipeptídeo tTau. Qualquer fragmento de anticorpo que retenha os critérios acima de um agente de ligação específico pode ser usado. Os anticorpos são gerados por procedimentos do estado da técnica, por exemplo, conforme descrito em Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzima immunoassays, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1990), todo o livro, especialmente páginas 43-78). Além disso, o técnico no assunto está bem ciente dos métodos com base em imunossorventes que podem ser usados para o isolamento específico de anticorpos. Por estes meios, a qualidade dos anticorpos policlonais e, portanto, o seu desempenho em imunoensaios podem ser aumentados (Tijssen, P., supra, páginas 108-115).

[026] Para as realizações conforme divulgado na presente invenção, os anticorpos policlonais produzidos em, por exemplo, cabras podem ser usados. No entanto, claramente também podem ser usados anticorpos policlonais de diferentes espécies, por exemplo, ratos, coelhos ou porquinhos-da-índia, bem como anticorpos monoclonais. Uma vez que os anticorpos monoclonais podem ser produzidos em qualquer quantidade necessária com propriedades constantes, eles representam ferramentas ideais no desenvolvimento de um ensaio para a rotina clínica.

[027] Para a medição, a amostra obtida de um indivíduo é incubada com o agente de ligação específico para o marcador em questão sob

condições apropriadas para a formação de um complexo de marcador de agente de ligação. Tais condições não precisam ser especificadas, uma vez que o técnico no assunto sem qualquer esforço inventivo pode facilmente identificar tais condições de incubação apropriadas. A quantidade de complexo-marcador do agente de ligação é medida e usada nos métodos e utilizações da invenção. Como o técnico no assunto apreciará, existem numerosos métodos para medir a quantidade do complexo-marcador do agente de ligação específico, todos descritos em detalhes nos livros de texto relevantes (cf., por exemplo, Tijssen P., supra, ou Diamandis, EP e Christopoulos, TK (eds.), Immunoassay, Academic Pressão, Boston (1996)).

[028] Particularmente, os anticorpos monoclonais para os marcadores (A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau) são usados em imunoensaios quantitativos (a quantidade ou a concentração dos marcadores é determinada).

[029] De preferência, o marcador em questão é detectado em um formato de ensaio do tipo sanduíche. Em tal ensaio, um primeiro agente de ligação específico é usado para capturar o marcador em questão de um lado e um segundo agente de ligação específico (por exemplo, um segundo anticorpo), que é marcado para ser direta ou indiretamente detectável, é usado do outro lado. O segundo agente de ligação específico pode conter uma porção repórter detectável ou marcador, como uma enzima, corante, radionuclídeo, grupo luminescente, grupo fluorescente ou biotina ou semelhantes. Qualquer fração repórter ou marcador pode ser usado com os métodos divulgados neste documento, desde que o sinal de tal seja diretamente relacionado ou proporcional à quantidade de agente de ligação remanescente no suporte após a lavagem. A quantidade do segundo agente de ligação que permanece ligado ao suporte sólido é então determinada usando um método apropriado para a porção ou marcador repórter detectável específico. Para grupos radioativos, a contagem de cintilação ou métodos autoradiográficos são de forma geral

apropriados. Os conjugados de anticorpo-enzima podem ser preparados usando uma variedade de técnicas de acoplamento (para revisão ver, por exemplo, Scouten, W. H., *Methods in Enzymology* 135: 30-65, 1987). Métodos espectroscópicos podem ser usados para detectar corantes (incluindo, por exemplo, produtos colorimétricos de reações enzimáticas), grupos luminescentes e grupos fluorescentes. A biotina pode ser detectada usando avidina ou estreptavidina, acoplada a um grupo repórter diferente (comumente um grupo radioativo ou fluorescente ou uma enzima). Grupos repórter de enzima podem de forma geral ser detectados pela adição de substrato (de forma geral por um período de tempo específico), seguido por espectroscopia, espectrofotometria ou outra análise dos produtos de reação. Padrões e adições de padrões podem ser usados para determinar o nível de antígeno em uma amostra, usando técnicas bem conhecidas.

[030] Conforme descrito acima, há uma variedade de métodos para medir os níveis de A $\beta$ 40. Um ensaio para A $\beta$ 40 mede de forma específica A $\beta$ 40, mas não, por exemplo, A $\beta$ 42 ou A $\beta$ 43. A medição de A $\beta$ 40 é tipicamente com base na ligação específica para o terminal COOH da sequência A $\beta$  1-40. Produtos comercialmente disponíveis para medir A $\beta$ 40 incluem Amyloid beta 40 Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), imunoensaio Simoa™ A $\beta$ 40 (Quanterix Corporation, Lexington, MA, EUA) e Amyloid  $\beta$ 1-40 Assay Kit (Cisbo Assays, Codolet, França). No ensaio A $\beta$ 40 usado nos Exemplos, são usados os anticorpos monoclonais específicos 23C2 que se ligam aos aminoácidos 25-40 de A $\beta$ 40. De preferência, A $\beta$ 40 é medido usando a tecnologia Elesys® ECL em uma célula de medição Elesys® de acordo com as instruções do fabricante e conforme detalhado nos Exemplos.

[031] Também para a medição dos níveis de A $\beta$ 42, existe uma variedade de ensaios. Produtos comercialmente disponíveis para medir A $\beta$ 42 incluem Amyloid beta 42 Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, EUA), imunoensaio Simoa™ Aβ42 (Quanterix Corporation, Lexington, MA, EUA), INNOTEST® amyloid β (1-42) (Fujirebio, Gent, BE) e ensaio de CSF Elecsys® β-Amyloid (1-42) (Id.No. 06986811-190; Roche Diagnostics AG; CH). No ensaio Aβ42 da Roche Diagnostics, Alemanha, os anticorpos monoclonais específicos 21F12 e 3D6 são usados. De preferência, Aβ42 é medido usando a tecnologia Elecsys® ECL em uma célula de medição Elecsys® de acordo com as instruções do fabricante e conforme detalhado nos Exemplos.

[032] O nível de tTau pode ser determinado com qualquer método adequado. Produtos comercialmente disponíveis para medir tTau incluem Tau (Total) Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), imunoensaio Simoa™ Human Total Tau 2.0 (Quanterix Corporation, Lexington, MA, EUA), Total Tau ELISA Kit (humano) (Dinova GmbH, Hamburgo, DE) e ensaio Elecsys® Total-Tau CSF (Id.No. 07356994-190; Roche Diagnostics AG; CH). No ensaio tTau da Roche Diagnostics, Alemanha, os anticorpos monoclonais específicos 5.28.464, 4.35.411 e PC1C6 são usados. De preferência, tTau é medido usando a tecnologia Elecsys® ECL em uma célula de medição Elecsys® de acordo com as instruções do fabricante e conforme detalhado nos Exemplos.

[033] A etapa de medição do nível de um marcador pode ser realizada da seguinte forma: A amostra e, opcionalmente, o calibrador e/ ou controle podem ser colocados em contato com o agente de ligação (que pode ser imobilizado, por exemplo, em uma fase sólida) sob condições que permitem a ligação do agente ao marcador. Opcionalmente, os agentes de ligação não ligados podem ser removidos por uma etapa de separação (por exemplo, uma ou mais etapas de lavagem). Um segundo agente (por exemplo, um agente marcado) pode ser adicionado para detectar o agente de ligação ligado para permitir a ligação e a quantificação do mesmo. Opcionalmente, o segundo agente não ligado pode ser removido. A quantidade do segundo agente de

ligação que é proporcional à quantidade do marcador pode ser quantificada, por exemplo, com base no rótulo. A quantificação pode ser feita com base em, por exemplo, uma curva de calibração construída para cada ensaio traçando o valor medido versus a concentração para cada calibrador. A concentração ou quantidade de marcador na amostra pode ser lida a partir da curva de calibração.

[034] Como uma segunda etapa, o indivíduo é identificado como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide, comparando o valor combinado para os marcadores determinados na etapa (a) com um valor de controle, em que um valor combinado aumentado em relação ao valor controle é indicativo de demência positiva para amilóide. Após a quantidade ou concentração dos marcadores ser medida (etapa a), os valores da quantidade ou concentração das moléculas marcadoras medidas na etapa (a) são combinados para obter um valor combinado e o valor obtido é comparado a um valor de controle. Se o valor combinado para os marcadores determinados na etapa (a) for aumentado em relação ao valor de controle, o indivíduo é identificado como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide.

[035] “Combinado para obter um valor combinado” no contexto da presente invenção refere-se a um procedimento matemático. O valor combinado é calculado de acordo com uma operação matemática, de preferência uma operação aritmética usando a quantidade/ concentração de A $\beta$ 40, a quantidade/ concentração de A $\beta$ 42 e a quantidade/ concentração de tTau. O resultado da operação é um valor, ou seja, o valor combinado. O valor combinado é comparado com o valor combinado do controle, que foi obtido usando o mesmo procedimento matemático. Na invenção de forma geral a quantidade ou a concentração, de preferência a concentração, de todos os marcadores é usada a fim de obter o valor combinado para o indivíduo e o



controle. De preferência, o valor combinado é obtido pela adição dos valores obtidos para as concentrações dos marcadores. Em outra forma de realização preferida, o valor combinado é obtido por cálculo ponderado da quantidade ou concentração das moléculas marcadoras nas amostras. Isso significa que os marcadores recebem pesos diferentes no procedimento matemático.

[036] Por exemplo, uma análise de regressão logística pode ser realizada com um resultado binário “positivo para amilóide” e “negativo para amilóide” como a variável dependente e a combinação de A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau como as variáveis independentes. A precisão da classificação pode ser avaliada por área sob a curva ROC (Características operacionais do receptor - *Receiver-Operating Characteristic*) (AUC) e a sensibilidade e a especificidade podem ser calculadas (veja abaixo).

[037] O valor de controle pode ser obtido de diferentes maneiras e usando diferentes projetos de teste - como conhecido pelo técnico. É usado para dividir os resultados contínuos (aqui os valores combinados) em categorias. Na presente invenção, as categorias são positivas (indicando um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide) e negativas (indicando que um indivíduo não tem ou não está em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide), em que um valor acima do controle resulta na categorização “positiva”. Normalmente, um controle externo é usado (ou seja, uma ou mais amostras não obtidas do indivíduo testado).

[038] Em uma forma de realização da invenção, o valor de controle é estabelecido usando uma amostra de controle, que é obtida de um indivíduo ou de preferência de uma população de controle de indivíduos (também referida como população de referência) sabidamente livre de uma determinada condição, isto é (um) indivíduo negativo para amilóide, de forma preferencial sem demência. De forma alternativa, o valor de controle é definido

com base na análise de uma população de indivíduos sabidamente portadores de uma determinada condição (demência positiva para amiloide). Aqui, o valor de controle deve ser escolhido para ficar abaixo dos valores normalmente determinados para esta população. Finalmente, o valor de controle pode ser obtido avaliando uma população saudável (negativa para amiloide) e uma população doente (demência positiva para amiloide) e estabelecido um valor de corte a fim de categorizar um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amiloide ou como negativa para amiloide/ saudável. Está dentro das habilidades do médico escolher uma amostra/ população de controle apropriada e/ ou um valor de controle para os marcadores ali estabelecidos. Populações exemplares são fornecidas nos Exemplos.

[039] Será apreciado pelo técnico no assunto que os valores absolutos do marcador estabelecidos em um controle serão dependentes do ensaio utilizado. De preferência, amostras de 100 ou mais indivíduos bem caracterizados da população de controle/ referência apropriada são usadas para estabelecer um valor de controle. Também preferida, a população de controle/ referência pode ser escolhida para consistir em pelo menos 20, 30, 50, 200, 500 ou 1000 indivíduos. Indivíduos saudáveis representam uma população de referência preferida para estabelecer um valor de controle.

[040] De acordo com a presente invenção, um valor combinado aumentado é indicativo de uma demência positiva para amiloide futura ou presente. Se o valor for aumentado, a demência positiva para amiloide já está presente ou é provável que ocorra no futuro. O indivíduo assim identificado pode ser submetido a outros métodos diagnósticos ou terapêuticos, incluindo outros testes de sangue, testes de LCR, métodos de imagem como PET, estudos comportamentais ou administração de um medicamento. O profissional habilitado será capaz de selecionar os meios adequados de acordo com a

prática médica do país predominante.

[041] Em uma forma de realização, o valor é aumentado se o valor for de pelo menos 110%, de forma mais preferencial em pelo menos 120%, de forma mais preferencial em pelo menos 130%, de forma mais preferencial em pelo menos 140%, de forma mais preferencial em pelo menos 150%, de forma mais preferencial em pelo menos 160%, de forma mais preferencial em pelo menos 170%, de forma mais preferencial em pelo menos 180%, ainda de forma mais preferencial em pelo menos 190% em relação ao valor de controle.

[042] No presente caso, três marcadores, nomeadamente A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau, são usados nos métodos da invenção. Consequentemente, um valor combinado é calculado usando a quantidade/ concentração de A $\beta$ 40, a quantidade/ concentração de A $\beta$ 42 e a quantidade/ concentração de tTau. O valor combinado é comparado com o valor combinado do controle, que foi obtido usando o mesmo procedimento matemático.

[043] Em uma forma de realização preferida, o valor combinado é obtido por cálculo ponderado da quantidade ou concentração das moléculas marcadoras na amostra. Isso significa que cada um dos marcadores recebe um fator de pesagem individual que pode ser superior ou inferior ao dos outros.

[044] Em uma forma de realização mais preferida, o valor combinado  $v$  é obtido por cálculo ponderado com base no nível (quantidade ou concentração) de A $\beta$ 40 ([A $\beta$ 40]), o nível (quantidade ou concentração) de A $\beta$ 42 ([A $\beta$ 42]) e o nível (quantidade ou concentração) de tTau ([tTau]) de acordo com a equação:

$$v = a * [A\beta 40] + b * [A\beta 42] + c * [tTau] + d,$$

em que  $a$ ,  $b$  e  $c$  representam fatores de pesagem e  $d$  representa uma interceptação. A interceptação pode estar ausente. De preferência, os fatores de pesagem foram obtidos analisando uma população de referência.

Um procedimento adequado é descrito nos Exemplos.

[045] Em outra forma de realização preferida, o valor combinado  $v$  é obtido por cálculo ponderado com base no nível (quantidade ou concentração) de  $A\beta 40$  ( $[A\beta 40]$ ), o nível (quantidade ou concentração) de  $A\beta 42$  ( $[A\beta 42]$ ) e o nível (quantidade ou concentração) de  $t\tau$  ( $[t\tau]$ ) de acordo com a equação:

$$v = e * [A\beta 42] / [A\beta 40] + f * [t\tau] + g,$$

em que  $e$  e  $f$  representam os fatores de pesagem e  $g$  representa uma interceptação. A interceptação pode estar ausente. De preferência, os fatores de pesagem foram obtidos analisando uma população de referência. Um procedimento adequado é descrito nos Exemplos.

[046] Por exemplo, o valor combinado de  $A\beta 40$ ,  $A\beta 42$  e  $t\tau$  é determinado para cada amostra de um grupo de referência e, subsequentemente, a mediana ou um corte adequado dos valores combinados podem ser calculados como conhecido pelo técnico. Em (uma) população (ões) de referência adequada (s), pode-se calcular um modelo de regressão com uma medição de resultado adequada (por exemplo, demência positiva para amilóide) como uma variável dependente e usando  $A\beta 40$ ,  $A\beta 42$  e  $t\tau$  como variáveis independentes.

[047] Os coeficientes de regressão fornecidos pelo modelo de regressão para  $A\beta 40$ ,  $A\beta 42$  e  $t\tau$  podem então ser usados como fatores de pesagem i)  $a$ ,  $b$  e  $c$  ou ii)  $e$  e  $f$  e como interceptador i)  $d$  ou ii)  $g$ , respectivamente, a fim de calcular o valor combinado  $v$  para cada indivíduo na (s) população (ões). Nestes valores de  $v$  combinados o controle, por exemplo, um ponto de corte pode ser calculado, como a mediana de  $v$  na (s) população (ões).

[048] Indivíduos com valores de  $v$  acima do valor de controle ou corte seriam considerados como possuindo ou estando em risco de

desenvolver uma demência positiva para amilóide e indivíduos no controle ou abaixo do controle ou corte como não possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide.

[049] Os métodos estatísticos acima são apenas exemplos de métodos estatísticos para a identificação de indivíduos positivos para amilóide. O estatístico experiente conhecerá métodos adequados para analisar os dados predominantes e, em seguida, fornecer um valor de controle ou corte adequado.

[050] Consequentemente, em uma forma de realização preferida, o indivíduo é identificado como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide se o valor combinado para os marcadores estiver acima de um valor limite. Os valores para os marcadores A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau medidos em uma população de referência ou populações de referência são usados para estabelecer um valor de corte. Um valor acima desse valor de corte é considerado indicativo para um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide. Em uma forma de realização, um valor de corte fixo é ou foi estabelecido antes do teste do indivíduo. Esse valor de corte é escolhido para corresponder à questão diagnóstica de interesse. De preferência, o corte é a mediana das populações de referência compreendendo indivíduos positivos para amilóide e negativos para amilóide. Uma mediana adequada ou valor de corte pode ser escolhido dependendo de quantos indivíduos alguém deseja identificar como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide. Um número maior de indivíduos selecionados para “demência positiva para amilóide” diminui o risco de caracterizar falsamente um indivíduo doente ou de risco como saudável e, portanto, aumenta a sensibilidade (taxa de verdadeiro positivo). Por outro lado, aumenta o risco de caracterizar falsamente um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência

positiva para amilóide e, portanto, diminui a especificidade (taxa verdadeiramente negativa). Para um número menor de indivíduos selecionados, o mesmo é verdadeiro vice-versa. Para qualquer teste, de forma geral há uma compensação entre as medidas. Por exemplo, em um ambiente de segurança de aeroporto no qual se está testando possíveis ameaças à segurança, os scanners podem ser configurados para acionar itens de baixo risco, como fivelas de cintos e chaves (baixa especificidade), a fim de reduzir o risco de objetos perdidos que representam uma ameaça para a aeronave e as pessoas a bordo (alta sensibilidade). Esta compensação pode ser representada graficamente como uma curva característica de operação do receptor (veja abaixo). Um preditor perfeito seria descrito como 100% sensível (por exemplo, todos os doentes são identificados como doentes) e 100% específico (por exemplo, todos os saudáveis não são identificados como doentes); entretanto, teoricamente, qualquer preditor possuirá um limite de erro mínimo conhecido como taxa de erro de Bayes. O corte pode ser definido para aumentar a sensibilidade ou especificidade.

[051] Em estatística, uma característica de operação do receptor (ROC), ou curva ROC, é um gráfico que ilustra o desempenho de um sistema classificador binário conforme seu limite de discriminação é variado. A curva é criada traçando a taxa de verdadeiro positivo (TPR) contra a taxa de falso positivo (FPR) em várias configurações de limite. Conforme detalhado acima, a taxa de verdadeiro-positivo também é conhecida como sensibilidade ou índice de sensibilidade  $d'$ , conhecido como “*d-prime*” na detecção de sinal e informática biomédica, ou *recall* no aprendizado de máquina. A taxa de falsos positivos também é conhecida como caimento e pode ser calculada como  $(1 - \text{especificidade})$ . A curva ROC compara a sensibilidade versus especificidade em uma faixa de valores para a capacidade de prever um resultado dicotômico. A área sob a curva (AUC) apresenta a precisão geral para comparar o

desempenho do teste (Florkowski CM, 2008, Clin Biochem Rev 29 (Suppl 1): S83-S87). Sensibilidade é a capacidade de um teste para classificar corretamente um indivíduo como doente. A capacidade de um teste de classificar corretamente um indivíduo como livre de doença é chamada de especificidade (Fawcett T, 2006, Pattern Recognition Letters 27: 861-874).

[052] A análise ROC fornece ferramentas para selecionar modelos possivelmente ótimos e descartar os subótimos independentemente (e antes de especificar) o contexto de custo ou a distribuição de classes. A análise ROC está relacionada de forma direta e natural à análise custo/ benefício da tomada de decisão diagnóstica.

[053] Conforme detalhado acima, os fatores de pesagem podem ser obtidos analisando uma ou mais população (ões) de referência. Por conseguinte, em uma forma de realização preferida, os fatores de pesagem foram obtidos analisando uma ou mais populações de referência. De acordo com o acima, o valor de controle pode ter sido obtido de uma população de controle negativa para amilóide ou uma população de controle positivo para amilóide ou uma combinação das mesmas, isto é, uma população de controle negativo para amilóide e uma população de controle positivo para amilóide.

[054] Conforme detalhado acima, a demência relacionada à DA está associada a depósitos de beta amilóide no cérebro. A porcentagem de indivíduos que apresentam depósitos de beta amilóide e a área do cérebro afetada aumenta com a progressão da doença. Assim, existe uma parcela muito pequena de indivíduos positivos para amilóide que ainda não apresentam sintomas de DA, que são cognitivamente normais (NC) e que são considerados indivíduos de risco. O percentual aumenta para indivíduos com declínio cognitivo subjetivo (SCD) e comprometimento cognitivo leve (MCI). Finalmente, a DA é, por definição, caracterizada por placas amilóides e, portanto, uma demência positiva para amilóide. Pode ser parte de uma demência mista, por

exemplo, em combinação com demência vascular, demência de corpos de Lewy e/ ou demência do lobo frontotemporal. Consequentemente, em uma forma de realização preferencial, o indivíduo é cognitivamente normal (CN), possui um declínio cognitivo subjetivo (SCD), possui um comprometimento cognitivo leve (MCI) ou possui doença de Alzheimer (DA), opcionalmente DA combinado com outro tipo de demência (demência mista), particularmente misturada com demência vascular, demência de corpos de Lewy e/ ou demência do lobo frontotemporal.

[055] Conforme detalhado acima, uma amostra analisada na presente invenção pode ser qualquer amostra adequada para medir os marcadores de acordo com a presente invenção e não é uma amostra do cérebro ou uma amostra de fluido cerebrospinal. Normalmente, as amostras relacionadas com o sangue são amostras de teste preferidas para uso no contexto da presente invenção. Para isso, o sangue pode ser retirado de uma veia, de forma geral da parte interna do cotovelo ou dorso da mão. O sangue pode ser coletado, por exemplo, em uma pipeta, ou em uma lâmina ou tira de teste. Por conseguinte, em uma forma de realização preferida da presente invenção, a amostra obtida do indivíduo é uma amostra de sangue, particularmente selecionada a partir do grupo que consiste em soro, plasma e sangue total, especialmente plasma.

[056] Conforme detalhado acima, as moléculas marcadoras podem ser medidas por diferentes métodos e em diferentes níveis. De preferência, a (s) molécula (s) marcadora (s) é/ são medidas ao nível da proteína.

[057] Conforme detalhado acima, o indivíduo de acordo com a presente invenção pode ser qualquer animal humano ou não humano, particularmente um mamífero, especialmente um humano. Assim, os métodos e usos aqui descritos são aplicáveis a doenças humanas e veterinárias.



Evidentemente, mamíferos não humanos de interesse particular incluem animais domésticos, animais de estimação e animais de valor comercial (por exemplo, animais domésticos, como cavalos) ou valor pessoal (por exemplo, animais de estimação, como cães, gatos). O método é especialmente preferido com indivíduos humanos, para os quais métodos de diagnóstico são comumente empregados. Em uma forma de realização particularmente preferida, o indivíduo é, portanto, um humano.

[058] Após o indivíduo ter sido identificado como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amiloide, medidas adequadas podem ser recomendadas ou tomadas. O diagnóstico pode ser confirmado por um teste de licor ou uma análise de tomografia por emissão de pósitrons do cérebro (PET). Além disso, medidas para prevenir o aparecimento da demência, para prevenir o agravamento da demência ou para melhorar os sintomas da doença. Além disso, controles regulares ou monitoramento do estado do indivíduo ou outros testes de diagnóstico podem ser adequados. Os meios preventivos podem incluir a administração de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides, evitar a terapia de reposição hormonal na menopausa, mudança no estilo de vida (por exemplo, mais atividades intelectuais ou dieta adequada). Medicamentos para problemas cognitivos associados à DA incluem inibidores da acetilcolinesterase (como terrina, rivastigmina, galantamina e donepezila) e antagonistas do receptor NMDA (memantina). Os antipsicóticos atípicos são modestamente úteis na redução da agressão e da psicose em pessoas com doença de Alzheimer. Huperzine A também pode ser útil. As invenções psicossociais podem ser usadas sozinhas ou em combinação com outros tratamentos.

[059] Em um segundo aspecto, a presente invenção se refere ao uso de A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau como combinação de marcadores para a identificação de um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver

uma demência positiva para amilóide, em que a detecção de um valor combinado aumentado de combinação de marcadores em uma amostra obtida do indivíduo em comparação com o valor combinado conforme estabelecido em uma ou mais populações de referência (valor de controle) é indicativa de demência positiva para amilóide, em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou amostra de fluido cefalorraquidiano.

[060] O uso de acordo com o segundo aspecto pode ser ainda definido como especificado para o método do primeiro aspecto da presente invenção. Particularmente, no que diz respeito aos termos usados no segundo aspecto da presente invenção, refere-se aos termos, exemplos e formas de realização específicas usadas no primeiro aspecto da presente invenção, que também são aplicáveis ao segundo aspecto da presente invenção.

[061] Em um terceiro aspecto, a presente invenção se refere a um método para detectar um indivíduo com um valor aumentado para uma combinação de marcadores, o método compreendendo:

a) medir em uma amostra obtida do indivíduo a quantidade ou concentração das moléculas marcadoras A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau, e

b) detectar um valor combinado aumentado para os marcadores determinados na etapa (a) em relação ao valor combinado conforme estabelecido em uma ou mais populações de referência (valor de controle),

em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou uma amostra do fluido cefalorraquidiano.

[062] O método de acordo com o terceiro aspecto pode ser ainda definido como especificado para o método do primeiro aspecto da presente invenção. Particularmente, no que diz respeito aos termos usados no terceiro aspecto da presente invenção, refere-se aos termos, exemplos e formas de realização específicas usadas no primeiro aspecto da presente invenção, que também são aplicáveis ao terceiro aspecto da presente invenção.

[063] Em geral, a invenção não está limitada à metodologia, protocolos e reagentes específicos descritos neste documento, porque eles podem variar. Além disso, a terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever formas de realização particulares apenas e não se destina a limitar o escopo da presente invenção. Conforme usado neste documento e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o/a” incluem referência no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário. Da mesma forma, as palavras “compreender”, “conter” e “englobar” devem ser interpretadas inclusivamente em vez de exclusivamente.

[064] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos e quaisquer acrônimos usados neste documento têm os mesmos significados como comumente entendidos por alguém versado na técnica no campo da invenção. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos neste documento possam ser usados na prática, conforme apresentado neste documento, os métodos e materiais específicos são descritos neste documento.

[065] A invenção é ainda ilustrada pelas seguintes Figuras e exemplos, embora deva ser entendido que as Figuras e exemplos são incluídos apenas para fins de ilustração e não se destinam a limitar o escopo da invenção, a menos que de outra forma especificamente indicado.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[066] As Figuras 1 a 4 ilustram curvas ROC para 4 populações diferentes de indivíduos humanos.

[067] Figura 1: População 1: Cognitivo normal, doença neurológica e pacientes com diferentes tipos de demência, conforme definido no Exemplo 1.

[068] Figura 2: População 2: Cognitivos normais e pacientes com diferentes estágios da doença de Alzheimer, conforme definido no Exemplo 2.

[069] Figura 3: População 3: cognitivos normais e pacientes com comprometimento cognitivo leve, conforme definido no Exemplo 3.

[070] Figura 4: População 4: Cognitivos normais e pacientes com comprometimento cognitivo leve ou doença de Alzheimer leve, conforme definido no Exemplo 4.

### **EXEMPLOS**

#### **EXEMPLO 1: DESCRIÇÃO GERAL DOS ENSAIOS DE SANDUÍCHE ELECSYS®**

[071] O ensaio sanduíche Elecsys® é um ensaio imunológico realizado no sistema Elecsys®. É com base na formação do sanduíche anticorpo-antígeno-anticorpo e sua ligação às micropartículas revestidas com estreptavidina. Um primeiro e um segundo anticorpo monoclonal são usados para se ligar ao antígeno alvo de interesse ( $\beta$ 40, A $\beta$ 42 ou tTau) (tempo de incubação usado: 9 min). O primeiro anticorpo é biotilado e o segundo anticorpo é rutenilado, marcado com rutênio. Além disso, uma micropartícula revestida com estreptavidina está presente (usando a adição em uma segunda etapa de incubação com duração de 9 min). Após a ligação dos dois anticorpos ao antígeno alvo e a ligação da estreptavidina à biotina, um complexo que compreende:

micropartícula - 1º anticorpo - alvo - 2º anticorpo - rutênio

é formado, que pode ser imobilizado no dispositivo de detecção (por exemplo, pela aplicação de um campo magnético, quando a micropartícula é paramagnética), particularmente na superfície de um eletrodo usando a micropartícula, e que pode ser detectado em uma célula de medição com base em quimioluminescência usando o rótulo de rutênio.

### **1.1 ENSAIOS CSF**

#### **1.1.1 ENSAIO ELECSYS® TOTAL-TAU CSF**

[072] O ensaio Elecsys® Total-Tau CSF (Id.No. 07356994-190; Roche Diagnostics AG; CH) foi usado para a determinação de tTau em

amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR).

[073] 1ª incubação (9 minutos): 50 µL de amostra, dois anticorpos monoclonais biotinilados específicos para Tau (5.28.464 e 4.35.411; Roche Diagnostics AG; CH) e um anticorpo monoclonal específico para Tau (PC1C6; MAB3420; por exemplo, disponível na Merck KGaA, DE) marcado com um complexo de rutênio (Tris (2,2'-bipiridil) rutênio (II)-complexo; Ru (bpy)) foram co-incubados e formaram um complexo sanduíche compreendendo os dois anticorpos biotinilados, tTau e o anticorpo rutenilado.

[074] 2ª incubação (9 min): micropartículas revestidas com estreptavidina (esferas Elecsys®) foram adicionadas à mistura da primeira etapa de incubação e durante esta segunda incubação o complexo compreendendo os anticorpos biotinilados, tau e o anticorpo rutenilado tornou-se ligado à fase sólida via interação de biotina e estreptavidina.

[075] Medição: A mistura de reação foi aspirada para a célula de medição onde as micropartículas foram magneticamente capturadas na superfície do eletrodo. As substâncias não ligadas foram então removidas com ProCell/ ProCell M. A aplicação de uma voltagem ao eletrodo induz a emissão quimioluminescente que foi medida por um fotomultiplicador. Os resultados foram determinados por meio de uma curva de calibração que é um instrumento gerado de forma específica por calibração de 2 pontos e uma curva mestre fornecida por meio do código de barras do reagente ou e-código de barras.

#### **1.1.2 ENSAIO DE ELECSYS® β -AMYLOID (1-42) CSF**

[076] O ensaio Elecsys® β-Amyloid (1-42) CSF (Id.No. 06986811-190; Roche Diagnostics AG; CH) foi utilizado para a determinação de Aβ42 em amostras de líquido cefalorraquidiano.

[077] 1ª incubação (9 min): 50 µL de uma amostra, um anticorpo monoclonal biotinilado específico β-Amilóide (1-42) (21F12) e um anticorpo

monoclonal  $\beta$ -Amilóide específico (3D6) marcado com um complexo de rutênio foram co-incubados e formam um complexo sanduíche compreendendo o anticorpo biotinilado, A $\beta$ 42 e o anticorpo rutenilado.

[078] 2ª incubação (9 min): micropartículas revestidas com estreptavidina (esferas Elecsys®) foram adicionadas à mistura da primeira etapa de incubação e durante esta segunda incubação o complexo compreendendo o anticorpo biotinilado, A $\beta$ 42 e o anticorpo rutenilado tornou-se ligado à fase sólida via interação de biotina e estreptavidina.

[079] Medição: A mistura de reação foi aspirada para a célula de medição onde as micropartículas são capturadas magneticamente na superfície do eletrodo. As substâncias não ligadas foram então removidas com ProCell/ ProCell M. A aplicação de uma voltagem ao eletrodo induz a emissão quimioluminescente que foi medida por um fotomultiplicador. Os resultados foram determinados por meio de uma curva de calibração que é um instrumento gerado de forma específica por calibração de 2 pontos e uma curva mestre fornecida por meio do código de barras do reagente ou e-código de barras.

## **1.2. ENSAIOS DE PLASMA**

### **1.2.1 ENSAIO DE PLASMA ELECSYS® TOTAL-TAU**

[080] Para esta aplicação de plasma, foram usados os mesmos reagentes que para o ensaio de LCR (ver 1.1.1):

- R1 = líquido, reagente pronto para usar, que contém os anticorpos biotinilados;
- R2 = líquido, reagente pronto para usar, que contém o anticorpo marcado com Ru; e
- M = líquido, reagente pronto para usar, que contém as micropartículas revestidas com estreptavidina.

[081] Em comparação com o ensaio de CSF, apenas outros

calibradores e controles foram usados para superar as diferentes matrizes de amostra e os diferentes níveis de analito no plasma. Um antígeno tau sintetizado quimicamente (o mesmo que para o ensaio de CSF) foi adicionado a um tampão TRIS contendo proteína em concentrações de aprox. 0, 30, 100, 500 e 5000 µg/ ml. Esses calibradores foram congelados a -80 °C antes do uso.

[082] A 1ª incubação, a 2ª incubação e a medição foram realizadas conforme detalhado em 1.1.1, com a exceção de que os resultados foram determinados por meio de uma curva de calibração que é gerada por uma curva de calibração de 5 pontos.

#### **1.2.2 ENSAIO DE PLASMA ELECSYS® β-AMYLOID (1-42)**

[083] Para esta aplicação de plasma, foram usados os mesmos reagentes que para o ensaio CSF (ver 1.1.2):

- R1 = líquido, reagente pronto para uso, que contém o anticorpo biotinilado;
- R2 = líquido, reagente pronto para usar, que contém o anticorpo marcado com Ru; e
- M = líquido, reagente pronto para usar, que contém as micropartículas revestidas com estreptavidina.

[084] Em comparação com o ensaio de CSF, apenas outros calibradores e controles foram usados para superar as diferentes matrizes de amostra e os diferentes níveis de analito no plasma. O antígeno Aβ42 sintetizado quimicamente (o mesmo que para o ensaio de CSF) foi adicionado ao soro de cavalo em concentrações de aprox. 0, 20, 50, 250 e 1200 µg/ ml. Esses calibradores foram congelados a -80 °C antes do uso.

[085] A 1ª incubação, a 2ª incubação e a medição foram realizadas conforme detalhado em 1.1.2, com a exceção de que os resultados foram determinados por meio de uma curva de calibração que é gerada por

uma curva de calibração de 5 pontos.

### **1.2.3 ENSAIO DE PLASMA ELECSYS® $\beta$ -AMYLOID (1-40)**

[086] 1ª incubação (9 minutos): 50  $\mu$ L de amostra, um anticorpo monoclonal A $\beta$ 40 biotinilado específico (23C2) e um anticorpo monoclonal  $\beta$ -Amilóide específico (3D6) marcado com um complexo de rutênio foram co-incubados e formam um complexo sanduíche compreendendo o biotinilado anticorpo, A $\beta$ 40 e o anticorpo rutenilado.

[087] 2ª incubação (9 min): micropartículas revestidas com estreptavidina (esferas Elecsys®) foram adicionadas à mistura da primeira etapa de incubação e durante esta segunda incubação o complexo compreendendo o anticorpo biotinilado, A $\beta$ 40 e o anticorpo rutenilado tornou-se ligado à fase sólida via interação de biotina e estreptavidina.

[088] Medição: A mistura de reação foi aspirada para a célula de medição onde as micropartículas foram magneticamente capturadas na superfície do eletrodo. As substâncias não ligadas foram então removidas com ProCell/ ProCell M. A aplicação de uma voltagem ao eletrodo induziu então a emissão quimioluminescente que foi medida por um fotomultiplicador. Os resultados foram determinados por meio de uma curva de calibração que é gerada por uma curva de calibração de 5 pontos.

### **CALIBRADORES E CONTROLES**

[089] Solução salina tamponada com fosfato contendo 0,4 g/ L de BSA foi enriquecida com um antígeno A $\beta$ -40 quimicamente sintetizado, que continha anticorpos que reconhecem os epítomos 1-12 e 25-40. Os seguintes níveis de A $\beta$ 40 foram produzidos: 0, 250, 500, 2500 e 10.000  $\mu$ g/ ml.

### **EXEMPLO 2: AMOSTRA COLETIVA**

[090] Uma grande amostra coletiva que consiste em pacientes com Doença de Alzheimer (DA), outras demências como demência frontotemporal, etc., Deficiência Cognitiva Leve (MCI), doenças neurológicas e



também cognitivos normais foram coletados prospectivamente alguns anos atrás. De todos os pacientes, o licor e também o plasma EDTA foram coletados em paralelo no mesmo ponto de tempo. Uma vez que nenhuma imagem PET estava disponível para a determinação do estado de positivo ou negativo para amiloide  $\beta$  do cérebro, medimos as amostras de LCR com os imunoenaios  $\beta$ -Amiloide (1-42) e tTAU da Roche Diagnostics.

[091] Usamos a razão tTAU/ A $\beta$ 42 no LCR com valor de corte de 0,28 como referência para classificar as amostras em positivas para amiloide (> 0,28) e negativas para amiloide (<0,28). Esta proporção mostrou uma alta concordância com a leitura visual de PET amiloide com uma AUC de 94% (consulte a folha de métodos do ensaio tTAU Id. No. 07356994 190; Roche Diagnostics AG, CH).

[092] As seguintes amostras de pacientes foram medidas:

Diagnóstico clínico	- para amiloide	+ para amiloide
DA (MMSE > 22)	20 (19,6%)	82 (80,4%)
DA (MMSE 14-22)	9 (6,9%)	121 (93,1%)
CN (cognitivo normal)	31 (86,1%)	5 (13,9%)
MCI (comprometimento cognitivo leve)	66 (58,4%)	47 (41,6%)
FTD (demência do lobo frontotemporal)	13 (39,4%)	20 (60,6%)
Demência de corpo de Lewy	0 (0%)	1 (100%)
Demência mista	12 (23,1%)	40 (76,9%)
Demência vascular	15 (31,9%)	32 (68,1%)
Doença neurológica	84 (77,1%)	25 (22,9%)
Total	250	373

[093] Para a definição de positivo/ negativo para amiloide, usamos a razão tTau/ A $\beta$ 42 no LCR com valor de corte de 0,28 como referência para classificar as amostras em + para amiloide (> 0,28) e - para amiloide (<0,28).

### **EXEMPLO 3: ANÁLISE DE DADOS**

[094] O poder preditivo foi comparado usando diferentes modelos. O “modelo” mais básico é a proporção de dois ou mais biomarcadores (dividindo o valor de um biomarcador pelo valor do outro).

Para permitir relações não lineares entre dois ou mais marcadores, introduzimos modelos de regressão logística com diferentes combinações de marcadores. De forma mais específica, comparamos as seguintes proporções e modelos:

- Razão Ab42/ Ab40 (referência);
- Razão tTau/ Ab42;
- Ab42/ Ab40 (razão) + tTau (modelo 2; cálculo ponderado); e
- Ab42 + Ab40 + tTau (modelo 1; cálculo ponderado).

[095] A regressão logística (ou regressão logit) é um método estatístico para estimar um modelo que descreve uma variável dependente binária. O *log-odds* da probabilidade de um evento é uma combinação linear das variáveis preditoras. A resposta estimada é a probabilidade de uma resposta binária (aqui +/- para amilóide) com base em variáveis preditoras (aqui: os biomarcadores). Ele pode ser usado como um classificador para prever classes de novas amostras com base em seus níveis de variáveis independentes.

[096] O modelo pode ser interpretado da seguinte forma:

$$\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$$

com p sendo a probabilidade de ser + para amilóide, sendo os biomarcadores preditivos (Ab42 plasmático, Ab40 plasmático, tTau plasmático ou proporções plasmáticas) e sendo os coeficientes (também chamados de fator de pesagem).

[097] Então,

$$\text{probabilidades} = \frac{p}{1-p} = \frac{\text{probabilidade (+para amilóide)}}{\text{probabilidade (- para amilóide)}}$$

e

$$\text{logit}(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right).$$

[098] Para a análise envolvendo todos os três biomarcadores Ab42, Ab40 e tTau, os fatores de pesagem (a a e) foram calculados usando

as seguintes equações:

$$v = a * [A\beta 40] + b * [A\beta 42] + c * [tTau] + d \text{ (modelo 1)}$$

$$v = e * [A\beta 42] / [A\beta 40] + f * [tTau] + g \text{ (modelo 2)}$$

[099] Além disso, as curvas de características de operação do receptor (ROC) foram estabelecidas traçando a taxa de verdadeiro positivo contra a taxa de falso positivo (consulte as Figuras 1 a 4). A taxa de verdadeiro positivo também é conhecida como sensibilidade. A taxa de falso-positivo também é conhecida como queda ou probabilidade de falso alarme e pode ser calculada como (1 - especificidade). A área sob a curva (AUC) foi determinada para caracterizar o teste.

#### **EXEMPLO 4: RESULTADOS**

##### **1. POPULAÇÃO 1: TODOS OS PACIENTES AVALIADOS: COGNITIVOS NORMAIS, DOENÇAS NEUROLÓGICAS E PACIENTES COM DIFERENTES TIPOS DE DEMÊNCIA**

[0100] Uma população de 623 humanos (373 positivos para amiloide e 250 negativos para amiloide), que foi composta conforme indicado na Tabela 1a a seguir, foi usada em uma primeira análise de dados:

<b><u>TABELA 1A</u></b>	CSF: - para amiloide	CSF: + para amiloide
Diagnóstico		
Total (não NA)	250	373
DA (MMSE>22)	20 (19,6%)	82 (80,4%)
DA (MMSE22-14)	9 (6,9%)	121 (93,1%)
Cognitivo normal	31 (86,1%)	5 (13,9%)
Demência do lobo frontotemporal	13 (39,4%)	20 (60,6%)
Demência de corpo de Lewy	0 (0%)	1 (100%)
Comprometimento cognitivo leve	66 (58,4%)	47 (41,6%)
Demência mista	12 (23,1%)	40 (76,9%)
Doença neurológica	84 (77,1%)	25 (22,9%)
Demência vascular	15 (31,9%)	32 (68,1%)

[0101] A população inclui cognitivos normais (não-NA), bem como pacientes com diferentes tipos de demência, conforme indicado acima. Os resultados da análise estão resumidos na seguinte Tabela 1b:

<b><u>TABELA 1B</u></b>	Modelo 1: Ab42 + Ab40 + tTau	Modelo 2: Ab42/ Ab40 + tTau
(Interceptar)	0,97* (0,46)	1,80** (0,68)
C (TAU_Elecsys_PLASMA)	0,11*** (0,02)	0,09*** (0,02)
b (AB42_Elecsys_PLASMA)	-0,25*** (0,03)	
a (AB40_Elecsys_PLASMA)	11,04*** (1,91)	
d (AB42_AB40_Elecsys_PLASMA)		-43,19*** (8,80)

\*\*\* p <0,001, \*\* p <0,01, \* p <0,05.

[0102] Assim, o modelo 1 (Ab42 + Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 0,97 + 0,11 * [t\text{Tau}] - 0,25 * [A\beta 42] + 11,04 * [A\beta 40];$$

e o modelo 2 (Ab42/ Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 1,80 + 0,09 * [t\text{Tau}] - 43,19 * [A\beta 42]/ [A\beta 40].$$

[0103] A qualidade da análise para as quatro combinações de marcadores diferentes pode ser caracterizada pela sensibilidade e especificidade, conforme mostrado na Figura 1 e especificado na Tabela 1c:

<b><u>TABELA 1C</u></b>	AUC	Especificidade	
		Sensibilidade = 0,8	Sensibilidade = 0.85
Ab42/Ab40	0,73	0,50	0.41
tTau/Ab42	0,73	0,56	0.48
Ab42/Ab40 + tTau	0,73	0,55	0.43
Ab42 + Ab40 + tTau	0,79	0,71	0.60

[0104] Evidentemente, a combinação padrão de marcadores usada atualmente (Ab42/ Ab40) pode ser melhorada. As combinações de marcadores de Aβ42, Aβ40 e tTau são superiores à combinação padrão, com o modelo 1 apresentando os melhores resultados.

## **2. POPULAÇÃO 2: COGNITIVOS NORMAIS E PACIENTES COM DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA DE ALZHEIMER**

[0105] Uma população de 381 humanos, que foi composta conforme indicado na Tabela 2a a seguir, foi usada em uma segunda análise de dados:

<b>TABELA 2A</b>	CSF: - para amiloide	CSF: + para amiloide
Diagnóstico		
Total	126	255
DA (MMSE>22)	20 (19,6%)	82 (80,4%)
DA (MMSE22-14)	9 (6,9%)	121 (93,1%)
Cognitivo normal	31 (86,1%)	5 (13,9%)
Comprometimento cognitivo leve	66 (58,4%)	47 (41,6%)

[0106] A população inclui cognitivos normais, bem como com diferentes estágios da doença de Alzheimer, mas exclui outras formas de demência e doenças neurológicas. Os resultados da análise estão resumidos na seguinte Tabela 2b:

<b>TABELA 2B</b>	Modelo 1: Ab42 + Ab40 + tTau	Modelo 2: Ab42/Ab40 + tTau
(Interceptar)	2,33*** (0,69)	3,70*** (0,99)
TAU_Elecsys_PLASMA	0,13*** (0,03)	0,09** (0,03)
AB42_Elecsys_PLASMA	-0,39*** (0,05)	
AB40_Elecsys_PLASMA	16,95*** (2,96)	
AB42_AB40_Elecsys_PLASMA		66,44*** (13,44)

\*\*\* p <0,001, \*\* p <0,01, \* p <0,05.

[0107] Assim, o modelo 1 (Ab42 + Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 2,33 + 0,13 * [\text{tTau}] - 0,39 * [\text{A}\beta 42] + 16,95 * [\text{A}\beta 40];$$

e o modelo 2 (Ab42/ Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 3,70 + 0,09 * [\text{tTau}] + 66,44 * [\text{A}\beta 42]/ [\text{A}\beta 40].$$

[0108] A qualidade da análise para as quatro combinações de marcadores diferentes pode ser caracterizada pela sensibilidade e especificidade, conforme mostrado na Figura 2 e especificado na Tabela 2c:

<b>TABELA 2C</b>	AUC	Especificidade	
		Sensibilidade = 0,8	Sensibilidade = 0,85
Ab42/Ab40	0,75	0,58	0,49
tTau/Ab42	0,74	0,57	0,51
Ab42/Ab40 + tTau	0,75	0,61	0,53
Ab42 + Ab40 + tTau	0,82	0,73	0,68

[0109] Evidentemente, a combinação padrão de marcadores usada atualmente (Ab42/ Ab40) pode ser melhorada. As combinações de marcadores de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 e tTau são superiores à combinação padrão, com o

modelo 1 apresentando os melhores resultados. Presume-se que a análise de uma população excluindo pacientes com outras demências pode levar a melhores resultados, pois na população 1 os pacientes com demência podem ter sido alocados em grupos de falsa demência no diagnóstico de demência. Essa suposição é com base no fato de que as amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes que sofrem de demências negativas para amiloide foram consideradas positivas para amiloide (ver Tabela 1a).

### **3. POPULAÇÃO 3: COGNITIVOS NORMAIS E PACIENTES COM PROBLEMAS**

#### **COGNITIVOS LEVES**

[0110] Uma população de 151 humanos, que foi composta conforme indicado na Tabela 3a a seguir, foi usada em uma terceira análise de dados:

<b><u>TABELA 3A</u></b>	CSF: - para amiloide	CSF: + para amiloide
Diagnóstico		
Total	97	52
Cognitivo normal	31 (86,1%)	5 (13,9%)
Comprometimento cognitivo leve	66 (58,4%)	47 (41,6%)

[0111] A população inclui cognitivos normais, bem como pacientes com comprometimento cognitivo leve, conforme indicado acima. Os resultados da análise estão resumidos na seguinte Tabela 3b:

<b><u>TABELA 3B</u></b>	Modelo 1: Ab42 + Ab40 + tTau	Modelo 2: Ab42/Ab40 + tTau
(Interceptar)	2,69** (1,03)	4,50** (1,67)
TAU_Elecsys_PLASMA	0,03 (0,04)	-0,00 (0,04)
AB42_Elecsys_PLASMA	-0,38*** (0,08)	
AB40_Elecsys_PLASMA	16,28*** (4,17)	
AB42_AB40_Elecsys_PLASMA		76,09*** (22,13)

\*\*\* p < 0,001, \*\* p < 0,01, \* p < 0,05.

[0112] Assim, o modelo 1 (Ab42 + Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 2,69 + 0,03 * [\text{tTau}] - 0,38 * [\text{A}\beta 42] + 16,28 * [\text{A}\beta 40];$$

e o modelo 2 (Ab42/ Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 4,50 + 0 * [\text{tTau}] + 76,09 * [\text{A}\beta 42] / [\text{A}\beta 40].$$

[0113] A qualidade da análise para as quatro combinações de marcadores diferentes pode ser caracterizada pela sensibilidade e especificidade, conforme mostrado na Figura 3 e especificado na Tabela 3c:

<b><u>TABELA 3c</u></b>	AUC	Especificidade	
		Sensibilidade = 0,8	Sensibilidade = 0,85
Ab42/Ab40	0,70	0,41	0,25
tTau/Ab42	0,65	0,43	0,32
Ab42/Ab40 + tTau	0,70	0,41	0,26
Ab42 + Ab40 + tTau	0,81	0,73	0,67

[0114] Evidentemente, a combinação padrão de marcadores usada atualmente (Ab42/ Ab40) pode ser melhorada. As combinações de marcadores de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 e tTau são superiores à combinação padrão, com o modelo 1 apresentando os melhores resultados. A população 3 é de interesse diagnóstico particular na detecção de MCI como um estágio muito inicial da doença de Alzheimer.

#### **4. POPULAÇÃO 4: COGNITIVOS NORMAIS E PACIENTES COM DOENÇA COGNITIVA LEVE OU DOENÇA DE ALZHEIMER LEVE**

[0115] Uma população de 251 humanos, que foi composta conforme indicado na Tabela 4a a seguir, foi usada em uma quarta análise de dados:

<b><u>TABELA 4A</u></b>	CSF: - para amiloide	CSF: + para amiloide
Diagnóstico		
Total	117	134
DA (MMSE>22)	20 (19,6%)	82 (80,4%)
Cognitivo normal	31 (86,1%)	5 (13,9%)
Comprometimento cognitivo leve	66 (58,4%)	47 (41,6%)

[0116] A população inclui cognitivos normais (não-NA), bem como pacientes com comprometimento cognitivo leve ou doença de Alzheimer leve, como indicado acima. Os resultados da análise estão resumidos na seguinte Tabela 4b:

<b><u>TABELA 4B</u></b>	Modelo 1: Ab42 + Ab40 + tTau	Modelo 2: Ab42/Ab40 + tTau
(Interceptar)	3,00*** (0,84)	5,13*** (1,24)
TAU_Elecsys_PLASMA	0,06 (0,04)	0,04 (0,03)
AB42_Elecsys_PLASMA	-0,46*** (0,07)	
AB40_Elecsys_PLASMA	20,90*** (3,62)	
AB42_AB40_Elecsys_PLASMA		85,46*** (16,89)

\*\*\* p <0,001, \*\* p <0,01, \* p <0,05.

[0117] Assim, o modelo 1 (Ab42 + Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 3,00 + 0,06 * [t\text{Tau}] - 0,46 * [A\beta 42] + 20,90 * [A\beta 40];$$

e o modelo 2 (Ab42/ Ab40 + tTau) pode ser escrito como:

$$\text{logit}(p) = 5,13 + 0,04 * [t\text{Tau}] + 85,46 * [A\beta 42]/ [A\beta 40].$$

[0118] A qualidade da análise para as quatro combinações de marcadores diferentes pode ser caracterizada pela sensibilidade e especificidade, conforme mostrado na Figura 4 e especificado na Tabela 4c:

<b><u>TABELA 4C</u></b>	AUC	Especificidade	
		Sensibilidade = 0,8	Sensibilidade = 0,85
Ab42/Ab40	0,76	0,55	0,46
tTau/Ab42	0,71	0,52	0,41
Ab42/Ab40 + tTau	0,76	0,58	0,50
Ab42 + Ab40 + tTau	0,84	0,76	0,74

[0119] Evidentemente, a combinação padrão de marcadores usada atualmente (Ab42/ Ab40) pode ser melhorada. As combinações de marcadores de A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 e tTau são superiores à combinação padrão, com o modelo 1 apresentando os melhores resultados. A população 4 é de interesse diagnóstico particular na detecção de estágios iniciais de DA, incluindo MCI.

[0120] 5. Tabela Resumo:

<b><u>TABELA 5</u></b>	AUC	Sensibilidade	Especificidade
<u>População 1: DA versus controles (todos)</u>			
A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,73	80 %	50 %
Tau/A $\beta$ 42	0,73	80 %	56 %
tTau + A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,73	80 %	55 %
tTau + A $\beta$ 42 + A $\beta$ 40	0,79	80 %	71 %



<u>População 2: DA versus controle (sem demência)</u>			
A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,75	80 %	58 %
Tau/A $\beta$ 42	0,74	80 %	57 %
tTau + A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,75	80 %	61 %
Modelo Tau + A $\beta$ 42 + A $\beta$ 40	0,82	80 %	73 %
<u>População 3: MCI versus controle</u>			
A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,70	80 %	41 %
Tau/A $\beta$ 42	0,65	80 %	43 %
tTau + A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,70	80 %	41 %
Modelo Tau + A $\beta$ 42 + A $\beta$ 40	0,81	80 %	73 %
<u>População 4: MCI/ DA leve versus controle</u>			
A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,76	80 %	55 %
Tau/A $\beta$ 42	0,71	80 %	52 %
tTau + A $\beta$ 42/A $\beta$ 40	0,76	80 %	58 %
Modelo Tau + A $\beta$ 42 + A $\beta$ 40	0,84	80 %	76 %

### REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA IDENTIFICAR UM INDIVÍDUO COMO POSSUINDO OU ESTANDO EM RISCO DE DESENVOLVER UMA DEMÊNCIA POSITIVA PARA AMILÓIDE, o método caracterizado por compreender:

a) medir em uma amostra obtida do indivíduo a quantidade ou concentração das moléculas marcadoras amilóide  $\beta$ 40 ( $A\beta$ 40), amilóide  $\beta$ 42 ( $A\beta$ 42) e Tau total (tTau), e

b) identificar um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide, comparando o valor combinado para os marcadores determinados na etapa (a) com um valor de controle, em que um valor combinado aumentado em relação ao valor de controle é indicativo da demência positiva para amilóide,

em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou uma amostra do fluido cefalorraquidiano.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo valor combinado ser obtido por cálculo ponderado da quantidade ou concentração das moléculas marcadoras nas amostras.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo valor combinado  $v$  ser obtido por cálculo ponderado com base no nível (quantidade ou concentração) de  $A\beta$ 40 ( $[A\beta$ 40]), o nível (quantidade ou concentração) de  $A\beta$ 42 ( $[A\beta$ 42]) e o nível (quantidade ou concentração) de tTau ( $[tTau]$ ) de acordo com a equação:

$$v = a * [A\beta 40] + b * [A\beta 42] + c * [tTau] + d$$

em que  $a$ ,  $b$  e  $c$  representam os fatores de pesagem e  $d$  representa a interceptação.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo indivíduo ser identificado como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide se o valor

combinado para os marcadores estiver acima de um valor de corte.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 3, caracterizado pelos fatores de pesagem serem obtidos através da análise de uma ou mais populações de referência.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo valor de controle ter sido obtido a partir de uma população de controle negativo para amiloide ou uma população de controle positivo para amiloide ou uma combinação dos mesmos.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo indivíduo ser cognitivamente normal (CN), possui um declínio cognitivo subjetivo (SCD), possui um comprometimento cognitivo leve (MCI) ou possui doença de Alzheimer (DA), opcionalmente DA combinado com outro tipo de demência (demência mista), particularmente misturada com demência vascular, demência de corpos de Lewy e/ ou demência do lobo frontotemporal.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pela amostra ser uma amostra de sangue, particularmente selecionada a partir do grupo que consiste em soro, plasma e sangue total, especialmente plasma.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelas moléculas marcadoras serem medidas no nível da proteína.

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo indivíduo ser um humano.

11. USO DE A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 E tTAU, caracterizado por ser como combinação de marcadores para a identificação de um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amiloide, em que a detecção de um valor combinado aumentado da combinação de marcadores

em uma amostra obtida do indivíduo em comparação com o valor combinado conforme estabelecido em uma população de referência (valor de controle) é indicativo de demência positiva para amiloide, em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou uma amostra de líquido cefalorraquidiano.

12. USO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo uso ser ainda definido conforme especificado em qualquer uma das reivindicações 2 a 10.

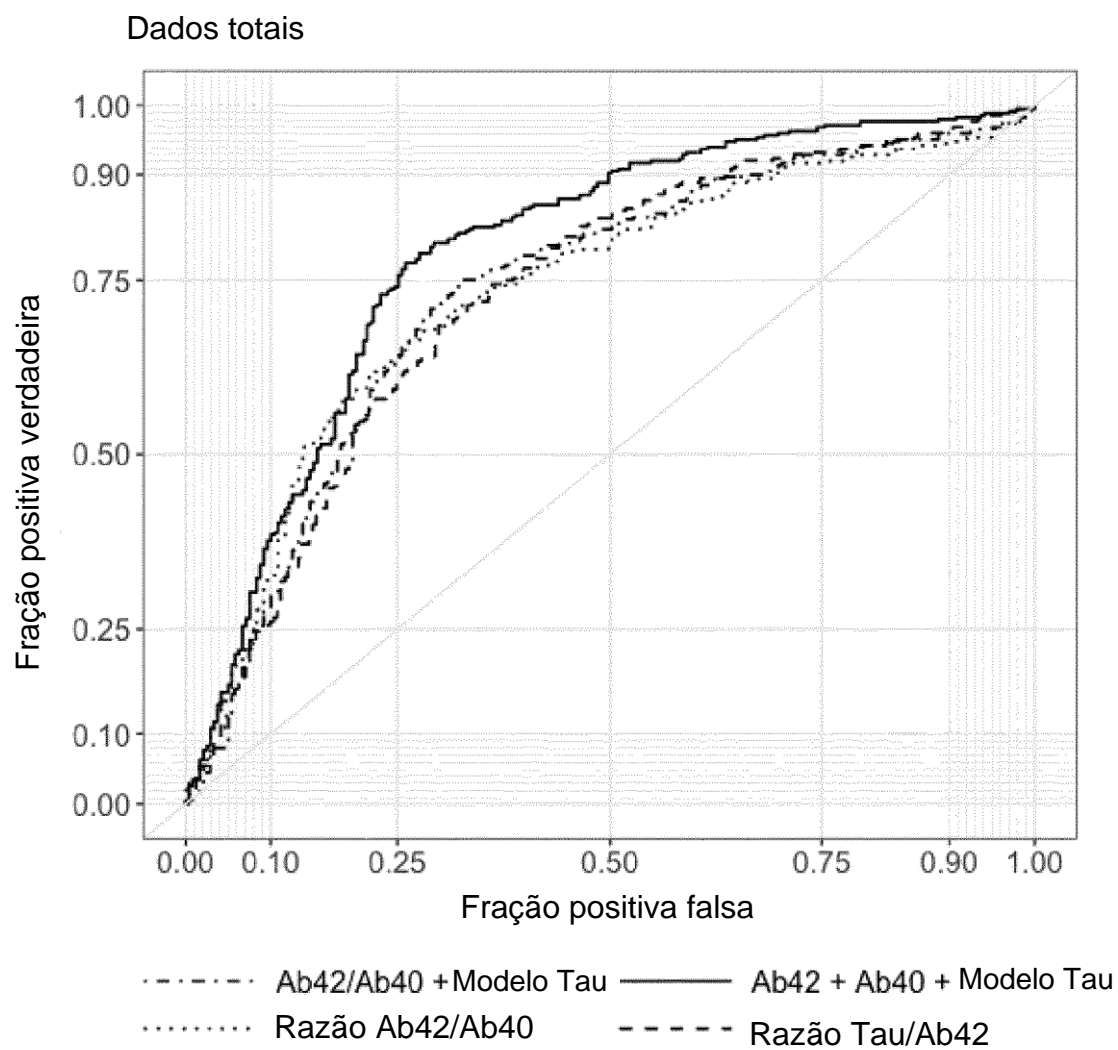
13. MÉTODO PARA DETECTAR UM INDIVÍDUO COM UM VALOR AUMENTADO PARA UMA COMBINAÇÃO DE MARCADORES, o método caracterizado por compreender:

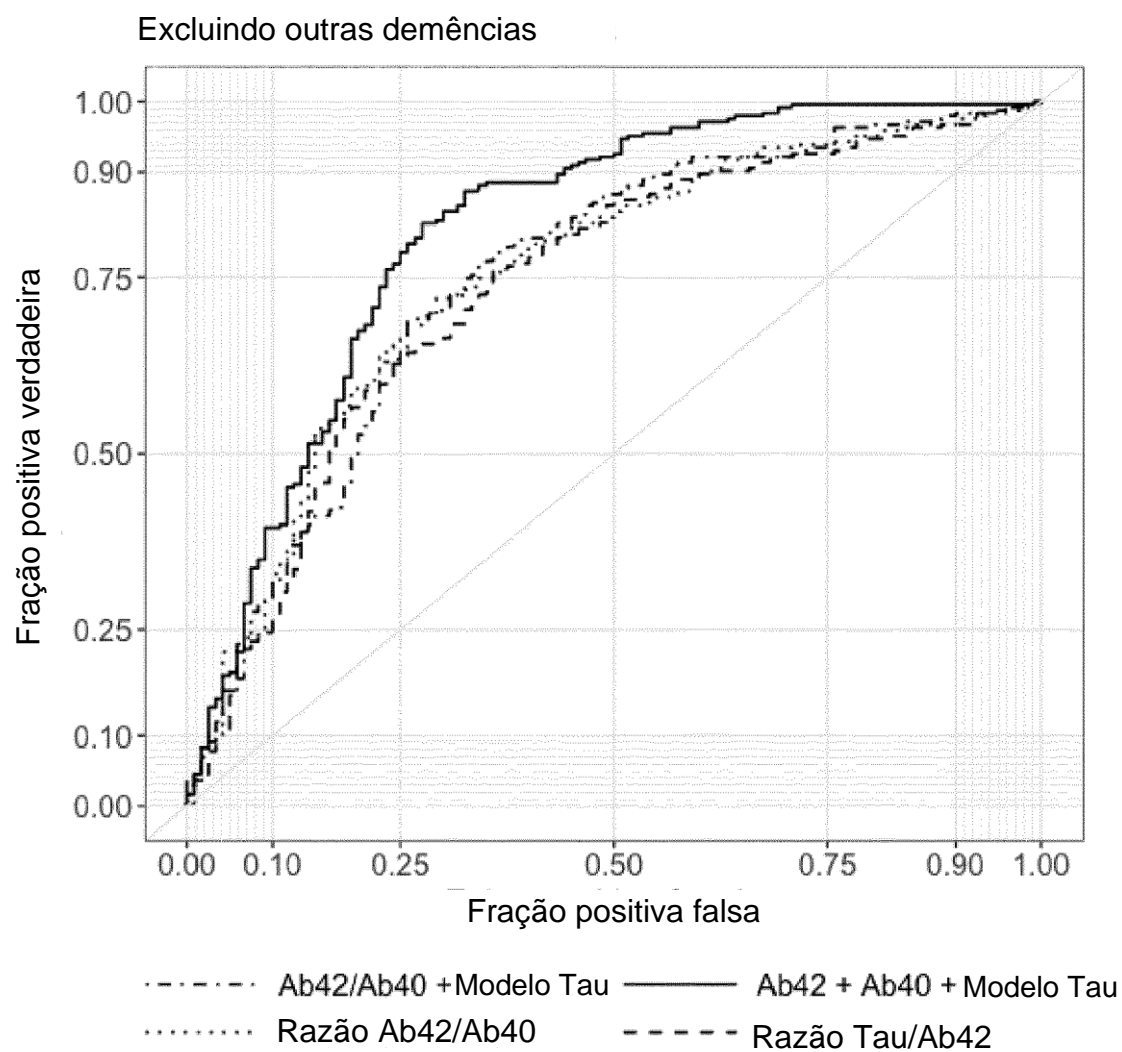
a) medir em uma amostra obtida do indivíduo a quantidade ou concentração das moléculas marcadoras A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 e tTau, e

b) detectar um valor combinado aumentado para os marcadores determinados na etapa (a) em relação ao valor combinado conforme estabelecido em uma ou mais populações de referência (valor de controle),

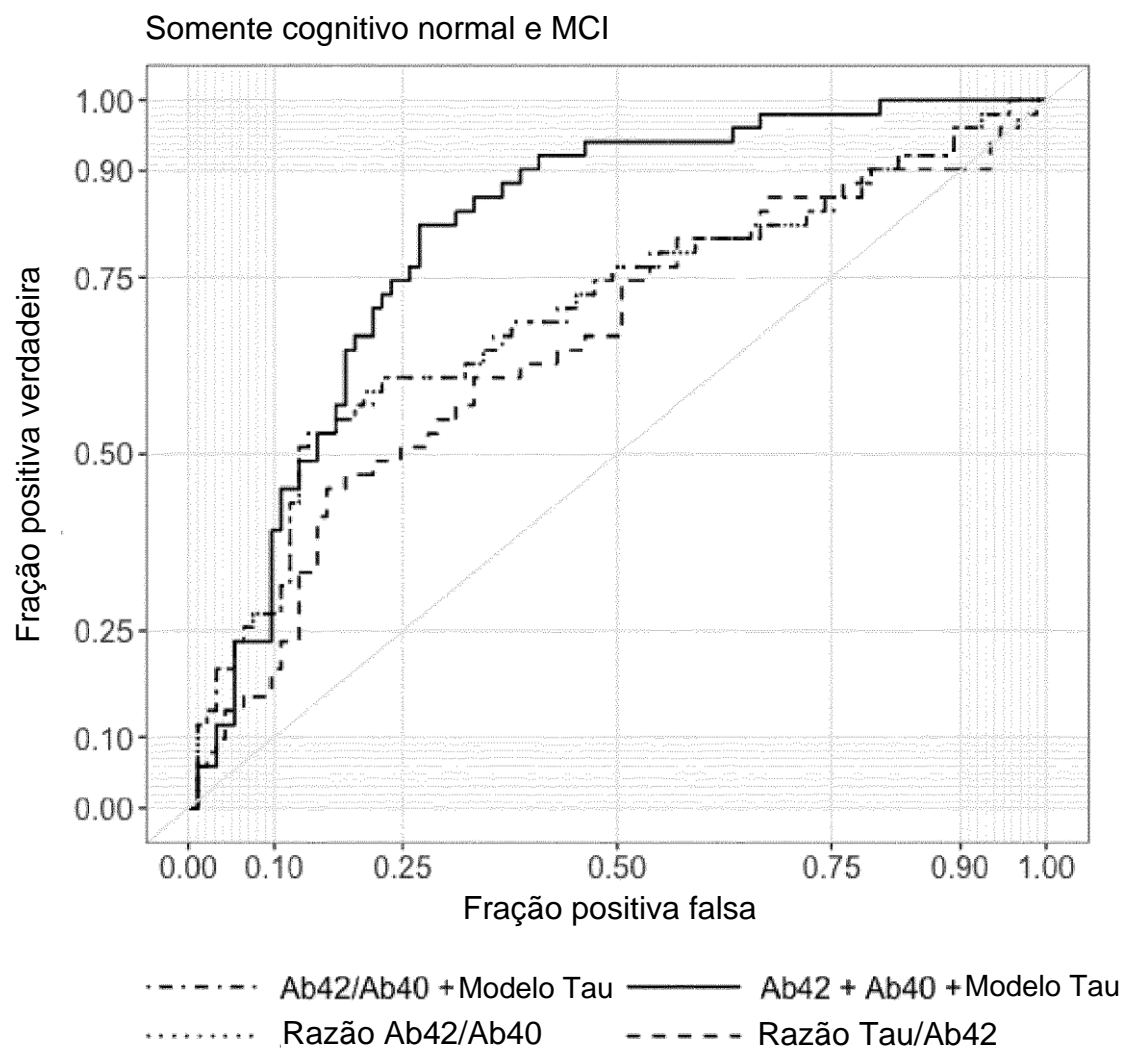
em que a amostra não é uma amostra do cérebro ou uma amostra do fluido cefalorraquidiano.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo método ser ainda definido conforme especificado em qualquer uma das reivindicações 2 a 10.

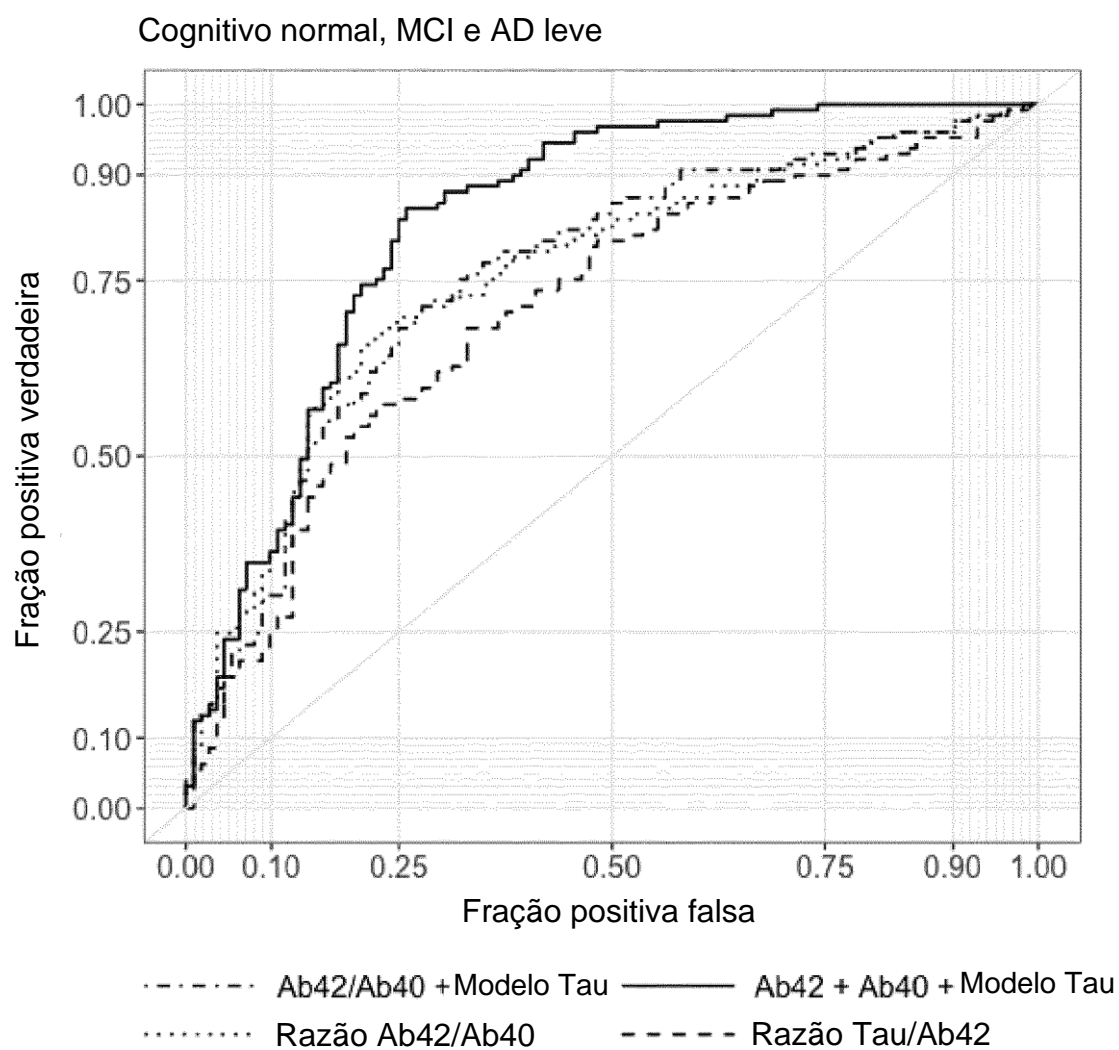
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**RESUMO****“MÉTODOS PARA IDENTIFICAR UM INDIVÍDUO COMO POSSUINDO OU ESTANDO EM RISCO DE DESENVOLVER UMA DEMÊNCIA POSITIVA PARA AMILÓIDE E PARA DETECTAR UM INDIVÍDUO COM UM VALOR AUMENTADO PARA UMA COMBINAÇÃO DE MARCADORES E USO DE A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 E tTAU”**

A presente invenção refere-se à identificação de um indivíduo como possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide com base em moléculas marcadoras de amilóide  $\beta$ 40 (A $\beta$ 40), amilóide  $\beta$ 42 (A $\beta$ 42) e Tau total (tTau), o uso das moléculas marcadoras para a identificação de um indivíduo possuindo ou estando em risco de desenvolver uma demência positiva para amilóide e um método para detectar um indivíduo com um valor aumentado para a combinação das moléculas marcadoras.