

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 256**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2018** **PCT/GB2018/050817**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018** **WO18178665**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2018** **E 18715247 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023** **EP 3602068**

54 Título: **Biomarcador para predecir el deterioro cognitivo**

30 Prioridad:

29.03.2017 GB 201705044

06.07.2017 GB 201710858

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2024

73 Titular/es:

NEURO-BIO LTD (100.0%)

**Building F5, Culham Science Centre
Abingdon, Oxfordshire OX14 3DB, GB**

72 Inventor/es:

GREENFIELD, SUSAN;

TU, HENRY;

MORRILL, PAUL;

ROTONDO, SERGIO y

GARCIA-RATES, SARA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 968 256 T3

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcador para predecir el deterioro cognitivo

- 5 La divulgación se refiere a biomarcadores, y particularmente, aunque no exclusivamente, a biomarcadores para trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington o enfermedad de la Neurona Motora. La divulgación se refiere especialmente a un nuevo biomarcador predictivo cuantitativo para el deterioro cognitivo y, en particular, la tasa de deterioro cognitivo que sufrirá un sujeto, por ejemplo como resultado del desarrollo de un trastorno neurodegenerativo. La divulgación proporciona además métodos de diagnóstico y pronóstico, y kits para predecir la tasa de deterioro cognitivo en sujetos.
- 10 La enfermedad de Alzheimer (AD) se está convirtiendo rápidamente en una de las mayores cargas socioeconómicas del mundo, con una creciente tasa de incidencia mundial de casi 10 millones de nuevos casos de demencia cada año. Dado que tanto la incidencia como la prevalencia de la AD aumentan con la edad, el número de pacientes aumenta significativamente con el envejecimiento de la población. En 2015, había más de 46 millones de personas que vivían con demencia con un coste socioeconómico estimado de 800 mil millones de dólares al año y se espera que el número de pacientes aumente a más de 130 millones para 2050 lo que le costará a la sociedad más de 2 billones de dólares al año. Recientemente se anunció que la AD es la principal causa de muerte en personas mayores de 65 años en el Reino Unido, y en los EE.UU. es ahora la sexta causa de muerte en todas las edades.
- 15 En la actualidad no existe ninguna prueba única que se pueda administrar para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. La clasificación clínica de la enfermedad de Alzheimer se basa en una combinación de informes subjetivos, evaluación del historial médico, pruebas de función cognitiva y costosos escaneos de formación de imágenes del cerebro, sin que sea posible una verdadera clasificación hasta que se pueda realizar un examen post mortem del cerebro. La identificación de un biomarcador que permita la detección objetiva de la AD o tasa de deterioro cognitivo con un alto grado de especificidad y sensibilidad permitiría el cribado rutinario, intervención temprana, e investigación neuropatológica revolucionaría al abrir la ruta a nuevas estrategias de intervención.
- 20 Los inventores han continuado su trabajo anterior en esta área y se han centrado en el péptido tóxico T14, que se deriva del terminal C de la acetilcolinesterasa (AChE), que está presente como una molécula bioactiva de origen natural en el tejido cerebral. El documento WO 2016/156803 describe un anticuerpo generado contra T14 que puede reconocer y cuantificar selectivamente esta molécula de señalización innata en muestras de sangre o tejido cerebral humano y de rata, mediante técnicas ELISA o de transferencia Western. Ahora, empleando el mismo procedimiento y métodos, los inventores han analizado un número estadísticamente significativo de muestras de plasma humano, que han mostrado sorprendentemente que los niveles variables del péptido derivado de AChE (es decir, T14) se correlacionan con la edad, y se pueden utilizar como un predictor o biomarcador objetivo y cuantificable del deterioro cognitivo.
- 25 La invención es como se define en las reivindicaciones y cualesquier otros aspectos, configuraciones o realizaciones establecidos en el presente documento que no caigan dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para información. Adicionalmente, cualesquier referencias en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas, y medicamentos de la presente divulgación para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).
- 30 Por lo tanto, en un primer ejemplo, se divulga un método para predecir el ritmo al que un sujeto sufrirá un deterioro cognitivo, o para detectar una predisposición al mismo, el método comprende:
- 35 (a) analizar, en una muestra obtenida de un sujeto de prueba, la concentración de (i) un péptido soluble que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma y/o (ii) un péptido agregado que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma; y
- 40 (b) comparar esta concentración con un valor de referencia de una población de control para concentraciones de péptido soluble o agregado que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma,
- 45 en el que una concentración más baja de péptido soluble que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, y/o una concentración más alta de péptido agregado que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, del sujeto de prueba, con respecto a el valor de referencia respectivo, sugiere que el sujeto sufrirá una mayor tasa de deterioro cognitivo, o tiene una predisposición a sufrirlo.
- 50 En un segundo ejemplo, se divulga un kit de predicción del deterioro cognitivo, para identificar a un sujeto propenso a sufrir un deterioro cognitivo, o que tiene una predisposición al mismo, el kit comprende:
- 55 (a) medios para determinar, en una muestra obtenida de un sujeto de prueba, la concentración de (i) un péptido soluble que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma y/o (ii) un péptido agregado que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma; y
- 60

(b) un valor de referencia de una población de control para concentraciones de péptido soluble o agregado que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma,

en el que el kit se utiliza para identificar una concentración más baja de péptido soluble que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, y/o una concentración más alta de péptido agregado que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, en la muestra del sujeto de prueba, en comparación con el valor de referencia respectivo, lo que sugiere que el sujeto de prueba sufrirá una tasa más alta de deterioro cognitivo, o tiene una predisposición al mismo.

En un tercer ejemplo, se divulga un método para tratar a un sujeto propenso a sufrir un deterioro cognitivo, o que tiene una predisposición al mismo, el método comprende:

(a) analizar, en una muestra obtenida del sujeto, la concentración de (i) un péptido soluble que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma y/o (ii) un péptido agregado que comprende o consiste en de la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, en la que una concentración más baja de péptido soluble que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, y/o una concentración más alta de péptido agregado que comprende o que consiste en de la SEQ ID No:3, del sujeto de prueba, en relación con un valor de referencia respectivo de una población de control para concentraciones de péptido soluble o agregado que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, sugiere que el sujeto sufrirá una mayor tasa de deterioro cognitivo o tiene una predisposición al mismo; y

(b) administrar, al sujeto, un agente terapéutico que previene, reduce o retrasa el deterioro cognitivo.

Ventajosamente, la investigación descrita en el presente documento respalda la idea de que la detección del péptido de la SEQ ID No:3 (denominado en el presente documento "T14") en individuos se puede utilizar en la primera prueba objetiva de diagnóstico o pronóstico para predecir si un sujeto o no sufrirá una mayor tasa de deterioro cognitivo, como resultado del desarrollo de un trastorno neurodegenerativo, en comparación con un individuo por lo demás sano. El uso del biomarcador T14 (es decir, el péptido de la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma) permite la detección de la susceptibilidad a una tasa más alta de deterioro cognitivo con un grado muy alto de especificidad y sensibilidad a partir de un procedimiento no invasivo, fácil de repetir, rentable, tal como la recolección de sangre, y por lo tanto permite el cribado sistemático, y la intervención temprana con tratamiento terapéutico.

Como se describe en el Ejemplo 4 y en la Figura 8, la clara correlación entre los niveles de T14 (formas solubles y/o agregadas) y las puntuaciones MMSE menores de 20 corroboran los datos del ensayo de T14, confirmando de esta manera que los niveles de T14 se pueden utilizar de forma fiable para predecir si o no el sujeto de prueba sufrirá un deterioro cognitivo en los años posteriores, mucho antes de que muestre algún síntoma, como ocurre actualmente con la puntuación MMSE estándar. Esto significa que los métodos descritos en el presente documento, que detectan el T14, se pueden utilizar como una prueba de alerta temprana, de tal manera que luego se puedan tomar medidas positivas para reducir el riesgo de deterioro cognitivo (por ejemplo, dieta, elecciones de estilo de vida), y la administración de terapias, según sea apropiado.

Se apreciará que el método de acuerdo con el primer ejemplo es útil para permitir a un médico tomar decisiones con respecto al mejor curso de tratamiento para un sujeto que está en riesgo de sufrir una tasa más alta de deterioro cognitivo en el futuro. Preferiblemente, el método se lleva a cabo antes de que se hayan desarrollado síntomas de deterioro cognitivo, por ejemplo cuando el sujeto tiene 30, 40, 50 y 60 años detectar si el sujeto podría sufrir más tarde de una tasa más alta de deterioro cognitivo, y luego, si se detecta un pronóstico negativo, iniciar el tratamiento para prevenir la aparición del deterioro cognitivo. Como tal, la afección se previene antes de que aparezcan los síntomas. Además, el método del primer ejemplo es útil para monitorizar la eficacia de un supuesto tratamiento para el deterioro cognitivo. Por tanto, el kit de acuerdo con el segundo ejemplo es útil para proporcionar un pronóstico de la afección del sujeto, de tal manera que el médico pueda llevar a cabo el tratamiento de acuerdo con el tercer ejemplo. El kit también se puede utilizar para monitorizar la eficacia de un supuesto tratamiento para el deterioro cognitivo. Por lo tanto el método y el kit son muy útiles para guiar un régimen de tratamiento del deterioro cognitivo para el médico, y para monitorizar la eficacia de dicho régimen de tratamiento.

Ejemplos de agentes terapéuticos adecuados que se pueden administrar al sujeto para prevenir o tratar el deterioro cognitivo incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la acetilcolinesterasa, tales como Rivastigmina, Galantamina, y Donepezilo, y/o antagonistas de N-metil-D-aspartato (NMDA), tales como Memantina.

Por tanto, la concentración del péptido T14, ya sea en su forma soluble o agregada, puede actuar como marcador de diagnóstico y/o pronóstico del deterioro cognitivo.

Por lo tanto, en un cuarto ejemplo, se divulga el uso de un péptido que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, como un biomarcador de diagnóstico o pronóstico para predecir la tasa de deterioro cognitivo.

Lo más preferiblemente, el método del primer ejemplo es un método de pronóstico y, por lo tanto el péptido se utiliza en el cuarto ejemplo como biomarcador de pronóstico. La divulgación se puede utilizar en un método de diagnóstico o pronóstico para diagnosticar o predecir la tasa de deterioro cognitivo causado por cualquier enfermedad neurodegenerativa seleccionada de un grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Huntington; enfermedad de la Neurona Motora; Espinocerebeloso tipo 1, tipo 2, y tipo 3; Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS); esquizofrenia; Demencia con cuerpos de Lewy; y Demencia Frontotemporal. Se prefiere, sin embargo, que la divulgación se utilice para estudiar o predecir el deterioro cognitivo en cualquier trastorno neurológico asociado con la función no enzimática de AChE, en particular, por ejemplo, la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de la Neurona Motora.

Sin embargo, se prefiere especialmente que la divulgación se utilice para predecir la tasa de deterioro cognitivo en un paciente con Enfermedad de Alzheimer.

Siguiendo con sus estudios anteriores, los inventores continuaron su investigación con la acetilcolinesterasa, y su anticuerpo que exhibe inmunoespecificidad para regiones específicas en el terminal C de esta enzima, como se describe en el documento WO 2016/156803. La acetilcolinesterasa es una serina proteasa que hidroliza la acetilcolina, y es bien conocida por el experto. La forma principal de acetilcolinesterasa que se encuentra en el cerebro se conoce como acetilcolinesterasa de cola (T-AChE). La secuencia de proteínas de una realización de la acetilcolinesterasa de cola humana (Gen Bank: AAA68151.1) tiene una longitud de 614 aminoácidos y se proporciona en el presente documento como la SEQ ID No:1, de la siguiente manera:

```

1 mrppqcllht pslaspllll llwllqggvg aegredaeli vtvrggrlrg iriktpggpv
61 saflqipfae ppmgprrrfp pepkqpwsgv vdatffqsvc yqyvdtlypq feqtemwnpn
121 relsedclyl nwtptyprpt sptpvlvwiy qqqfysqass ldvydgrflv qaertvlvsm
181 nyrvgafgfl alpgsreapq nvqlldqrla lqvwqenvaa fggdptsvtl fgesagaasv
241 gmhllsppsr glfhravlsq gapngpwatv gmgearrrat qlahlvgcpp ggtggndtel
301 vacrltrpaq vlvnhewhvl pgesvfrfsf vpvvdgdfis dtpealinag dfhglqlvlg
361 vvkdeqsyfl vyqapqfskd neslisraef laqvrqvvpq vsdlaseavv lhytdwlhpe
421 dparlreals dvvgdhnvvc pvaqlagrla aqgarvyayv fehrastlsw plwmqgvphgy
481 eiefifgipl dpsrnytaee kifaqrlmry wanfartgdp neprdpkapq wppytagaqq
541 yvsldlrple vrrqlraqac afwnrflpkl lsatdtldea erqwkafehr wssymvhwkn
601 qfdhyskqdr csdl

```

[SEQ ID No:1]

La secuencia de aminoácidos de T30 (que corresponde a los últimos 30 residuos de aminoácidos de la SEQ ID No:1) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID No:2, de la siguiente manera:

KAEFHRWSSYMVHWKNQFDHYSKQDRCSDL

[SEQ ID No:2]

La secuencia de aminoácidos de T14 (que corresponde a los 14 residuos de aminoácidos ubicados hacia el extremo de la SEQ ID No:1, y carece de los 15 aminoácidos finales encontrados en T30) se proporciona en el presente documento como la SEQ ID No:3, de la siguiente manera: -

AEFHRWSSYMVHWK

[SEQ ID No:3]

Preferiblemente, por lo tanto, el péptido de la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma es T14.

Los fragmentos de T14 (SEQ ID No:3) también son detectables como se muestra en el Ejemplo 7 y la Figura 34, y pueden actuar como marcadores de diagnóstico o pronóstico utilizados de acuerdo con la divulgación.

Por lo tanto, en un ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No:7 (es decir, T7), es decir, SYMVHWK.

En otro ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 8 (es decir, T8), es decir, SSYMVHWK.

En otro ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 9 (es decir, T9), es decir, WSSYMVHWK.

En otro ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 10 (es decir, T10), es decir RWSSYMVHWK.

5 En otro ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 11 (es decir, T11), es decir HRWSSYMVHWK.

En otro ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 12 (es decir, T12), es decir, FHRWSSYMVHWK.

10 En otro ejemplo, un fragmento de la SEQ ID No:3 comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No:13 (es decir, T13), es decir, EFHRWSSYMVHWK.

En otras palabras, aunque se prefiere la detección de T14 (es decir, SEQ ID No:3), la divulgación también puede depender de la detección de uno o más de cualquiera de T7-T13 (es decir, SEQ ID No: 7-13).

15 El sujeto puede ser un vertebrado, un mamífero o un animal doméstico. Sin embargo, lo más preferible es que el sujeto sea un ser humano, que puede ser hombre o mujer. El sujeto puede ser un niño o un adulto. La edad del sujeto podrá ser de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 años. El sujeto, sin embargo, puede tener menos de 80, 70 o 60 años. Preferiblemente, se prueba al sujeto antes de que sea evidente cualesquier síntomas de deterioro cognitivo o trastorno neurodegenerativo. Se prevé que la divulgación se puede llevar a cabo en un momento similar y de manera similar a la forma en que se toman las mediciones del índice de masa corporal (BMI).

25 Preferiblemente, el método se lleva a cabo in vitro. Preferiblemente, la muestra comprende una muestra biológica. La muestra puede ser cualquier material que se pueda obtener del sujeto del que se pueda obtener proteína. Además, la muestra puede ser sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, sudor, saliva, lágrimas, aspirado mamario, líquido prostático, líquido seminal, líquido vaginal, heces, raspado cervical, citos, líquido amniótico, líquido intraocular, mucosas, humedad en el aliento, tejido animal, lisados celulares, tejido tumoral, cabello, piel, raspados bucales, linfa, líquido intersticial, uñas, médula ósea, cartilago, priones, polvo de hueso, cerumen, o combinaciones de los mismos.

30 Preferiblemente, sin embargo, la muestra comprende sangre, orina, tejido, etc. Lo más preferiblemente, la muestra comprende una muestra de sangre. La sangre puede comprender sangre venosa o arterial.

El kit puede comprender un recipiente de recolección de muestras para recibir la muestra extraída.

35 Las muestras de sangre se pueden ensayar inmediatamente para T14. Alternativamente, la muestra de sangre se puede almacenar a bajas temperaturas, por ejemplo en un refrigerador o incluso congelar antes de realizar el ensayo de T14. La detección de T14 se puede llevar a cabo en sangre completa.

40 Preferiblemente, sin embargo, la muestra de sangre comprende suero sanguíneo. Preferiblemente, la muestra de sangre comprende plasma sanguíneo.

45 La sangre se puede procesar adicionalmente antes de realizar el ensayo de T14. Por ejemplo, se puede agregar un anticoagulante, tal como citrato (tal como citrato de sodio), hirudina, heparina, PPACK, o fluoruro de sodio. Por tanto, el recipiente de recolección de muestras puede contener un anticoagulante para evitar que se coagule la muestra de sangre. Alternativamente, la muestra de sangre se puede centrifugar o filtrar para preparar una fracción de plasma o suero, que se puede utilizar para análisis. Por lo tanto, se prefiere que el T14 se analice o ensaye en una muestra de plasma sanguíneo o de suero sanguíneo. Se prefiere especialmente que la concentración de T14 se mida in vitro a partir de una muestra de suero sanguíneo o de una plasma tomada del sujeto.

50 Preferiblemente, el kit o método se utiliza para identificar la presencia o ausencia de células positivas a T14 (es decir, células que comprenden la SEQ ID No:3) en la muestra, o para determinar la concentración de las mismas en la muestra, preferiblemente la concentración de T14 soluble y/o o T14 agregado. Los medios para determinar la concentración de T14, ya sea T14 soluble o agregado, pueden comprender un ensayo adaptado para detectar la presencia y/o ausencia de células positivas a T14 en la muestra. El kit o método puede comprender el uso de un control positivo y/o un control negativo contra el que se puede comparar el ensayo.

55 El péptido T14 (SEQ ID No:3) se puede ensayar mediante varias formas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, preferiblemente se emplea un inmunoensayo para medir los niveles del péptido T14. Sin embargo, se apreciará que se pueden emplear ensayos no basados en inmunología, por ejemplo, al etiquetar un compuesto que tiene afinidad con un ligando de la molécula de péptido T14, y luego ensayar la etiqueta. El péptido T14 también se puede determinar mediante análisis de transferencia Western, que se puede utilizar para determinar el nivel de proteína total del péptido T14. Por lo tanto la concentración del péptido T14 se puede detectar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo fluorométrico, ensayo quimioluminiscente, o análisis de radioinmunoensayo.

65

En un ejemplo de la divulgación, se determina la concentración de (i) un péptido soluble que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, o de (ii) un péptido agregado que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma. En un ejemplo preferido, se determina la concentración de (i) un péptido soluble que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma, y de (ii) un péptido agregado que comprende o que consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma.

Como se describe en el Ejemplo 1, lo más preferible es utilizar un inmunoensayo, tal como ELISA, para detectar el péptido T14 soluble. Sin embargo, como se discute en el Ejemplo 2, el análisis de transferencia Western se utiliza más preferiblemente para detectar el péptido T14 agregado. Como se describe en el Ejemplo 4, se prefiere que tanto el T14 soluble como agregado se puedan detectar en combinación. Aunque los inventores no desean limitarse a hipótesis, han observado una banda de 2 kDa y también una banda de 50 kDa en sus transferencias Western. Sus experimentos de agregación no tienen en cuenta la diferencia en el peso molecular, porque no se observó un cambio en el peso molecular al desencadenar la agregación en condiciones de laboratorio. Se postula, aunque no verificado, que el péptido T14 puede estar unido a una proteína de peso molecular más alto, y que esta interacción no se ve alterada por las condiciones desnaturizantes y reductoras de la transferencia Western.

Los medios para determinar, en la muestra obtenida del sujeto de prueba, la concentración de (i) un T14 soluble y/o (ii) un T14 agregado pueden comprender un anticuerpo anti-T14 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es decir, un anticuerpo neutralizante de T14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se puede generar en un conejo, ratón o rata.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la SEQ ID No:3. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más aminoácidos en el terminal C de la SEQ ID No:3. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más aminoácidos en la SEQ ID No: 5 (es decir, SYMVHWK, que son los aminoácidos de terminal C números 7-14 de la SEQ ID No: 3). Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un residuo de lisina (K) de terminal C en el epítipo. Los inventores han observado sorprendentemente que la secuencia de aminoácidos de terminal C VHWK en la SEQ ID No:3, que se describe en el presente documento como la SEQ ID No. 6 (es decir, los aminoácidos de terminal C números 10-14 de la SEQ ID No:3), actúa como un epítipo para el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. De acuerdo con lo anterior, más preferiblemente el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más aminoácidos en la SEQ ID No:6. Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a la SEQ ID No:6. Por lo tanto, se apreciará que el epítipo al que se une el anticuerpo comprende o consiste en la SEQ ID No: 6. Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la SEQ ID No:3, o un fragmento o variante de la misma, y se puede utilizar como o en el medio de detección.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo no se une a la SEQ ID No:2 (es decir, T30).

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a la SEQ ID No:4 (es decir, T15), es decir, NQFDHYSKQDRCSL.

Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a la SEQ ID No: 14 (es decir, β -amiloides ($A\beta$), es decir

DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA.

El kit del segundo ejemplo puede comprender además una etiqueta que se puede detectar. El término "etiqueta" puede significar una fracción que se puede adherir a los medios para determinar, en la muestra obtenida del sujeto de prueba, la concentración de (i) un T14 soluble y/o (ii) un T14 agregado. Las fracciones se pueden utilizar, por ejemplo, para procedimientos terapéuticos o de diagnóstico. Las etiquetas terapéuticas incluyen, por ejemplo, fracciones que se pueden adherir al anticuerpo o fragmento del mismo descrito en el presente documento y utilizar para monitorizar la unión del anticuerpo al péptido T14 (es decir, SEQ ID No:3, o fragmento o variante de la misma). Las etiquetas de diagnóstico incluyen, por ejemplo, fracciones que se pueden detectar mediante métodos analíticos. Los métodos analíticos incluyen, por ejemplo, procedimientos cualitativos y cuantitativos. Los métodos analíticos cualitativos incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta. Los métodos analíticos cuantitativos incluyen, por ejemplo, procedimientos de inmunoafinidad tales como radioinmunoensayo, ELISA o análisis FACS. Los métodos analíticos también incluyen procedimientos de formación de imágenes tanto in vitro como in vivo. Ejemplos específicos de etiquetas de diagnóstico que se pueden detectar por medios analíticos incluyen enzimas, radioisótopos, fluorocromos, marcadores quimioluminiscentes, y biotina.

Preferiblemente, las concentraciones de péptido T14 soluble en suero o plasma de péptido T14 se pueden medir mediante ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo, que será conocido por el técnico experto. El ELISA puede comprender utilizar un anticuerpo adecuado para recubrir una placa de microtitulación. Por ejemplo, dicho anticuerpo

adecuado puede comprender un anticuerpo policlonal antipéptido T14 purificado por afinidad descrito en el presente documento (WO 2016/156803). Además, el ELISA puede comprender utilizar un anticuerpo adecuado para la detección. Por ejemplo, dicho anticuerpo adecuado puede comprender un anticuerpo antipéptido T14 humano de ratón monoclonal etiquetado con peroxidasa. El péptido T14 humano, que se puede purificar a partir de plasma y que luego se puede cuantificar mediante análisis de aminoácidos, se puede utilizar para calibrar un estándar de plasma utilizando técnicas estándar conocidas por el técnico experto. Se puede adherir una etiqueta directamente al anticuerpo o adherir al agente de unión secundario que se une específicamente a T14. Dicho agente de unión secundario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo secundario. Un anticuerpo secundario puede ser ya sea policlonal o monoclonal, y de origen humano, de roedor o quimérico.

Los Ejemplos 1 y 2 describen datos de ELISA y transferencia de Western para T14 en una variedad de individuos sanos, así como en pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer. Se apreciará que el valor de referencia del péptido T14, ya sea en forma soluble o agregada, en un individuo (sano o con AD) depende en gran medida de una serie de factores, por ejemplo, su edad, si o no el sujeto sufre de un trastorno neurodegenerativo y, de ser así, hasta qué punto ha progresado ese trastorno.

Con referencia a la Figura 5A, se muestra la correlación de la concentración de T14 con la edad para toda la cohorte ($n = 160$), y la Figura 5B muestra la correlación de la concentración de T14 con la edad para amiloide negativo, es decir, el grupo de Control menos aquellos sujetos que No muestran Quejas de Memoria menos aquellos sujetos que muestra Quejas de Memoria Subjetiva ($n=100$) y amiloide positivo, es decir, Enfermedad de Alzheimer, menos aquellos sujetos que muestran un deterioro cognitivo leve. Como se puede ver, en la Figura 5B, los niveles de T14 aumentan para el grupo de control con la edad (línea verde), mientras que hay pocos cambios en la concentración de T14 de los pacientes con Alzheimer (línea negra). Además, a medida que la población envejece, el grado de separación entre las respectivas concentraciones de T14 se vuelve mucho más pronunciado, por lo que está claro que la edad influye en los niveles de T14. Como tal, los inventores consideran que es más fácil distinguir entre sujetos sanos (línea verde) y pacientes con Alzheimer (línea negra) para los sujetos de mayor edad. Sin embargo, claramente, debe haber un compromiso para que los métodos de la invención se empleen antes de que un sujeto de prueba comience a mostrar cualesquier síntomas de deterioro cognitivo, es decir, se haya dejado demasiado tarde.

Por lo tanto, el valor de referencia descrito en el presente documento se calcula preferiblemente a partir de una pluralidad de individuos que tienen entre 60 y 90 años, y más preferiblemente entre 70 y 80 años, algunos de los cuales están sanos y algunos de los cuales muestran al menos cierto deterioro cognitivo. El valor de referencia se puede producir al designar miembros de la población de referencia como ya sea Amiloide positivo o Amiloide negativo. En una realización, dicha designación se puede lograr al evaluar los valores relativos de beta-amiloide en la escala BeCKeT. Por ejemplo, un paciente con Amiloide negativo puede tener un valor de BeCKeT de <1.4 , y un sujeto con Amiloide positivo puede tener un valor de BeCKeT de >1.4 .

Con referencia a la Figura 4B, los inventores han mostrado que, cuando se utiliza ELISA para detectar concentraciones de T14 soluble en pacientes con Alzheimer, sorprendentemente las concentraciones de T14 más bajas se correlacionan con una tasa más rápida de deterioro cognitivo que aquellos pacientes que tienen concentraciones de T14 más altas. Con referencia a las Figuras 6B y 7B, los inventores también se sorprendieron al observar que cuando se utiliza la transferencia Western para detectar la concentración de T14 agregado en pacientes con Alzheimer, las concentraciones más altas de T14 se correlacionan con una tasa más rápida de deterioro cognitivo que aquellos pacientes que tienen concentraciones más bajas de T14. De acuerdo con lo anterior, la medición de las concentraciones de T14 soluble o agregado da resultados opuestos cuando se correlaciona con la tasa de deterioro cognitivo. Debido a las limitaciones actuales de los ensayos (tanto transferencia Western como ELISA), actualmente todos los valores en ambos casos solo pueden considerarse en relación con diferentes grupos. Aunque los inventores no desean estar limitados a hipótesis, consideran que dado que las transferencias Western miden agregados del péptido T14, estos datos sugieren que el péptido T14 agregado, o su conjugación con una proteína desconocida o proteína portadora presente en el plasma desempeña una función en la neurodegeneración. Además, dado que ELISA mide el T14 soluble, los inventores plantean la hipótesis de que podría haber un monómero libre que se mediría que ha sido absorbido y/o está unido a sus dianas respectivas, agotando el conjunto circulante de monómero (o péptido T14 soluble/no unido).

Los inventores han observado que la concentración de T14 soluble en los sujetos de prueba era estadísticamente menor que la concentración de referencia, calculada utilizando el método descrito en el Ejemplo. Esto se denomina en el presente documento concentración "reducida" de péptido soluble que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma. Por el contrario, los inventores muestran que la concentración de T14 agregado en los sujetos de prueba fue estadísticamente mayor que la concentración de referencia, calculada utilizando el método descrito en el Ejemplo. Esto se denomina en el presente documento concentración "aumentada" de péptido agregado que comprende o consiste en la SEQ ID No:3, o una variante o fragmento de la misma.

El técnico experto apreciará cómo medir las concentraciones de péptido T14 (ya sea soluble o agregado) en un número estadísticamente significativo de individuos de control, y la concentración de T14 en el sujeto de prueba, y luego utilizará estas cifras respectivas para determinar si el sujeto de prueba tiene un aumento o disminución

estadísticamente significativo en la concentración de T14 y, por lo tanto, inferir si ese sujeto está en riesgo de desarrollar en el futuro una tasa más alta de deterioro cognitivo.

De acuerdo con lo anterior, los inventores se han dado cuenta de que la diferencia en las concentraciones de T14 entre los niveles normales y elevados/reducidos, para T14 agregado o soluble, respectivamente, se puede utilizar como marcador fisiológico, lo que sugiere la probabilidad de desarrollar una tasa más alta de deterioro cognitivo de lo que normalmente sería el caso para ese individuo. Se apreciará que si un sujeto tiene una concentración reducida de T14 soluble que es considerablemente menor que la concentración de T14 soluble de referencia, o una concentración elevada de T14 agregado que es considerablemente más alta que la concentración de T14 agregado de referencia, entonces estaría en un riesgo más alto de sufrir una tasa más alta de deterioro cognitivo que si la concentración de T14 fuera solo marginalmente más alta o más baja que las concentraciones de T14 de referencia.

A modo de ejemplo, la disminución en la concentración de T14 soluble a partir de la concentración de referencia puede ser aproximadamente un 10 %, preferiblemente aproximadamente una disminución del 20 %, más preferiblemente aproximadamente una disminución del 30 %, incluso más preferiblemente aproximadamente una disminución del 40 %, y lo más preferiblemente una disminución de aproximadamente el 50 % de la concentración de referencia. Dichas disminuciones en las concentraciones de T14 soluble infieren que el sujeto de prueba sufrirá una mayor tasa de deterioro cognitivo. Alternativamente, el aumento en la concentración de T14 agregado a partir de la concentración de referencia puede ser aproximadamente un 10 %, preferiblemente aproximadamente un aumento del 20 %, más preferiblemente aproximadamente un aumento del 30 %, incluso más preferiblemente aproximadamente un aumento del 40 %, y lo más preferiblemente un aumento de aproximadamente 50 % de la concentración de referencia. Dichos aumentos en las concentraciones de T14 agregado infieren que el sujeto de prueba sufrirá una mayor tasa de deterioro cognitivo. De acuerdo con lo anterior, un médico podría tomar una decisión en cuanto al curso de tratamiento preferido requerido, por ejemplo, el tipo y dosificación del agente terapéutico de acuerdo con el tercer ejemplo que se va a administrar.

Los métodos de la invención pueden comprender medir la tasa de deterioro cognitivo mediante una puntuación del Mini Examen del Estado Mental (MMSE) o una puntuación del Compuesto Cognitivo Preclínico de Alzheimer (PACC).

El MMSE es un cuestionario que se administra prácticamente universalmente en personas con sospecha de AD, y en cohortes de estudio más amplias, como medida del deterioro cognitivo. Se considera ampliamente un estándar de oro para el diagnóstico de la AD debido a su facilidad de aplicación que requiere poca capacitación, repetibilidad, validez y confiabilidad. También es particularmente útil cuando se considera la evaluación longitudinal de la AD y su progresión. Se pueden utilizar medidas repetidas de la puntuación MMSE, recolectadas a intervalos regulares, para calcular una tasa de deterioro cognitivo del sujeto. Luego, preferiblemente se realiza una regresión lineal para calcular la pendiente del cambio de la puntuación MMSE a lo largo del tiempo, y es esta pendiente la que se interpreta como la tasa de cambio cognitivo (deterioro/aumento). Por lo tanto, preferiblemente el deterioro cognitivo se mide en términos de puntuación MMSE. La pendiente se puede calcular en puntos caídos en la puntuación MMSE por mes; por ejemplo, los niveles bajos de T14 en la Figura 4B se correlacionan con una caída en la puntuación MMSE de 0.15 puntos por mes.

La prueba PACC, por otro lado, combina pruebas que evalúan la memoria episódica, la función ejecutiva cronometrada y la cognición global. Es la medida de resultado primaria para el primer ensayo clínico en AD preclínica. En la Figura 7B, para los pacientes con AD, los niveles altos de T14 se asocian con un deterioro más rápido.

Preferiblemente, la tasa más alta de deterioro cognitivo equivale a al menos un 5 %, al menos un 10 % o al menos un 15 % de deterioro cognitivo mayor que el observado en el valor de referencia. Más preferiblemente, la tasa más alta de deterioro cognitivo equivale a al menos un 20 %, al menos un 25 % o al menos un 30 % de deterioro cognitivo mayor que el observado en el valor de referencia.

Preferiblemente, el método comprende una etapa para ajustar por edad las concentraciones de T14 del sujeto de prueba, ya sea T14 soluble o T14 agregado, frente al valor de referencia correspondiente.

Preferiblemente, el método comprende una etapa para detectar la presencia o ausencia de beta-amiloide en la muestra del sujeto de prueba. Por ejemplo, la detección se puede realizar utilizando formación de imágenes de beta-amiloide, tal como formación de imágenes por PET. El método puede comprender una etapa de designar al sujeto de prueba como amiloide positivo o amiloide negativo. En una realización, dicha designación se puede lograr al evaluar los valores relativos de beta-amiloide en la escala BeCKeT. Por ejemplo, un paciente con Amiloide negativo puede tener un valor de BeCKeT de <1.4, y un sujeto con Amiloide positivo puede tener un valor de BeCKeT de >1.4.

Más preferiblemente, el método comprende el uso de una combinación de niveles de T14 ajustados por edad y formación de imágenes de beta amiloide para predecir la probabilidad de una mayor tasa de deterioro cognitivo. Las etapas del método se pueden realizar en cualquier orden. Por ejemplo, en una realización, el método puede comprender determinar la desviación ajustada por edad en las concentraciones de T14, seguida al determinar la tasa de deterioro cognitivo, seguida por la detección de beta-amiloide.

Como se muestra en la Figura 9 y el Ejemplo 3, los inventores han ideado un método de pronóstico novedoso de acuerdo con el primer ejemplo para detectar inicialmente, y tratar posteriormente trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, de acuerdo con el tercer ejemplo.

5 Preferiblemente, una primera etapa del método comprende realizar una prueba de sangre en una muestra tomada del sujeto, por ejemplo por su médico o enfermero, en el que se detectan concentraciones de T14 soluble y/o agregado utilizando ELISA y/o transferencia Western.

10 Preferiblemente, una segunda etapa del método comprende comparar los niveles de T14 medidos contra las concentraciones de referencia esperadas relacionadas con la edad. Por ejemplo, la transferencia Western o ELISA incluirían muestras de referencia de la misma edad de sujetos de control y/o enfermos, o materiales de referencia certificados para determinar los niveles relativos de T14. En una realización en la que se detecta poca o ninguna desviación con respecto a las concentraciones de referencia relacionadas con la edad (es decir, hay poca o ninguna separación entre las líneas verde y negra mostradas en la Figura 5B), se puede considerar que el sujeto está sano con poca riesgo de desarrollar una mayor tasa de deterioro cognitivo. Sin embargo, en una realización en la que se detecta una desviación (es decir, hay una separación estadísticamente significativa entre las líneas verde y negra mostradas en la Figura 5B), entonces una tercera etapa del método comprende preferiblemente la detección de amiloide, por ejemplo utilizando un escaneo PET de amiloide. Si no se detecta amiloide, entonces se puede considerar que el sujeto está sano y tiene poco riesgo de desarrollar una alta tasa de deterioro cognitivo. Sin embargo, si se detecta amiloide, entonces una cuarta etapa del método comprende preferiblemente la predicción de la tasa de deterioro cognitivo. La predicción de la tasa de deterioro cognitivo puede comprender una comparación con límites predefinidos de desviación de los niveles esperados de T14 para un grupo de edad determinado.

25 Finalmente, cuando se predice un deterioro cognitivo, el método comprende preferiblemente una quinta etapa de tratamiento terapéutico.

Se apreciará que la divulgación se extiende a cualquier ácido nucleico o péptido o variante, derivado o análogo del mismo, que comprende sustancialmente las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de cualquiera de las secuencias referidas en el presente documento, que incluyen variantes funcionales o fragmentos funcionales de las mismas. Los términos "sustancialmente la secuencia de aminoácidos/nucleótidos/péptidos", "variante funcional" y "fragmento funcional", pueden ser una secuencia que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos/nucleótidos/péptidos de cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento, por ejemplo, 40 % de identidad con la secuencia identificada en el presente documento.

35 También se prevén secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos con una identidad de secuencia que es mayor del 65 %, más preferiblemente mayor del 70 %, incluso más preferiblemente mayor del 75 %, y aún más preferiblemente mayor del 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos tiene al menos un 85 % de identidad con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia, más preferiblemente al menos un 90 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 92 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 95 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 97 % de identidad, incluso más preferiblemente al menos un 98 % de identidad y, lo más preferiblemente al menos un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento.

45 El técnico experto apreciará cómo calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos. Para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos, primero se debe preparar una alineación de las dos secuencias, seguida del cálculo del valor de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad para dos secuencias puede tomar valores diferentes dependiendo de: (i) el método utilizado para alinear las secuencias, por ejemplo, ClustalW, BLAST, FASTA, Smith-Waterman (implementado en diferentes programas), o la alineación estructural a partir de la comparación 3D; y (ii) los parámetros utilizados por el método de alineación, por ejemplo, alineación local versus global, la matriz de puntuación de pares utilizada (por ejemplo, BLOSUM62, PAM250, Gonnet, etc.), y la penalización por brecha, por ejemplo forma funcional y constantes.

55 Una vez realizada la alineación, existen muchas formas diferentes para calcular el porcentaje de identidad entre las dos secuencias. Por ejemplo, se puede dividir el número de identidades por: (i) la longitud de la secuencia más corta; (ii) la longitud de la alineación; (iii) la longitud media de la secuencia; (iv) el número de posiciones sin brecha; o (v) el número de posiciones equivalentes excluyendo las salientes. Además, se apreciará que el porcentaje de identidad también depende en gran medida de la longitud. Por lo tanto, cuanto más corto sea un par de secuencias, mayor será la identidad de secuencia que se puede esperar que ocurra por casualidad.

65 Por tanto, se apreciará que la alineación precisa de secuencias de proteínas o ADN es un proceso complejo. El popular programa de alineación múltiple ClustalW (Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson et al., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) es una forma preferida para generar múltiples alineaciones de proteínas o ADN de acuerdo con la invención. Los parámetros adecuados para ClustalW pueden ser los siguientes: Para alineaciones de ADN: Penalización por Apertura de Brecha = 15.0, Penalización por Extensión de Brecha = 6.66

y Matriz = Identidad. Para alineaciones de proteínas: Penalización por Apertura de Brecha = 10.0, Penalización por Extensión de Brecha = 0.2 y Matrix = Gonnet. Para alineaciones de ADN y proteínas: ENDGAP = -1, y GAPDIST = 4. Aquellos expertos en la técnica sabrán que puede ser necesario variar estos y otros parámetros para una alineación óptima de la secuencia.

Preferiblemente, el cálculo de las identidades porcentuales entre dos secuencias de aminoácidos/polinucleótidos/polipéptidos se puede calcular a partir de una alineación como $(N/T) \times 100$, donde N es el número de posiciones en las que las secuencias comparten un residuo idéntico, y T es el número total de posiciones comparadas, que incluye las brechas pero excluye las salientes. Por lo tanto, el método más preferido para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias comprende (i) preparar una alineación de secuencia utilizando el programa ClustalW utilizando un conjunto adecuado de parámetros, por ejemplo, como se estableció anteriormente; y (ii) insertar los valores de N y T en la siguiente fórmula: $\text{-Identidad de Secuencia} = (N/T) \times 100$.

Aquellos expertos en la técnica conocerán métodos alternativos para identificar secuencias similares. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar será codificada por una secuencia, que se hibrida con secuencias de ADN o sus complementos bajo condiciones estrictas. Por condiciones estrictas, nos referimos a que el nucleótido se hibrida con ADN o ARN unido al filtro en $3 \times$ cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C , seguido de al menos un lavado en $0.2 \times$ SSC/SDS al 0.1 % a aproximadamente $20\text{--}65^\circ\text{C}$. Alternativamente, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en al menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos de las secuencias mostradas en la SEQ ID No: 1-14.

Debido a la degeneración del código genético, está claro que cualquier secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento podría variarse o cambiarse sin afectar sustancialmente la secuencia de la proteína codificada por la misma, para proporcionar una variante funcional de la misma. Las variantes de nucleótidos adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo de esta manera un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son aquellas que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprenden toda, o porciones de, la secuencia, que se alteran mediante la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido al que sustituye, para producir un cambio conservador. Por ejemplo, pequeños aminoácidos hidrofóbicos, no polares incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos hidrofóbicos, no polares grandes incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Por lo tanto, se apreciará que se pueden reemplazar los aminoácidos con un aminoácido que tenga propiedades biofísicas similares, y el técnico experto conocerá las secuencias de nucleótidos que codifican estos aminoácidos.

Todas las características descritas en el presente documento (que incluyen las reivindicaciones, resumen y dibujos acompañantes), y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así divulgado, se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores en cualquier combinación, excepto combinaciones en las que al menos algunas de dichas características y/o etapas son mutuamente excluyentes.

Para una mejor comprensión de la divulgación, y para mostrar cómo se pueden llevar a cabo realizaciones de la misma, ahora se hará referencia, a modo de ejemplo, a las Figuras acompañantes, en las que:

Las Figuras 1-9 muestran datos generados utilizando 160 muestras de un estudio Australian Imaging Biomarker & Lifestyle (AIBL).

La Figura 1 muestra curvas de Característica Operativa del Receptor (ROC) que emplean regresión logística múltiple para modelar la probabilidad (logaritmo de probabilidades) de deterioro cognitivo en el rango de 'puntos de corte' de T14. Estas curvas de ROC se utilizaron para evaluar el valor de los ensayos de WB y ELISA;

La Figura 2 muestra puntuaciones MMSE en relación con la progresión de la enfermedad;

La Figura 3A muestra la distribución de frecuencia de los niveles de T14 en el estudio AIBL para las 160 muestras medidas por ELISA (μM T14), y los criterios para la selección de grupos (grupos Bajo, Medio-Bajo, Medio-Alto y Alto) según se determina por valores relativos de T14, en control, sin quejas de memoria (NMC), quejas de memoria subjetiva (SMC), enfermedad de Alzheimer (AD) y sujetos con deterioro cognitivo leve (MCI). La Figura 3B muestra la distribución de frecuencia de los niveles de T14 para 40 muestras iniciales que se obtuvieron originalmente de AIBL como parte de un estudio piloto;

La Figura 4A muestra la correlación de T14 con la gravedad del deterioro cognitivo (según se mide por un miniexamen del estado mental, MMSE) en ELISA para el subconjunto de cohorte de 20 pacientes de control del estudio AIBL (pacientes con Amiloide negativo, BeCKeT <1.4). La Figura 4B muestra el mismo análisis para el subconjunto de 20 pacientes con AD/MCI (Amiloide positivo, BeCKeT >1.4). La pendiente MMSE más negativa indica una progresión más rápida del deterioro cognitivo;

La Figura 5A muestra la correlación de T14 con la edad para toda la cohorte del Estudio AIBL (n = 160), y la Figura 5B para amiloide -ve (Control-NMC [Sin Quejas de Memoria]-SMC [Quejas de Memoria Subjetiva], n = 100) y amiloide +ve (AD-MCI [deterioro cognitivo leve]);

La Figura 6A muestra la correlación de T14 con la gravedad del deterioro cognitivo (según se mide por un miniexamen del estado mental, MMSE) en transferencia Western para los 20 pacientes de control del estudio AIBL (pacientes con Amiloide negativo, BeCKeT < 1.4), y la Figura 6B muestra la correlación de T14 con la gravedad del deterioro cognitivo (según se mide por MMSE) en transferencia Western para el subconjunto de 20 pacientes con AD/MCI (Amiloide positivo, BeCKeT > 1.4). La pendiente MMSE más negativa indica una progresión más rápida del deterioro cognitivo;

La Figura 7A muestra la correlación de T14 con la gravedad del deterioro cognitivo (según se mide por PACC) en transferencia Western para los 20 pacientes de control del estudio AIBL (pacientes con Amiloide negativo, BeCKeT < 1.4), y la Figura 7B muestra la correlación de T14 con la gravedad del deterioro cognitivo (según se mide por MMSE) en transferencia Western para el subconjunto de 20 pacientes con AD/MCI (amiloide positivo, BeCKeT > 1.4). La pendiente MMSE más negativa indica una progresión más rápida del deterioro cognitivo;

La Figura 8 muestra la correlación entre los niveles de T14 con la puntuación MMSE para toda la cohorte AIBL, separada en la puntuación MMSE anterior 26 para A) T14 agregado, B) T14 soluble; entre puntuación MMSE 20-25 para C) T14 agregado, D) T14 soluble; puntuación MMSE inferior a 20 para E) T14 agregado, F) T14 soluble; registrada en el momento de la recolección de sangre. Los puntos destacados en amarillo indican significancia estadística;

La Figura 9 es un modelo de un posible análisis de sangre de rutina desde la cuantificación de T14 hasta la predicción del deterioro cognitivo;

La Figura 10 muestra los datos de WB generados a partir del análisis de muestras de NeuroScios Clinic, Austria, y muestra la correlación entre el cambio en el valor de T14 y la tasa de cambio de MMSE en 22 pacientes probables con AD de la cohorte austriaca;

Las Figuras 11-33 muestran datos generados utilizando una base de datos agrupada con pacientes de AIBL, Suecia y Austria. El análisis que involucra la edad solo incluye datos de la cohorte de AIBL austriaca, y el análisis que involucra el MMSE incluye datos de la cohorte de AIBL, austriaca y sueca. La Figura 11 muestra un diagrama de caja y bigotes de fuentes de bancos de datos. Caja = percentil 25-75, rombo = media, línea horizontal = mediana. Los grupos parecen razonablemente comparables;

La Figura 12 muestra un diagrama de caja y bigotes de grupos de Demencia, que parecen razonablemente comparables;

La Figura 13 muestra un diagrama de caja y bigotes de grupos de Edad. Hay pequeñas diferencias en las distribuciones. T14 parece aumentar con la edad, pero la variabilidad también aumenta con la edad;

La Figura 14 muestra un diagrama de caja y bigotes de grupos MMSE. Parece haber pequeñas distribuciones;

La Figura 15 muestra un diagrama de correlación de Sujetos con AD: Correlación T14 versus Edad;

La Figura 16 muestra un diagrama de correlación de Sujetos Normales: Correlación T14 versus Edad;

La Figura 17 muestra un diagrama de correlación de Sujetos con AD: Correlación T14 versus MMSE;

La Figura 18 muestra un diagrama de correlación de Sujetos Normales: Correlación T14 versus MMSE;

La Figura 19 muestra T14 de Ajuste de Modelo ANCOVA versus Edad por Grupo de Demencia. Este gráfico puede indicar una diferencia cuantitativa consistente en T14 entre los grupos de Demencia (casi paralela) en diferentes edades. Los valores de T14 son más altos en el grupo Normal que en el grupo AD. Los valores T14 aumentan en general con la Edad;

La Figura 20 muestra T14 de Ajuste de Modelo ANCOVA versus MMSE por Grupo de Demencia. Este gráfico puede indicar diferencias cuantitativas entre Grupos con puntuación MMSE recopilada en las estadísticas del modelo ANCOVA: los valores T14 son más altos en el grupo Normal. Los valores de T14 son en general más bajos con un MMSE más alto;

La Figura 21 muestra las Diferencias Generales del Grupo: Medias Ajustadas (+/-95 % de CI). Diferencia de medias ajustada (95 % de CI) entre AD-Control = -0.10 (-1.8 a -0.02). (La relación de AD/Control expresada como porcentaje fue del 90.0 % (84.4 % a 96.0 %), lo que representa una diferencia entre los dos grupos del 10 %). Se observaron diferencias consistentes con T14 transformado logarítmicamente utilizando log ANCOVA y también utilizando la prueba CMH. Se notaron diferencias significativas entre AD-Control para el grupo de edad de 70-79 años;

La Figura 22 muestra las Diferencias de Grupo de acuerdo con la Edad: Medias Ajustadas (+/-95 % de CI);

La Figura 23 muestra la Distribución: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: en general;

La Figura 24 muestra el Análisis ROC: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: en general. Utilizando el máximo Youden J ($J=1.17$) para identificar la precisión máxima, la sensibilidad fue del 64.2 % y la especificidad del 53.1 %, lo que produjo un 'punto de corte' diagnóstico de 1.008;

La Figura 25 muestra el Análisis ROC: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: en general con la Edad. NB: El AUC aumentó de 0.58 a 0.63;

La Figura 26 muestra la Distribución: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: mayores de 50 años;

La Figura 27 muestra el Análisis ROC: Sujetos Clasificados con AD versus Normales – mayores de 50 años;

La Figura 28 muestra la Distribución: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: mayores de 60 años;

La Figura 29 muestra el Análisis ROC: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: mayores de 60 años;

La Figura 30 muestra la Distribución: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: mayores de 70 años;

La Figura 31 muestra el Análisis ROC: Sujetos Clasificados con AD versus Normales: mayores de 70 años;

La Figura 32 muestra la Distribución: Sujetos Clasificados con AD Versus Normales: mayores de 80 años;

La Figura 33 muestra el Análisis ROC: Sujetos Clasificados con AD Versus Normales: mayores de 80 años; y

La Figura 34 muestra un diagrama de barras de variantes de T14 de 5-14 meros del extremo C cubierto con Lisina (K), es decir, la SEQ ID No:3 (conc. 150 nM).

Ejemplos

Dado que tanto la incidencia como la prevalencia de la AD aumentan con la edad, el número de pacientes aumenta significativamente con el envejecimiento de la población. Desafortunadamente, actualmente no existe ninguna prueba única que se pueda administrar para diagnosticar la Enfermedad de Alzheimer, y su clasificación clínica se basa en una combinación de informes subjetivos, evaluación de la historia médica, pruebas de función cognitiva y costosos escaneos de formación de imágenes cerebrales, sin que sea posible una verdadera clasificación hasta que se pueda realizar un examen post mortem del cerebro. La identificación de un biomarcador que permita la detección de la AD con un alto grado de especificidad y sensibilidad a partir de un procedimiento rentable, no invasivo y fácilmente repetible tal como la recolección de sangre, permitiría el cribado sistemático, intervención temprana y potencialmente revolucionaría la investigación neuropatológica al abrir la ruta para nuevas estrategias de intervención.

Los inventores presentan en el presente documento un péptido derivado del terminal C de la acetilcolinesterasa (AChE), que está presente como una molécula bioactiva de origen natural en el tejido cerebral. Este péptido se denomina T14 (SEQ ID No:3). El documento WO 2016/156803 describe que un anticuerpo generado contra este péptido de terminal C puede reconocer y cuantificar selectivamente esta molécula de señalización innata en tejido cerebral humano y de rata mediante un inmunoensayo ELISA indirecto o una técnica de transferencia Western. Ahora, empleando los mismos procedimientos, los inventores han correlacionado los niveles variables de T14 con la edad, y muestran que se puede utilizar como un predictor cuantitativo o biomarcador de la tasa de deterioro cognitivo. También han demostrado que los fragmentos de T14 (por ejemplo, T7-T13) también se pueden detectar y utilizar como un biomarcador potente. Los inventores evaluaron el T14 utilizando plasma de tres fuentes distintas: 1) Australian Imaging Biomarker & Lifestyle (AIBL). 2) NeuroScios Clinic, Austria. 3) Biobank Sverige, Suecia.

Ejemplo 1: cohorte de AIBL: Detección del péptido T14 en muestra utilizando un anticuerpo en ELISA

Utilizando ELISA, que detecta T14 soluble, los inventores han analizado muestras de plasma humano que correlacionan concentraciones variables de T14 con la edad.

Materiales y métodos

ELISA para anticuerpo del péptido T14

Las curvas estándar y las muestras se procesaron por triplicado. Las muestras de plasma se diluyeron 1:10,000 en tampón PBS. La curva estándar para la determinación del péptido T14 en muestras de tejido cerebral que se diluyeron en tampón PBS. La curva estándar varió desde 8 hasta 100 nM de T14, y el blanco fue tampón PBS solo. Brevemente,

se recubrieron inmunoplaacas de 96 pocillos (NUNC) con 100 µl/pocillo de muestra o T14 estándar, se cubrieron con parapelícula y se incubaron durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró la muestra al agitar la placa sobre un fregadero con agua corriente y se agregaron 200 µl de la solución de bloqueo que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 2 % en solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TBS-T) y se incubaron durante 4 h a temperatura ambiente. Luego se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 100 µl de anticuerpo (descrito en el documento WO 2016/156803), diluido en solución de bloqueo a 1 µg/ml, y se incubó durante la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se eliminó al día siguiente y los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µl de TBS-T. Después se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario conjugado con enzima (ver documento WO 2016/156803) diluido en solución de bloqueo a 0.1 µg/ml y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente; la placa se cubrió con parapelícula durante todas las incubaciones. Después de 2 h, la placa se lavó 4 veces con TBS-T. La adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina inició la reacción de color. La reacción se detuvo 20 min después con una solución de parada que contenía H₂SO₄ 2 M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Versamax (Molecular Devices, Wokingham, Reino Unido).

Cálculo del deterioro cognitivo a través de datos del MMSE longitudinales.

Se utilizaron medidas repetidas de la puntuación MMSE, como se recolectó por el estudio AIBL en intervalos de 18 meses, para calcular una tasa de deterioro cognitivo para cada paciente individual. Brevemente, se realizó una regresión lineal para calcular la pendiente del cambio en la puntuación MMSE a lo largo del tiempo. Esta pendiente se interpreta como la tasa de cambio cognitivo (deterioro/aumento).

Resultados y discusión de ELISA

Los inventores obtuvieron una cohorte inicial de 40 pacientes y luego una segunda cohorte de 160 pacientes proporcionada por el Australian Imaging Biomarker & Lifestyle (AIBL). Con referencia a la Figura 3 (gráfico superior), el análisis de la cohorte completa de 160 pacientes proporcionado por el estudio AIBL muestra que la distribución de los valores en la cohorte grande, determinada mediante el cálculo del contenido de T14, según se deriva de una curva estándar del péptido exógeno en PBS, sigue una distribución normal (prueba de normalidad general de D'Agostino y Pearson $P = 0.0929$). Esta distribución de la curva de Bell permite que el análisis de las muestras se base en una serie de grupos discretos que se describen por su distribución alrededor de la media.

Todas las muestras que están dentro de la desviación estándar de la media se consideran en el grupo "medio" (niveles medios de T14). Todas las muestras por debajo de la media se consideran en el grupo T14 "bajo", mientras que todas las que están por encima de la media se consideran en el grupo T14 "alto". Estas descripciones se aplican a aquellos valores que están dentro del grupo medio (dentro de la desviación estándar de la media) y también se extienden más allá de este grupo. Utilizando este método, los inventores han definido cuatro grupos discretos: Bajo, Medio-Bajo, Medio-Alto y Alto, en base a la distribución de valores.

La normalidad de la distribución es válida para ambas cohortes cuando se toman como un todo (ver Figura 3A) y para la cohorte original de 40 pacientes (ver Figura 3B).

Las muestras de AIBL se suministraron en dos cohortes: una primera cohorte que contenía 40 pacientes (20 de control, 2 con MCI, 18 con AD) y la segunda cohorte que contenía 120 pacientes. En la primera cohorte de 40 pacientes, la clasificación clínica de cada sujeto está determinada por su puntuación BeCKeT derivada de escaneos de formación de imágenes de amiloide. Todos los sujetos con una puntuación BeCKeT <1.4 se definen como "Control" y todos los sujetos con una puntuación BeCKeT >1.4 se definen como "AD". Con referencia a la Figura 4A, se muestran los resultados del análisis ELISA de sujetos de control. Los sujetos de control no muestran ninguna tendencia asociada con los niveles de T14.

La Figura 4B, sin embargo, muestra el mismo análisis para aquellos sujetos clínicamente clasificados como AD/MCI (Deterioro cognitivo leve). Este subconjunto de pacientes muestra una tendencia que sugiere que los niveles más bajos de T14 se asocian con una tasa más rápida de deterioro cognitivo que aquellos con niveles más altos de T14. La tendencia parece ser continua entre los grupos con cada grupo, en niveles crecientes de T14, que muestra un deterioro cognitivo menos severo que el grupo inmediatamente inferior.

Con referencia a la Figura 5A, el análisis de regresión de toda la cohorte de 160 sujetos que comparan los niveles de T14 con la edad muestra una correlación positiva significativa con la edad. Cuando las cohortes se dividen por su estado clínico (según lo determinado por los niveles de beta amiloide/puntuación BeCKeT), como se muestra en la Figura 5B, los controles (que incluyen NMC y SMC) conservan una correlación positiva significativa con la edad ($R^2 = 0.1068$, $p=0.0009$), mientras que la porción de AD/MCI de la cohorte no muestra correlación significativa con la edad ($R^2 = 0.01103$, $p=0.4244$). Esta separación de las cohortes basada en la edad puede ofrecer parámetros de riesgo de deterioro cognitivo relacionados con la edad que se determinarán con una prueba serológica más discriminadora.

Ejemplo 2: cohorte de AIBL: Detección del péptido T14 en muestra utilizando un anticuerpo en transferencia Western

Dado que T14 es detectable en varios pesos moleculares diferentes dentro del rango de la transferencia Western al sondear membranas de transferencia Western con el anticuerpo T14, se seleccionó para el análisis la banda de 50

kDa ya que tiene el rango más dinámico de modulación de señal. El objetivo de este experimento fue evaluar, utilizando transferencia Western, cómo la especie T14 endógena refleja la patología de la AD y su potencial como biomarcador de la AD. Los niveles de agregados de péptidos se midieron inicialmente en áreas del cerebro humano y en el CSF para establecer el comportamiento de los péptidos en el SNC. Lo más importante es que los niveles de agregados de péptidos en el plasma sanguíneo se midieron utilizando transferencia Western y esto se vinculó posteriormente con la función cognitiva del paciente para demostrar una relación correlativa.

5 Materiales y métodos

10 Medición de la concentración de la muestra de proteínas

Las concentraciones de proteínas de las muestras anteriores se midieron utilizando el Ensayo de Proteínas Pierce™ de 660 nm (Thermo Scientific). En resumen, se realizó una dilución en serie (0 a 2 mg/ml) a partir de una solución madre de 10 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA). Se prepararon tres réplicas de cada concentración de BSA al transferir 10 µl de la proteína a una placa transparente de 96 pocillos (Greiner). Luego, las muestras se diluyeron con tres concentraciones (1:1, 1:2, 1:10) y se colocaron tres réplicas de cada concentración en la misma placa de 96 pocillos, conteniendo cada réplica 10 µl de muestra. Posteriormente, se agregaron 150 µl de Reactivo de Pearce a los estándares y todas las muestras y la mezcla se dejaron incubar durante 5 min con agitación suave. Finalmente, la placa se leyó sobre un espectrofotómetro (Molecular Devices) a 660 nm. Las concentraciones de proteína de las muestras se determinaron utilizando la pendiente y la intersección con el eje y de la curva estándar de BSA, ambas calculadas a través de Microsoft Excel.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras de proteínas

25 Geles de poliacrilamida (geles mini-PROTEAN® sin manchas TGX™, BIO-RAD) se colocaron en el tanque de electroforesis (BIO-RAD, mini-PROTEAN tetra system) y se agregó tampón de procesamiento (base TRIS 25 mM, pH 8.6, glicina 192 mM, SDS al 0.1 %) al gel y los reservorios del tanque (BioRad). Las muestras de proteínas se prepararon al mezclarlas con agua destilada y 4 × tampón de muestra Laemmli (concentraciones finales: TRIS-HCl 69.5 mM, pH 6.8, LDS al 1.1 %, glicerol al 11.1 % (p/v), azul de bromofenol al 0.005 %, BIO-RAD) y mercaptoetanol al 30 2.5 % (BIO-RAD). Las mezclas se calentaron a 95 °C durante 5 min antes de enfriarlas en hielo. Las muestras y el control positivo se cargaron en los geles y se sometieron a electroforesis junto con un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Estándares Dual Xtra, BIO-RAD) a 35 mV durante 90 min. Se colocó un bloque de hielo dentro del tanque en funcionamiento para evitar cualquier sobrecalentamiento.

35 Transferencia de muestras de proteínas a membrana de PVDF.

Los geles apilados se recortaron y los geles de separación se transfirieron a una Membrana de Transferencia de PVDF (Thermo Scientific) en una Celda Mini Transblot (BIO-RAD). Brevemente, la Membrana de Transferencia de PVDF se activó al sumergirla en metanol durante 1 min y luego al sumergirla en agua destilada durante 2 min. Posteriormente, todas las capas se saturaron con tampón de transferencia (base TRIS 20 mM pH 8.6, glicina 154 mM, SDS al 0.8 % p/v y metanol al 20 %). El sándwich de transferencia, en orden de abajo hacia arriba, consiste en una esponja de transferencia, papel secante, el gel, Membrana de Transferencia de PVDF, el papel secante y la esponja de transferencia se colocaron en un casete de transferencia, que se insertó en la Celda Mini Transblot llena con Tampón de Transferencia. Finalmente, la transferencia electroforética se realizó durante 90 min a 200 mA. Se colocó un bloque de hielo dentro del tanque de transferencia para evitar cualquier sobrecalentamiento.

Tinción de membrana de PVDF.

Se utilizó BLOT-Faststain™ (G-Biosciences, EE. UU.) para teñir la proteína total, actuando como control de carga. Inmediatamente después de la transferencia electroforética, la membrana de transferencia de PVDF se tiñó con solución fijadora BLOT-Faststain™ diluida (10 veces) durante 2 min con agitación suave. Luego se incubó la membrana con la solución reveladora BLOT-Faststain™ diluida (4 veces) durante 1 min con agitación suave. Posteriormente, la membrana se almacenó a 4 °C en la oscuridad en la solución reveladora durante 30 min para permitir que las bandas de proteínas alcanzaran la máxima intensidad. Finalmente, la membrana se lavó con agua fría para eliminar la tinción de fondo y se tomaron imágenes utilizando la caja G (Syngene). Luego, la membrana se puede decolorar con agua desionizada tibia (40-45 °C) y dejarla lista para el estadio de bloqueo.

Detección de bandas de proteínas

60 La membrana de transferencia de PVDF se bloqueó en TBS (solución salina tamponada con TRIS, base TRIS 20 mM pH 7.5, NaCl 0.5 mM) que contenía leche desnatada en polvo al 5 % durante 1 h, luego se lavó dos veces durante 7 min cada una en TTBS (TBS suplementado con 0.05 % v/v de Tween-20). La membrana se incubó durante la noche a 4 °C con un anticuerpo primario diluido en TTBS que contenía leche desnatada en polvo al 1 %. Al día siguiente, se eliminó el anticuerpo primario. La membrana se lavó tres veces durante 5 minutos cada una en TTBS, y luego se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario de elección depende del tipo de anticuerpo primario utilizado. Puede ser un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado

con HRP (a9309, Sigma, diluido en TTBS que contiene leche desnatada en polvo al 1 % (concentración de trabajo: 1:1000) o anticuerpo secundario anticonejo de cabra conjugado con HRP (ab6721, abcam) diluido en TTBS que contenía leche desnatada en polvo al 1 % (concentración de trabajo: 1:5000). Después de la incubación secundaria del anticuerpo, las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos en TTBS antes de un lavado final de 10 minutos en TBS. Las bandas de proteínas se detectaron utilizando la caja G (Syngene).

Tabla 1 - Anticuerpos primarios utilizados para la detección por transferencia Western

Anticuerpo	Especies criadas en	Compañía	Número de catalogo	Conc. de trabajo.
Anti-T14	Conejo	Neuro-Bio/ Genosphere	N/A	1:1000
Beta anti-amiloide	Conejo	Cell Signalling Technology	8243	1:1000
Anti-P-Tau	Ratón	Termo Fisher	MN1020	1:1000

Formación de imágenes de bandas de proteínas y análisis de datos

La membrana de PVDF se colocó en la caja G (Syngene). Las configuraciones de enfoque y zoom se ajustaron para garantizar que la membrana estuviera en su punto más grande en el centro de la pantalla. Se mezclaron soluciones de Luminol y Peróxido de sustrato Western ECL Clarity™ (BIO-Rad) en partes iguales y se aplicaron a la membrana. Las imágenes se tomaron en la oscuridad a intervalos de 1 minuto durante 5 minutos para obtener la señal óptima para las bandas de proteínas. A continuación, la membrana se expuso a luz blanca utilizando un ajuste automático para obtener una imagen de la escalera molecular. Luego las imágenes de transferencia se analizaron utilizando la imagen J. Se colocaron cajas de tamaños iguales alrededor de las bandas de proteínas en cada carril, lo que permitió la medición de las intensidades de las bandas de proteínas. Luego se restó el fondo de las intensidades de las bandas y los resultados se analizaron en Microsoft Excel y el software Graphpad.

Extracción de anticuerpos para volver a sondear

La señal de proteína de la membrana de transferencia de PVDF se puede extraer y volver a analizar para una proteína diferente. Brevemente, la membrana se lavó con tampón de extracción suave (glicina 200 mM, SDS 3.5 mM, Tween-20 al 1 % v/v, pH 2.2) dos veces durante 10 min cada uno. Posteriormente, la membrana se lavó con PBS dos veces durante 10 min cada una y luego se lavó con TTBS dos veces durante 5 min cada una. Se agregó sustrato Western ECL Clarity™ (BIO-Rad) a la membrana y se tomaron imágenes utilizando la Caja G (Syngene) para verificar las señales de proteínas residuales. Si la señal residual era demasiado fuerte, se repetía todo el proceso de extracción. Luego, la membrana estaba lista para el estadio de bloqueo posterior y el sondeo del anticuerpo primario (ver anteriormente).

MMSE

MMSE (Mini Examen del Estado Mental) es un cuestionario que se administra prácticamente universalmente en personas con sospecha de AD, y en cohortes de estudio más amplias, como medida del deterioro cognitivo. Se considera ampliamente un estándar de oro para el diagnóstico de la AD debido a su facilidad de aplicación que requiere poca capacitación, repetibilidad, validez y confiabilidad. También es particularmente útil cuando se considera la evaluación longitudinal de la AD y su progresión.

Resultados y discusión para transferencia Western

Los inventores obtuvieron una cohorte inicial de 40 pacientes proporcionada por el Australian Imaging Biomarker & Lifestyle (AIBL), que contenía 20 controles, 2 MCI, 18 AD. La afección clínica se clasificó mediante formación de imágenes de PET con amiloide, con una puntuación BeCKeT ≥ 1.4 que se define como AD.

Los niveles de T14 se midieron utilizando transferencia Western, se normalizaron a la proteína total (el control de carga) y se separaron en sujetos de control y con MCI/AD. Posteriormente, los valores de T14 se clasificaron de bajo a alto para los sujetos de control y con AD y se dividieron en cuartiles estadísticos de tal manera que haya cuatro grupos de valores. El grupo "bajo" se encuentra por debajo del cuartil inferior; el grupo "medio bajo" se encuentra entre el cuartil inferior y la mediana, el grupo "medio alto" se encuentra entre la mediana y el cuartil superior y el grupo "alto" se encuentra por encima del cuartil superior.

A continuación, utilizando datos longitudinales, se calculó la tasa de deterioro cognitivo utilizando dos pruebas cognitivas independientes: MMSE y PACC. Luego se agruparon dependiendo de su afección clínica y el subgrupo al que pertenecen en base a sus valores de T14. Con referencia a la Figura 6A, en los sujetos de control, no hay asociación entre el nivel de T14 y la tasa de deterioro medida por MMSE. Sin embargo, en pacientes con AD, con referencia a la Figura 6B, el nivel más bajo de T14 se asocia con el deterioro cognitivo más lento y la tasa del deterioro aumenta gradualmente con el aumento del nivel de T14 con el grupo de T14 más que exhibe el deterioro más rápido medido por MMSE.

Otra prueba cognitiva que puede medir el deterioro relacionado con el amiloide se conoce como PACC (Compuesto Cognitivo de Alzheimer Preclínico). PACC combina pruebas que evalúan la memoria episódica, la función ejecutiva cronometrada y la cognición global. Es la medida de resultado primaria para el primer ensayo clínico en AD preclínica. Con referencia a la Figura 7A, la evaluación por transferencia Western de la cohorte original de 40 pacientes mostró que no existe asociación entre los niveles de T14 en los pacientes de control y la tasa de deterioro de PACC. Sin embargo, en la Figura 7B, para los pacientes con AD, los niveles altos de T14 se asocian con un deterioro más rápido. Por lo tanto, se muestra un patrón similar a los resultados del MMSE cuando se utilizaron las puntuaciones PACC para medir el deterioro cognitivo. La Figura 7A muestra que los sujetos de control no exhiben asociación entre los niveles de T14 y la tasa de deterioro cognitivo, mientras que la Figura 7B demostró la fuerte asociación entre los niveles de T14 y la tasa de deterioro cognitivo.

La tasa de deterioro cognitivo se determina como la tasa de cambio en la puntuación MMSE a lo largo del tiempo. El estudio AIBL abarca la recopilación de datos en intervalos de 18 meses, con una variedad de duraciones de participación dentro de la cohorte. La pendiente (cambio en MMSE) se calculó para cada caso individual. Las pendientes más negativas indican un deterioro cognitivo más rápido a lo largo del estudio, mientras que una pendiente positiva indica un aumento en la capacidad cognitiva a lo largo del estudio.

Como las clasificaciones clínicas en esta cohorte están determinadas por sus valores relativos en la escala BeCKeT, se deduce que la formación de imágenes de amiloide podría desempeñar una función complementaria en la previsibilidad del deterioro cognitivo, en conjunto con la determinación de los niveles circulantes de T14 en plasma.

Ejemplo 3: cohorte de AIBL: Desarrollo de un análisis de sangre para detectar y tratar la enfermedad de Alzheimer

Reuniendo sus conclusiones basadas en los datos discutidos en los Ejemplos 1 y 2, los inventores han desarrollado una nueva prueba médica para detectar y tratar el Alzheimer, y se muestra un esquema en la Figura 9. El modelo utiliza una combinación de niveles de T14 ajustados por edad y formación de imágenes de beta amiloide para predecir la tasa probable de deterioro cognitivo que desarrollará un paciente, de la siguiente manera:-

1) Etapa 1: se realiza una prueba de sangre del sujeto (por ejemplo, realizado por su médico o enfermero) y luego se detectan las concentraciones de T14 soluble y/o agregado utilizando ELISA y/o transferencia Western. Como lo muestra ELISA, los niveles de T14 soluble exhibieron dependencia de la edad para los sujetos de control, para pacientes con AD;

2) Etapa 2: los niveles de T14 medidos luego se comparan con las concentraciones relacionadas con la edad esperadas, por ejemplo al comparar el grado de separación entre las líneas verde y negra mostradas en la Figura 5B). Si no se detecta ninguna desviación (es decir, hay poca o ninguna separación entre las líneas verde y negra mostradas en la Figura 5B), se puede suponer que el sujeto está sano y tiene poco riesgo de desarrollar una tasa más alta de deterioro cognitivo. Sin embargo, si se detecta alguna desviación (es decir, hay separación entre las líneas verde y negra mostradas en la Figura 5B), entonces se debe llevar a cabo la siguiente etapa;

3) Etapa 3: la detección de amiloide se lleva a cabo utilizando un escaneo PET de amiloide. Si no se detecta amiloide (refiérase a las puntuaciones MMSE o PACC, etc.), entonces el sujeto está sano y tiene poco riesgo de desarrollar una tasa más alta de deterioro cognitivo. Sin embargo, si se detecta amiloide, se avanza a la etapa final del diagnóstico;

4) Etapa 4: dependiendo de sus niveles de T14 soluble y agregado, es posible predecir la tasa de deterioro cognitivo utilizando el cuadro de la Figura 9 y referir al sujeto a tratamiento si es necesario;

5) Etapa 5: se recomendaría el tratamiento terapéutico para sujetos que muestren propensión a desarrollar altas tasas de deterioro cognitivo en la vida futura.

Ejemplo 4: cohorte de AIBL: Valor discriminatorio de los niveles de T14 entre grupos MMSE (transferencia Western + ELISA)

Objetivo estadístico

Los inventores investigaron la capacidad de los niveles de T14 (medidos utilizando transferencia Western y ELISA) para diferenciar entre los grupos MMSE clasificados de manera diferente (Normales (MMSE $\geq$ 26) versus Deterioro Cognitivo (MMSE $<$ 26)).

Datos

Los datos de las cohortes 1 y 2 de AIBL (160 muestras) se agruparon con sujetos clasificados como Normales, Leves o con deterioro cognitivo Moderado/Grave de acuerdo con la puntuación MMSE (como anteriormente).

Métodos

Luego se utilizaron curvas de Características Operativas del Receptor (ROC) que emplean regresión logística múltiple para modelar la probabilidad (logaritmo de probabilidades) de deterioro cognitivo en el rango de 'puntos de corte' de T14 para evaluar el valor de los ensayos WB y ELISA.

5 Resultados

Con referencia a la Figura 1, las curvas ROC muestran que los métodos WB y ELISA por separado son razonablemente sensibles y específicos para detectar el deterioro cognitivo en los dos grupos de MMSE. Sin embargo, cuando los valores de T14 para ambos métodos se utilizan juntos en el modelo, la sensibilidad y la especificidad se mejoran (AUC WB+ELISA = 0.732, AUC WB = 0.6877, AUC ELISA = 0.6522). Los inventores se sorprendieron al observar que la precisión de la prueba con las medidas combinadas fue 80 % sensible y 75 % específica.

Conclusiones

Los dos métodos de ELISA y transferencia Western pueden funcionar de manera complementaria al evaluar su capacidad para discriminar entre sujetos normales y con deterioro cognitivo según lo definido por los grupos MMSE (leve/moderado/grave).

La Figura 8 muestra la correlación entre los niveles de T14 con la puntuación MMSE en todas las muestras de AIBL, separadas en puntuación MMSE >26 para (A) T14 agregado, (B) T14 soluble; puntuación MMSE entre 20-25 para C) T14 agregado, D) T14 soluble; puntuación MMSE inferior a 20 para E) T14 agregado, F) T14 soluble; registrado en el momento de la recolección de sangre. Los puntos destacados en amarillo indican una clara significación estadística.

Conclusiones

La Figura 2 muestra las puntuaciones del MMSE en relación con la progresión de la enfermedad, y muestra claramente la no linealidad de las puntuaciones del MMSE con el deterioro progresivo. Los pacientes con deterioro cognitivo grave (es decir, puntuación MMSE <20) exhibieron una fuerte correlación entre los niveles de T14 (agregados y solubles) y el grado de disfunción cognitiva. No se encontraron dichas correlaciones para pacientes con deterioro leve (puntuación MMSE de 20-25) y sujetos de control sanos (puntuación MMSE >26). Sin embargo, los ensayos descritos en el presente documento han demostrado ser sensibles y potencialmente cuantitativos para pacientes con deterioro cognitivo grave, ya que los valores de P muestran que las correlaciones entre las puntuaciones individuales y los niveles de T14 (medidos de dos maneras, es decir, con tanto WB como ELISA) son significativas en solo 19 pacientes. Dado que las puntuaciones del MMSE no muestran una progresión lineal, podría ser que la falta de significancia en los sujetos más sanos/estadios más tempranos de la enfermedad se deba a una falta de sensibilidad del MMSE en el rango más alto de puntuaciones.

Por lo tanto, estos datos corroboran los datos del ensayo de T14, confirmando de esta manera que los niveles de T14 (soluble y/o agregado) se pueden utilizar de manera confiable para predecir si un sujeto de prueba sufrirá o no deterioro cognitivo en años posteriores, mucho antes de que muestre algún síntoma, como ocurre actualmente utilizando la puntuación MMSE. Esto significa que los métodos descritos en el presente documento que detectan T14 se pueden utilizar como una prueba de alerta temprana, de tal manera que se puedan tomar medidas positivas para reducir el riesgo de deterioro cognitivo (por ejemplo, dieta, elecciones de estilo de vida) y la administración de terapias, según corresponda.

Resumen

Actualmente no existe ninguna prueba de sangre con biomarcadores aceptada para la neurodegeneración. Con referencia a las Figuras 1-9, el trabajo descrito en el presente documento resume el análisis de 160 muestras de plasma ensayadas para detectar el péptido T14 novedoso de 2 cohortes proporcionadas por separado por el estudio Australian Imaging, Biomarkers and Life (AIBL) y que comprende los siguientes casos de pacientes: amiloide negativo de control, amiloide positivo de control, deterioro cognitivo leve, sin quejas de memoria y quejas de memoria subjetiva tanto negativas como positivas para amiloide. Los inventores ensayaron las muestras de plasma proporcionadas para detectar T14 utilizando dos métodos basados en anticuerpos desarrollados de manera diferente (transferencias Western y ELISA). Las investigaciones exploratorias iniciales de la relación entre los niveles de T14 del sujeto y el posible deterioro cognitivo correspondiente utilizando la prueba Mini Examen del Estado Mental (MMSE) mostraron una correlación razonable en general, pero particularmente durante su fase más sensible (puntuaciones <20). Luego se investigó la relación (es decir, las diferencias) entre los grupos de sujetos MMSE y los niveles de T14 (utilizando métodos de transferencias Western y ELISA), al igual que el valor discriminatorio del ensayo de T14 utilizando métodos estadísticos no paramétricos y de curva Característica Operativa del Receptor (ROC) respectivamente. Los resultados demuestran claramente que, incluso con un tamaño de muestra tan pequeño, los ensayos T14 realmente son prometedores inicialmente para distinguir entre los diferentes grupos con deterioro cognitivo.

Por lo tanto, para resumir, los inventores han desarrollado la primera prueba objetiva para predecir si o no un sujeto es propenso a desarrollar una mayor tasa de deterioro cognitivo en comparación con un individuo normal, sano, como resultado de desarrollar un trastorno neurodegenerativo. El uso del biomarcador cuantitativo T14 permite la detección

con fiable de tasas más altas de deterioro cognitivo causado por trastornos neurodegenerativos con un alto grado de especificidad y sensibilidad a partir de un procedimiento no invasivo, fácil de repetir y rentable, tal como la recolección de sangre, y por lo tanto permite el cribado de rutina, y la intervención temprana con tratamiento terapéutico. Los inventores han mostrado que es posible medir de forma fiable los niveles de T14 soluble utilizando ELISA y los niveles de T14 agregado utilizando transferencia Western. Estas dos técnicas complementarias, que se pueden llevar a cabo de forma independiente o combinadas, proporcionan una imagen completa de cómo pueden cambiar los niveles de T14 en pacientes con AD.

Ejemplo 5: cohorte de Austria: Evaluación de la correlación entre el cambio en los niveles de T14 y la tasa de cambio de MMSE utilizando transferencia Western

Con referencia a la Figura 10, se muestra la correlación entre el cambio en el valor de T14 y la tasa de cambio del MMSE en 22 pacientes probables para AD de la cohorte austriaca.

Conclusiones

- La cohorte austriaca contiene plasma de 119 pacientes probables para AD y 26 pacientes posibles para AD. Cada paciente individual tiene de 1 a 6 muestras de plasma secuenciales y las muestras se toman cada 6 meses después de la primera ronda de muestreo (conocida como valor inicial). También se realizaron pruebas MMSE cada vez que se tomaban muestras de plasma.

- Hasta el momento, se probaron muestras secuenciales de plasma de 22 de 119 pacientes probables para AD para detectar T14 utilizando transferencia Western.

- Se detectaron seis bandas de T14, al igual que en la cohorte de AIBL, y se cuantificaron todas las bandas de T14 para cada paciente. Posteriormente, los valores se normalizaron frente al valor T14 de un control externo sano de 40 años.

- Los resultados mostraron que los cambios en los valores de T14 para 22 pacientes probables para AD se correlacionan significativamente con su tasa correspondiente de cambios en el MMSE a partir de los valores iniciales (ver Figura 10).

Ejemplo 6 – La prueba de diagnóstico T14 ELISA normalizó T14 utilizando una base de datos agrupada con pacientes de AIBL, Suecia y Austria

1) Resúmenes de valor inicial

Se combinaron los datos normalizados de T14 de los tres bancos de datos y los sujetos se categorizaron como Normal o con AD. Los sujetos normales se categorizaron de los sujetos clasificados NMC, SMC, CN en la base de datos de AIBL, AD (posibles) en la base de datos AUSTRIACA y Controles en la base de datos de SUECA. Todos los sujetos con AD se definieron como AD o probables con AD. Estuvieron disponibles un total de 421 sujetos con datos de valor inicial.

Nuevamente la Edad (50-59, 60-69, 70-79, ≥ 80 años, etiquetada como ≥ 50 años, ≥ 60 años, ≥ 60 años, ≥ 70 años, ≥ 80 años) y MMSE (< 10 , 10-19, 20-25, ≥ 26) se categorizó como se definió previamente. NB: La información MMSE estaba disponible para los datos suecos, pero no había información sobre la edad. Por lo tanto, los análisis posteriores que involucran MMSE o condiciones clínicas incluyen datos de las tres fuentes; sin embargo, el análisis que involucra la edad solo se lleva a cabo utilizando el conjunto de datos de AIBL y austriaco.

Tabla 2 - Resumen general por grupo de demencia

	T14 normalizado con Elisa					
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Estándar	N
AD	1.000	0.941	0.495	3.004	0.350	229
Normal	1.068	1.021	0.370	2.608	0.348	192
Todo	1.031	0.972	0.370	3.004	0.350	421

Tabla 3 - Resumen general por edad y grupo MMSE

	T14 normalizado con Elisa					
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Estándar	N
Edad (años)						
Edad ≥ 50 años	0.896	0.887	0.707	1.349	0.181	12
Edad ≥ 60 años	1.034	0.944	0.595	2.420	0.351	55
Edad ≥ 70 años	1.032	0.987	0.370	2.608	0.313	155
Edad ≥ 80 años	1.158	1.024	0.700	3.004	0.445	66
Valor inicial categorizado con MMSE	1.064	0.941	0.598	3.004	0.447	54

	T14 normalizado con Elisa					
	Media	Mediana	Mín.	Máx.	Estándar	N
MMSE 10-19 (Moderado)						
MMSE 20-25 Moderado (Leve)	0.974	0.943	0.532	2.608	0.284	101
MMSE <10 (Grave)	1.206	1.420	0.681	1.518	0.458	3
MMSE ≥26 (Normal)	1.111	1.048	0.370	2.679	0.350	130
NB: Números pequeños en el grupo MMSE grave y personas de 50-59 años						

2) Distribuciones de valor inicial

5 Las distribuciones entre los grupos y las posibles covariables se exploran con diagramas de caja y bigotes, como se muestra en las Figuras 11-14.

3) Correlación T14 por grupo de demencia con edad y MMSE

10 La posible relación entre T14, la Edad y el MMS en cada uno de los grupos de sujetos también se ha investigado con diagramas de correlación. Ninguna de las estadísticas de correlación de Pearson indicó una asociación particularmente fuerte ($r < 0.2$), aunque la Edad fue mejor que el MMSE, como se muestra en las Figuras 15-18.

4) Diferencias de grupo

15 La cuantificación de las diferencias en T14 entre los grupos de demencia (AD/Normal), entre los diferentes grupos de Edad y entre el MMSE se analizó mediante ANOVA utilizando solo los efectos principales.

Tabla 4 - Diferencias entre grupos de demencia (ANOVA) - excluyendo valores atípicos

Obs.	Tipo C	LS Media	CL inferior	CL superior	Dif. Prob.
1	AD	0.999	0.954303	1.044963	0.0447
2	Normal	1.068	1.018902	1.117913	-

NB: Diferencia estadísticamente significativa en los niveles de T14 entre los grupos AD y control cuando se excluyeron los valores atípicos.

NB: El nivel de error cuantificado en las repeticiones de muestreo es 0.21, por lo tanto la diferencia observada puede ser un error de medición y no necesariamente un efecto real

20 Tabla 5 - Diferencias entre grupos de demencia (ANOVA) - incluyendo valores atípicos

Obs.	Tipo C	LS Media	CL inferior	CL superior	Dif. Prob.
1	AD	1.031	0.955732	1.107399	0.2247
2	Normal	1.101	1.018227	1.183796	-

NB: No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de T14 entre los grupos con valores atípicos.

Tabla 6 - Diferencia entre grupos de edad (ANOVA)

Obs	xAGEncatc	LS media	CL inferior	CL superior	F Prob
1	Edad ≥ 50 años	0.896	0.696	1.095	0.031
2	Edad ≥ 60 años	1.034	0.941	1.127	.
3	Edad ≥ 70 años	1.032	0.976	1.087	.
4	Edad ≥ 80 años	1.158	1.073	1.243	.

NB: Diferencia estadísticamente significativa en los niveles de T14 entre grupos de edad. Parece haber una tendencia lineal con T14 aumentando con la edad independientemente del grupo de enfermedad. (El nivel de error cuantificado en el muestreo repetido fue de 0.21, por lo que se puede tratar de un efecto real y no de un error de medición)

Tabla 7 - Diferencia de grupo MMSE (ANOVA)

Obs.	xMMSEcatc	LS media	CL inferior	CL superior	F Prob
1	MMSE ≥ 26 (Normal)	1.058	1.010	1.105	0.2067
2	MMSE 20-25 (Leve)	0.983	0.925	1.042	.
3	MMSE 10-19 (Moderado)	1.037	0.953	1.121	.
4	MMSE <10 (grave)	1.206	0.810	1.603	.

NB: No hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de T14 entre los grupos MMSE

25

5) Análisis T14 de las diferencias de grupo con la covariable de valor inicial de edad

La influencia de covariables tales como la edad y el MMSE también se evaluó mediante ANCOVA para evaluar la relación entre T14 y posibles factores pronósticos. Las visualizaciones de las estimaciones del modelo frente a las

covariables de valor inicial para los diferentes grupos son indicadores útiles (suponiendo que el modelo sea razonable). Las estimaciones de T14 previstas por el modelo se presentan frente al valor inicial de acuerdo con los diferentes grupos.

5 Tabla 8 - Modelo ANCOVA con grupo de demencia y covariable de edad: Estadísticas

Fuente	DF	Tipo III SS	Media cuadrática	Valor F	Pr > F
Grupo	1	0.78930078	0.78930078	6.51	0.0112
Edad	1	0.84134171	0.84134171	6.94	0.0089

NB: El grupo nuevamente es estadísticamente diferente más la covariable estadísticamente significativa de la Edad para explicar las diferencias de T14 (como efecto continuo o fijo). No existe una interacción significativa Grupo*Covariable con un efecto tan consistente como se muestra en la Figura 19.

Tabla 9 - Modelo ANCOVA con grupo de demencia y covariable MMSE: Estadísticas

Fuente	DF	Tipo III SS	Media cuadrática	Valor F	Pr > F
Grupo	1	0.52959011	0.52959011	4.34	0.0377
MMSE	1	0.07730034	0.07730034	0.63	0.4263

NB: El grupo nuevamente fue estadísticamente diferente al explicar las diferencias de T14 pero no la covariable del MMSE (ya sea como efecto continuo o fijo). No existe una interacción significativa Grupo*Covariable con un efecto tan consistente como se muestra en la Figura 20.

6) Selección del modelo general

10 De los distintos modelos evaluados se seleccionó un modelo ANCOVA final que incluye Grupo (AD/Normal) como efecto fijo y Edad como covariable continua explicativa (sin interacción). Tanto el Grupo como la Edad contribuyeron estadísticamente de manera significativa al modelo, pero la interacción, cuando se consideró continua, no lo fue. Las estimaciones del modelo de media ajustada (+/-95 % de CI) se presentan gráficamente como en las Figuras 21 y 22, tanto para los Grupos en general como para los efectos de los Grupos de acuerdo con la Edad categorizada.

NB: No se describe en el presente documento, pero se evaluaron otras covariables demográficas (Duración, Educación, Sexo, etc.), pero ninguna resultó informativa.

20 Tabla 10 - Diferencias generales del grupo: Medias ajustadas (+/-95 % de CI)

Obs	Grupo	LS media	CL inferior	CL superior	F Prob
1	Normal	1.115	1.054	1.176	.0089
2	AD	1.009	0.955	1.063	

NB: Diferencia de medias ajustada (95 % de CI) entre AD-Control = -0.10 (-1.8 a -0.02). (La relación de AD/Control expresada como porcentaje fue del 90.0 % (84.4 % a 96.0 %), lo que representa una diferencia entre los dos grupos del 10 %). Se observaron diferencias consistentes con T14 transformado logarítmicamente utilizando log ANCOVA y también utilizando la prueba CMH. Se observaron diferencias significativas entre AD-Control para el grupo de edad de 70-79 años.

Tabla 11 - Diferencias de grupo de acuerdo con edad: Medias ajustadas (+/-IC del 95 %)

	Grupo Obs	EDAD	LS media	CL inferior	CL superior	F Prob
1	Normal	Edad>=50 años	0.864	0.472	1.255	0.0423
2		Edad>=60 años	1.064	0.931	1.197	.
3		Edad>=70 años	1.140	1.060	1.219	.
4		Edad>=80 años	1.106	0.968	1.245	.
5	AD	Edad>=50 años	0.906	0.680	1.132	.
6		Edad>=60 años	1.007	0.881	1.133	.
7		Edad>=70 años	0.936	0.861	1.011	.
8		Edad>=80 años	1.187	1.082	1.292	.

NB: La significancia estadística sólo se refiere a la interacción Grupo* Edad cuando la Edad se considera solo categórica (menos útil en el modelo ya que se utiliza menos información cuando es categórico)

7) Precisión diagnóstica

25 La precisión diagnóstica de T14 para clasificar correctamente a los sujetos como AD o Normales se evalúa utilizando curvas ROC (regresión logística). Los análisis iniciales incluyeron la clasificación de los grupos de sujetos de acuerdo con solo el nivel T14 y luego con la edad agregada como covariable. Los análisis de subgrupos luego involucraron análisis ROC para los cuatro grupos de edad por separado. También se proporcionan histogramas de las distribuciones de T14 por grupo para ayudar a explicar la probable capacidad discriminadora del modelo. En todos los casos, las AUC que indicaron la fuerza de la sensibilidad y la especificidad fueron modestas.

Con referencia a las Figuras 23-33, se muestran curvas de Distribución para T14 en diferentes grupos y subgrupos de sujetos con ROC (Curvas de Recepción de Operador) coincidentes. El modelo de análisis ROC permite especificar

diferentes "puntos de corte" para dicotomizar la clasificación de sujetos en los diferentes grupos definidos y por lo tanto evaluar la precisión de T14 para hacer coincidir correctamente a los sujetos con los grupos clínicamente definidos.

Ejemplo 7 - Detección de T14 y fragmentos T14 para diagnóstico y pronóstico

Los inventores se propusieron determinar si los fragmentos de T14 (AEFHRWSSYMHVHWK, es decir, SEQ ID No:3) también son detectables y pueden actuar como marcadores de diagnóstico o pronóstico utilizados de acuerdo con la divulgación.

Materiales y métodos

Los fragmentos que fueron probados fueron:

(i) SYMHVHWK (SEQ ID No:7, es decir T7);

(ii) SSYMHVHWK (SEQ ID No: 8, es decir T8);

(iii) WSSYMHVHWK (SEQ ID No: 9, es decir T9);

(iv) RWSSYMHVHWK (SEQ ID No: 10, es decir T10);

(v) HRWSSYMHVHWK (SEQ ID No: 11, es decir T11);

(vi) FHRWSSYMHVHWK (SEQ ID NO: 12), es decir, T12); y

(vii) EFHRWSSYMHVHWK (SEQ ID No: 13, es decir T13).

Cada uno de los fragmentos anteriores se deriva de T14 pero carecía de una cierta cantidad de aminoácidos de terminal N. T13, por ejemplo, es idéntico a T14 excepto que carece del residuo 'A' de terminal N, T12 carece de los residuos 'AE' de terminal N, y así sucesivamente. T7 carece de los siete residuos de terminal N, T6 carece de los ocho residuos de terminal N y T5 carece de los nueve residuos de terminal N.

ELISA para las variantes del péptido T14 (T5-T14)

Las curvas estándar se procesaron por triplicado y las variantes de péptido se procesaron por cuadruplicado. Las variantes de péptido se diluyeron hasta una concentración de 150 nM en tampón PBS. La curva estándar varió entre 12 y 150 nM de T14, y el blanco fue solo tampón PBS. Brevemente, se recubrieron inmunoplaquetas de 96 pocillos (NUNC) con 100 µl/pocillo de variante de péptido o T14 estándar, se cubre con parafilm y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se retiró la muestra al sacudir la placa sobre un fregadero con agua corriente y se agregaron 200 µl de la solución de bloqueo que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 2 % en solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (TBS-T) y se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. Luego se eliminó la solución bloqueadora y se agregaron 100 µl de anticuerpo (descrito en el documento WO 2016/156803), diluido en solución de bloqueo a 1 µg/ml, y se incubó durante la noche a 4 °C. El anticuerpo primario se eliminó al día siguiente y los pocillos se lavaron 3 veces con 200 µl de TBS-T. Después se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario conjugado con enzima (ver documento WO 2016/156803) diluido en solución de bloqueo a 0.1 µg/ml y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente; la placa se cubrió con parafilm durante todas las incubaciones. Después de 2 h, la placa se lavó 4 veces con TBS-T. La adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina inició la reacción de color. La reacción se detuvo 20 min después con una solución de parada que contenía H₂SO₄ 2 M y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Versamax (Molecular Devices, Wokingham, Reino Unido).

Resultados

Los inventores centraron gran parte de este trabajo en detectar T14 (SEQ ID No:3), y utilizar T14 es un biomarcador de pronóstico para predecir la tasa a la que un sujeto sufrirá un deterioro cognitivo, o para detectar una predisposición al mismo. Sin embargo, como se muestra en la Figura 34, está claro que los péptidos más cortos basados en T14 también son fácilmente detectables utilizando el anticuerpo descrito en el presente documento, es decir, los péptidos T7-T14 son detectables, siempre que incluyan el epitopo de terminal C. A estos péptidos más cortos les faltan los aminoácidos de terminal N correspondientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro para predecir la tasa a la que un sujeto sufrirá el deterioro cognitivo causado por la enfermedad de Alzheimer, el método comprende:-

(a) analizar, en una muestra de plasma obtenida de un sujeto de prueba, la concentración de un péptido soluble T14 que consiste en la SEQ ID No:3; y

10 (b) comparar esta concentración con un valor de referencia de una población de control para concentraciones de un péptido soluble que consiste en la SEQ ID No:3,

en el que una concentración más baja de péptido soluble que consiste en la SEQ ID No:3, del sujeto de prueba, en relación con el valor de referencia respectivo, sugiere que el sujeto sufrirá una mayor tasa de deterioro cognitivo, en
15 el que la concentración es de 110 μ M o menor.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la edad del sujeto es al menos 30, 40, 50, 60 o 70 años.

3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que se utiliza un inmunoensayo, opcionalmente
20 ELISA, para detectar el péptido T14 soluble en la muestra.

4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el valor de referencia se calcula a partir de una pluralidad de individuos que están entre 60 y 90 años, algunos de los cuales están sanos y algunos de los cuales muestran al menos algún deterioro cognitivo, y/o en el que el cálculo del valor de referencia comprende una etapa de
25 designar miembros de la población de referencia como Amiloide positivo o Amiloide negativo, opcionalmente en el que dicha designación se logra al evaluar los valores relativos de beta-amiloide en la escala BeCKeT, en el que un paciente Amiloide negativo tiene un valor BeCKeT de < 1.4, y un sujeto Amiloide positivo tiene un valor BeCKeT de > 1.4.

5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el método comprende medir la tasa de
30 deterioro cognitivo mediante una puntuación del Mini Examen del Estado Mental (MMSE), opcionalmente en el que el método comprende medir la tasa de deterioro cognitivo mediante una puntuación del Compuesto Cognitivo de Alzheimer Preclínico (PACC).

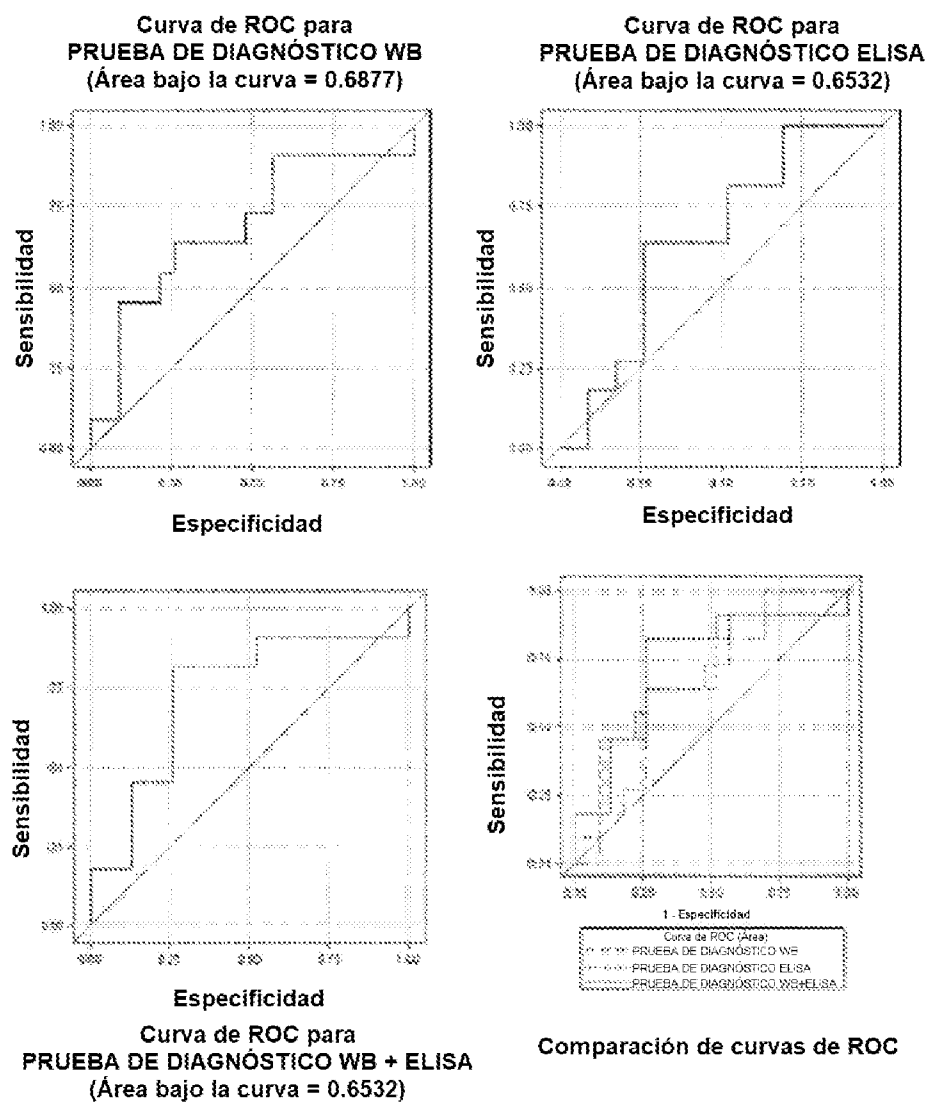
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que:

35 i) el método comprende una etapa para ajustar por edad las concentraciones de T14 soluble del sujeto de prueba frente al valor de referencia correspondiente; y/o

ii) el método comprende una etapa para detectar la presencia o ausencia de beta-amiloide en la muestra,
40 opcionalmente utilizando formación de imágenes de PET, y luego designar al sujeto de prueba como Amiloide positivo o Amiloide negativo; y/o

iii) el método comprende el uso de una combinación de niveles de T14 ajustados por edad y formación de imágenes de beta amiloide para predecir la probabilidad de una mayor tasa de deterioro cognitivo.
45

7. Uso in vitro de un péptido que consiste en la SEQ ID No:3, como biomarcador pronóstico para predecir la tasa de deterioro cognitivo causado por la enfermedad de Alzheimer.

Figura 1

Estadística de Asociación de ROC			
Modelo de ROC	Mann-Whitney		
	Área	Error estándar	95% de Límites de confianza de Wald
Prueba de diagnóstico WB	0.6877	0.1064	0.4792-0.8963
Prueba de diagnóstico ELISA	0.6522	0.0978	0.4606-0.8438
Prueba de diagnóstico WB+ELISA	0.7312	0.1015	0.5323-0.9302

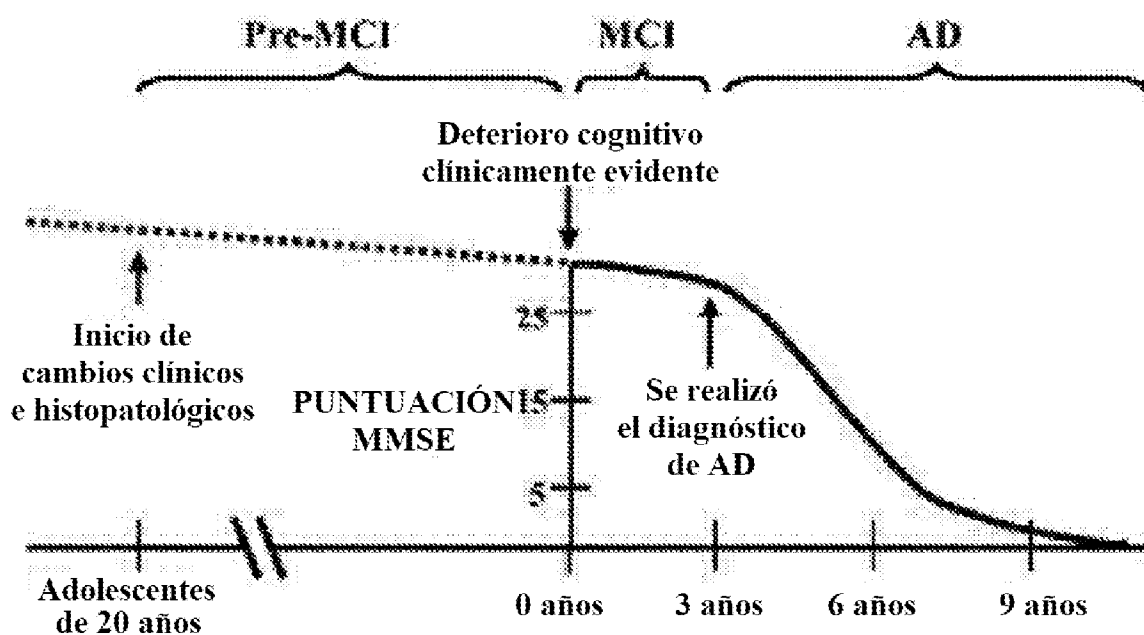
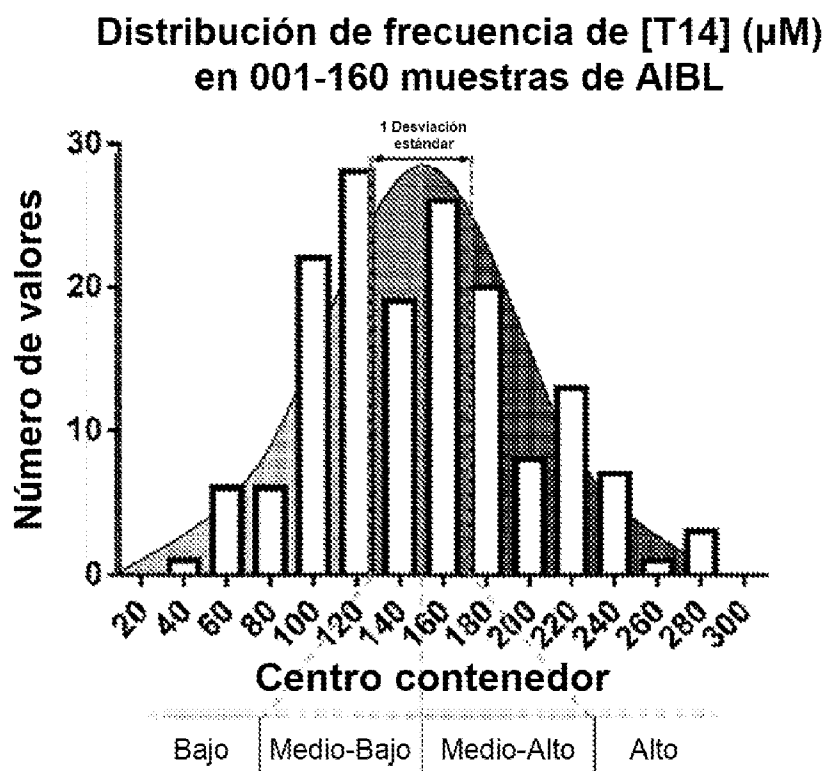
Figura 2**Figura 3A**

Figura 3B

**Distribución de frecuencia de [T14] (μM)
en 001-040 muestras de AIBL**

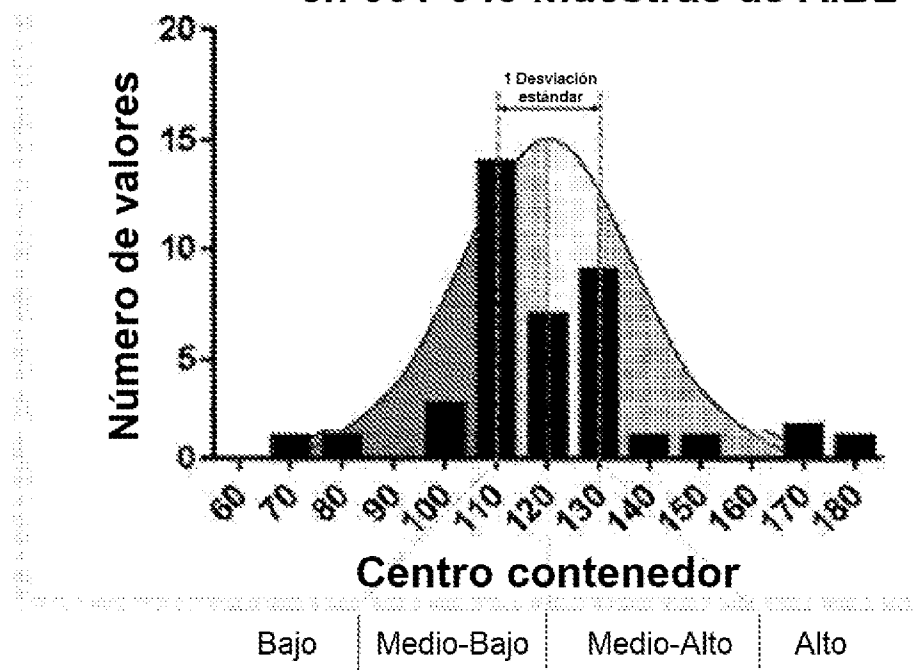
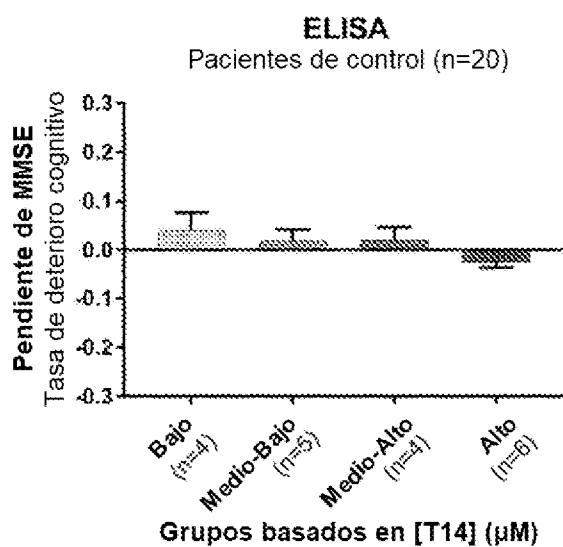
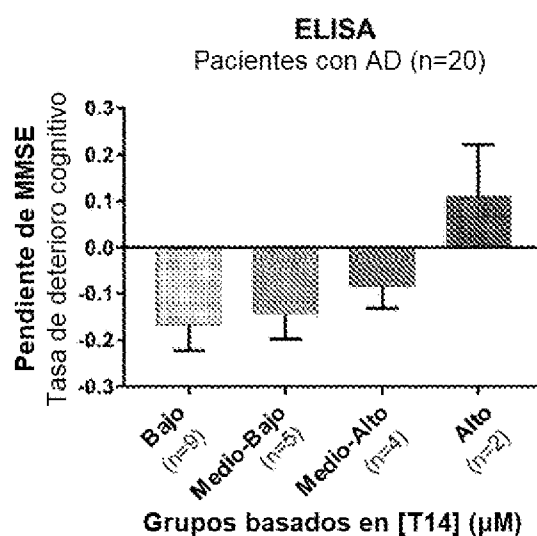
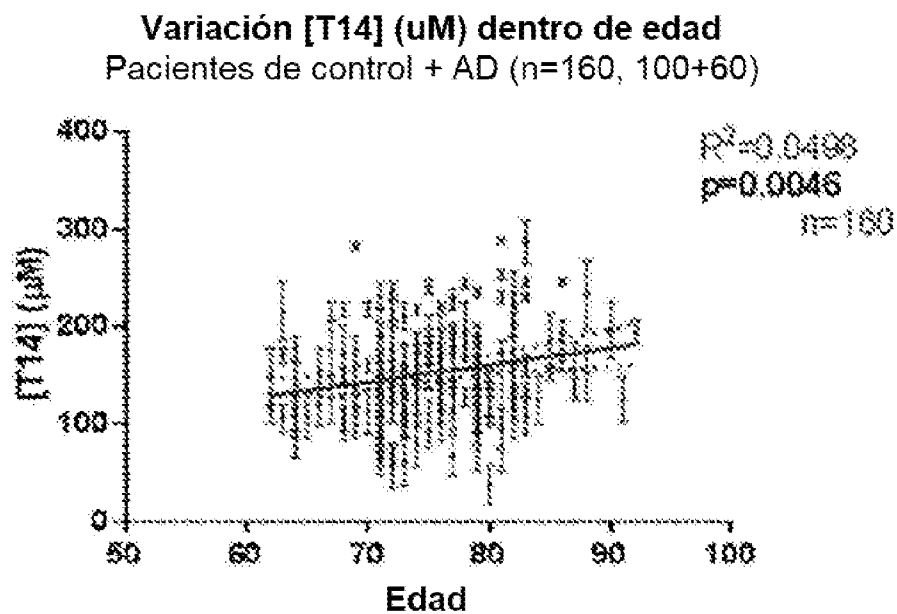
**Figura 4****A****B**

Figura 5

A



B

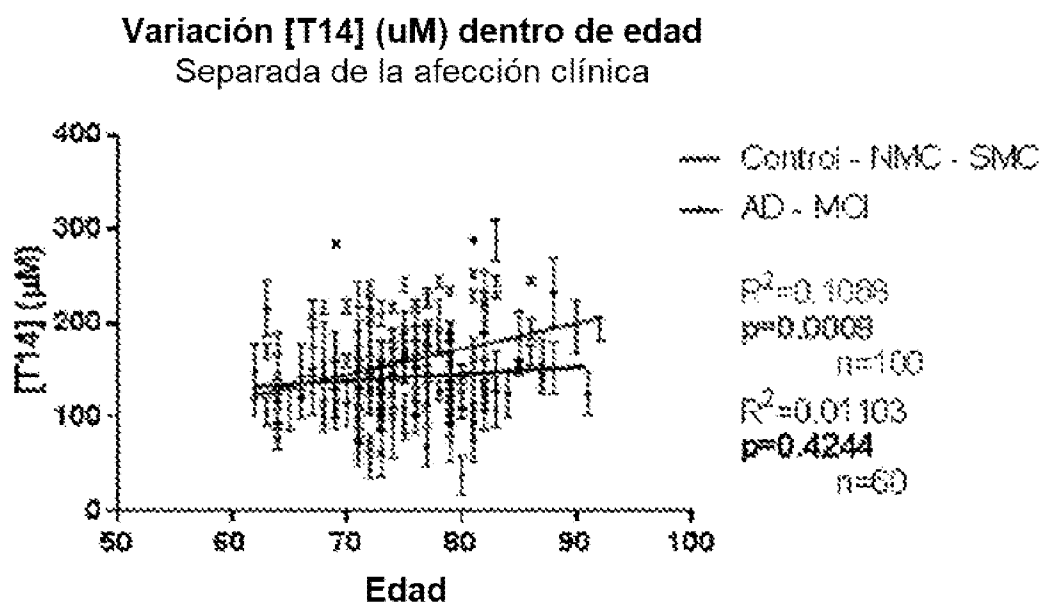
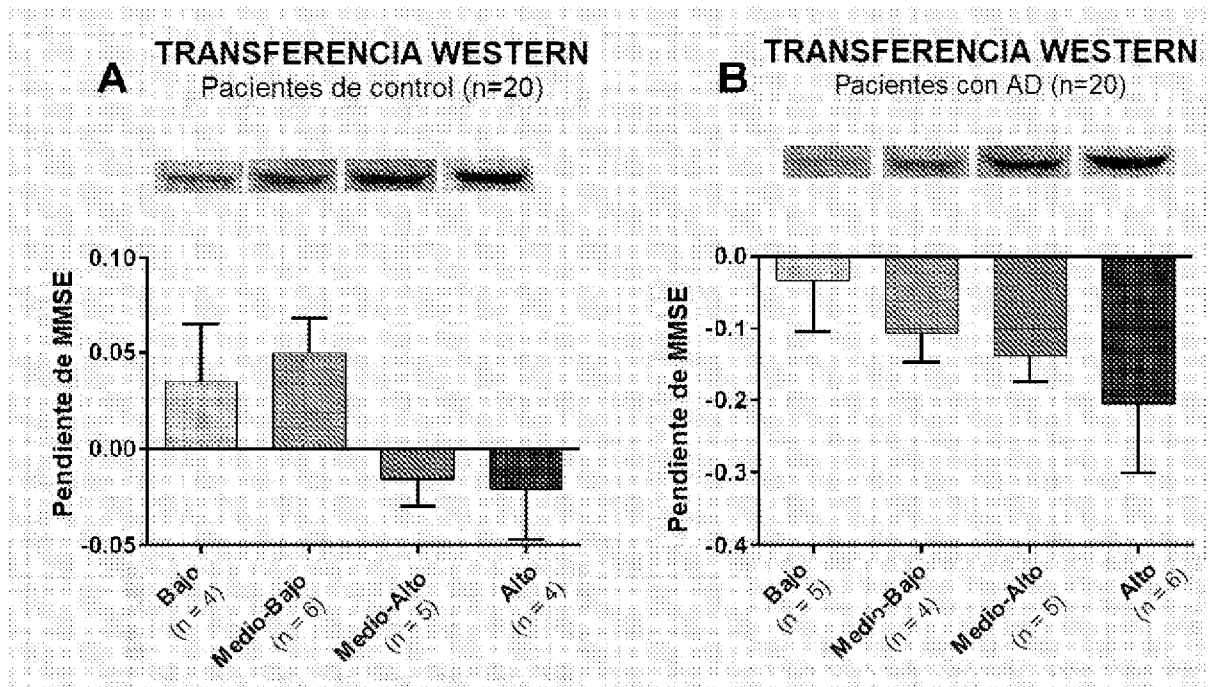
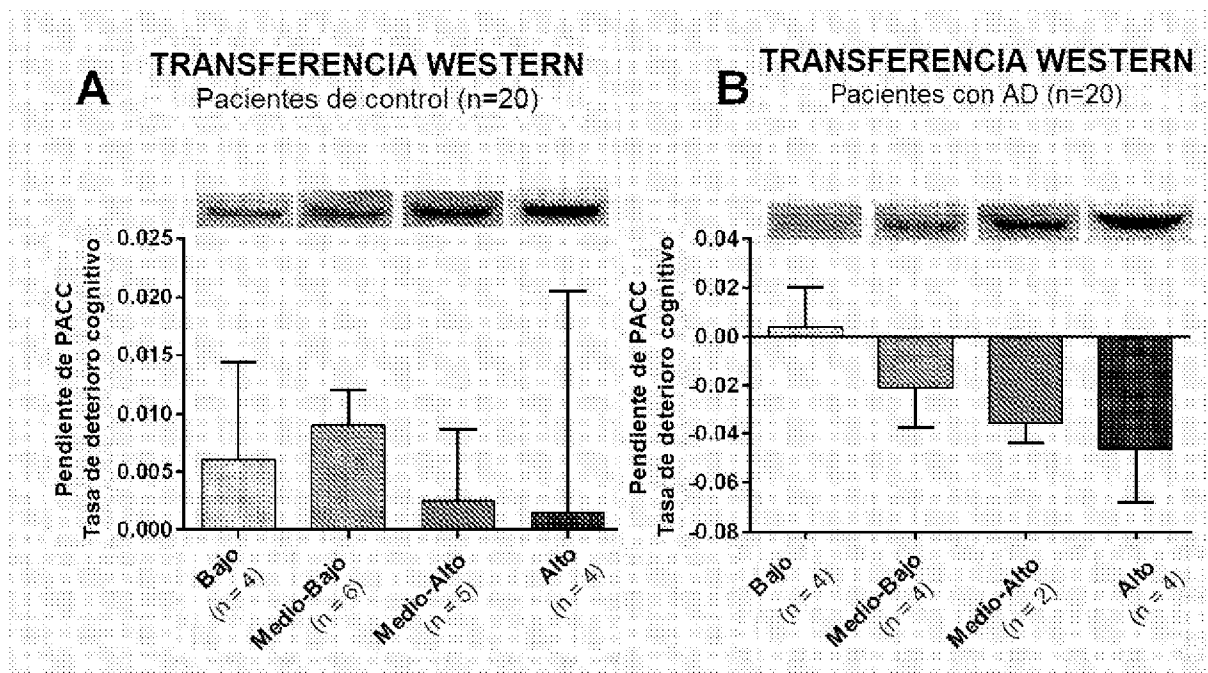
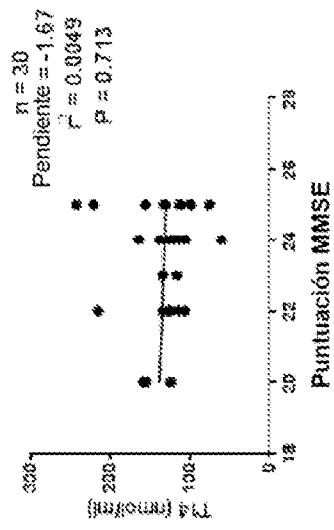
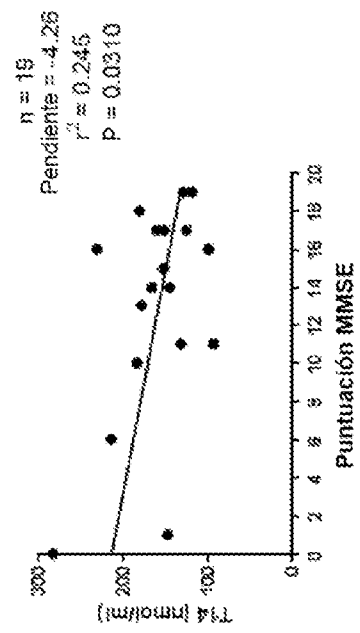


Figura 6**Figura 7**

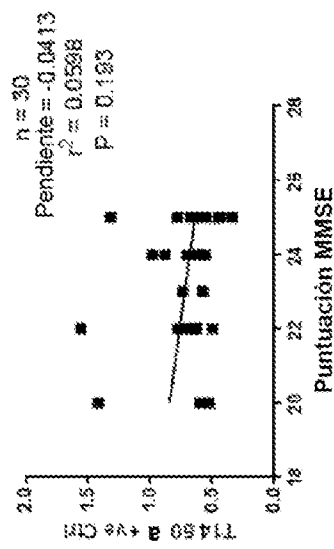
D



F



C



E

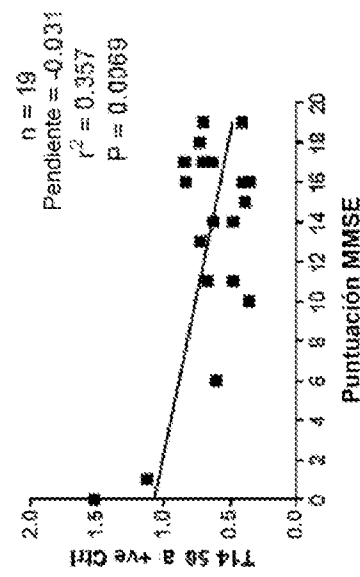


Figura 10

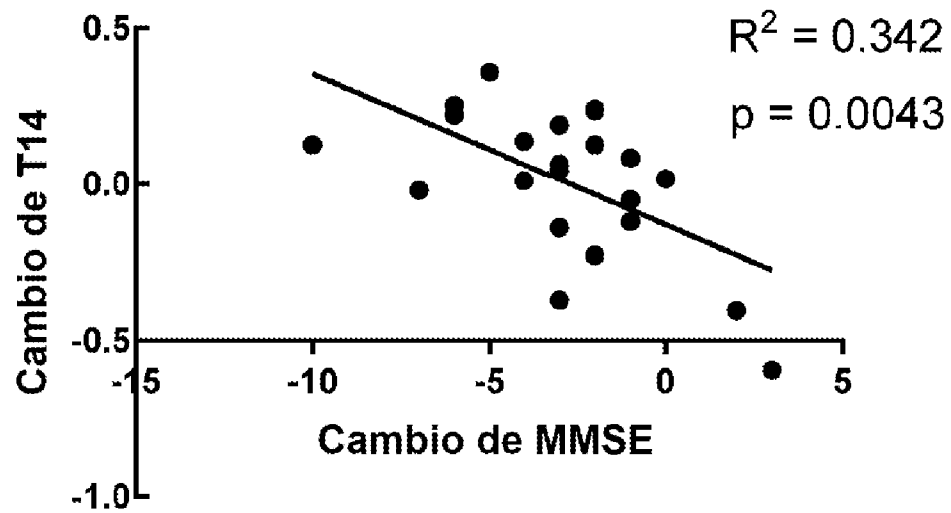


Figura 11

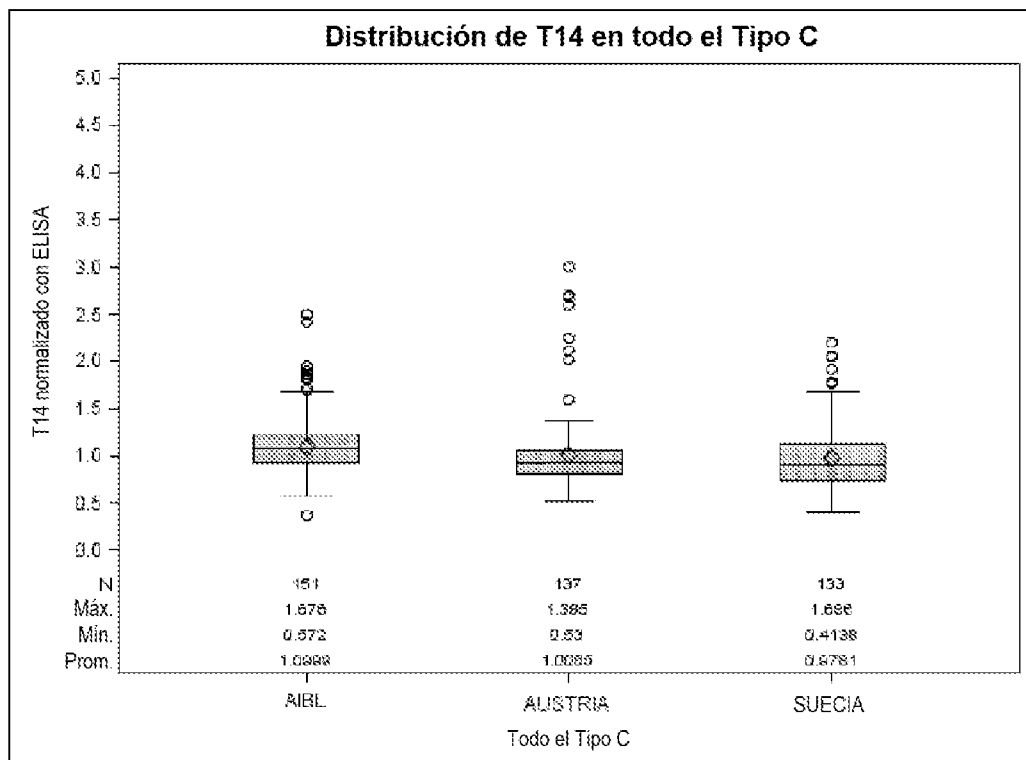


Figura 12

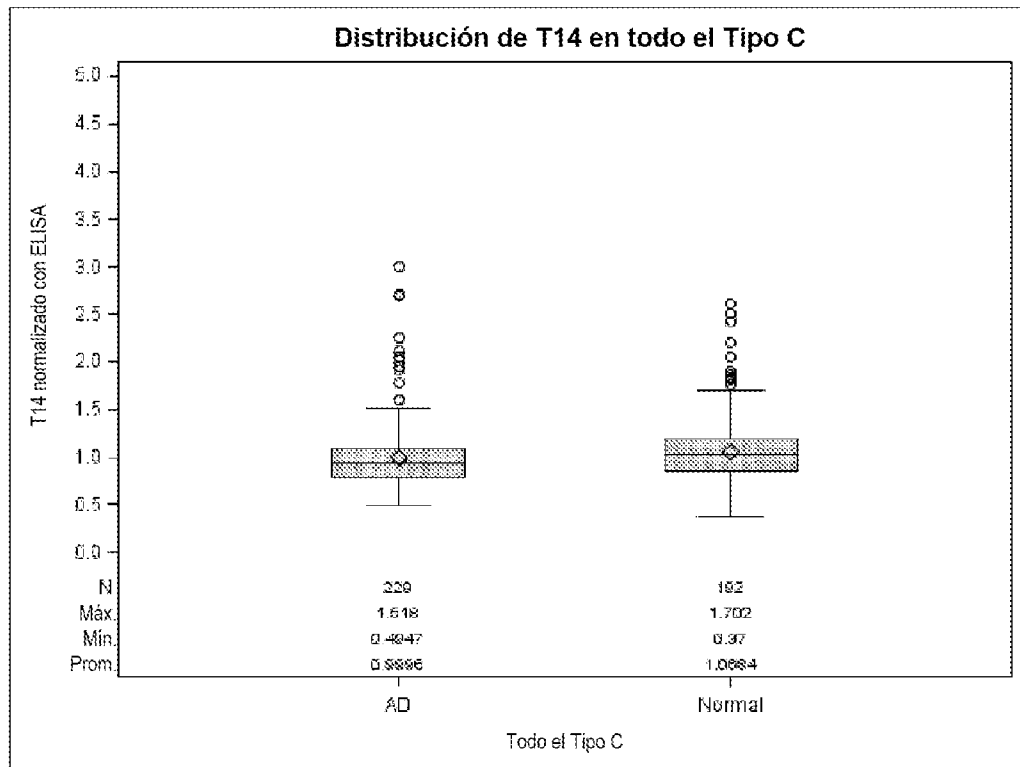


Figura 13

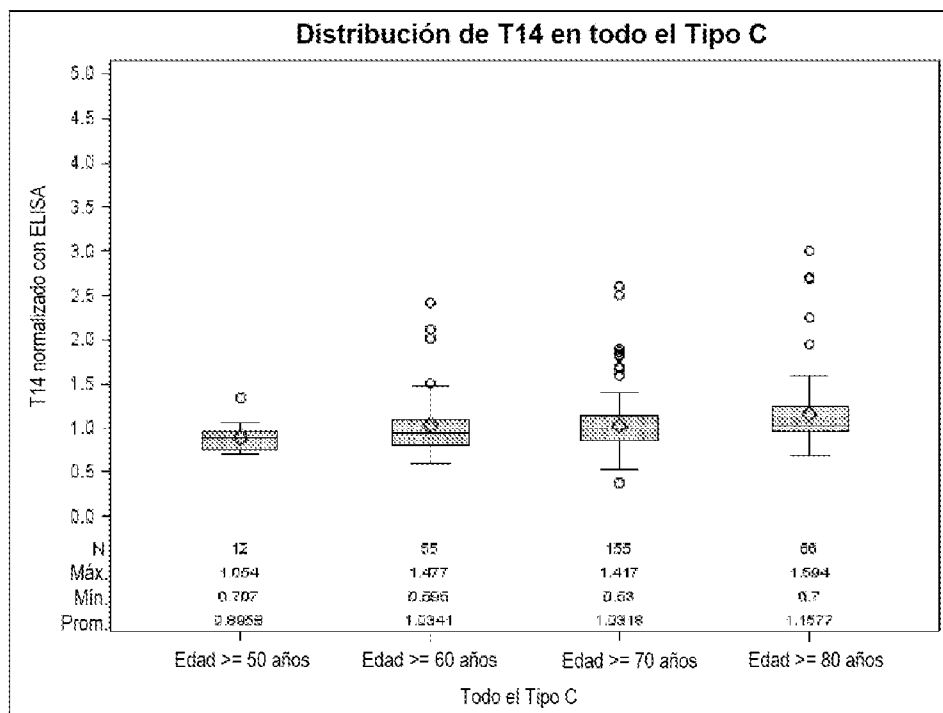


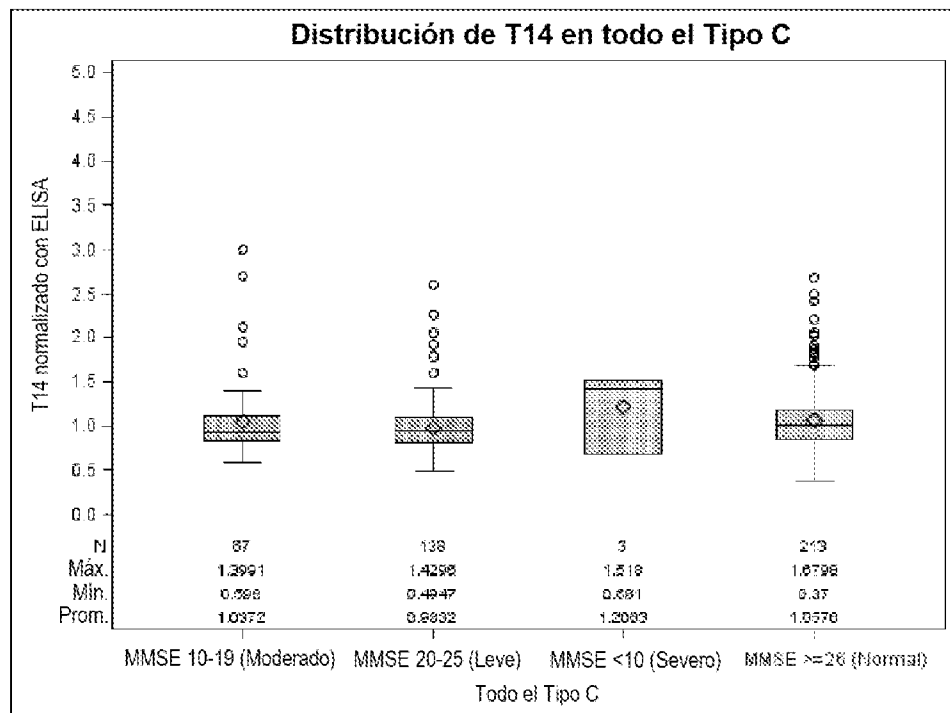
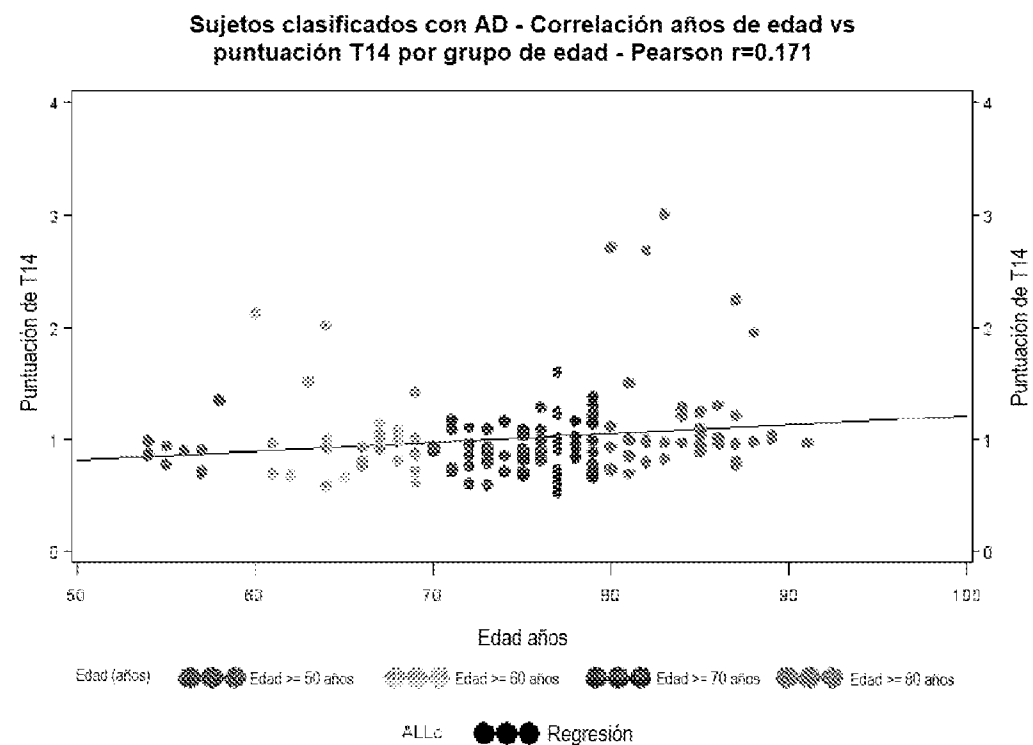
Figura 14**Figura 15**

Figura 16

Sujetos clasificados normales - Correlación años de edad vs puntuación T14 por grupo de edad - Pearson $r=0.128$

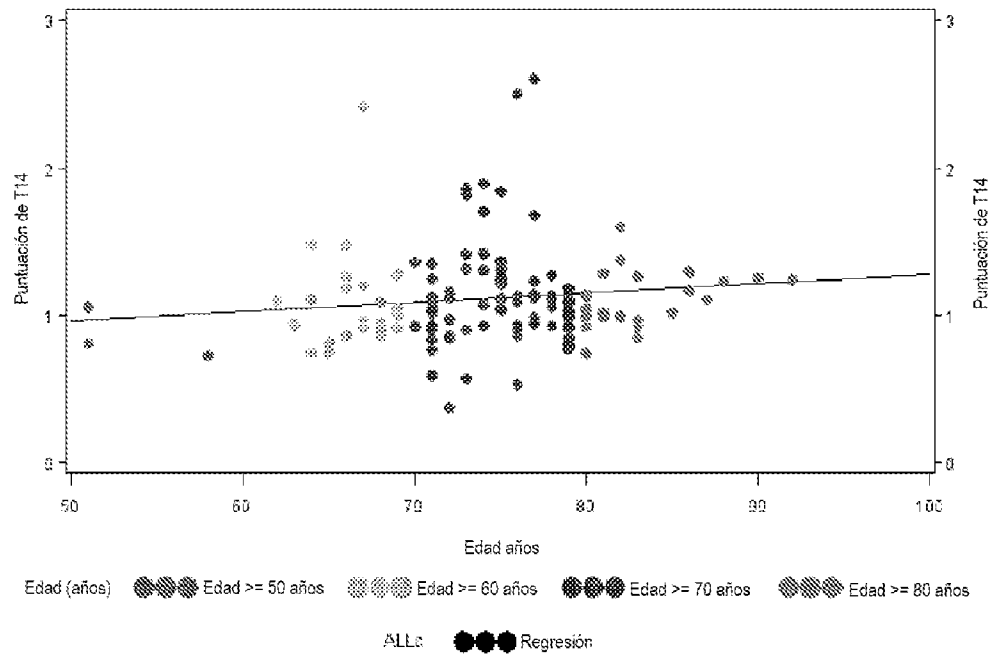


Figura 17

Sujetos clasificados con AD - Correlación puntuación MMSE vs puntuación T14 por grupo de MMSE - Pearson $r=0.048$

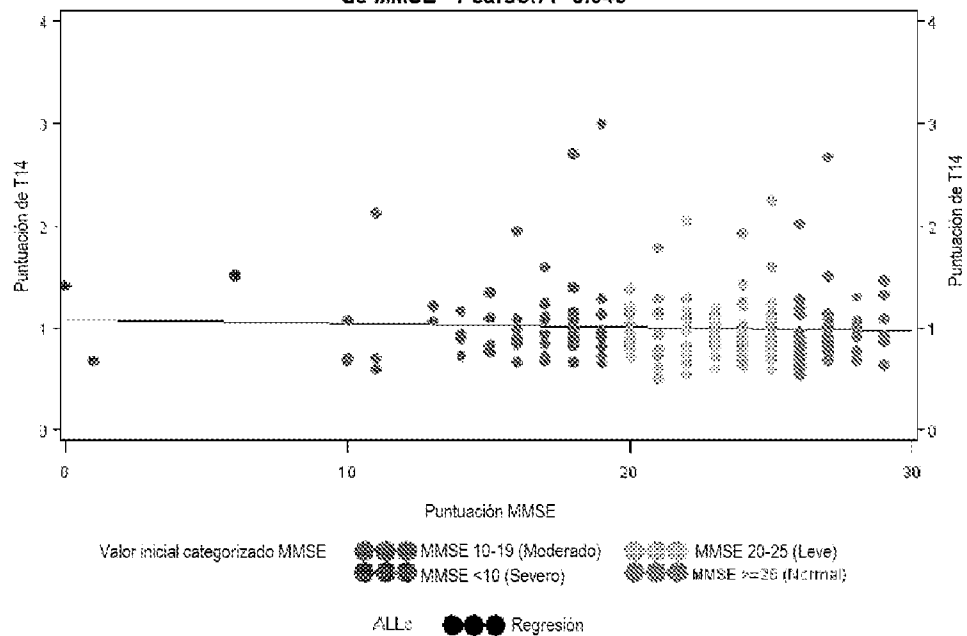


Figura 18

Sujetos clasificados normales - Correlación puntuación MMSE vs puntuación T14 por grupo de MMSE - Pearson $r=0.025$

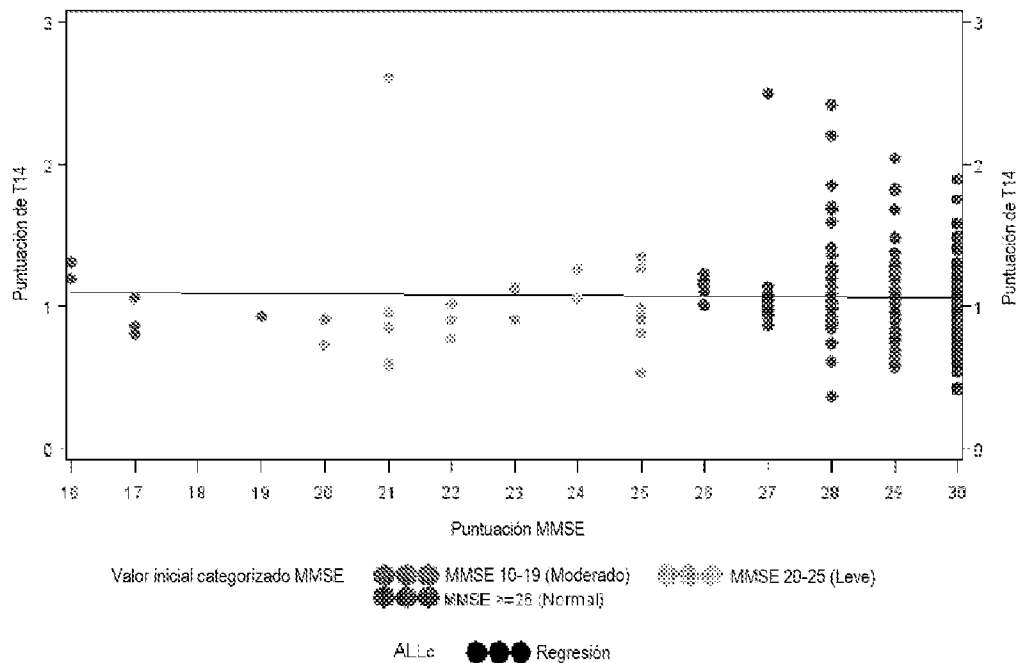


Figura 19

Análisis de ajuste del modelo ANCOVA de T14 con Elisa por grupo de demencia con covariable inicial de años de edad

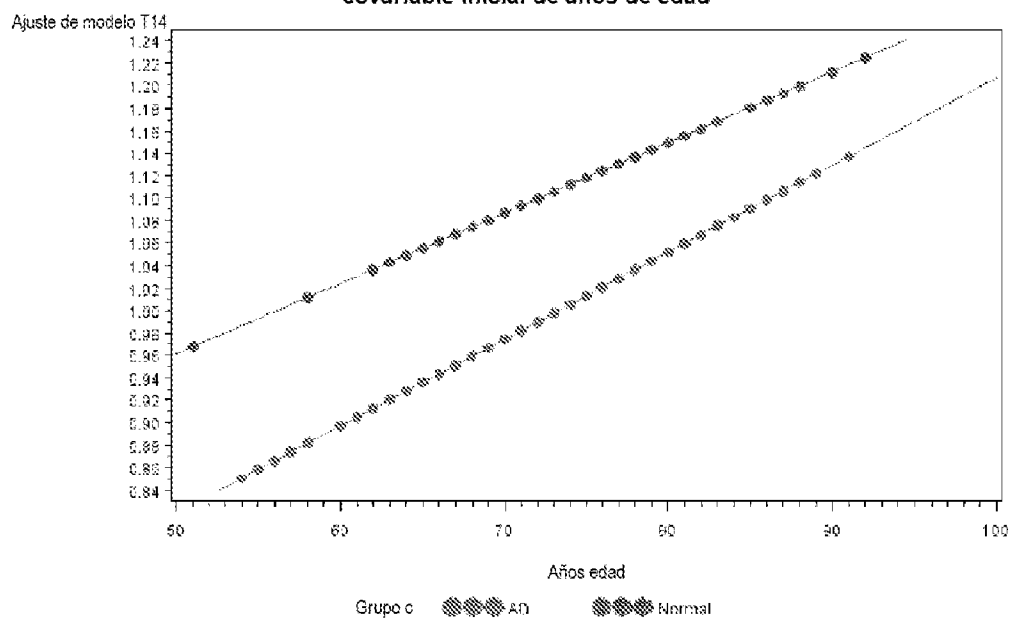


Figura 20

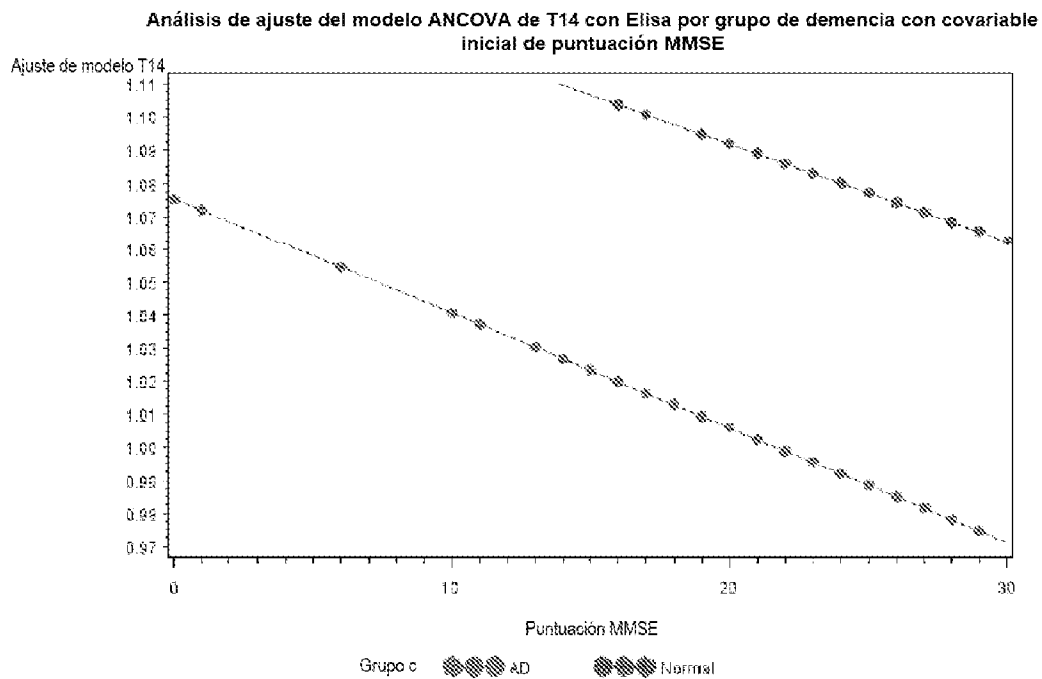


Figura 21

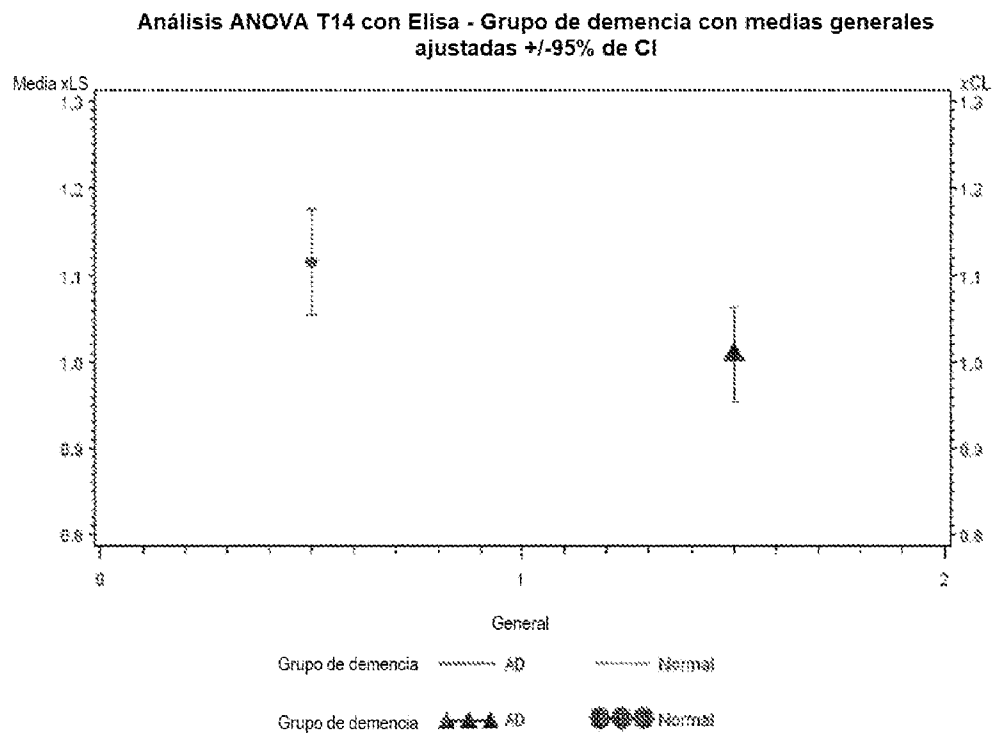


Figura 22

Análisis ANOVA T14 con Elisa - Grupo de demencia con medias ajustadas de edad $\pm$ 95% de CI

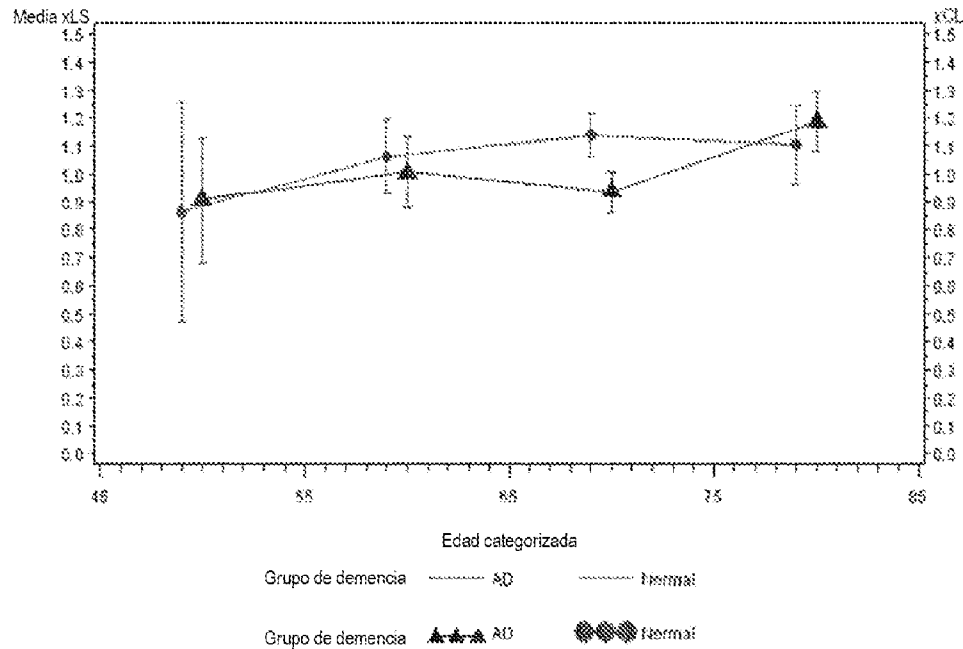


Figura 23

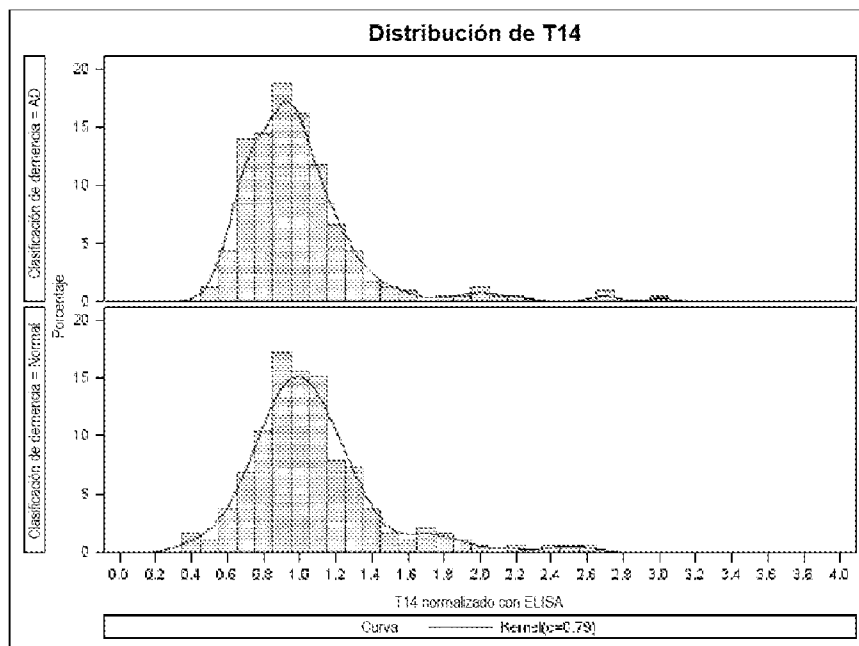


Figura 24

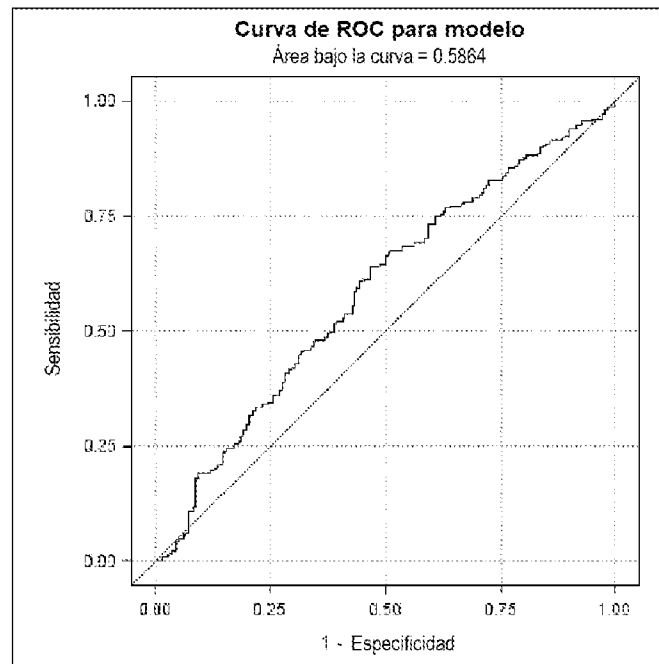


Figura 25

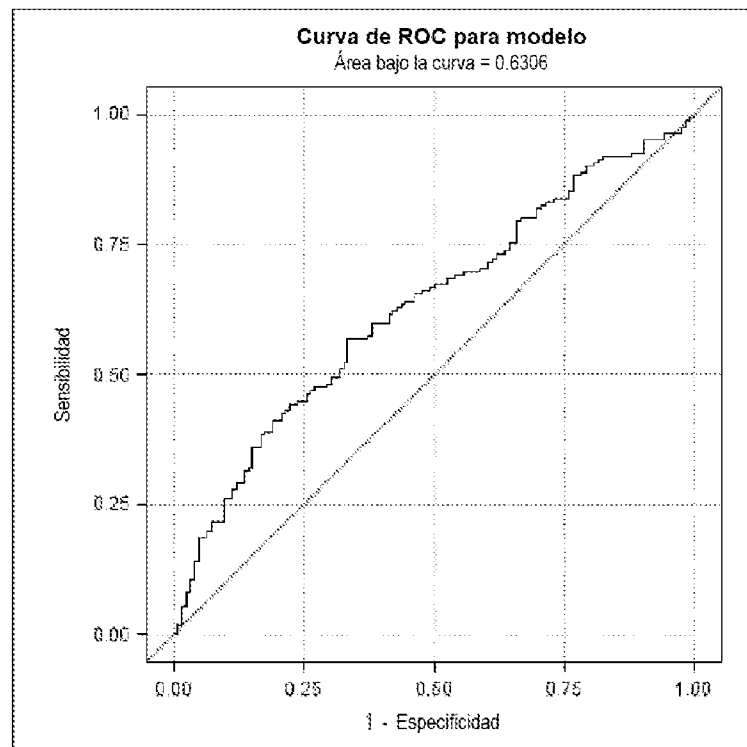


Figura 26

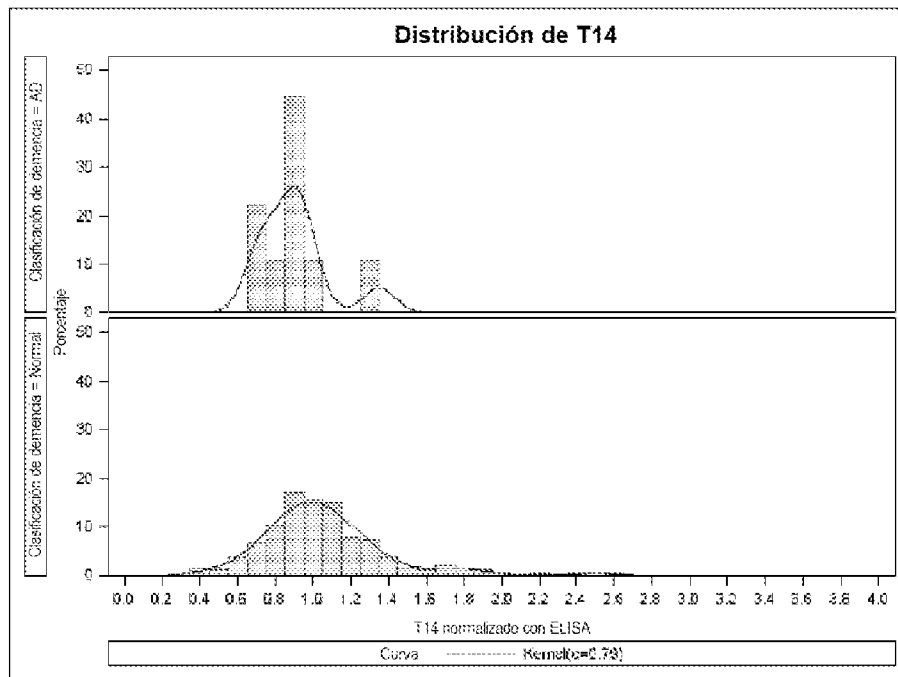


Figura 27

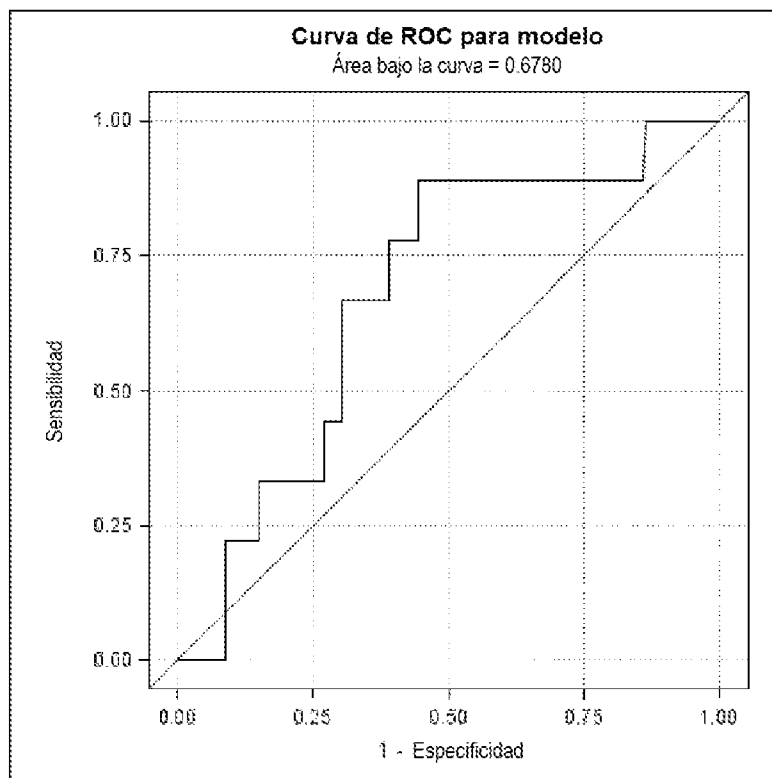


Figura 28

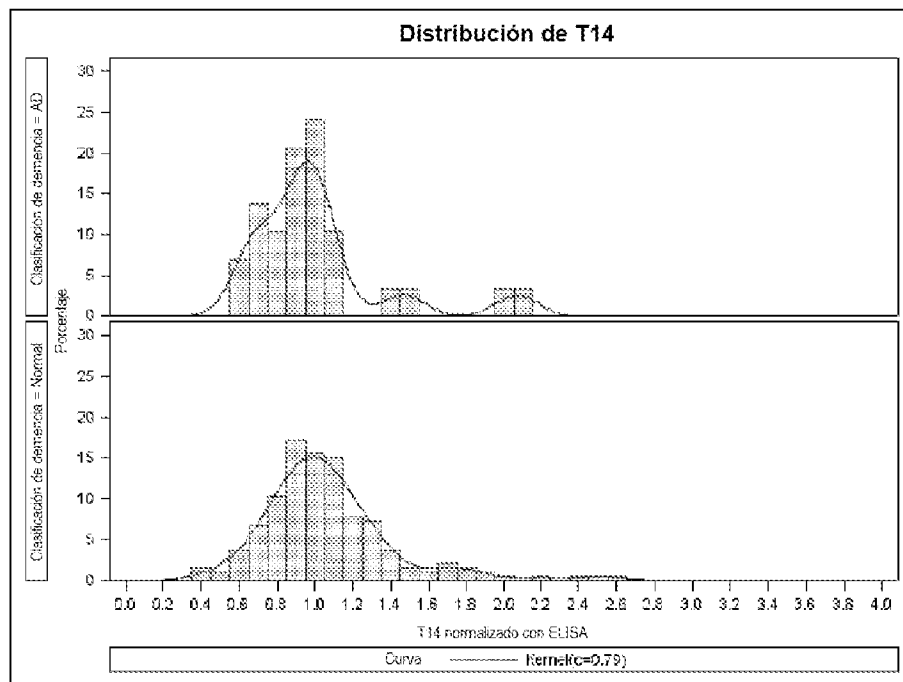


Figura 29

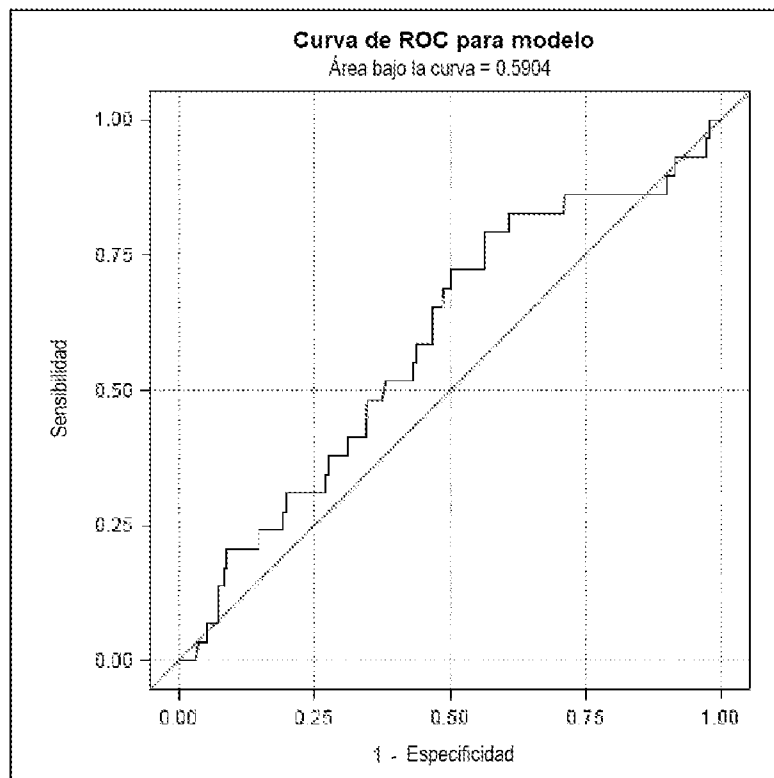


Figura 30

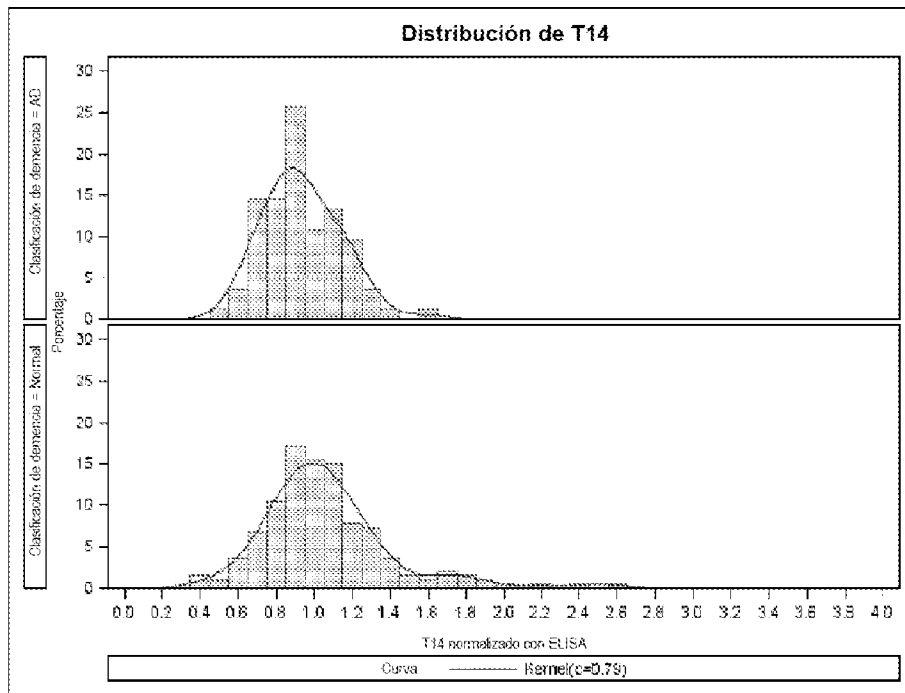


Figura 31

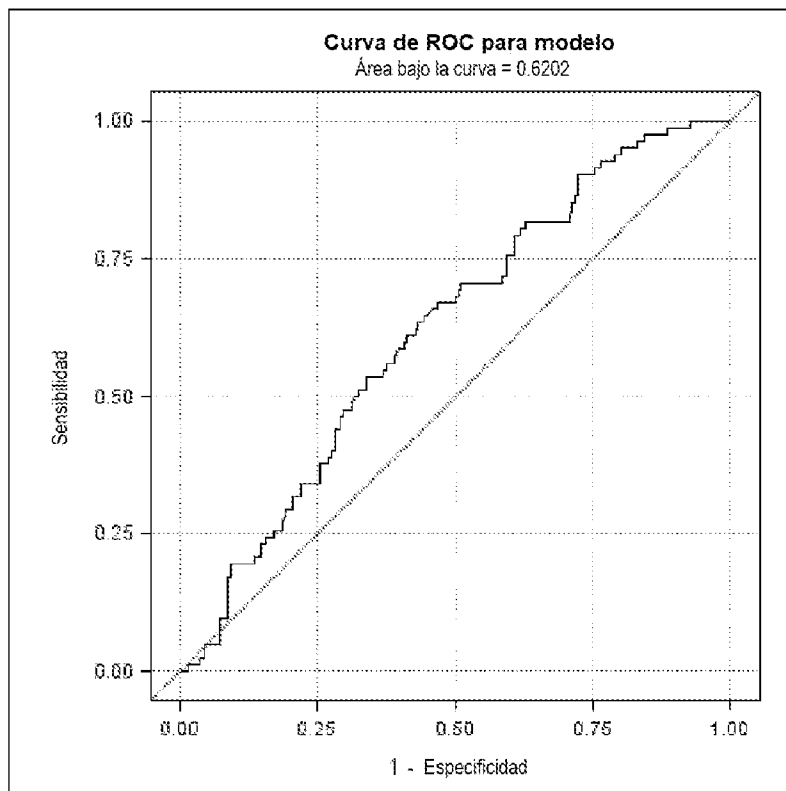


Figura 32

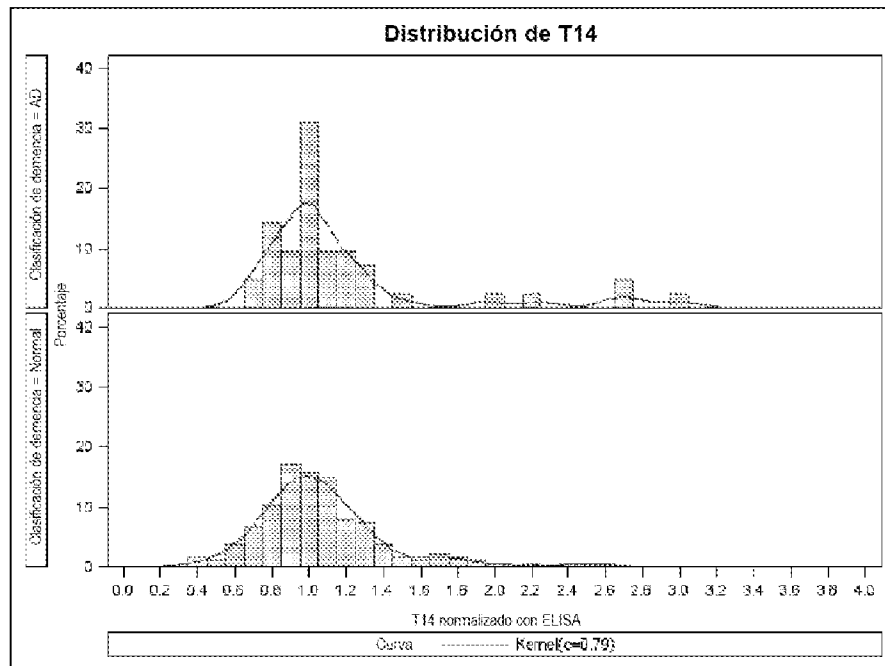


Figura 33

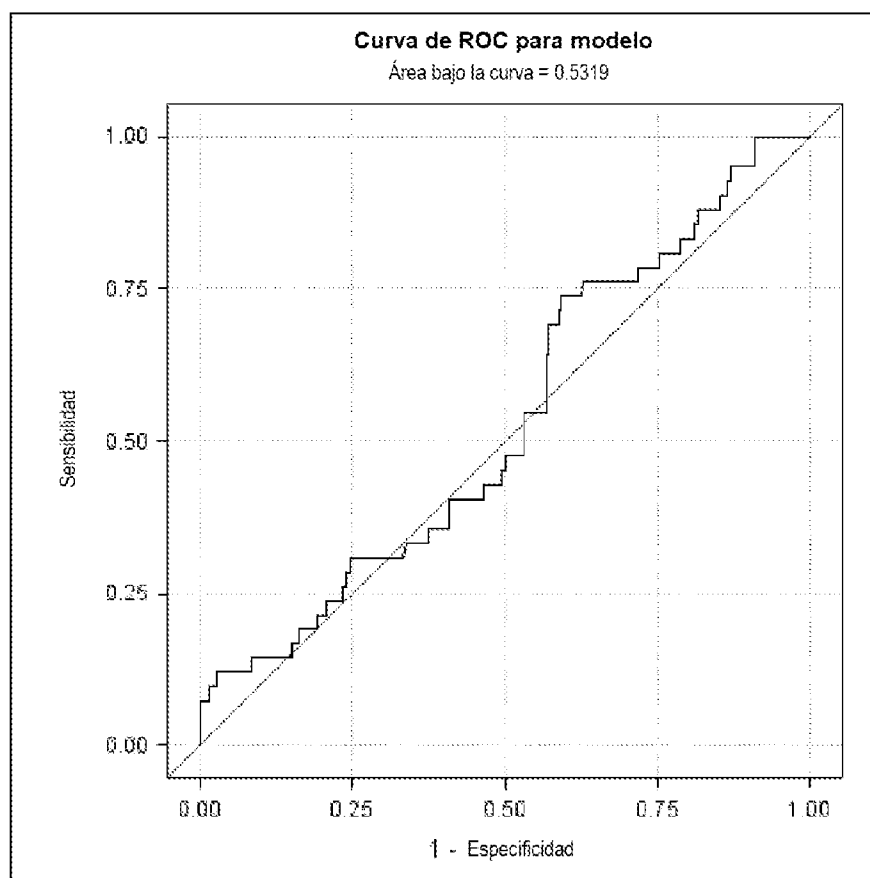


Figura 34

**Variantes de 5-14 meros del extremo C
cubierto con K
(conc. 150 nM)**

