

## **MÉTODOS PARA DETECTAR UNA CADENA LIGERA DE NEUROFILAMENTO EN PLASMA Y FLUIDO CEFALORRAQUÍDEO**

### **REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. N.º 63/147.833 presentada el 10 de febrero de 2021, la solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/183.417, presentada el 3 de mayo de 2021 y la solicitud provisional de EE. UU. n.º 63/197.826, presentada el 7 de junio de 2021, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

### **DERECHOS GUBERNAMENTALES**

[0002] Esta invención ha sido elaborada con el apoyo del gobierno bajo el AG067559 otorgado por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

### **REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS**

[0003] Esta aplicación contiene un listado de secuencias que ha sido presentado en formato ASCII a través de EFS-Web y se incorpora aquí por referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el 31 de enero de 2022, se llama "716468\_ST25.txt" y tiene un tamaño de 10.025 bytes.

### **CAMPO DE LA TECNOLOGÍA**

[0004] La presente divulgación abarca métodos para cuantificar y analizar varias especies de cadenas ligeras de neurofilamentos y los usos de las mismas para medir el daño neuronal, informar el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, seleccionar pacientes para más pruebas de diagnóstico y guiar las decisiones de tratamiento.

### **ANTECEDENTES**

[0005] Los neurofilamentos son un componente principal de la neurona citoesqueleto de axones mielinizados y juegan un papel importante en la conductancia nerviosa al permitir el crecimiento axonal radial. En el sistema nervioso central, los neurofilamentos están compuestos por cuatro proteínas: cadena pesada de neurofilamento (NfH), cadena media de neurofilamento, cadena ligera de neurofilamento (NfL, por sus siglas en inglés) y alfa-internexina. Entre estas cuatro proteínas, solo NfL está bien establecida como marcador de daño neuronal. Está elevado en la enfermedad de Alzheimer (AD), la demencia

frontotemporal (FTD), la enfermedad de Parkinson (PD), la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la lesión cerebral traumática (TBI), la esclerosis múltiple (MS), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y otros trastornos neurodegenerativos. Esto indica que la biología y la fisiopatología aprendidas sobre NfL son útiles para una variedad de enfermedades neurodegenerativas.

[0006] Actualmente, solo se utiliza un par de anticuerpos anti-NfL comercialmente disponibles para monitorear cohortes y ensayos clínicos (anti-NF-L mAb 2:1 y anti-NfL mAb 47:3, Umam). Si bien el uso del ensayo comercial ha tenido éxito en la diferenciación de enfermedades neurodegenerativas de controles sanos, la utilidad del biomarcador actualmente está limitada por su naturaleza no específica. El "ruido" debido a las elevaciones de NfL en múltiples procesos neurodegenerativos y neuroinflamatorios hace que NfL sea un marcador menos confiable del estado de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, lo que limita su utilidad clínica en los protocolos de tratamiento. Si bien NfL sufre múltiples modificaciones postraduccionales (PTM), lo que da como resultado la posibilidad de muchas isoformas de NfL diferentes en cualquier muestra biológica dada, el inmunoensayo comercialmente disponible es ciego a estas PTM. Además, quedan lagunas importantes en nuestra comprensión, por ejemplo, en qué medida, si las hay, las especies de NfL pueden usarse para detectar trastornos neurodegenerativos, estadificar a los sujetos y/o guiar las decisiones de tratamiento.

[0007] Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos mejorados para detectar y cuantificar las isoformas de NfL presentes en el líquido cefalorraquídeo y la sangre.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

[0008] El expediente de solicitud contiene al menos una fotografía ejecutada en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de solicitud de patente con fotografías en color previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

[0009] **La FIG. 1** es un gráfico que muestra cantidades de NfL recombinante de longitud completa (rec-NfL) después de la inmunoprecipitación

con un anticuerpo anti-Nfl y el análisis LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido nomenclatura. Cada línea es un anticuerpo diferente (ver la clave dentro de la figura). Los datos de los anticuerpos individuales se presentan en la **FIG. 4-27**.

[0010] **La FIG. 2A** es un gráfico que muestra las cantidades de Nfl inmunoprecipitadas a partir de lisado de cerebro con un anticuerpo anti-Nfl medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico. Cada línea es un anticuerpo diferente (ver la clave dentro de la figura). Los datos de los anticuerpos individuales se presentan en la **FIG. 4-21**.

[0011] **La FIG. 2B** es una versión ampliada del gráfico que se muestra en la **FIG. 2A** (nota la diferencia en la escala del eje y entre las dos figuras).

[0012] **La FIG. 3** es un gráfico que muestra las cantidades de Nfl inmunoprecipitadas de CSF con un anticuerpo anti-Nfl medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico. Cada línea es un anticuerpo diferente (ver la clave dentro de la figura). Los datos de los anticuerpos individuales se presentan en la FIG. 4-27.

[0013] **La FIG. 4A** y la **FIG. 4B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 4A**) y CSF (**FIG. 4B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.1, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0014] **La FIG. 4C** es un gráfico que muestra las cantidades rec-Nfl después inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.1, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para

obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0015] **La FIG. 5A y la FIG. 5B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitadas a partir de lisado de cerebro (**FIG. 5A**) y líquido cefalorraquídeo CSF (por sus siglas en inglés) (**FIG. 5B**) con un anticuerpo anti-Nfl HJ30.2, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0016] **La FIG. 5C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.2, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0017] **La FIG. 6A y la FIG. 6B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 6A**) y CSF (**FIG. 6B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.3.1, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0018] **La FIG. 6C** es un gráfico que muestra las cantidades de péptidos trípticos de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.3.1, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0019] **La FIG. 7A y la FIG. 7B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 7A**) y CSF (**FIG. 7B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.4, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0020] **La FIG. 7C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl

después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.4, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0021] **La FIG. 8A y la FIG. 8B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitados de lisado cerebral (**FIG. 8A**) y CSF (**FIG. 8B**) con un anticuerpo anti-Nfl HJ30.3.5, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área máxima medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0022] **La FIG. 8C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ305, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0023] **La FIG. 9A y la FIG. 9B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado cerebral inmunoprecipitado a partir de lisado cerebral (**FIG. 9A**) y CSF (**FIG. 9B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.6, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0024] **FIG. 9C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.6, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0025] **La FIG. 10A y la FIG. 10B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 10A**) y CSF (**FIG. 10B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.7, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la

nomenclatura del péptido tríptico.

[0026] **La FIG. 10C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.7, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0027] **La FIG. 11A** y la **FIG. 11B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado de lisado cerebral (**FIG. 11A**) y CSF (**FIG. 11B**) con un anticuerpo anti-Nfl HJ30.8, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0028] **La FIG. 11C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.8, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0029] **La FIG. 12A** y la **FIG. 12B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 12A**) y CSF (**FIG. 12B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.9, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0030] **La FIG. 12C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.9, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0031] **La FIG. 13A** y la **FIG. 13B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 13A**) y CSF (**FIG. 13B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.11, medido por LC-MS. El eje y es la

relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0032] **La FIG. 13C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.11, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0033] **La FIG. 14A** y **la FIG. 14B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado de lisado cerebral (**FIG. 14A**) y CSF (**FIG. 14B**) con un anticuerpo anti-Nfl HJ30.12, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área máxima medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0034] **La FIG. 14C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.12, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0035] **La FIG. 15A** y **FIG. 15B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 15A**) y CSF (**FIG. 15B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.13, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0036] **La FIG. 15C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.13, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0037] **La FIG. 16A** y **FIG. 16B** son gráficos que muestran cantidades

de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 16A**) y CSF (**FIG. 16B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.14, medido por LC-MS. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0038] **FIG. 16C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.14, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0039] **La FIG. 17A** y **la FIG. 17B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado cerebral (**FIG. 17A**) y CSF (**FIG. 17B**) con un anticuerpo anti-Nfl HJ30.15, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área máxima medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0040] **La FIG. 17C** es un gráfico que muestra las cantidades rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.15, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0041] **La FIG. 18A** y **la FIG. 18B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 18A**) y CSF (**FIG. 18B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.16.1, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0042] **La FIG. 18C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.16.1, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0043] **La FIG. 19A y la FIG. 19B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 19A**) y CSF (**FIG. 19B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.16.2, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0044] **FIG. 19C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.16.2, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0045] **La FIG. 20A y la FIG. 20B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitado a partir de lisado de cerebro (**FIG. 20A**) y CSF (**FIG. 20B**) con un anticuerpo anti-Nfl HJ30.17, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área máxima medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0046] **La FIG. 20C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.17, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0047] **La FIG. 21A y la FIG. 21B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl inmunoprecipitadas a partir de lisado de cerebro (**FIG. 21A**) y CSF (**FIG. 21B**) con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.18, medido por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0048] **FIG. 21C** es un gráfico que muestra cantidades de rec-Nfl después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Nfl, HJ30.18, medida por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada

péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0049] **FIG. 22** es una ilustración que resume los datos de los experimentos de inmunoprecipitación del anticuerpo anti-Nfl y el análisis de MS (los datos individuales se muestran en las **FIGs. 4-21**). La ilustración superior muestra isoformas aproximadas de Nfl enriquecidas a partir de CSF. La ilustración inferior muestra isoformas Nfl aproximadas enriquecidas a partir de lisado cerebral. Cada ilustración contiene un esquema de la proteína Nfl de longitud completa con la numeración de aminoácidos indicada en la parte inferior. En CSF, se enriquecieron una pluralidad de isoformas de Nfl, incluidas isoformas con truncamientos N-terminales, isoformas con truncamientos C-terminales e isoformas con truncamientos N-terminales y C-terminales. El tamaño de la isoforma se aproxima a partir de los datos de MS, pero no es específico al nivel de residuos debido a las limitaciones técnicas del enfoque utilizado. Por lo tanto, cada línea puede representar una pluralidad de isoformas con diferencias de longitud en cualquiera de los extremos. Una línea continua (azul oscuro) indica un mayor nivel de confianza: la isoforma truncada contiene residuos aproximados por la línea continua. La línea discontinua (azul claro) indica un nivel de confianza más bajo, lo que representa una posible variación. Por ejemplo, los datos de MS sugieren una pluralidad de isoformas truncadas en el extremo N que contienen los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1 (representadas por las cuatro líneas inferiores en la ilustración del CSF). Se aproxima que la más pequeña de estas isoformas contiene los aminoácidos 462 a 543 de SEC ID N.º: 1. Sin embargo, esto es sólo una aproximación; la longitud exacta no se puede determinar utilizando el enfoque actual. Por tanto, también es posible que la isoforma más pequeña representada sea una pluralidad de isoformas. En el lisado cerebral, al menos dos se enriquecieron las poblaciones de isoformas de Nfl: una primera población que es aproximadamente de longitud completa y una segunda población de isoformas truncadas en el extremo N que comprenden al menos los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1. La ilustración del CSF también incluye una indicación aproximada de varias regiones que contienen epítomos a los que se unen los

anticuerpos anti-Nfl (indicados encima del esquema de la proteína Nfl). Por ejemplo, los anticuerpos anti-Nfl HJ30.1, HJ30.2, HJ30.13 y HJ30.15 se representan como unión a epítomos dentro de una región que comprende alrededor del aminoácido 100 a alrededor del 225 de Nfl de longitud completa, según se determina a partir de los datos MS. Nota: esta representación no sugiere que estos anticuerpos se unan al mismo epítomo.

[0050] **La FIG. 23** representa un esquema de un proceso de enriquecimiento de dos pasos (lado izquierdo) y un gráfico que muestra las cantidades (eje y, área del pico) del péptido tríptico [323.330] inmunoprecipitado con HJ30.4 en cada paso. Las barras rojas son 14N [323.330] y las barras azules son 15N [323.330]. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0051] **La FIG. 24** muestra un esquema de un proceso de enriquecimiento de dos pasos (lado izquierdo) y un gráfico que muestra las cantidades (eje y, área del pico) del péptido tríptico [529.539] inmunoprecipitado con HJ30.11 en cada paso. Las barras rojas son 14N [529.539] y las barras azules son 15N [529.539]. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0052] **FIG. 25** representa un esquema de un proceso de enriquecimiento de dos pasos (lado izquierdo) y un gráfico que muestra cantidades (eje y, área del pico) del péptido tríptico [116.125] inmunoprecipitado con HJ30.13 en cada paso. Las barras rojas son 14N [116.125] y las barras azules son 15N [116.125]. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico.

[0053] **La FIG. 26** representa dos procesos diferentes de enriquecimiento de tres pasos. Los nombres de las muestras identificados corresponden a las claves de las **FIG. 27-28**.

[0054] **La FIG. 27** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl medidas por LC-MS. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico. Cada línea de color

es una muestra diferente, como se identifica en la clave y la **FIG. 26**.

[0055] **La FIG. 28** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl medidas por LC-MS. El eje y es el área del pico 14N para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Véase el primer párrafo del Ejemplo 2 para obtener una descripción de la nomenclatura del péptido tríptico. Cada línea coloreada es una muestra diferente, como se identifica en la clave y en la **FIG. 26**.

[0056] **La FIG. 29** representa un proceso de enriquecimiento de tres pasos. Los nombres de las muestras identificadas corresponden a la **FIG. 30-39** y **41**.

[0057] **La FIG. 30** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide positivo con una CDR = 0,5. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

**Tabla A**

| <b>Péptido tríptico</b> | <b>Secuencia (SEC ID N.º)</b>                  | <b>m/z y cargar</b> | <b>N.º en el eje x</b> |
|-------------------------|------------------------------------------------|---------------------|------------------------|
| [17, 22]                | YVETPR (SEC ID N.º: 2)                         | 382.7005++          | 1                      |
| [23,29]                 | VHISSVR (SEC ID N.º: 3)                        | 399.2350++          | 2                      |
| [37,53]                 | SAYSSYSAPVSSSLSVR (SEC ID N.º: 4)              | 874.4285++          | 3                      |
| [55,83]                 | SYSSSSGSLMPSELENLDLSQVAAISNDLK (SEC ID N.º: 5) | 1005.1605++<br>+    | 4                      |
| [91,99]                 | AQLQDLNDR (SEC ID N.º: 6)                      | 536.7727++          | 5                      |
| [100.106]               | FASFIER (SEC ID N.º: 7)                        | 435.2294++          | 6                      |
| [107, 115]              | VHELEQQNK (SEC ID N.º: 8)                      | 562.7884++          | 7                      |
| [116.125]               | VLEAELLVLR (SEC ID N.º: 9)                     | 577.8608++          | 8                      |
| [136.143]               | ALYEQEIR (SEC ID N.º: 10)                      | 511.2693++          | 9                      |
| [147.156]               | LAAEDATNEK (SEC ID N.º: 11)                    | 531.2591++          | 10                     |
| [157, 163]              | QALQGER (SEC ID N.º: 12)                       | 401.2143++          | 11                     |
| [164.171]               | EGLEETLR (SEC ID N.º: 13)                      | 473.7456++          | 12                     |

| Péptido tríptico | Secuencia (SEC ID N.º)                     | m/z y cargar | N.º en el eje x |
|------------------|--------------------------------------------|--------------|-----------------|
| [177.184]        | YEEEVLSR (SEC ID N.º: 14)                  | 512.7509++   | 13              |
| [191.195]        | LMEAR (SEC ID N.º: 15)                     | 310.1652++   | 14              |
| [197.205]        | GADEAALAR (SEC ID N.º: 16)                 | 437.2249++   | 15              |
| [212. 223]       | IDSLMDEISFLK (SEC ID N.º: 17)              | 705.8629++   | 16              |
| [283.292]        | FTVLTESAAK (SEC ID N.º: 19)                | 533.7926++   | 17              |
| [323.330]        | GMNEALEK (SEC ID N.º: 20)                  | 446.2157++   | 18              |
| [331.338]        | QLQELEDK (SEC ID N.º: 21)                  | 501.7587++   | 19              |
| [353.358]        | LENELR (SEC ID N.º: 22)                    | 387.2112++   | 20              |
| [399, 420]       | LSFTSVGSITSGYSQSSQVFGR (SEC ID N.º: 26)    | 765.7132+++  | 21              |
| [421.436]        | SAYGGLQTSSYLMSTR (SEC ID N.º: 27)          | 861.4118++   | 22              |
| [437.461]        | SFPSYYTSHVQEEQIEVEETIEAAK (SEC ID N.º: 28) | 972.1258+++  | 23              |
| [529.539]        | VEGAGEEQAAC (SEC ID N.º: 29)               | 544.7646++   | 24              |

[0058] **La FIG. 31** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide positivo con una CDR = 0,5. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0059] **La FIG. 32** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide positivo con una CDR = 0,5. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0060] **La FIG. 33** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide positivo con una CDR = 0,5. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada

péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0061] **La FIG. 34** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide negativo con una CDR=0. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. Se proporciona la identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0062] **La FIG. 35** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide negativo con una CDR=0. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0063] **La FIG. 36** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide negativo con una CDR=0. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0064] **La FIG. 37** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide negativo con una CDR=0. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la

línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0065] **La FIG. 38** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide negativo con una CDR=0. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0066] **La FIG. 39** es un gráfico que muestra cantidades de Nfl enriquecido a partir de CSF obtenido de un sujeto que era amiloide negativo con una CDR=0. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. Se proporciona la identidad de los péptidos trípticos, que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x en la **Tabla A**. La línea azul es la muestra "30.13", la línea naranja es la muestra "post 30.13\_30.4IP"; y la línea gris es la muestra "post 30.13&4\_30.11IP".

[0067] **La FIG. 40A, la FIG. 40B, y la FIG. 40C** son gráficos que resumen los datos individuales en las **FIGs. 31-40**. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medido para cada péptido tríptico identificado a lo largo del eje x. Las líneas rojas son los sujetos positivos para amiloide y las líneas negras son los sujetos negativos para amiloide.

[0068] **La FIG. 40D** es un gráfico que resume los datos individuales en las **FIGs. 31-40**. El eje x es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje y.

[0069] **FIG. 41A and FIG. 41B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl enriquecido a partir de LCR obtenidos de sujetos que eran amiloide positivo ("AD") y CDR 0, CDR 0,5, CDR 1 o CDR 2, o de sujetos que eran amiloide negativo y CDR 0, CDR 0,5, o CDR 1. Los sujetos con CDR > 0,5 que son amiloide negativos se consideran "sin AD." **FIG. 41A** muestra la "muestra post30.13\_30.4IP", y la **FIG. 41B** muestra la "muestra de IP posterior a 30.13 y 4\_30.11". En cada gráfico, el eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. La identidad de los péptidos trípticos,

que están numerados del 1 al 24 a lo largo del eje x, se proporciona en la **Table B**.

**Tabla B**

| <b>Péptido<br/>tríptico</b> | <b>Secuencia (SEC ID N.º)</b>                | <b>m/z y cargar</b> | <b>N.º en el<br/>eje x</b> |
|-----------------------------|----------------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| [17, 22]                    | YVETPR (SEC ID N.º: 2)                       | 382.7005++          | 1                          |
| [23,29]                     | VHISSVR (SEC ID N.º: 3)                      | 399.2350++          | 2                          |
| [37,53]                     | SAYSSYSAPVSSSLSVR (SEC ID N.º: 4)            | 874.4285++          | 3                          |
| [55,83]                     | SYSSSSGSLMPLENLDLSQVAAISNDLK (SEC ID N.º: 5) | 1005.1605++<br>+    | 4                          |
| [91,99]                     | AQLQDLNDR (SEC ID N.º: 6)                    | 536.7727++          | 5                          |
| [100.106]                   | FASFIER (SEC ID N.º: 7)                      | 435.2294++          | 6                          |
| [107, 115]                  | VHELEQQNK (SEC ID N.º: 8)                    | 562.7884++          | 7                          |
| [116.125]                   | VLEAELLVLR (SEC ID N.º: 9)                   | 577.8608++          | 8                          |
| [136.143]                   | ALYEQEIR (SEC ID N.º: 10)                    | 511.2693++          | 9                          |
| [147.156]                   | LAAEDATNEK (SEC ID N.º: 11)                  | 531.2591++          | 10                         |
| [157, 163]                  | QALQGER (SEC ID N.º: 12)                     | 401.2143++          | 11                         |
| [164.171]                   | EGLEETLR (SEC ID N.º: 13)                    | 473.7456++          | 12                         |
| [177.184]                   | YEEEVLSR (SEC ID N.º: 14)                    | 512.7509++          | 13                         |
| [191.195]                   | LMEAR (SEC ID N.º: 15)                       | 310.1652++          | 14                         |
| [197.205]                   | GADEAALAR (SEC ID N.º: 16)                   | 437.2249++          | 15                         |
| [212. 223]                  | IDSLMDEISFLK (SEC ID N.º: 17)                | 705.8629++          | 16                         |
| [271.280]                   | NMQNAEEWFK (SEC ID NO: 18)                   | 648.7875++          | 17                         |
| [283.292]                   | FTVLTESAAK (SEC ID N.º: 19)                  | 533.7926++          | 18                         |
| [323.330]                   | GMNEALEK (SEC ID N.º: 20)                    | 446.2157++          | 19                         |
| [331.338]                   | QLQELEDK (SEC ID N.º: 21)                    | 501.7587++          | 20                         |
| [353.358]                   | LENELR (SEC ID N.º: 22)                      | 387.2112++          | 21                         |
| [370.378]                   | EYQDLLNVK (SEC ID NO: 23)                    | 561.2955++          | 22                         |
| [379.389]                   | MALDIEIAAYR (SEC ID NO: 24)                  | 633.3316++          | 23                         |
| [391.398]                   | LLEGEETR (SEC ID NO: 25)                     | 473.7456++          | 24                         |
| [421.436]                   | SAYGGLQTSSYLMSTR (SEC ID N.º: 27)            | 861.4118++          | 25                         |
| [437.461]                   | SFPSYYTSHVQEEQIEVEETIEAAK (SEC ID N.º: 28)   | 972.1258+++         | 26                         |
| [529.539]                   | VEGAGEEQAQK (SEC ID N.º: 29)                 | 544.7646++          | 27                         |

[0070] **La FIG. 41C** es un gráfico que resume los datos individuales en la **FIG. 42B**. El eje y es la relación 14N/15N del área del pico medida para el péptido tríptico [529.539].

[0071] **La FIG. 42A** y la **FIG. 42B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl enriquecido a partir de sangre medidas por LC-MS en la "muestra 30.13". En cada gráfico, el eje y es la relación 14N/15N (**FIG. 42A**) o la cantidad de 14N (**FIG. 42B**) del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. Cuando no se detectó una señal de MS confiable para un péptido tríptico determinado del ISTD, no se informaron datos. Cada línea es una muestra de sangre diferente.

[0072] **La FIG. 43A** y la **FIG. 43B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl enriquecido a partir de sangre medidas por LC-MS en la "muestra post30.13\_30.4IP". En cada gráfico, el eje y es la relación 14N/15N (**FIG. 43A**) o la cantidad de 14N (**FIG. 43B**) del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. Cuando no se detectó una señal de MS confiable para un péptido tríptico determinado del ISTD, no se informaron datos. Cada línea es una muestra de sangre diferente.

[0073] **La FIG. 44A** y la **FIG. 44B** son gráficos que muestran cantidades de Nfl enriquecido a partir de sangre medidas por LC-MS en la "muestra post30.13&4\_30.11IP". En cada gráfico, el eje y es la relación 14N/15N (**FIG. 44A**) o la cantidad de 14N (**FIG. 44B**) del área del pico medida para cada péptido tríptico a lo largo del eje x. En caso de MS confiable detectó señal para un péptido tríptico determinado del ISTD, no se informaron datos. Cada línea es una muestra de sangre diferente.

[0074] **La FIG. 45** muestra inmunoprecipitación de NfL recombinante cada uno de los 23 Se evaluó la capacidad de los anticuerpos NfL (HJ.30.x) y un anticuerpo de control negativo contra la beta amiloide (HJ5.1) para inmunoprecipitar NfL recombinante de longitud completa. Se muestran las cantidades relativas de recuperación de NfL recombinante (mayor N14/N15 = mayor recuperación de N14. N15 añadido después de IP.

[0075] **La FIG. 46** muestra la inmunoprecipitación de NfL nativo a partir

de LCR combinado. Se evaluó la capacidad de cada uno de los 23 anticuerpos internos contra NfL (HJ.30.x) y un anticuerpo de control negativo contra la beta amiloide (HJ5.1) para inmunoprecipitar NfL del CSF. Los colores de las líneas corresponden a anticuerpos individuales y se indican en la leyenda de la figura. Los anticuerpos parecían apuntar a 3 regiones diferentes de NfL.

[0076] **La FIG. 47** muestra la linealidad del método de MS cuantitativa (6 péptidos). La cuantificación de los 6 péptidos es lineal dentro del rango N14/N15 analizado.

[0077] **La FIG. 48** muestra un mapa de especies de luz de neurofilamentos que indican que el CSF NfL existe como especies de fragmentos múltiples. Los anticuerpos dirigidos a diversos dominios de NfL utilizados para la inmunoprecipitación, junto con el análisis de espectrometría de masas, permitieron la identificación de múltiples especies de NfL en el CSF. Las líneas de puntos claras representan fragmentos potenciales en la identificación de especies de NfL, mientras que las líneas continuas oscuras representan especies de fragmentos identificadas. Las especies de NfL se identificaron utilizando 23 anticuerpos personalizados diferentes y los datos utilizados para determinar las especies de NfL se muestran en la **FIG. 49A-49B**.

[0078] **La FIG. 49A, la FIG. 49B y la FIG. 49C** muestra que el cerebro contiene dos especies principales de NfL mientras que el CSF tiene al menos tres especies principales de NfL. Método experimental para el ensayo IP-MS/MS secuencial que purifica e identifica al menos 3 especies de fragmentos de NfL **FIG. 49A** IP secuencial de NfL de CSF agrupado indica 3 dominios principales de NfL; una región de dominio mediodo NfL93 a NfL224, otra región de NfL324 a NfL359 y una región c-terminal en NfL530 **FIG. 49B** y lisado de corteza cerebral que muestra NfL de longitud completa desde NfL2 hasta NfL540, con un péptido c-terminal en NfL 530 **FIG. 49C**. La línea azul representa los péptidos identificados después de la primera IP con HJ30.13, la línea roja representa los péptidos identificados durante la segunda IP con HJ30.4 y la línea verde representa los péptidos identificados durante la tercera IP con HJ30.11.

[0079] **La FIG. 50** muestra que las especies de NfL aumentan en AD

CSF en comparación con controles sanos. IP/MS secuencial de las tres especies principales de NfL en LCR identifica niveles aumentados de NfL en la demencia de la enfermedad de Alzheimer (n=4) en comparación con los controles (n=6) para cada especie principal. Las líneas rojas representan cantidades relativas de especies de NfL para individuos con demencia por AD según lo determinado por la presencia de placas amiloides mediante PET y demencia muy leve (CDR = 0,5) y las líneas negras representan controles sanos de la misma edad (CDR = 0).

[0080] **FIG. 51A, FIG. 51B, FIG. 51C, FIG. 51D, FIG. 51E, FIG. 51F y La FIG. 51G** La cohorte de validación del programa 51G confirma un aumento de NfL324 y NfL530 en la EA en comparación con los controles sanos. Esquema que muestra el mapa NfL y la ubicación de péptidos en el método cuantitativo IP-MS (**FIG. 51A**). Comparación de péptidos NfL entre participantes sintomáticos con AD (N=30; amiloide positivo, CDR>0) y controles sanos (N=25; amiloide negativo, CDR=0) para las regiones de la bobina 1A y 1B NfL101(**FIG. 51B**), NfL117 (**FIG. 51C**) y NfL165 (**FIG. 51D**) muestran tendencias aumentadas no significativas en AD, ninguna diferencia en la región NfL283 de la bobina 2B (**FIG. 51E**) y aumentos altamente significativos en NfL323 (**FIG. 51F**) y la región c-terminal. NfL529 (**FIG. 51G**). \*\* Representa significancia estática en  $p<0,01$ .

[0081] **La FIG. 52A, FIG. 52B, FIG. 52C, FIG. 52D, FIG. 52E, y la FIG. 52F** muestran la correlación entre IP-MS y ELISA por especies NfL. La correlación entre IP-MS y los resultados ELISA de Uman Diagnostics, el estándar de oro, varían según la especie NfL: NfL101 (**FIG. 52A**), NfL 117 (**FIG. 52B**), NfL 165 (**FIG. 52C**), NfL284 (**FIG. 52D**), NfL 324 (**FIG. 52E**), NfL530 (**FIG. 52F**). La correlación más alta se observa entre ELISA y NfL324.

[0082] **La FIG. 53A, la FIG. 53B, la FIG. 53C, la FIG. 53D, la FIG. 53E, y la FIG. 53F** muestran la correlación de especies de NfL con el estadio de demencia por AD (suma de cuadros CDR). La cantidad de especies de NfL está mínimamente correlacionada con el estadio de gravedad de la demencia. El eje x de cada gráfico indica la suma de cuadros de CDR, una escala clínica de demencia con CDR-SB 0 es normal, 0,5 a 6 demencia leve y >6 demencia clínica moderada. La cantidad relativa de especies de NfL se muestra en el eje y como la

relación N14/N15 de la región de NfL. La correlación de Spearman y valor p calculado para cada grupo: NfL101: Amiloide + Spearman  $r = 0,29$  (ns,  $p=0,05$ ), Amiloide-Spearman  $r = 0,18$  (ns,  $p=0,30$ ) (**FIG. 53A**); NfL117: Amiloide+ Spearman  $r = 0,30$  ( $p=0,04$ ), Amiloide-Spearman  $r = 0,18$  (ns,  $p=0,31$ ) (**FIG. 53B**); NfL165: Amiloide+ Spearman  $r = 0,36$  ( $p=0,01$ ), Amiloide-Spearman  $r = 0,19$  (ns,  $p=0,28$ ) (**FIG. 53C**); NfL284: Amiloide+ Spearman  $r = 0,24$  (ns,  $p=0,10$ ), Amiloide-Spearman  $r = 0,31$  (ns,  $p=0,07$ ) (**FIG. 53D**); NfL324: Amiloide+ Spearman  $r = 0,30$  ( $p=0,04$ ), Amiloide-Spearman  $r = 0,16$  (ns,  $p=0,35$ ) (**FIG. 53E**); NfL530: Amiloide+ Spearman  $r = 0,13$  (ns,  $p=0,39$ ), Amiloide-Spearman  $r = 0,25$  (ns,  $p=0,14$ ) (**FIG. 53F**). Los participantes con placas de amiloide se muestran con círculos rojos y los participantes con amiloide negativo se muestran con cuadrados grises. NfL101, NfL117, NfL165 y NfL284 tienen cada uno  $n=1$  valores atípicos que no se representan en el gráfico, pero se incluyen en el cálculo de la correlación.

[0083] La **FIG. 54A**, la **FIG. 54B**, la **FIG. 54C**, la **FIG. 54D**, la **FIG. 54E**, y la **FIG. 54F** muestran concentraciones de NfL transformadas logarítmicamente según el estado de amiloide y la CDR. El grupo amiloide-CDR 0 se utiliza como grupo de referencia y los otros tres grupos se compararon con el grupo de referencia mediante dos pruebas t de muestra. Los valores de p se corrigieron para la comparación múltiple utilizando el método de Benjamini-Hochberg. Las concentraciones de NfL para cada uno de los cuatro grupos (CDR amiloide negativo = 0; CDR amiloide positivo = 0, CDR amiloide positivo > 0, CDR amiloide negativo > 0) se compararon para NfL 101(**FIG. 54A**), NfL 117 (**FIG. 54B**), NfL 165 (**FIG. 54C**), NfL 284 (**FIG. 54D**), NfL 324 (**FIG. 54E**) and NfL 530 (**FIG. 54F**).

[0084] La **FIG. 55A**, la **FIG. 55B**, la **FIG. 55C**, la **FIG. 55D**, la **FIG. 55E**, y **FIG. 55F** muestran las concentraciones de NfL transformadas logarítmicamente según el estado global de CDR. Las diferencias entre los grupos CDR 0 y CDR > 0 se compararon usando la prueba t de dos muestras para (**FIG. 55A**), NfL 117 (**FIG. 55B**), NfL 165 (**FIG. 55C**), NfL 284 (**FIG. 55D**), NfL 324 (**FIG. 55E**) and NfL 530 (**FIG. 55F**).

[0085] La **FIG. 56** muestra un mapa de calor para la correlación entre especies de NfL y biomarcadores clínicos de neurodegeneración, AD y tau. El

mapa representa la correlación de Spearman: el azul más oscuro representa una correlación más fuerte y el blanco/azul claro representa una correlación débil. Las correlaciones más fuertes de las regiones NfL del CSF fueron entre sí, siendo NfL324 y NfL530, la región c-terminal, las menos correlacionadas con otras regiones NfL con otras regiones NfL. Hubo correlaciones modestas entre NfL324 o NfL530 y CDR (una escala de calificación clínica de la demencia), la edad y p-tau y t-tau, mientras que las medidas de PET con amiloide y el MMSE tuvieron correlaciones bajas. Las correlaciones entre NfL y tau o ptau fueron mayores para la región c-terminal de NfL (NfL324, NfL530) que para otros péptidos.

[0086] **FIG. 57** representa un esquema del proceso de enriquecimiento (lado izquierdo) y un tipo de muestra (lado derecho).

[0087] **La FIG. 58A, la FIG. 58B, la FIG. 58C, la FIG. 58D, la FIG. 58E, y la FIG. 58F** presentan gráficos que muestran las diferencias en las concentraciones de NfL para ALS (por sus siglas en inglés), atrofia muscular espinal (SMA, por sus siglas en inglés) y control. **La FIG. 58F** muestra concentraciones de NfL 101. **La FIG. 58E** muestra concentraciones de NfL 117. **La FIG. 58C** muestra concentraciones de NfL165. **La FIG. 58D** muestra concentraciones de NfL 284. **La FIG. 58B** muestra concentraciones de NfL 324. **La FIG. 58A** muestra concentraciones de 530.

[0088] **La FIG. 59A, la FIG. 59B, la FIG. 59C, la FIG. 59D, la FIG. 59E, y la FIG. 59F** presentan gráficos que muestran la correlación entre la progresión de la ELA y las concentraciones de NfL. **La FIG. 59F** muestra concentraciones de NfL 101. **La FIG. 59E** muestra concentraciones de NfL 117. **La FIG. 59C** muestra concentraciones de NfL165. **La FIG. 59D** muestra concentraciones de 284. **La FIG. 59B** muestra concentraciones de NfL 324. **La FIG. 59A** muestra concentraciones de NfL 530.

[0089] **La FIG. 60A, la FIG. 60B, la FIG. 60C, la FIG. 60D, la FIG. 60E, y la FIG. 60F** presentan gráficos que muestran la correlación entre la progresión de la ELA y las concentraciones de NfL. **La FIG. 60F** muestra concentraciones de NfL 101. **La FIG. 60E** muestra concentraciones de 117. **La FIG. 60C** muestra concentraciones de NfL165. **La FIG. 60D** muestra concentraciones de NfL 284. **La**

**FIG. 60B** muestra concentraciones de NfL 324. **La FIG. 60A** muestra concentraciones de NfL 530.

[0090] **FIG. 61** muestra IP/MS secuencial de especies de LCR NfL en ALS.

[0091] **La FIG. 62** muestra IP/MS secuencial de especies de CSF NfL en control.

[0092] **FIG. 63** muestra IP/MS secuencial de especies de CSF NfL en SMA que otros péptidos o partes de Nfl. También se divulgan en el presente documento una pluralidad de agentes de unión a epítomos anti-Nfl y su uso en los métodos de la presente divulgación.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

[0093] Entre los diversos aspectos de la divulgación se encuentra la provisión de Métodos para detectar y opcionalmente cuantificar Nfl presente en el líquido cefalorraquídeo y la sangre y uso de los métodos para detectar y, opcionalmente, medir niveles de biomarcadores de Nfl indicativo de daño neuronal. Como se describe con mayor detalle en el presente documento, se ha descubrió que ciertos péptidos o partes de Nfl son mejores indicadores del daño neuronal

### **I. Definiciones**

[0094] Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenecen las realizaciones de la invención. Muchos métodos y materiales similares, modificados o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica de las realizaciones de la presente invención sin experimentación indebida; los materiales y métodos preferidos se describen en el presente documento. Al describir y reivindicar las realizaciones de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación.

[0095] Las concentraciones, cantidades y otros datos numéricos pueden expresarse o presentarse aquí en un formato de rango. Debe entenderse que dicho formato de rango se utiliza simplemente por conveniencia y brevedad y debe interpretarse de manera flexible para incluir no sólo los valores numéricos explícitamente citados como límites del rango, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subrangos abarcados dentro de ese rango como si cada valor numérico y subrango se recitara explícitamente. A modo de ilustración, se debe interpretar que un rango numérico de “aproximadamente 2 a aproximadamente 50” incluye no sólo los valores explícitamente citados de 2 a 50, sino que también incluye todos los valores individuales y subintervalos dentro del rango indicado. Por lo tanto, se incluyen en este rango numérico valores individuales como de 2, 2.4, 3, 3.7, 4, 5.5, 10, 10.1, 14, 15, 15.98, 20, 20.13, 23, 25.06, 30, 35.1, 38.0, 40, 44, 44.6, 45, 48, y subrangos como de 1-3, de 2-4, de 5-10, de 5-20, de 5-25, de 5-30, de 5-35, de 5-40, de 5-50, de 2-10, de 2-20, de 2-30, de 2-40, de 2-50, etc. Este mismo principio se aplica a rangos que citan solo un valor numérico como mínimo o máximo. Además, esa interpretación debería aplicarse independientemente de la amplitud de la gama o de las características que se describen.

[0096] El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la variación de la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, a través de técnicas de medición típicas y equipo, con respecto a cualquier variable cuantificable, incluyendo, entre otros, masa, volumen, tiempo, distancia y cantidad. Además, dados los procedimientos de manipulación de sólidos y líquidos utilizados en el mundo real, existe cierto error y variación involuntarios que probablemente se deban a diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes utilizados para elaborar las composiciones o llevar a cabo los métodos y similares. . El término “aproximadamente” también abarca estas variaciones, que pueden ser de hasta  $\pm 5\%$ , pero también pueden ser  $\pm 4\%$ ,  $3\%$ ,  $2\%$ ,  $1\%$ , etc. Modificadas o no por el término “aproximadamente”, la las reclamaciones incluyen equivalentes a las cantidades.

[0097] En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que

contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de EE. UU. y pueden significar "incluye", "incluido" y el similares, y generalmente se interpretan como términos abiertos. Los términos "que consiste en" o "consiste en" son términos cerrados e incluyen solo los componentes, estructuras, pasos o similares enumerados específicamente junto con dichos términos, así como aquello que esté de acuerdo con la ley de patentes de los EE. UU. "Consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en" tienen el significado que generalmente les atribuye la ley de patentes de los Estados Unidos. En particular, dichos términos son generalmente términos cerrados, con la excepción de permitir la inclusión de artículos, materiales, componentes, pasos o elementos adicionales, que no afecten materialmente las características o funciones básicas y novedosas de los artículos utilizados en conexión. con eso. Por ejemplo, los oligoelementos presentes en una composición, pero que no afectan la naturaleza o las características de la composición, estarían permitidos si estuvieran presentes en el lenguaje "que consiste esencialmente en", aunque no se mencionen expresamente en una lista de elementos siguiendo dicha terminología. En esta especificación, cuando se utiliza un término abierto, como "que comprende" o "que incluye", se entiende que se debe brindar apoyo directo también a "que consiste esencialmente en" el lenguaje, así como a "que consiste en" el lenguaje como si se indicara explícitamente y viceversa. viceversa.

[0098] El término "Ap" se refiere a péptidos derivados de una región en el extremo carboxilo de una proteína más grande llamada proteína precursora de amiloide (APP). El gen que codifica APP se encuentra en el cromosoma 21. Hay muchas formas de Ap que pueden tener efectos tóxicos: los péptidos Ap suelen tener secuencias de 37 a 43 aminoácidos de largo, aunque pueden tener truncamientos y modificaciones que cambian su tamaño general. Se pueden encontrar en compartimentos solubles e insolubles, en monoméricos, oligoméricos y agregados se forma, intracelular o extracelularmente, y puede formar complejos con otras proteínas o moléculas. Los efectos adversos o tóxicos de Ap pueden ser atribuibles a cualquiera o todas las formas mencionadas anteriormente, así como a otras no descritas específicamente. Por ejemplo, dos de estas isoformas de Ap

incluyen Ap40 y Ap42; siendo la isoforma Ap42 particularmente fibrillogénica o insoluble y asociada con estados patológicos. El término "Ap" normalmente se refiere a una pluralidad de especies de Ap sin discriminación entre especies de Ap individuales. Las especies de Ap específicas se identifican por el tamaño del péptido, por ejemplo, Ap42, Ap40, Ap38, etc.

[0099] Como se usa en el presente documento, el término "valor de Ap42/Ap40" significa la relación de la cantidad de Ap42 en una muestra obtenida de un sujeto en comparación con la cantidad de Ap40 en la misma muestra.

[0100] La "amiloidosis de Ap" se define como un depósito de Ap clínicamente anormal en el cerebro. Un sujeto que se determina que tiene amiloidosis Ap se denomina en el presente documento "amiloide positivo", mientras que un sujeto que se determina que no tiene amiloidosis Ap se denomina en el presente documento "amiloide negativo". Existen indicadores aceptados de amiloidosis Ap en la técnica. En el momento de esta divulgación, la amiloidosis Ap se mide directamente mediante imágenes de amiloide (p. ej., PET con PiB, fluorbetapir u otros métodos de imágenes conocidos en la técnica) o se mide indirectamente mediante una disminución de la Ap42 del líquido cefalorraquídeo (CSF) o una disminución de la Ap42/40 del CSF. relación. [11C]Las imágenes PIB-PET con una puntuación media de potencial de unión cortical (MCP) > 0,18 son un indicador de amiloidosis Ap, al igual que la concentración de Ap42 en el líquido cefalorraquídeo (CSF) de aproximadamente 1 ng/ml medida mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas (IP/ EM)). Alternativamente, se puede utilizar una relación de corte para CSF Ap42/40 que maximiza la precisión en la predicción de la positividad de amiloide determinada por PIB-PET. Valores como estos, u otros conocidos en la técnica y/o usados en los ejemplos, se pueden usar solos o en combinación para confirmar clínicamente la amiloidosis Ap. Véase, por ejemplo, Klunk W E et al. Ann Neurol 55(3) 2004, Fagan A M et al. Ann Neurol, 2006, 59(3), Patterson et. al, Annals of Neurology, 2015, 78(3): 439-453, o Johnson et al., J. Nuc. Med., 2013, 54(7): 1011-1013, cada uno de ellos incorporado aquí como referencia en su totalidad. Los sujetos con amiloidosis Ap pueden ser sintomáticos o no, y los sujetos sintomáticos pueden satisfacer o no

los criterios clínicos para una enfermedad asociada con amiloidosis Ap. Ejemplos no limitantes de síntomas asociados con la amiloidosis Ap pueden incluir deterioro de la función cognitiva, alteración del comportamiento, anormalidad, función del lenguaje, desregulación emocional, convulsiones, demencia y deterioro de la estructura o función del sistema nervioso. Las enfermedades asociadas con la amiloidosis Ap incluyen, entre otras, la enfermedad de Alzheimer (AD), la angiopatía amiloide cerebral (CAA), la demencia con cuerpos de Lewy y la miositis por cuerpos de inclusión. Los sujetos con amiloidosis Ap tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la amiloidosis Ap.

[0101] Un "signo clínico de amiloidosis Ap" se refiere a una medida objetiva de la deposición de Ap conocida en la técnica. Los signos clínicos de amiloidosis Ap pueden incluir, entre otros, depósito de Ap identificado mediante imágenes de amiloide (por ejemplo, PET con PiB, fluorbetapir u otros métodos de imágenes conocidos en la técnica) o por una disminución de la relación Ap42 o Ap42/40 del líquido cefalorraquídeo (CSF) . Véase, por ejemplo, Klunk WE et al. Ann Neurol 55(3) 2004, y Fagan AM et al. Ann Neurol 59(3) 2006, cada uno incorporado aquí como referencia en su totalidad. Los signos clínicos de amiloidosis Ap también pueden incluir mediciones del metabolismo de Ap, en particular mediciones del metabolismo de Ap42 solo o en comparación con mediciones del metabolismo de otras variantes de Ap (por ejemplo, Ap37, Ap38, Ap39, Ap40 y/o Ap total). , como se describe en las patentes estadounidenses números de serie 14/366,831, 14/523,148 y 14/747,453, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Se describen métodos adicionales en Albert et al. Alzheimer y demencia 2007 vol. 7, págs. 170-179; McKhann et al., Alzheimer y demencia 2007 vol. 7, págs. 263-269; y Sperling et al. Alzheimer y demencia 2007 vol. 7, págs. 280-292, cada uno incorporado aquí como referencia en su totalidad. Es importante destacar que un sujeto con signos clínicos de amiloidosis Ap puede tener o no síntomas asociados con el depósito de Ap. Sin embargo, los sujetos con signos clínicos de amiloidosis Ap tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con la amiloidosis Ap. Los signos clínicos de amiloidosis Ap también pueden incluir mediciones de otras proteínas solubles

en el LCR o en la sangre, incluidas, entre otras, especies de tau fosforiladas (p. ej., especies de tau fosforiladas en el residuo T217 y/ro T181, y similares).

[0102] Un "candidato para imágenes de amiloide" se refiere a un sujeto que ha sido identificado por un médico como un individuo para quien las imágenes de amiloide pueden estar clínicamente justificadas. Como ejemplo no limitante, un candidato para imágenes de amiloide puede ser un sujeto con uno o más signos clínicos de amiloidosis Ap, uno o más síntomas asociados a placa Ap, uno o más síntomas asociados a CAA, o combinaciones del mismo. Un médico puede recomendar imágenes de amiloide para dicho sujeto para dirigir su atención clínica. Como otro ejemplo no limitante, un candidato para imágenes de amiloide puede ser un participante potencial en un ensayo clínico para una enfermedad asociada con amiloidosis Ap (ya sea un sujeto de control o un sujeto de prueba).

[0103] Un "síntoma asociado a la placa Ap" o un "síntoma asociado a CAA" se refiere a cualquier síntoma causado o asociado con la formación de placas amiloides o CAA, respectivamente, que están compuestos por agregados fibrilares ordenados regularmente llamados fibrillas de amiloide. Los síntomas ejemplares asociados a la placa Ap pueden incluir, entre otros, degeneración neuronal, deterioro de la función cognitiva, deterioro de la memoria, alteración del comportamiento, desregulación emocional, convulsiones, deterioro de la estructura o función del sistema nervioso y un mayor riesgo de desarrollo o empeoramiento de la enfermedad de Alzheimer o CAA. La degeneración neuronal puede incluir un cambio en la estructura de una neurona (incluidos cambios moleculares como la acumulación intracelular de proteínas tóxicas, agregados de proteínas, etc. y cambios a nivel macro como cambios en la forma o longitud de los axones o dendritas, cambios en la composición de la vaina de mielina, pérdida de la vaina de mielina, etc.), un cambio en la función de una neurona, una pérdida de la función de una neurona, la muerte de una neurona o cualquier combinación de los mismos. La función cognitiva deteriorada puede incluir, entre otras, dificultades con la memoria, la atención, la concentración, el lenguaje, el pensamiento abstracto, la creatividad, la función ejecutiva, la planificación y la organización. El comportamiento alterado puede incluir, entre otros, agresión física o verbal,

impulsividad, disminución de la inhibición, apatía, disminución de la iniciación, cambios en la personalidad, abuso de alcohol, tabaco o drogas y otros comportamientos relacionados con la adicción. La desregulación emocional puede incluir, entre otros, depresión, ansiedad, manía, irritabilidad e incontinencia emocional. Las convulsiones pueden incluir, entre otras, convulsiones tónico-clónicas generalizadas, convulsiones parciales complejas y convulsiones psicógenas no epilépticas. La estructura o función del sistema nervioso deteriorada puede incluir, entre otros, hidrocefalia, parkinsonismo, trastornos del sueño, psicosis y deterioro del equilibrio y la coordinación. Esto puede incluir alteraciones motoras como monoparesia, hemiparesia, tetraparesia, ataxia, balismo y temblor. Esto también puede incluir pérdida o disfunción sensorial, incluidas sensaciones olfativas, táctiles, gustativas, visuales y auditivas. Además, esto puede incluir alteraciones del sistema nervioso autónomo, como disfunción intestinal y vesical, trastornos sexuales desregulación de la presión arterial y la temperatura. Finalmente, esto puede incluir alteraciones hormonales atribuibles a la disfunción del hipotálamo y la glándula pituitaria, como deficiencias y desregulación de la hormona del crecimiento, la hormona estimulante de la tiroides, la hormona luteinizante, la hormona estimulante del folículo, la hormona liberadora de gonadotropina, la prolactina y muchas otras hormonas y moduladores.

[0104] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "muestra de sangre" se refiere a una muestra biológica derivada de sangre, preferiblemente sangre periférica (o circulante). La muestra de sangre puede ser sangre completa, plasma o suero, aunque normalmente se prefiere el plasma.

[0105] El término "isoforma", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de varias formas diferentes de la misma proteína, que surgen debido al corte y empalme alternativo del ARNm que codifica la proteína, la modificación postraducciona de la proteína, el procesamiento proteolítico de la proteína que ocurre *in vivo*, variaciones genéticas y recombinación somática. Los términos "isoforma", "especie" y "variante" se usan indistintamente (p. ej., el término "isoforma de Nf1" y "especie de Nf1" se pueden usar indistintamente).

[0106] A menos que se indique expresamente lo contrario, el término "cadena ligera de neurofilamento" se refiere a "cadena ligera de neurofilamento humano" y abarca todas las isoformas o variantes codificadas genéticamente, así como especies de las mismas que están truncadas en el extremo C *in vivo*, truncadas en el extremo N *in vivo*, N-terminalmente truncado y C-terminalmente truncado *in vivo*, modificado postraduccionalmente *in vivo*, o cualquier combinación de los mismos. Los términos "cadena ligera de neurofilamento", "polipéptido ligero de neurofilamento" y "Nfl" se usan indistintamente en el presente documento. Nfl de longitud completa tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 1.

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEC ID N.º: 1 | MSSFSEYEPYYSTSYKRRYVETPRVHISSVRSGYSTARSAYSSYSAPVSSSL<br>VRRSYSSSSGSLMPLENLDLSQVAASNDLKSIRTQEKAQLQDLNDRFASFI<br>ERVHELEQQNKVLEAELLVLRQKHSEPSRFRALYEQEIRDLRLAAEDATNEK<br>QALQGEREGLEETLRNLQARYEEEVLSREDAEGRLMEARKGADEAALARAE<br>LEKRIDSLMDEISFLKKVHEEEIAELQAQIQYAQISVEMDVTKPDLAALKDIRA<br>QYEKLAAKNMQNAEEWFKSRFTVLTESAAKNTDAVRAAKDEVSESRLLKAK<br>TLEIEACRGMNEALEKQLQELEDKQNADISAMQDTINKLENELRTTKSEMARY<br>LKEYQDLLNVKMALDIEIAAYRKLLEGEETRLSFTSVGSITSGYSQSSQVFGRS<br>AYGGLQTSSYLMSTRSFPSYYTSHVQEEQIEVEETIEAAKAEAAKDEPPSEGE<br>AEEEEKDKEEAEEEEAAKEESEEAKKEEGGEGEGEGEETKEAEEEE<br>KKVE GAG E EQAAKKKD |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0107] El término "Nfl recombinante" se refiere a Nfl codificado por un ácido nucleico que se ha introducido en un sistema (por ejemplo, una célula procariótica, una célula eucariota o un sistema de expresión libre de células) que soporta la expresión del ácido nucleico y su traducción. en una proteína. Los métodos para producir proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica, y la producción de Nfl recombinante descrita en el presente documento no se limita a un sistema particular.

[0108] El término "sujeto" se refiere a un ser humano o a un animal no humano que expresa Nfl humano.

[0109] Los términos "tratar", "tratar" o "tratamiento" como se usan en el presente documento, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico o una enfermedad/trastorno no deseado. Los

resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad. y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad, afección o trastorno, así como aquellos propensos a padecer la enfermedad, afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad, afección o trastorno.

[0110] El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se usa en el sentido más amplio y abarca varios anticuerpos y estructuras similares a anticuerpos, que incluyen, entre otras, estructuras monoclonales, policlonales y multiespecíficas de longitud completa (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas, etc.) anticuerpos, así como anticuerpos de cadena pesada y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada. Los dominios de un anticuerpo que participan en la unión de un antígeno se denominan "región variable" o "dominio variable" y se describen con más detalle a continuación. Un único dominio variable puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Preferiblemente, pero no necesariamente, los anticuerpos útiles en el descubrimiento se producen de forma recombinante. Los anticuerpos pueden estar glicosilados o no, aunque pueden preferirse los anticuerpos glicosilados. Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunos se purifica un anticuerpo hasta una pureza superior al 95 % o al 99 % según se determina mediante métodos conocidos en la técnica.

[0111] Además de los anticuerpos descritos en el presente documento, puede ser posible diseñar un mimético de anticuerpo o un aptámero usando métodos conocidos en la técnica que funcione sustancialmente igual que un anticuerpo de la invención. Un "anticuerpo mimético" se refiere a un polipéptido o una proteína que puede unirse específicamente a un antígeno pero que no está

relacionado estructuralmente con un anticuerpo. Los miméticos de anticuerpos tienen una masa de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 20 kDa. Ejemplos no limitantes de miméticos de anticuerpos son moléculas de aficuerpo, afilinas, afímeros, alfacuerpos, anticalinas, avímeros, DARPs y monocuerpos. Los aptámeros son una clase de pequeños ligandos de ácidos nucleicos que están compuestos de ARN o oligonucleótidos de ADN monocatenario y tienen alta especificidad y afinidad por sus objetivos. Los aptámeros interactúan y se unen a sus objetivos mediante el reconocimiento estructural, un proceso similar al de una reacción antígeno-anticuerpo. Los aptámeros tienen un peso molecular más bajo que los anticuerpos, normalmente entre 8 y 25 kDa.

[0112] Los términos "anticuerpo de longitud completa" y "anticuerpo intacto" pueden usarse indistintamente y se refieren a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento. La unidad estructural básica de un anticuerpo nativo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras se clasifican en gamma, mu, alfa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. La porción amino terminal de cada cadena ligera y pesada incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más secuencias de aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos (VL y VH, respectivamente). La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más secuencias de aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 secuencias de aminoácidos más. Los anticuerpos intactos se reticulan adecuadamente mediante enlaces disulfuro, como se sabe en la técnica.

[0113] Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Ver, por ejemplo, Kindt et al. *Inmunología de Kuby*, 6<sup>a</sup> ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión al antígeno. Además, se pueden aislar anticuerpos que se unen a un antígeno particular usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para seleccionar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0114] "Región marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). El FR de un dominio variable generalmente consta de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia: FR1-HVR1-FR2-HVR2-FR3-HVR3-FR4. Los dominios FR de una cadena pesada y una cadena ligera pueden diferir, como se sabe en la técnica.

[0115] El término "región hipervariable" o "HVR" como se usa en el presente documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable que son hipervariables en secuencia (también denominadas comúnmente "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR") y/o forman estructuras definidas estructuralmente. bucles ("bucles hipervariables") y/o contienen los residuos en contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Como se usa en el presente documento, "un HVR derivado de una región variable" se refiere a un HVR que no tiene más de dos sustituciones de aminoácidos, en comparación con el HVR correspondiente de la región variable original. Los HVR ejemplares en el presente documento incluyen: (a) bucles hipervariables que ocurren en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)); (b) CDR que aparecen en los residuos de aminoácidos

24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3). ) (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991)); (c) contactos con antígenos que ocurren en los residuos de aminoácidos 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 4758 (H2) y 93-101 (H3) (MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996)); (d) Regiones CDR1-IMGT (posiciones 27-38), CDR2-IMGT (posiciones 56-65) y CDR3-IMGT (posiciones 105-116 o 105-117), que se basan en IMGT numeración única (Lefranc, "The IMGT Unique Numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains", *The Immunologist*, 1999, 7: 132-136; Lefranc et al., *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (edición de la base de datos) : D1006-D1012; Ehrenmann et al., "Capítulo 2: Análisis estandarizado de secuencia y estructura de anticuerpos utilizando IMGT", en *Antibody Engineering Volumen 2*, Eds. Roland E. Kontermann and Stefan Dubel, 2010, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-01147-4; [www.imgt.org/IMGTScientificChart/Nomenclature/IMGT-FRCDRdefinition.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Nomenclature/IMGT-FRCDRdefinition.html)), y (e) combinaciones de (a), (b), (c) y/o (d), como se define a continuación para varios anticuerpos de este divulgación. A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) a los que se les asignan números de identificación de secuencia se numeran basándose en la numeración única IMGT, supra.

[0116] El término "región Fc" en el presente documento se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C-terminal (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza según el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service,

National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

[0117] Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que puede diferir de la de una región Fc nativa en virtud de una o más sustituciones de aminoácidos y/o en virtud de un patrón de glicosilación modificado, en comparación con una región Fc nativa. región o a la región Fc de un polipéptido original. En un ejemplo, una región Fc variante puede tener de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, o de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La región Fc variante en el presente documento puede poseer al menos aproximadamente 80 % de homología, al menos aproximadamente 90 % de homología o al menos aproximadamente 95 % de homología con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original.

[0118] Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; formas monocatenarias de anticuerpos y variantes de orden superior de los mismos; anticuerpos de dominio único y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0119] Las formas monocatenarias de anticuerpos y sus formas de orden superior pueden incluir, entre otras, anticuerpos de dominio único, fragmentos variantes de cadena sencilla (scFv), scFv divalentes (di-scFv), scFv trivalentes (tri-scFv) , scFv tetravalentes (tetra-scFv), diacuerpos y tricuerpos y tetracuerpos. Los ScFv se componen de regiones variables de cadena pesada y ligera conectadas por un conector. En la mayoría de los casos, pero no en todos, el conector puede ser un péptido. Un péptido conector tiene preferiblemente una longitud de aproximadamente 5 a 30 aminoácidos, o de aproximadamente 10 a 25 aminoácidos de longitud. Normalmente, el conector permite la estabilización de los dominios variables sin interferir con el plegamiento adecuado y la creación de un sitio de unión activo. En realizaciones preferidas, un péptido conector es rico en

glicina, así como en serina o treonina. Los ScFv se pueden usar para facilitar la presentación en fagos o se pueden usar para citometría de flujo, inmunohistoquímica o como dominios de direccionamiento. En la técnica se conocen métodos para preparar y utilizar scFv. Los ScFv también se pueden conjugar con un dominio constante humano (por ejemplo, un dominio constante pesado se deriva de un dominio de IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un dominio constante de cadena pesada derivado de IgA, IgM o IgE). Los diacuerpos, tricuerpos y tetracuerpos y variantes de orden superior se crean típicamente variando la longitud del péptido conector de cero a varios aminoácidos. Alternativamente, también es bien conocido en la técnica que se pueden generar variantes de anticuerpos de unión multivalente usando unidades de autoensamblaje unidas al dominio variable.

[0120] Un "anticuerpo de dominio único" se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en un dominio de anticuerpo variable monomérico único.

[0121] Los anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos biespecíficos, triespecíficos o anticuerpos de cuatro o más especificidades. Los anticuerpos multiespecíficos pueden crearse mediante que combina las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo con las cadenas pesadas y ligeras de uno o más anticuerpos diferentes. Estas cadenas pueden estar unidas covalentemente.

[0122] "Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de una única copia o clon, incluyendo, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fago. El "anticuerpo monoclonal" no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, así como tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de dichas tecnologías y otras tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. Además, el anticuerpo monoclonal puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse en una fase sólida y/o conjugarse con un compuesto heterólogo (por ejemplo, una enzima o toxina) según métodos conocidos en la técnica.

[0123] Un "anticuerpo de cadena pesada" se refiere a un anticuerpo que

consta de dos cadenas pesadas. Un anticuerpo de cadena pesada puede ser un anticuerpo tipo IgG de camellos, llamas, alpacas, tiburones, etc., o un IgNAR de un pez cartilaginoso.

[0124] Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano que se ha modificado para reducir el riesgo de que el anticuerpo no humano provoque una respuesta inmune en humanos después de la administración, pero que conserva una especificidad y afinidad de unión similares a las del anticuerpo no humano inicial. Un anticuerpo humanizado se une al mismo epítipo o a un epítipo similar al del anticuerpo no humano. El término "anticuerpo humanizado" incluye un anticuerpo que está compuesto parcial o totalmente por secuencias de aminoácidos derivadas de una línea germinal de anticuerpo humano alterando la secuencia de un anticuerpo que tiene regiones hipervariables no humanas ("HVR"). La alteración más simple puede consistir simplemente en sustituir la región constante murina por la región constante de un anticuerpo humano, dando así como resultado una quimera humana/murina que puede tener una inmunogenicidad suficientemente baja para ser aceptable para uso farmacéutico. Preferiblemente, la región variable del anticuerpo también se humaniza mediante técnicas que ahora son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las regiones estructurales de una región variable pueden sustituirse por las regiones estructurales humanas correspondientes, conservando al mismo tiempo uno, varios o los seis HVR no humanos. Algunos residuos estructurales pueden sustituirse con residuos correspondientes de un dominio VL no humano o un dominio VH (por ejemplo, el anticuerpo no humano del que se derivan los residuos HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo humanizado. Las regiones estructurales sustancialmente humanas tienen al menos aproximadamente un 75% de homología con una secuencia estructural humana conocida (es decir, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia). Los HVR también pueden mutarse aleatoriamente de modo que la actividad de unión y la afinidad por el

antígeno se mantengan o mejoren en el contexto de regiones estructurales de línea germinal completamente humana o regiones estructurales que son sustancialmente humanas. Como se mencionó anteriormente, para su uso en los métodos de este descubrimiento es suficiente emplear un fragmento de anticuerpo. Además, como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende una región estructural sustancialmente humana, al menos un HVR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente humana. Las regiones constantes sustancialmente humanas tienen al menos aproximadamente un 90 % de una secuencia constante humana conocida (es decir, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 % o aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia). Por lo tanto, todas las partes de un anticuerpo humanizado, excepto posiblemente los HVR, son sustancialmente idénticas a los pares correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana de línea germinal.

[0125] Si se desea, el diseño de inmunoglobulinas humanizadas se puede llevar a cabo de la siguiente manera, o usando métodos similares familiares para los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Almagro, et al. *Front. Biosci.* 2008, 13(5):1619-33). Una región variable de anticuerpo murino se alinea con las secuencias de la línea germinal humana más similares (por ejemplo, utilizando BLAST o un algoritmo similar). Los residuos de CDR de la secuencia del anticuerpo murino se injertan en la línea germinal "acceptora" humana similar. Posteriormente, una o más posiciones cerca de las CDR o dentro del marco (por ejemplo, posiciones Vernier) pueden revertirse al aminoácido murino original para lograr un anticuerpo humanizado con afinidad de unión similar al anticuerpo murino original. Por lo general, se generan y prueban empíricamente su actividad varias versiones de anticuerpos humanizados con diferentes mutaciones de reversión. La variante de anticuerpo humanizado con propiedades más similares al anticuerpo murino original y la menor cantidad de reversiones de la estructura murina se selecciona como candidato a anticuerpo humanizado final.

[0126] El término "agente de unión a epítipo" se refiere a un anticuerpo,

un aptámero, un ácido nucleico, un péptido, una proteína, un lípido, un metabolito, una molécula pequeña o un fragmento del mismo que reconoce y es capaz de específicamente unión a un epítipo determinado. Los El epítipo puede ser un epítipo lineal o puede ser un epítipo conformacional. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "epítipo lineal" se refiere a un epítipo que consiste en una secuencia lineal (o continua) de aminoácidos. El término "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo que consta de aminoácidos discontinuos en la superficie de un agregado proteico que tiene una forma tridimensional específica.

[0127] Como se usa en el presente documento, el término "aptámero" se refiere a un polinucleótido, generalmente un ARN o ADN que tiene una actividad biológica útil en términos de actividad bioquímica, reconocimiento molecular o atributos de unión. Por lo general, un aptámero tiene una actividad molecular como unirse a una molécula objetivo en un epítipo (región) específico. Generalmente se acepta que un aptámero, que es específico en su unión a un polipéptido, puede sintetizarse y/o identificarse mediante métodos de evolución in vitro. Los medios para preparar y caracterizar aptámeros, incluso mediante métodos de evolución in vitro, son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento US 7.939.313, incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad.

## **II. Agentes de unión a epítipos anti-Nfl**

[0128] Un "agente de unión a epítipo anti-Nfl", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de unión a epítipo aislado que se une al polipéptido ligero (Nfl) de neurofilamento humano recombinante con una afinidad constante o afinidad de interacción (KD) entre aproximadamente 0,1 pM a aproximadamente 10 pM, preferiblemente aproximadamente 0,1 pM a aproximadamente 1 pM, más preferiblemente aproximadamente 0,1 pM a aproximadamente 100 nM. Los métodos para determinar la afinidad de un agente de unión a epítipo por un antígeno son conocidos en la técnica y se ilustran con más detalle en los Ejemplos. En algunas realizaciones, un agente de unión a epítipo anti-Nfl es un aptámero de ácido nucleico. En algunas realizaciones, un

agente de unión a epítiope anti-Nfl es un anticuerpo.

[0129] Los agentes de unión a epítomos anti-Nfl descritos en el presente documento se pueden describir o especificar en términos del epítomo(s) que reconocen o se unen. La porción de un polipéptido diana que interactúa específicamente con el dominio de unión al antígeno de un agente de unión a epitopees un "epítomo". Nfl puede comprender cualquier número de epítomos, dependiendo de la fuente de la proteína (por ejemplo, recombinante, humana), la ubicación de la proteína (*por ejemplo*, intracelular, extracelular, cerebro, LCR, sangre, etc.), estado conformacional e isoforma. etc. Además, cabe señalar que un "epítomo" en Nfl puede ser un epítomo lineal o un epítomo conformacional, y en ambos casos puede incluir elementos no polipeptídicos, *por ejemplo*, un epítomo puede incluir una cadena lateral de carbohidrato, una cadena lateral de lípido, un fosfato, etc. El término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de unión de un epítomo individual con el sitio de unión al antígeno de un agente de unión a epítomo.

[0130] Aunque los agentes de unión a epítomos anti-Nfl de la presente divulgación se pueden generar usando Nfl recombinante de longitud completa como antígeno, los agentes de unión a epítomos anti-Nfl útiles para los métodos de la presente divulgación se unen específicamente a epítomos presentes en Nfl aislados. de sangre o plasma. Los agentes de unión a epítomos anti-Nfl preferidos de la presente divulgación se unen específicamente a epítomos dentro de los aminoácidos 90 a 543 de SEC ID N.º 1. En diversas realizaciones, los agentes de unión a epítomos anti-Nfl de la presente divulgación se unen específicamente a epítomos dentro de los aminoácidos 90 a 300 de SEC ID N.º 1, o dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID N.º 1. En otras realizaciones, los agentes de unión a epitopes anti-Nfl de la presente divulgación se unen específicamente a epítomos dentro de los aminoácidos 125 a 300 de SEC ID N.º 1, dentro de los aminoácidos 125 a 250 de SEC ID N.º 1, o dentro de los aminoácidos 125 a 200 de SEC ID N.º 1. En otras realizaciones, los agentes de unión a epitopes anti-Nfl de la presente divulgación se unen específicamente a epítomos dentro de los aminoácidos 251 a 400 de SEC ID N.º 1, dentro de los aminoácidos 251 a 355 de

SEC ID N.º 1, dentro de los aminoácidos 272 a 355 de SEC ID N.º 1, o dentro de los aminoácidos 272 a 350 de SEC ID N.º 1. En otras realizaciones, los agentes de unión a epítomos anti-Nfl de la presente divulgación se unen específicamente a epítomos dentro de los aminoácidos 350 a 543 de SEC ID NO. 1, dentro de los aminoácidos 397 a 543 de SEC ID N.º 1, dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º 1, dentro de los aminoácidos 397 a 540 de SEC ID N.º 1, o dentro de los aminoácidos 400 a 540 de SEC ID N.º 1. Los métodos para mapear epítomos son bien conocidos en la técnica.

[0131] En una realización, un agente de unión a epítomo anti-Nfl es HJ30.1, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.1 o un agente de unión a epítomo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1 a Nfl recombinante de longitud completa. HJ30.1 es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma PTA-126966 depositado en la American Type Culture Collection (ATCC).

[0132] En una realización, un agente de unión a epítomo anti-Nfl es HJ30.2, fragmento de unión a antígeno de HJ30.2 o un agente de unión a epítomo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.2 a Nfl recombinante de longitud completa. HJ30.2 es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma PTA-126967 depositado en la ATCC.

[0133] En una realización, un agente de unión a epítomo anti-Nfl es HJ30.4, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.4 o un agente de unión a epítomo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 a Nfl recombinante de longitud completa. HJ30.4 es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma PTA-126968 depositado en la ATCC.

[0134] En una realización, un agente de unión a epítomo anti-Nfl es HJ30.7, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.7 o un agente de unión a epítomo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa. HJ30.7 es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma PTA-126969 depositado en la ATCC.

[0135] En una realización, un agente de unión a epítomo anti-Nfl es HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.11 o un agente de unión a

epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa. HJ30.11 es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma PTA-126970 depositado en la ATCC.

[0136] En una realización, un agente de unión a epítopo anti-Nfl es HJ30.13, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.13 o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa. HJ30.13 es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma PTA-126971 depositado en la ATCC.

[0137] En realizaciones en las que el agente de unión a epítopo es un anticuerpo, el anticuerpo puede tener o no una región Fc variante. En algunos ejemplos, se puede modificar una región Fc para que tenga una afinidad aumentada o disminuida por un receptor Fc en una célula microglial y/o un patrón de glicosilación alterado. En diversas realizaciones, un anticuerpo antiNfl puede ser un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, en algunos ejemplos, un anticuerpo anti-Nfl de la presente divulgación es un anticuerpo humanizado derivado de HJ30.1, HJ30.2, HJ30.4, HJ30.7, HJ30.11 o HJ30.13. Un anticuerpo anti-Nfl humanizado puede comprender una o más regiones constantes, o una porción de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida).

[0138] Se dice que un agente de unión a epítopo de prueba inhibe competitivamente la unión de un agente de unión a epítopo de referencia (p. ej., HJ30.1, HJ30.2, HJ30.4, HJ30.7, HJ30.11, HJ30.13, etc. ) a un epítopo determinado si el agente de unión al epítopo de prueba se une preferentemente a ese epítopo hasta el punto de bloquear la unión del agente de unión al epítopo de referencia al epítopo en al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos el 80%, o al menos el 90%. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En un ejemplo específico, la inhibición competitiva se determina mediante un ELISA de inhibición competitiva que comprende las etapas de: recubrir una superficie de unión o soporte con un agente de unión a epítopo de referencia purificado para formar una superficie

recubierta con agente de unión a epítopo; combinar una cantidad predeterminada de un antígeno marcado purificado y una muestra de prueba que contiene un agente de unión a epítopo de prueba; añadir la mezcla incubada de antígeno marcado y agente de unión al epítopo de prueba a dicha superficie recubierta; incubar dicha superficie recubierta con dicha combinación de antígeno y agente de unión al epítopo de prueba; y medir la cantidad de inhibición de unión a antígeno en comparación con condiciones que carecen del agente de unión a epítopo de prueba.

[0139] Los agentes de unión a epítopos anti-Nfl descritos en el presente documento también se pueden describir o especificar en términos de su secuencia.

[0140] En una realización, un anticuerpo anti-Nfl comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.1 y/o una región variable de cadena pesada (VH) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.1. El HVR derivado del VL de HJ30.1 puede ser L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos. El HVR derivado del VH de HJ30.1 puede ser H1, H2, H3 o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo que comprende uno o más HVR derivados de la VH de HJ30.1 puede comprender además VL que comprende L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos de la VL de HJ30.1. En diversas realizaciones de lo anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, o el anticuerpo puede tener una VL con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la VL de HJ30.1 y/o un VH con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con el VH de HJ30.1. En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-Nfl puede comprender opcionalmente una o más regiones constantes, o una porción de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida). La presente divulgación también abarca las secuencias de ácido nucleico correspondientes, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, y pueden incorporarse en un vector u otra molécula de ADN grande, tal como un cromosoma, para expresar un anticuerpo de divulgación.

[0141] En una realización, un anticuerpo anti-Nfl comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.2 y/o una región variable de cadena pesada (VH) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30. 2. El HVR derivado del VL de HJ30.2 puede ser L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos. El HVR derivado del VH de HJ30.2 puede ser H1, H2, H3 o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo que comprende uno o más HVR derivados de la VH de HJ30.2 puede comprender además VL que comprende L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos de la VL de HJ30.2. En diversas realizaciones de lo anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, o el anticuerpo puede tener una VL con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la VL. de HJ30.2 y/o un VH con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con el VH de HJ30.2. En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-Nfl puede comprender opcionalmente una o más regiones constantes, o una porción de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida). La presente divulgación también abarca las secuencias de ácido nucleico correspondientes, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, y pueden incorporarse en un vector u otra molécula de ADN grande, tal como un cromosoma, para expresar un anticuerpo del divulgación.

[0142] En una realización, un anticuerpo anti-Nfl comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.4 y/o una región variable de cadena pesada (VH) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.4. El HVR derivado del VL de HJ30.4 puede ser L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos. El HVR derivado del VH de HJ30.4 puede ser H1, H2, H3 o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo que comprende uno o más HVR derivados de la VH de HJ30.4 puede comprender además VL que comprende L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos de la VL de HJ30.4. En diversas realizaciones de lo anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, o el anticuerpo puede tener una VL con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la VL. de HJ30.4 y/o un VH con 90, 91, 92,

93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con el VH de HJ30.4. En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-Nfl puede comprender opcionalmente una o más regiones constantes, o una porción de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida). La presente divulgación también abarca las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, y puede incorporarse en un vector u otra molécula de ADN grande, tal como un cromosoma, para expresar un anticuerpo de la divulgación.

[0143] En una realización, un anticuerpo anti-Nfl comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.7 y/o una región variable de cadena pesada (VH) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.7. El HVR derivado del VL de HJ30.7 puede ser L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos. El HVR derivado del VH de HJ30.7 puede ser H1, H2, H3 o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo que comprende uno o más HVR derivados de la VH de HJ30.7 puede comprender además VL que comprende L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos de la VL de HJ30.7. En diversas realizaciones de lo anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, o el anticuerpo puede tener una VL con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la VL de HJ30.7 y/o un VH con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con el VH de HJ30.7. En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-Nfl puede comprender opcionalmente una o más regiones constantes, o una porción de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida). La presente divulgación también abarca las secuencias de ácido nucleico correspondientes, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, y pueden incorporarse en un vector u otra molécula de ADN grande, tal como un cromosoma, para expresar un anticuerpo de la divulgación.

[0144] En una realización, un anticuerpo anti-Nfl comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.11 y/o

una región variable de cadena pesada (VH) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.11. El HVR derivado del VL de HJ30.11 puede ser L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos. El HVR derivado del VH de HJ30.11 puede ser H1, H2, H3 o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo que comprende uno o más HVR derivados de la VH de HJ30.11 puede comprender además VL que comprende L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos de la VL de HJ30.11. En diversas realizaciones de lo anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, o el anticuerpo puede tener una VL con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la VL de HJ30.11 y/o un VH con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con el VH de HJ30.11. En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-Nfl puede comprender opcionalmente una o más constantes de EFS, o una parte de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida). La presente divulgación también abarca las secuencias de ácido nucleico correspondientes, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, y pueden incorporarse en un vector u otra molécula de ADN grande, tal como un cromosoma, para expresar un anticuerpo de divulgación.

[0145] En una realización, un anticuerpo anti-Nfl comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.17 y/o una región variable de cadena pesada (VH) que tiene uno o más HVR derivados de HJ30.17. El HVR derivado del VL de HJ30.17 puede ser L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos. El HVR derivado del VH de HJ30.17 puede ser H1, H2, H3 o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo que comprende uno o más HVR derivados de la VH de HJ30.17 puede comprender además VL que comprende L1, L2, L3 o cualquier combinación de los mismos de la VL de HJ30.17. En diversas realizaciones de lo anterior, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, o el anticuerpo puede tener una VL con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la VL de HJ30.17 y/o un VH con 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con el VH de HJ30.17. En cada una de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-Nfl puede comprender

opcionalmente una o más regiones constantes, o una porción de una región constante, que es sustancialmente humana (es decir, al menos 90 %, 95 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia estructural humana conocida). La presente divulgación también abarca las secuencias de ácido nucleico correspondientes, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica, y pueden incorporarse en un vector u otra molécula de ADN grande, tal como un cromosoma, para expresar un anticuerpo de divulgación.

[0146] Los agentes de unión a epítopos anti-Nfl descritos en el presente documento también se pueden describir o especificar en términos de su reactividad cruzada. El término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un agente de unión a epítipo, específico de un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por tanto, un agente de unión a epítipo tiene reactividad cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo de reacción cruzada generalmente contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor y, en algunos casos, puede en realidad encaja mejor que el original. Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, ya que se unen a epítopos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % de identidad (como calculado usando métodos conocidos en la técnica) a un epítipo de referencia. Se puede decir que un anticuerpo, u otro agente de unión a epítopos, tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítopos con menos de aproximadamente el 95 %, menos de aproximadamente el 90 % o menos de aproximadamente el 85 % de identidad con un epítipo de referencia. Un anticuerpo, u otro agente de unión a epítipo, puede considerarse "altamente específico" para un determinado epítipo si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

### **III. Métodos para detectar Nfl en una muestra biológica**

[0147] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método

para detectar Nfl en una muestra biológica. El método comprende proporcionar una muestra biológica, enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en la muestra biológica y detectar de una a una pluralidad de isoformas de Nfl previamente enriquecidas. Tal como se usan en el presente documento, los términos "una pluralidad de isoformas de Nfl" y "una población de isoformas de Nfl" pueden usarse indistintamente.

(a) proporcionar una muestra biológica

[0148] Las muestras biológicas adecuadas incluyen una muestra de sangre o una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) obtenida de un sujeto. La sangre y el CSF contienen una pluralidad de isoformas de Nfl, como se detalla en los Ejemplos.

[0149] El tamaño de la muestra biológica utilizada puede variar dependiendo del tipo de muestra, el estado de salud del sujeto del que se obtuvo la muestra y los analitos además de Nfl a analizar (por ejemplo, Ap, tau, ApoE, a-sinucleína, etc.). Los volúmenes de muestra de CSF pueden ser de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 5 ml, o de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 5 ml. En un ejemplo específico, el tamaño de la muestra puede ser de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 1 ml de CSF. Los volúmenes de muestra de plasma pueden ser de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 20 ml, o de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 20 ml. En un ejemplo específico, el tamaño de la muestra puede ser de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20 ml de sangre.

[0150] En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. Un sujeto humano puede estar esperando atención o tratamiento médico, puede estar bajo atención o tratamiento médico, o puede haber recibido atención o tratamiento médico. En diversas realizaciones, un sujeto humano puede ser un sujeto sano, un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad neurodegenerativa, un sujeto con signos y/o síntomas de daño neuronal y/o una enfermedad neurodegenerativa, o un sujeto diagnosticado con daño neuronal y/o una enfermedad neurodegenerativa. La enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, encefalopatía traumática crónica

(CTE), enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Huntington, miositis por cuerpos de inclusión, priones. angiopatía amiloide cerebral por proteína, lesión cerebral traumática (TBI), complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de neurona motora no guameña con ovillos neurofibrilares, demencia granular argirófila, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, frontotemporal demencia con parkinsonismo ligado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, demencia con cuerpos de Lewy (LBD), esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración pálido-pontonigral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, parkinsonismo postencefálico, PART (tauopatía primaria relacionada con la edad), parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, panencefalopatía por esclerosis subaguda, demencia solo en ovillos (o demencia predominante en ovillos), demencia predominante en ovillos, tauopatía de sustancia blanca con inclusiones gliales globulares, deterioro cognitivo leve (DCL), glaucoma, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, parkinsonismo guadalupeño, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, retraso mental relacionado con SLC9A6, demencia relacionada con el VIH, amiloidosis cardíaca senil. Un sujeto sano, a veces denominado “sujeto control” o “control sano”, mínimamente no presenta signos o síntomas clínicos de deterioro cognitivo y también puede ser “negativo” para otros signos o síntomas clínicos de daño neuronal, enfermedades neurodegenerativas, y/o lesión cerebral traumática.

[0151] En otras realizaciones, el sujeto es un animal de laboratorio. En una realización adicional, el sujeto es un animal de laboratorio modificado genéticamente para expresar Nfl humano.

[0152] El CSF se puede haber obtenido mediante punción lumbar con o sin un catéter de CSF permanente. La sangre puede haberse extraído mediante punción venosa con o sin un catéter intravenoso, o mediante punción en el dedo (o su equivalente). Se pueden combinar múltiples muestras de sangre o CSF

extraídas simultáneamente de un sujeto para crear "una muestra". Una vez recolectadas, las muestras de sangre o CSF pueden haberse procesado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, centrifugación para eliminar células enteras y restos celulares; uso de aditivos diseñados para estabilizar y preservar la muestra antes de las pruebas analíticas, etc.). Las muestras de sangre o CSF pueden usarse inmediatamente o pueden congelarse y almacenarse indefinidamente.

[0153] Antes del uso en los métodos descritos en el presente documento, una muestra biológica también puede haberse modificado, si es necesario o deseado, para incluir inhibidores de proteasa, estándares internos, detergente(s) y agente(s) caotrópico(s), para agotar otros analitos (por ejemplo, proteínas, péptidos, metabolitos, etc.), o cualquier combinación de los mismos.

[0154] El término "agotar" significa disminuir en cantidad o número. En consecuencia, una muestra sin proteína puede tener cualquier cantidad de proteína que sea mensurablemente menor que la cantidad en la muestra original, sin incluir ninguna cantidad de proteína. Como ejemplo no limitante, las proteínas pueden eliminarse de una muestra mediante ultrafiltración o precipitación de proteínas con un ácido, un disolvente orgánico o una sal. En términos generales, estos métodos se utilizan para reducir de manera confiable proteínas de alta abundancia y alto peso molecular, que a su vez se enriquecen con proteínas y péptidos de bajo peso molecular y/o baja abundancia (por ejemplo, tau, Ap, Nfl, etc.). En un ejemplo específico, las proteínas pueden agotarse de una muestra mediante precipitación. Brevemente, la precipitación comprende agregar un agente precipitante a una muestra y mezclarla completamente, incubar la muestra con un agente precipitante para precipitar proteínas y separar las proteínas precipitadas mediante centrifugación o filtración. El sobrenadante resultante se puede utilizar luego en aplicaciones posteriores. La cantidad de reactivo necesaria puede determinarse experimentalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Los agentes precipitantes adecuados incluyen ácido perclórico, ácido tricloroacético, acetonitrilo, metanol y similares. En una realización ejemplar, las proteínas se agotan de una muestra mediante precipitación ácida. En una

realización adicional, las proteínas se agotan de una muestra mediante precipitación ácida usando ácido perclórico.

[0155] En otro ejemplo, las proteínas pueden agotarse de una muestra mediante precipitación ácida usando ácido perclórico. Como se usa en el presente documento, "ácido perclórico" se refiere a ácido perclórico al 70 % a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de aproximadamente 1 % v/v a aproximadamente 15 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de aproximadamente 1 % v/v a aproximadamente 10 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de aproximadamente 1 % v/v a aproximadamente 5 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de aproximadamente 3 % v/v a aproximadamente 15 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de aproximadamente 3 % v/v a aproximadamente 10 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de aproximadamente 3 % v/v a aproximadamente 5 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico a una concentración final de 3,5 % v/v a aproximadamente 15 % v/v, 3,5 % v/v a aproximadamente 10 % v/v, o 3,5 % v/v a aproximadamente 5 % v/v. En otras realizaciones, se añade ácido perclórico hasta una concentración final de aproximadamente 3,5 % v/v. Después de la adición del ácido perclórico, la muestra se mezcla bien (por ejemplo, mediante un mezclador de vórtice) y se mantiene a una temperatura fría, normalmente durante aproximadamente 10 minutos o más, para facilitar la precipitación. Por ejemplo, las muestras pueden conservarse durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 60 minutos o aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos. En otro ejemplo, las muestras se pueden conservar durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 45 minutos. En otros ejemplos, las muestras se pueden conservar durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 30 minutos, o aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos. En otros

ejemplos, las muestras se mantienen durante aproximadamente 30 minutos. Luego, la muestra se centrifuga a temperatura fría para sedimentar la proteína precipitada, y el sobrenadante (es decir, la fracción soluble en ácido), que comprende tau soluble, por ejemplo, se transfiere a un recipiente nuevo. Como se usa en el contexto anterior, una "temperatura fría" se refiere a una temperatura de 10°C o menos. Por ejemplo, una temperatura fría puede ser aproximadamente 1°C, aproximadamente 2°C, aproximadamente 3°C, aproximadamente 4°C, aproximadamente 5°C, aproximadamente 6°C, aproximadamente 7°C, aproximadamente 8°C, aproximadamente 9°C °C, o alrededor de 10°C. En algunas realizaciones, puede preferirse un rango de temperatura más estrecho, por ejemplo, aproximadamente 3°C a aproximadamente 5°C, o incluso aproximadamente 4°C. En determinadas realizaciones, se puede lograr una temperatura fría colocando una muestra sobre hielo.

[0156] Alternativamente, o además, las proteínas, los péptidos y/o los metabolitos pueden reducirse de una muestra mediante un método que se dirija específicamente a la biomolécula de interés, por ejemplo mediante reducción de la afinidad, extracción en fase sólida, u otro conocido en la técnica. El agotamiento dirigido de una proteína/péptido, o de múltiples proteínas/péptidos, se puede utilizar en situaciones en las que se desea un análisis posterior de esa proteína/péptido (por ejemplo, identificación, cuantificación, análisis de modificaciones posteriores a la traducción, etc.). Normalmente, al menos el 50 % (por ejemplo, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más) de la proteína diana en el material de partida está agotada. En algunas realizaciones, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 80 % o más, o aproximadamente el 90 % o más de la proteína diana en el material de partida está agotada. El agotamiento de la afinidad se refiere a métodos que agotan una proteína de interés de una muestra en virtud de sus propiedades de unión específicas a una molécula. Normalmente, la molécula es un ligando unido a un soporte sólido, tal como una perla, resina, placa de cultivo de tejidos, etc. (denominado ligando inmovilizado). La inmovilización de un ligando a un soporte sólido también puede ocurrir después de que ocurre la interacción ligando-proteína. Los ligandos adecuados incluyen

anticuerpos, aptámeros y otros agentes de unión a epítomos. Por ejemplo, los péptidos Ap pueden identificarse y cuantificarse mediante métodos conocidos en la técnica después del agotamiento de la afinidad de Ap con un agente de unión a epítomo adecuado. Tau también puede identificarse y cuantificarse de manera similar. La molécula también puede ser un polímero u otro material que absorba selectivamente una proteína de interés. Como ejemplo no limitante, se puede usar polihidroximetileno sustituido con alcohol oxetilado con grasa (p. ej., PHM-L LIPOSORB, Sigma Aldrich) para absorber selectivamente lipoproteínas (incluyendo ApoE) del suero. La identificación de la isoforma ApoE ("estado de ApoE") y/o la cuantificación de ApoE puede ocurrir entonces mediante métodos conocidos en la técnica. El agotamiento dirigido también se puede utilizar para aislar otras proteínas para análisis posteriores, incluidas, entre otras, apolipoproteína J, sinucleína, proteína precursora de amiloide soluble, macroglobulina alfa-2, S100B, proteína básica de mielina, una interleucina, TNF, TREM-2, TDP-43, YKL-40, VILIP-1, proteína priónica, pNFH y DJ-1.

(b) enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en la muestra biológica

[0157] El término "enriquecer" significa aumentar en cantidad o número.

La sangre y el LCR contienen una pluralidad de isoformas de Nfl. En consecuencia, "enriquecer de una a varias isoformas de Nfl en la muestra biológica" significa aumentar de manera mensurable la cantidad de la isoforma de Nfl, o la pluralidad de isoformas de Nfl, por volumen de muestra en comparación con la muestra inicial (es decir, la muestra biológica). En algunos ejemplos, el enriquecimiento puede ser al menos aproximadamente 5 veces. En algunos ejemplos, el enriquecimiento puede ser de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 1000 veces. Por ejemplo, el enriquecimiento puede ser al menos aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 200 veces, aproximadamente 300 veces, aproximadamente 400 veces, aproximadamente 500 veces, aproximadamente 600 veces, aproximadamente 700 veces, aproximadamente 800 veces, aproximadamente 900 veces, aproximadamente 1000 veces o más.

[0158] En algunas realizaciones, los métodos de la presente divulgación comprenden enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en una muestra biológica, en donde la(s) isoforma(s) de Nfl tienen aproximadamente 350 aminoácidos de longitud o menos. Por ejemplo, la(s) isoforma(s) de Nfl pueden tener una longitud de aproximadamente 300 aminoácidos o menos, una longitud de aproximadamente 250 aminoácidos o menos, una longitud de aproximadamente 200 aminoácidos o menos, una longitud de aproximadamente 150 aminoácidos o menos, una longitud de aproximadamente 100 aminoácidos o menos, o incluso aproximadamente 50 aminoácidos de longitud o menos. Las isoformas de Nfl de aproximadamente 350 aminoácidos de longitud o menos pueden contener un truncamiento N-terminal, un truncamiento C-terminal, o un truncamiento N-terminal y un truncamiento C-terminal, en cuanto a Nfl de longitud completa (que tiene una secuencia de SEC ID N.º: 1). En ejemplos adicionales, los métodos de la presente divulgación pueden comprender enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 101 a 107, los aminoácidos 108 a 116, los aminoácidos 117 a 126, aminoácidos 137 a 144, aminoácidos 148 a 157, aminoácidos 158 a 164, aminoácidos 165 a 172, aminoácidos 178 a 185, aminoácidos 192 a 196, o aminoácidos 198 a 206 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos. En otros ejemplos, los métodos de la presente divulgación pueden comprender enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 282 a 292, los aminoácidos 323 a 330, los aminoácidos 331 a 338 o los aminoácidos 339 a 353 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos. Aún en otros ejemplos, los métodos de la presente divulgación pueden comprender enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 422 a 437, los aminoácidos 438 a 462 y/o los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1. En otros ejemplos más, los métodos de la presente divulgación pueden comprender enriquecer una primera población de isoformas de Nfl y luego enriquecer posteriormente una segunda, tercera, cuarta o más poblaciones de

isoformas de Nfl, utilizando en cada caso la muestra previamente agotada. En otros ejemplos más, los métodos de la presente divulgación pueden comprender el enriquecimiento en una o más isoformas descritas en la **FIG. 22**.

[0159] Los métodos de la presente divulgación pueden enriquecer una isoforma de Nfl truncada, o una pluralidad de isoformas de Nfl truncadas, aislando la(s) isoforma(s) de Nfl de la muestra biológica (por ejemplo, purificación por afinidad, extracción en fase sólida, etc.) y/o mediante eliminar otras isoformas de Nfl de la muestra biológica (por ejemplo, agotamiento de la afinidad, extracción en fase sólida, etc.). El agotamiento de la afinidad se describe anteriormente. La purificación por afinidad se refiere a métodos que enriquecen una proteína de interés en virtud de sus propiedades de unión específicas a una molécula. Normalmente, la molécula es un ligando unido a un soporte sólido, tal como una perla, resina, placa de cultivo de tejidos, etc. (denominado ligando inmovilizado). La inmovilización de un ligando a un soporte sólido también puede ocurrir después de que ocurre la interacción ligando-proteína. Los ligandos adecuados incluyen anticuerpos, aptámeros y otros agentes de unión a epítomos. La purificación de Nfl mediante purificación por afinidad comprende poner en contacto una muestra que comprende Nfl con un ligando inmovilizado adecuado, una o más etapas de lavado y la elución de Nfl del ligando inmovilizado. Los reactivos para la purificación por afinidad de Nfl y/o el agotamiento de la afinidad de Nfl se pueden generar mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, usando Nfl recombinante de longitud completa para generar agentes de unión a epítomos y luego seleccionando agentes de unión a epítomos que se unen a epítomos dados). ), utilizando péptidos de Nfl recombinantes para generar agentes de unión a epítomos contra ciertos fragmentos de Nfl, etc.). También se pueden usar agentes de unión a epítomos disponibles comercialmente, por ejemplo, ABIN6025698 (Abxexa), ABIN4339158 (Novus Biologicals), 13-0400 (Invitrogen Antibodies), UD1 o UD2 (Uman Diagnostics), etc.). Los agentes de unión a epítomos adecuados también se describen en la **Sección II**.

[0160] Alternativamente, el enriquecimiento de una isoforma(s) de Nfl puede no ocurrir directamente, sino que la detección amplificada de una isoforma

de Nfl, o una pluralidad de isoformas de Nfl, puede ocurrir indirectamente. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de ligadura de proximidad (por ejemplo, Duo-Link (Sigma Aldrich)) para detectar una región N-terminal y una región C-terminal de la isoforma Nfl con reactivos capaces de producir una señal amplificada cuando los reactivos están unidos. a la región N-terminal y a la región C-terminal, respectivamente. Normalmente, los reactivos son agentes de unión a epítomos. Los agentes de unión a epítomos adecuados pueden incluir los descritos en la **Sección II** y/o anticuerpos disponibles comercialmente. La detección amplificada de una isoforma de Nfl, o una pluralidad de isoformas de Nfl, mediante un ensayo de ligamiento de proximidad o similar también puede ocurrir después de una etapa de enriquecimiento o agotamiento (por ejemplo, después de una única etapa de enriquecimiento con una que enriquece las isoformas que comprenden los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID NO: 1, etc.).

[0161] En una realización específica de lo anterior, enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en una muestra biológica puede comprender poner en contacto la muestra biológica con un agente de unión a epítomo que se une específicamente a una primera población de isoformas de Nfl, y aislar la primera población de isoformas de Nfl. isoformas, en las que el agente de unión a epítomo se selecciona del grupo que consiste en: (i) un agente de unión a epítomo que se une específicamente a un epítomo dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID NO: 1; (ii) un agente de unión a epítomo que se une específicamente a un epítomo dentro de los aminoácidos 116 a 184 de SEC ID NO: 1; (iii) un agente de unión a epítomo que se une específicamente a un epítomo dentro de los aminoácidos 250 a 400 de SEC ID NO: 1; (iv) un agente de unión a epítomo que se une específicamente a un epítomo dentro de los aminoácidos 283 a 338 de SEC ID NO: 1; (v) un agente de unión a epítomo que se une específicamente a un epítomo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID NO: 1; (vi) un agente de unión a epítomo que se une específicamente a un epítomo dentro de los aminoácidos 437 a 543 de SEC ID NO: 1; (vii) HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítomo que inhibe

competitivamente HJ30.1, HJ30 .2 o HJ30.13 que se unen a Nfl recombinante de longitud completa; y (vii) HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa. ; y (ix) HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epitope que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa.

[0162] En otra realización específica de lo anterior, enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en una muestra biológica puede comprender (a) poner en contacto la muestra biológica con un primer agente de unión a epítipo que se une específicamente a una primera población de isoformas de Nfl, y aislar las primera población de isoformas de Nfl; y (b) poner en contacto una muestra empobrecida de la primera población de isoformas de Nfl con un segundo agente de unión a epítipo que se une específicamente a una segunda población de isoformas de Nfl, y aislar la segunda población de isoformas de Nfl.

Alternativamente, la muestra biológica puede ponerse en contacto con el primer agente de unión a epítipo y el segundo agente de unión a epítipo simultáneamente, y la primera población de isoformas de Nfl y la segunda población de isoformas de Nfl pueden aislado de forma secuencial o simultánea. En realizaciones preferidas, el segundo agente de unión a epítipose une a un epítipo aguas abajo del epítipo del primer agente de unión a epítipo. En un ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 1 a 450 de SEC ID N.º: 1; y el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1. En otro ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 300 de SEC ID N.º: 1 o dentro de los aminoácidos 200 a 400 de SEC ID N.º: 1; y el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543, o de SEC ID N.º: 1. En otro ejemplo, el primer agente de unión a epitopose une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID N.º: 1 o dentro de los

aminoácidos 250 a 400 de SEC ID N.º: 1; y el segundo epítipo está dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 o dentro de los aminoácidos 430 a 540 de SEC ID N.º: 1. Los agentes de unión a epítipos adecuados incluyen los descritos en la **Sección II** y/o anticuerpos disponibles comercialmente. En una realización específica, el primer agente de unión a epítipo puede ser HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa. En otra realización específica, el primer agente de unión a epítipo puede ser HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7. hasta Nfl recombinante de larga duración. En otra realización específica, el segundo agente de unión a epítipo puede ser HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa. En otra realización específica, el segundo agente de unión a epítipo puede ser HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente HJ30.4 o HJ30.7 que se une a Nfl recombinante de longitud completa.

[0163] En otra realización específica de lo anterior, enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en una muestra biológica puede comprender (a) poner en contacto la muestra biológica con un primer agente de unión a epítipo que se une específicamente a una primera población de isoformas de Nfl, y aislar la primera población de isoformas de Nfl; (b) contactar una muestra empobrecida de la primera población de isoformas de Nfl con un segundo agente de unión a epítipo que se une específicamente a una segunda población de isoformas de Nfl, y aislar la segunda población de isoformas de Nfl; y (c) poner en contacto una muestra empobrecida de la primera y segunda poblaciones de isoformas de Nfl con un tercer agente de unión a epítipo que se une

específicamente a una tercera población de isoformas de Nfl, y aislar la tercera población de isoformas de Nfl. Alternativamente, la muestra biológica puede ponerse en contacto con el primer agente de unión a epítipo, el segundo agente de unión a epítipo y el tercer agente de unión a epítipo simultáneamente, y la primera población de isoformas de Nfl, la segunda población de isoformas de Nfl y la tercera población de las isoformas de Nfl se pueden aislar secuencialmente o en cualquier combinación. En realizaciones preferidas, el segundo agente de unión a epítipo puede unirse a un epítipo aguas abajo del epítipo del primer agente de unión a epítipo, y el tercer agente de unión a epítipo puede unirse a un epítipo aguas abajo del epítipo del segundo agente de unión a epítipo. Alternativamente, el segundo agente de unión a epítipo puede unirse a un epítipo aguas arriba del primer agente de unión a epítipo. En un ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 1 a 400 de SEC ID N.º: 1; el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 450 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítipo; y el tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítipo. En otro ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 300 de SEC ID N.º: 1; el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 200 a 400 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítipo; y el tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítipo. En otro ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID N.º: 1; el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 250 a 400 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítipo; y el tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítipo. Los agentes de unión a

epítopos adecuados incluyen los descritos en la **Sección II** y/o anticuerpos disponibles comercialmente. En una realización específica, (i) el primer epítipo de unión de EFS es HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) el segundo agente de unión a epítipo es HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de larga duración; (iii) el tercer agente de unión a epítipo es HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa; (iv) o cualquier combinación de los mismos.

[0164] En otra realización específica de lo anterior, enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en una muestra biológica puede comprender (a) poner en contacto la muestra biológica con dos o más agentes de unión a epítopos simultáneamente (no secuencialmente), en donde cada agente de unión a epítopos se une específicamente a un epítipo diferente de Nfl; y (b) detectar y opcionalmente cuantificar de una a una pluralidad de isoformas de Nfl enriquecidas en la etapa (a). En un ejemplo, un primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 1 a 400 de SEC ID N.º: 1; un segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 450 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítipo; y un tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítipo. En otro ejemplo, un primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 300 de SEC ID N.º: 1; un segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 200 a 400 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítipo; y un tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los

aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítopo. En otro ejemplo, un primer agente de unión a epitopose une específicamente a un primer epítopo dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID N.º: 1; un segundo agente de unión a epítopo se une específicamente a un segundo epítopo dentro de los aminoácidos 250 a 400 de SEC ID N.º: 1; y un tercer agente de unión a epítopo se une específicamente a un tercer epítopo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1. Los agentes de unión a epítomos adecuados incluyen los descritos en la **Sección II** y/o anticuerpos disponibles comercialmente. En una realización específica, los dos o más agentes de unión a epítomos del grupo que consiste en HJ30.1, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.1, HJ30.2, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.2, HJ30.13, un -fragmento de unión a antígeno de HJ30.13, HJ30.4, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.4, HJ30.7, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.7, HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.11, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2, HJ30.4, HJ30.7, HJ30.11 y HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa. En otra realización específica, un agente de unión a epítopo se selecciona del grupo (i), (ii) o (iii), y al menos un agente de unión a epítopo adicional se selecciona de un grupo diferente (i), (ii). o (iii), en donde los grupos (i), (ii) o (iii) son: (i) HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa; (iii) HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa. En otra realización específica, al menos un agente de unión a epítopo se selecciona de cada uno de los grupos (i), (ii) y (iii), en donde los grupos (i), (ii) o (iii) son: (i) HJ30 .1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un

fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 unión a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa; (iii) HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa.

[0165] Se puede utilizar un estándar interno (abreviado en el presente documento como "ISTD") para tener en cuenta la variabilidad durante el enriquecimiento y, opcionalmente, para calcular una concentración absoluta. Generalmente, se agrega un estándar interno antes de un procesamiento importante de la muestra y se puede agregar más de una vez si es necesario. Se pueden usar una o más isoformas de Nfl de longitud completa. Alternativamente, o además, también se pueden usar isoformas de Nfl con modificaciones postraduccionales y/o fragmentos peptídicos de Nfl. Por ejemplo, en con aislamiento secuencial de múltiples isoformas, puede ser ventajoso usar una cantidad de estándares internos igual a la cantidad de pasos de aislamiento, en donde cada estándar interno es un fragmento peptídico diferente de Nfl, de modo que Cada paso de aislamiento solo aislará un único estándar interno. En algunas realizaciones, cada estándar interno puede ser un péptido AQUA diferente (es decir, un péptido estable marcado con isótopos correspondiente a un péptido de interés que se va a detectar mediante MS). Alternativamente, si las isoformas de Nfl de la etapa de aislamiento final sólo son de interés, se puede usar un único estándar interno, en donde el estándar interno es un fragmento peptídico que no se aislará/enriquecerá hasta la etapa final. En algunas realizaciones, el estándar interno puede ser un péptido AQUA. Normalmente, los estándares internos están etiquetados de manera detectable, para diferenciar el estándar de Nfl del analito de Nfl endógeno, pero sin afectar las propiedades químicas en las que se basa la separación. En algunas realizaciones, un estándar interno es un estándar interno

Nfl marcado con isótopos. Los estándares internos Nfl marcados con isótopos adecuados tienen un marcador de isótopo pesado incorporado en al menos un residuo de aminoácido. En términos generales, los residuos de aminoácidos marcados que se incorporan deben aumentar la masa del péptido sin afectar sus propiedades químicas, y el cambio de masa resultante de la presencia de las etiquetas isotópicas debe ser suficiente para permitir que el método de espectrometría de masas distinga el estándar interno. (IS) a partir de señales endógenas de analitos de Nfl. Como se muestra en el presente documento, los marcadores de isótopos pesados adecuados incluyen, entre otros,  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . En un ejemplo, un estándar interno puede ser un Nfl de longitud completa o un fragmento peptídico de Nfl recombinante marcado con Lys, Arg,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . Normalmente, aproximadamente 0,1-10 ng de estándar interno suelen ser suficientes diluidos en un tampón apropiado (por ejemplo, TBEAC, ~0,01-2 % de albúmina, etc.). En realizaciones ejemplares, aproximadamente 1 ng a aproximadamente 2,5 ng en aproximadamente 1 % de albúmina sérica humana (HSA).

(c) detectar de una a una pluralidad de isoformas de Nfl previamente enriquecidas

[0166] Las isoformas de Nfl pueden detectarse, y opcionalmente cuantificarse, en las muestras enriquecidas mediante espectrometría de masas, como se detalla más adelante o en los Ejemplos, o mediante otros métodos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, un inmunoensayo, un ensayo multiplexado (como la tecnología xMAP de Luminex), un ensayo de matriz de molécula única (como la tecnología de perlas Simoa®), un ensayo de ligadura de proximidad (como DuoLink® de Sigma Aldrich), o similares.

[0167] En algunas realizaciones, las isoformas de Nfl se detectan y, opcionalmente, se cuantifican en una muestra enriquecida mediante espectrometría de masas. Brevemente, la detección por espectrometría de masas comprende escindir las isoformas de Nfl enriquecidas con una proteasa y opcionalmente desalar el producto de escisión resultante mediante extracción en fase sólida para obtener una muestra que comprende péptidos proteolíticos de Nfl;

y realizar espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC/MS) de la muestra que comprende péptidos proteolíticos de Nfl para detectar al menos un péptido proteolítico de Nfl. En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, también se puede cuantificar la cantidad de cualquier péptido proteolítico de Nfl (por ejemplo, a partir de la altura o integración del pico en un análisis de MS correspondiente al péptido proteolítico apropiado). Así, en la práctica, se utilizan uno o más péptidos proteolíticos de Nfl para detectar y medir la cantidad de proteína Nfl presente en la muestra biológica. Debido a que la sangre y el LCR contienen una pluralidad de isoformas de Nfl, y los subconjuntos de la pluralidad de isoformas comparten similitud de secuencia (ver **Figura 22**), una medición de un péptido proteolítico de Nfl puede describir el nivel de una pluralidad de isoformas de Nfl en la muestra biológica. que contienen el péptido proteolítico medido, a menos que el método de enriquecimiento fuera específico para una isoforma determinada.

[0168] En realizaciones en las que la tripsina es la proteasa, los péptidos proteolíticos adecuados de Nfl que indican la presencia de Nfl pueden ser como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, los péptidos trípticos [370.378], [379.389] y [391.398] no son exclusivos de Nfl y, por lo tanto, no son preferibles cuando la intención es cuantificar Nfl en una muestra biológica. En algunas realizaciones, los péptidos proteolíticos adecuados de Nfl que indican la presencia de Nfl se pueden seleccionar de los péptidos enumerados en la **Tabla C**. Los péptidos trípticos ejemplares incluyen los péptidos trípticos con los aminoácidos 108-116 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 117- 126 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 165-172 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 198-206 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 324-331 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 400 a 421 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 422 a 437 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 438 a 462 de SEC ID N.º: 1 y aminoácidos 530-540 de SEC ID N.º: 1. Cuando se utiliza una enzima alternativa para la digestión, los péptidos proteolíticos resultantes pueden diferir ligeramente pero pueden ser determinados fácilmente por una persona con conocimientos habituales en la técnica. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que una variación en la cantidad de un péptido tríptico entre dos muestras biológicas del

mismo tipo (por ejemplo, dos muestras de sangre) refleja una diferencia en la Nfl isoformas que componen esas muestras biológicas. Como se divulga en el presente documento, las cantidades de ciertos péptidos proteolíticos de Nfl, así como las proporciones de ciertos péptidos proteolíticos de Nfl, pueden proporcionar información clínicamente significativa para diagnosticar daño neuronal, informar el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, seleccionar pacientes para pruebas de diagnóstico adicionales, guiar decisiones de tratamiento, o cualquier combinación de los mismos. Por tanto, los métodos que permiten la detección y cuantificación de péptidos trípticos de Nfl tienen utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de muchas enfermedades.

**Tabla C:** Péptidos trípticos adecuados de Nfl

| Péptido tríptico | Secuencia de aminoácidos            |
|------------------|-------------------------------------|
| [91.99]          | Aminoácidos 92-100 de SEC ID N.º 1  |
| [100.106]        | Aminoácidos 101-107 de SEC ID N.º 1 |
| [107.115]        | Aminoácidos 108-116 de SEC ID N.º 1 |
| [116.125]        | Aminoácidos 117-126 de SEC ID N.º 1 |
| [136.143]        | Aminoácidos 137-144 de SEC ID N.º 1 |
| [147.156]        | Aminoácidos 148-157 de SEC ID N.º 1 |
| [157.163]        | Aminoácidos 158-164 de SEC ID N.º 1 |
| [164.171]        | Aminoácidos 165-172 de SEC ID N.º 1 |
| [177.184]        | Aminoácidos 178-185 de SEC ID N.º 1 |
| [191.195]        | Aminoácidos 192-196 de SEC ID N.º 1 |
| [197.205]        | Aminoácidos 198-206 de SEC ID N.º 1 |
| [212.223]        | Aminoácidos 213-224 de SEC ID N.º 1 |
| [323.330]        | Aminoácidos 324-331 de SEC ID N.º 1 |
| [331.338]        | Aminoácidos 332-339 de SEC ID N.º 1 |
| [339.352]        | Aminoácidos 340-353 de SEC ID N.º 1 |
| [353.358]        | Aminoácidos 355-359 de SEC ID N.º 1 |
| [437.461]        | Aminoácidos 438-462 de SEC ID N.º 1 |
| [529.539]        | Aminoácidos 530-540 de SEC ID N.º 1 |

[0169] Los péptidos proteolíticos de Nfl se pueden separar mediante un sistema de cromatografía líquida interconectado con un espectrómetro de masas

de alta resolución. Los sistemas LC-MS adecuados pueden comprender una columna de ID <1,0 mm y utilizar un caudal inferior a aproximadamente 100 pL/min. En realizaciones preferidas, se usa un sistema LC-MS de nanoflujo (por ejemplo, aproximadamente 50-100 pL/min de columna ID y un caudal de < 1 pL/min, preferiblemente aproximadamente 100-800 nL/min, más preferiblemente aproximadamente 200-600 nL/min). En una realización ejemplar, un sistema LC-MS puede comprender una columna de ID de 0,05 mm y utilizar un caudal de aproximadamente 400 nL/min.

[0170] Se puede usar espectrometría de masas en tándem para mejorar la resolución, como se sabe en la técnica, o se puede mejorar la tecnología para lograr la resolución de la espectrometría de masas en tándem con un único analizador de masas. En la técnica se conocen tipos adecuados de espectrómetros de masas. Estos incluyen, entre otros, cuadrupolo, tiempo de vuelo, trampa de iones y Orbitrap, así como espectrómetros de masas híbridos que combinan diferentes tipos de analizadores de masas en una arquitectura (por ejemplo, espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Tribrid™, Orbitrap Espectrómetro de masas Fusion™ Lumos™, espectrómetro de masas Orbitrap Tribrid™ Eclipse™, espectrómetro de masas Q Exactive, cada uno de ThermoFisher Scientific). En una realización ejemplar, un sistema LC-MS puede comprender un espectrómetro de masas seleccionado entre el espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Tribrid™, el espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Lumos™, el espectrómetro de masas Orbitrap Tribrid™ Eclipse™ o un espectrómetro de masas con enfoque de iones similar o mejorado y transparencia iónica en el cuadrupolo. Se pueden desarrollar protocolos de espectrometría de masas adecuados optimizando el número de iones recogidos antes del análisis (por ejemplo, (configuración de AGC utilizando una orbitrap) y/o el tiempo de inyección. En una realización ejemplar, se utiliza un protocolo de espectrometría de masas descrito en los Ejemplos.

[0171] Los péptidos proteolíticos analizados por MS pueden cuantificarse mediante métodos conocidos en la técnica. En términos generales, se añade a una muestra una cantidad conocida de un estándar interno. Luego, la

muestra se digiere y se analiza mediante LC-MS. Se generan cromatogramas de iones extraídos para el péptido nativo y el estándar interno. Utilizando relaciones de pico (por ejemplo, 14N/15N), se calcula la cantidad de péptido nativo.

#### **IV. Métodos para detectar un biomarcador y su uso**

[0172] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar, y opcionalmente cuantificar, un biomarcador proteico en una muestra obtenida de un sujeto. El método comprende detectar y opcionalmente cuantificar Nfl según un método de la **Sección III**, en donde la muestra biológica es una muestra obtenida de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener daño neuronal, y en donde el biomarcador es una isoforma de Nfl enriquecida, una proporción de una primera isoforma de Nfl a una segunda isoforma de Nfl, una población enriquecida de isoformas de Nfl, o una proporción de una primera población de isoformas de Nfl enriquecidas y una segunda población de isoformas enriquecidas. En algunas realizaciones, el daño neuronal puede incluir daño axonal. En algunas realizaciones, el daño neuronal es daño axonal. El tipo de daño neuronal no es limitante y puede deberse a una lesión aguda o crónica (por ejemplo, lesión cerebral traumática, etc.), neuroinflamación y/o una enfermedad neurodegenerativa. Los ejemplos no limitantes de enfermedades neurodegenerativas incluyen esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, encefalopatía traumática crónica (CTE), enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, demencia pugilística, síndrome de Down, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de Huntington, miositis por cuerpos de inclusión, angiopatía amiloide cerebral por proteína priónica, lesión cerebral traumática, complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo-demencia de Guam, enfermedad de neurona motora no guameña con ovillos neurofibrilares, demencia granular argirófila, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal, demencia frontotemporal con parkinsonismo relacionado al cromosoma 17, enfermedad de Hallevorden-Spatz, demencia con cuerpos de Lewy (LBD), esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, distrofia miotónica, enfermedad de Niemann-Pick tipo C, degeneración pálido-

pontonigral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, gliosis subcortical progresiva, Parkinsonismo postencefalítico, PART (tauopatía primaria relacionada con la edad), parálisis supranuclear progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, panencefalopatía por esclerosis subaguda, demencia solo en ovillos (o demencia predominante en ovillos), demencia predominante en ovillos, tauopatía de sustancia blanca con inclusiones gliales globulares, deterioro cognitivo leve (DCL), glaucoma, demencia británica familiar, demencia danesa familiar, parkinsonismo guadalupeño, neurodegeneración con acumulación de hierro en el cerebro, retraso mental relacionado con SLC9A6, demencia relacionada con VIH, enfermedad cardíaca senil amiloidosis. Un sujeto sano, a veces denominado “sujeto control” o “control sano”, mínimamente no presenta signos o síntomas clínicos de deterioro cognitivo y también puede ser “negativo” para otros signos o síntomas clínicos de daño neuronal, enfermedades neurodegenerativas, y/o lesión cerebral traumática.

[0173] En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser una población de isoformas de Nfl seleccionadas del grupo que consiste en isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste sustancialmente en el dominio de varilla de Nfl, isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste sustancialmente en una porción del dominio de varilla de Nfl, isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste en una porción del dominio de bastón de Nfl y ningún aminoácido fuera de esta región, o cualquier combinación de los mismos. Normalmente se describe que el dominio de varilla incluye los aminoácidos 90-396 de la SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que comprenden los aminoácidos 90 a 396 de la SEC ID N.º: 1 que tiene hasta aproximadamente 330 aminoácidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 330, aproximadamente 325, aproximadamente 320, aproximadamente 315, aproximadamente 310 aminoácidos). Alternativamente, o además, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que es un fragmento de los aminoácidos 90 a 396 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de 310 aminoácidos de longitud (aproximadamente 305, aproximadamente

300, aproximadamente 275, aproximadamente 250, aproximadamente 225, aproximadamente 200, aproximadamente 175, aproximadamente 150, aproximadamente 125, aproximadamente 100, aproximadamente 75, aproximadamente 50, aproximadamente 25, etc.) y comprende los aminoácidos 164 a 171 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 197 a 205 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 323 a 330 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de aproximadamente 200 aminoácidos de longitud y comprenden los aminoácidos 165 a 172 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de SEC ID N.º: 1, o una combinación de los mismos. Alternativamente, o además, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que es un fragmento de los aminoácidos 125 a 396 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen aproximadamente 275 aminoácidos de longitud o menos, y comprende los aminoácidos 165 a 172 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de la SEC ID N.º: 1, ácidos 324 a 331 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos.

[0174] En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser una población de isoformas de Nfl seleccionadas del grupo que consiste en isoformas que consisten sustancialmente en la región de la cola de Nfl, isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste en una porción de la cola de EFS de la NFL, o una combinación de ambos. La región de la cola normalmente se describe como los aminoácidos 397 a 543 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que comprenden los aminoácidos 397 a 543 de la SEC ID N.º: 1, que tiene una longitud de 147 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud. Alternativamente, o además, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que es un fragmento de los aminoácidos 397 a 543 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de 147 aminoácidos de longitud y comprenden los aminoácidos 422 a 437 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 438 a 462 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID

N.º 1, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el biomarcador puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud o menos y comprenden los aminoácidos 422 a 437 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 438 a 462 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos.

[0175] En realizaciones adicionales, el biomarcador puede ser una proporción de dos biomarcadores descritos anteriormente. Como ejemplos no limitantes, el biomarcador puede ser una proporción de dos biomarcadores de la región de los bastones, o una proporción de dos biomarcadores de la región de la cola, o más preferiblemente una proporción de un biomarcador de la región de los bastones y un biomarcador de la región de la cola. . En aún otras realizaciones, el biomarcador puede ser una proporción de un biomarcador con respecto a la cantidad total de Nfl. También se contemplan otras operaciones matemáticas y el uso de más de dos biomarcadores. Por ejemplo, cuando se analizan una primera y una segunda muestra biológica donde la segunda muestra se obtiene un período de tiempo después de la primera (por ejemplo, días, semanas, meses, años) se puede usar la tasa de cambio de un biomarcador.

[0176] En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser una población de isoformas de Nfl purificadas por afinidad con un agente de unión a epítipo elegido entre (i) HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30. 13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa; o (iii) HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa.

[0177] En algunas realizaciones, el biomarcador puede ser:

[0178] (a) una población de isoformas de Nfl que comprende los

aminoácidos 165 a 172 de SEC ID N.º: 1 y/o los aminoácidos 198 a 206 de SEC ID N.º: 1, en donde la población de isoformas de Nfl se purifica por afinidad con un agente de unión a epítipo elegido entre (i) HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente HJ30.1 , HJ30.2 o HJ30.13 que se unen a Nfl recombinante de longitud completa;

[0179] (b) una población de isoformas de Nfl que comprende los aminoácidos 324 a 331 de SEC ID N.º: 1, en donde la población de isoformas de Nfl se purifica por afinidad con un agente de unión a epítipo elegido entre HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa;

[0180] (c) una población de isoformas de Nfl que comprende los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1, en donde la población de isoformas de Nfl se purifica por afinidad con un agente de unión a epítipo elegido entre HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítipo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa;

[0181] (d) una relación de (a) a (b);

[0182] (e) una relación de (b) a (c); o

[0183] (f) una relación de (a) a (c).

[0184] En las realizaciones anteriores, cada población de isoformas de Nfl puede aislarse de la muestra biológica o puede aislarse de una muestra previamente agotada de otras isoformas de Nfl. Como ejemplo no limitante, la población de isoformas de Nfl en (c) puede aislarse de una muestra empobrecida en (a), empobrecida en (b) o empobrecida en (a) y (b).

[0185] En un ejemplo, el método comprende (a) proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra de CSF, (b) enriquecer de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en la muestra biológica, en donde el enriquecimiento

comprende/consiste en (i) poner en contacto la muestra biológica con un primer agente de unión a epítipo que se une específicamente a una primera población de isoformas de Nfl y aislar la primera población de isoformas de Nfl; (ii) poner en contacto una muestra empobrecida de la primera población de isoformas de Nfl con un segundo agente de unión a epítipo que se une específicamente a una segunda población de isoformas de Nfl, y aislar la segunda población de isoformas de Nfl; y (iii) poner en contacto una muestra empobrecida de la primera y segunda poblaciones de isoformas de Nfl con un tercer agente de unión a epítipo que se une específicamente a una tercera población de isoformas de Nfl, y aislar la tercera población de isoformas de Nfl; y (c) detectar y opcionalmente cuantificar de una a una pluralidad de isoformas de Nfl en la primera población, segunda población, tercera población o cualquier combinación de las mismas, en donde el biomarcador es la isoforma de Nfl o la población de isoformas de Nfl detectadas en (c), o una relación entre las isoformas de Nfl o la población de isoformas de Nfl detectadas en (c). En realizaciones preferidas, el segundo agente de unión a epítipo puede unirse a un epítipo aguas abajo del epítipo del primer agente de unión a epítipo, y el tercer agente de unión a epítipo puede unirse a un epítipo aguas abajo del epítipo del segundo agente de unión a epítipo. Alternativamente, el segundo agente de unión a epítipo puede unirse a un epítipo aguas arriba del primer agente de unión a epítipo. En un ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 1 a 400 de SEC ID N.º: 1; el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 450 de SEC ID N.º: 1; y el tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1. En otro ejemplo, el primer agente de unión a epítipo se une específicamente a un primer epítipo dentro de los aminoácidos 90 a 300 de SEC ID N.º: 1; el segundo agente de unión a epítipo se une específicamente a un segundo epítipo dentro de los aminoácidos 200 a 400 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítipo; y el tercer agente de unión a epítipo se une específicamente a un tercer epítipo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del

segundo epítopo. En otro ejemplo, el primer agente de unión a epítopo se une específicamente a un primer epítopo dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID N.º: 1; el segundo agente de unión a epítopo se une específicamente a un segundo epítopo dentro de los aminoácidos 250 a 400 de SEC ID N.º: 1; y el tercer agente de unión a epítopo se une específicamente a un tercer epítopo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1. Los agentes de unión a epitopos adecuados incluyen los descritos en la **Sección II** y/o anticuerpos disponibles comercialmente. En una realización específica, (i) el primer agente de unión a epítopo es HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) el segundo agente de unión a epítopo es HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de larga duración; (iii) el tercer agente de unión a epítopo es HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa; (iv) o cualquier combinación de los mismos.

[0186] En algunas realizaciones, el método comprende (a) proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra de CSF, (b) enriquecer una pluralidad de isoformas de Nfl poniendo en contacto la muestra biológica con dos o más agentes de unión a epítopos, en los que cada agente de unión a epítopos se une específicamente a un epítopo diferente de Nfl; y (c) detectar y opcionalmente cuantificar de una a una pluralidad de isoformas de Nfl enriquecidas en la etapa (b), en donde el biomarcador es una isoforma de Nfl o una población de isoformas de Nfl detectadas en (c), o una relación entre isoformas de Nfl o población de Nfl. isoformas detectadas en (c). En un ejemplo, un primer agente de unión a epítopo se une específicamente a un primer epítopo dentro de los aminoácidos 1 a 400 de

SEC ID N.º: 1; un segundo agente de unión a epítopo se une específicamente a un segundo epítopo dentro de los aminoácidos 90 a 450 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítopo; y un tercer agente de unión a epítopo se une específicamente a un tercer epítopo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítopo. En otro ejemplo, un primer agente de unión a epítopo se une específicamente a un primer epítopo dentro de los aminoácidos 90 a 300 de SEC ID N.º: 1; un segundo agente de unión a epítopo se une específicamente a un segundo epítopo dentro de los aminoácidos 200 a 400 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del primer epítopo; y un tercer agente de unión a epítopo se une específicamente a un tercer epítopo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1 que está aguas abajo del segundo epítopo. En otro ejemplo, un primer agente de unión a epítopo se une específicamente a un primer epítopo dentro de los aminoácidos 90 a 250 de SEC ID N.º: 1; un segundo agente de unión a epítopo se une específicamente a un segundo epítopo dentro de los aminoácidos 250 a 400 de SEC ID N.º: 1; y un tercer agente de unión a epítopo se une específicamente a un tercer epítopo dentro de los aminoácidos 400 a 543 de SEC ID N.º: 1. Los agentes de unión a epítopos adecuados incluyen aquellos descrito en la **Sección II** y/o anticuerpos disponibles comercialmente. En una realización específica, los dos o más agentes de unión a epítopo se seleccionan del grupo que consiste en HJ30.1, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.1, HJ30.2, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.2, HJ30.13, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.13, HJ30.4, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.4, HJ30.7, un fragmento de unión a antígeno de HJ30.7, HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno de HJ30. 11, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2, HJ30.4, HJ30.7, HJ30.11 y HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa. En otra realización específica, un agente de unión a epítopo se selecciona del grupo (i), (ii) o (iii), y al menos un agente de unión a epítopo adicional se selecciona de un grupo diferente (i), (ii). o (iii), en donde los grupos (i), (ii) o (iii) son: (i) HJ30.1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a

antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa; (iii) HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa. En otra realización específica, al menos un agente de unión a epítopo se selecciona de cada uno de los grupos (i), (ii) y (iii), en donde los grupos (i), (ii) o (iii) son: (i) HJ30 .1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.13 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente HJ30.1, HJ30.2 o HJ30.13 unión a Nfl recombinante de longitud completa; (ii) HJ30.4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, HJ30.7 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.4 o HJ30.7 a Nfl recombinante de longitud completa; (iii) HJ30.11, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un agente de unión a epítopo que inhibe competitivamente la unión de HJ30.11 a Nfl recombinante de longitud completa.

[0187] La detección y cuantificación del biomarcador se puede utilizar para diversos fines. Los ejemplos no limitantes incluyen diagnosticar daño neuronal, diagnosticar una enfermedad o condición caracterizada por daño neuronal (por ejemplo, lesión cerebral traumática, una enfermedad neurodegenerativa, etc.), monitorear/medir la desarrollo o progresión de daño neuronal y/o un estado de enfermedad caracterizado por daño neuronal, tratamiento de un sujeto con daño neuronal, determinación/medición de la eficacia de un tratamiento determinado, y similares.

[0188] Por consiguiente, en otro aspecto, el método comprende detectar y cuantificar el nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, y determinar si el nivel se reduce en comparación con su nivel en sujetos de control que son cognitivamente normales. En otro aspecto, el

método comprende detectar y cuantificar el nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, y determinar si el nivel se reduce en comparación con su nivel en sujetos de control que son cognitivamente normales y también negativos para uno o más signos o síntomas clínicos adicionales de una enfermedad neurodegenerativa o lesión cerebral traumática. En otro aspecto, el método comprende detectar y cuantificar el nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, y determinar si el nivel se reduce en comparación con su nivel en sujetos de control que son cognitivamente normales y también amiloide negativos (Ap -). En otro aspecto, el método comprende detectar y cuantificar el nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, y determinar si el nivel está reducido en comparación con su nivel en sujetos de control que son cognitivamente normales y también negativos para niveles patológicos de depósitos de tau en el cerebro. Se conocen en la técnica pruebas clínicas para evaluar el deterioro cognitivo, incluida la demencia. Como ejemplo no limitante, se puede utilizar la prueba de Clasificación Clínica de Demencia (CDR). El uso de trazadores de PET tau o trazadores de PET Ap para evaluar la deposición patológica de proteínas en el cerebro también es bien conocido en la técnica.

[0189] En algunas realizaciones, se puede diagnosticar que un sujeto tiene daño neuronal cuando el nivel del biomarcador se desvía significativamente de la media en los sujetos de control. "Se desvía significativamente de la media" se refiere a valores que son al menos 1 desviación estándar, preferiblemente al menos 1,3 desviaciones estándar, más preferiblemente al menos 1,5 desviaciones estándar o incluso más preferiblemente al menos 2 desviaciones estándar, por encima o por debajo de la media (p. ej., 1a, 1.1a, 1.2a, 1.3a, 1.4a, 1.5a, etc., donde a es la desviación estándar definida por la distribución normal medida en una población de control). Además de utilizar un umbral (por ejemplo, al menos 1 desviación estándar por encima o por debajo del de EFS), en algunas realizaciones, el grado de cambio por encima o por debajo de la media se puede utilizar para diagnosticar un sujeto.

[0190] En otro aspecto, el método comprende detectar y cuantificar el

nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, en una primera muestra biológica obtenida del sujeto y una segunda muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la primera la muestra biológica y la segunda muestra biológica son ambas una muestra de sangre o ambas una muestra de LCR, y en el que la segunda muestra biológica se obtuvo después de la primera muestra biológica.

[0191] En otro aspecto, el método comprende detectar y cuantificar el nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, en una primera muestra biológica obtenida del sujeto y una segunda muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la primera la muestra biológica y la segunda muestra biológica son ambas una muestra de sangre o ambas una muestra de LCR, y en el que la segunda muestra biológica se obtuvo después de la primera muestra biológica. Un aumento en el nivel de biomarcador en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica un aumento en el daño neuronal. En algunas realizaciones, la tasa de cambio en los niveles del biomarcador entre la primera muestra y las siguientes se usa para determinar el estadio de la enfermedad y/o el alcance del daño neuronal. En consecuencia, tales métodos pueden usarse para controlar que un sujeto tenga daño neuronal o esté en riesgo de tener daño neuronal.

[0192] En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más de los métodos anteriores en combinación con uno o más biomarcadores de enfermedades conocidos en la técnica para diagnosticar, estadificar y/o tratar enfermedades neurodegenerativas específicas. Por ejemplo, los datos muestran que una cascada fisiopatológica de eventos en la progresión de la AD comienza con una alteración de la relación Ap42/Ap40 en el CSF y el plasma sanguíneo, seguida de aumentos en las placas amiloides medidas mediante PET con amiloide, asociado con una mayor fosforilación de especies de tau específicas en el CSF (p. ej., p-tau217, p-tau231, p-tau181, p-tau153, p-tau111), antes de aumentos en p-tau205, NfL, concentraciones totales de tau, hipometabolismo y atrofia. Finalmente, algunas especies de MTBR-tau (p. ej., MTBR-tau299, MTBR-tau243, MTBR-tau354, MTBR-tau3R) aumentan antes o con la agregación de tau

mediante PET con tau y la aparición de síntomas clínicos y se correlacionan con la agregación de tau longitudinal y la progresión clínica. Estos hallazgos indican que las medidas de Nfl en CSF y sangre, en combinación con uno o más de Ap, p-tau, MTBR-tau las medidas son biomarcadores altamente precisos de amiloidosis cerebral, tauopatía y neurodegeneración y pueden identificar con precisión las etapas de la EA preclínica y clínica y predecir la efectividad de los tratamientos dirigidos a ciertos procesos patológicos. También se contempla el uso combinado con otros biomarcadores de enfermedades para el diagnóstico, estadificación y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas distintas de la AD.

[0193] En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más de los métodos anteriores además de, o como alternativa a, un método de diagnóstico más invasivo, tal como PET o punción lumbar. Así, en cualquiera de los métodos anteriores, el sujeto en algunos aspectos no ha recibido pruebas diagnósticas previas tales como imágenes PET.

[0194] En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más de los métodos anteriores para determinar si un sujeto debe recibir pruebas de diagnóstico adicionales, que pueden, por ejemplo, ser un método de diagnóstico más invasivo. Por ejemplo, si los niveles de Nfl, o los niveles de Nfl en combinación con otro signo clínico, sugieren enfermedad de Alzheimer, el sujeto puede ser seleccionado para recibir PET basada en amiloide o PET basada en tau. Alternativamente, o además, se pueden usar niveles de Nfl para seleccionar un sujeto para recibir pruebas cognitivas o pruebas cognitivas adicionales si se han realizado pruebas iniciales, por ejemplo para confirmar adicionalmente la presencia de una enfermedad o una etapa particular de la enfermedad.

Alternativamente, o además, se pueden usar los niveles de Nfl para seleccionar un sujeto para recibir pruebas de biomarcadores adicionales, tales como pruebas para determinar los niveles totales, o niveles de isoformas específicas, de apolipoproteína J, proteína huntingtina, sinucleína, proteína precursora de amiloide soluble, alfa. -2 macroglobulina, S100B, proteína básica de mielina, una interleucina, superóxido dismutasa, TNF, TREM-2, TDP-43, YKL-40, VILIP-1, proteína priónica, pNFH, DJ-1 y similares.

[0195] En algunas realizaciones, también se pueden usar uno o más de los métodos anteriores para pronosticar el estado cognitivo o el deterioro cognitivo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la divulgación se refiere a los métodos anteriores para su uso en la predicción del estado cognitivo o la predicción del deterioro cognitivo en un sujeto humano con daño neuronal, incluido el daño neuronal causado por una enfermedad neurodegenerativa, neuroinflamación o lesión cerebral traumática. Por consiguiente, en realizaciones adicionales, la divulgación se refiere a los métodos anteriores para su uso en la predicción de la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

[0196] En otro aspecto, el método comprende (a) detectar y cuantificar el nivel de un biomarcador, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, en un se obtuvo la primera muestra biológica del sujeto, un biomarcador como se describe en el presente documento; (b) administrar un tratamiento al sujeto; y (c) detectar y cuantificar, en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto después del tratamiento, el biomarcador cuantificado en la etapa (a); en el que la primera muestra biológica y la segunda muestra biológica son ambas una muestra de sangre o ambas una muestra de CSF. O ningún cambio en el nivel del biomarcador, o una disminución en el nivel del biomarcador, en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica una respuesta positiva al tratamiento. Además, un aumento en el nivel del biomarcador en la segunda muestra en comparación con la primera muestra también puede indicar una respuesta positiva al tratamiento cuando el aumento es menor que el aumento que ocurre en un grupo de control de sujetos que tienen daño neuronal pero fueron tratamiento no administrado. Preferiblemente, los sujetos de control tienen daño neuronal debido al mismo proceso patológico o tipo de lesión. En consecuencia, tales métodos pueden usarse para medir una respuesta al tratamiento en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener daño neuronal.

[0197] En otro aspecto, la presente divulgación comprende tratar a un sujeto diagnosticado con un daño neuronal o en riesgo de tener daño neuronal. El método comprende (a) cuantificar, en una muestra obtenida del sujeto, un

biomarcador como se describe en el presente documento; y (b) administrar al sujeto una composición farmacéutica para disminuir o estabilizar la cantidad del biomarcador medida en la etapa (a).

## **V. Composiciones**

[0198] En otro aspecto, la presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden un biomarcador de la **Sección IV** y un estándar interno.

[0199] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un estándar interno y una pluralidad de isoformas de Nfl seleccionadas del grupo que consiste en isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste sustancialmente en el dominio de bastón de Nfl (típicamente descrito como aminoácidos 90- 396 de SEC ID N.º: 1), isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste sustancialmente en una porción del dominio de bastón de Nfl, isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste en una porción del dominio de bastones de Nfl y ningún aminoácido fuera de este región, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que comprenden los aminoácidos 90 a 396 de SEC ID N.º: 1 que tiene hasta aproximadamente 330 aminoácidos de longitud. Alternativamente, o además, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que es un fragmento de los aminoácidos 90 a 396 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de 310 aminoácidos de longitud (aproximadamente 305, aproximadamente 300, aproximadamente 275, aproximadamente 250, aproximadamente 225, aproximadamente 200, aproximadamente 175, aproximadamente 150, aproximadamente 125, aproximadamente 100, aproximadamente 75, aproximadamente 50, aproximadamente 25, etc.) y comprende los aminoácidos 165 a 172 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 324 a 331 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de aproximadamente 200 aminoácidos de longitud y comprenden los aminoácidos

165 a 172 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de SEC ID NO.º: 1, o una combinación de los mismos. Alternativamente, o además, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que es un fragmento de los aminoácidos 125 a 396 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen aproximadamente 275 aminoácidos de longitud o menos, y comprende los aminoácidos 165 a 172 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 198 a 206 de la SEC ID N.º: 1, ácidos 324 a 331 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos.

[0200] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un estándar interno y una pluralidad de isoformas de Nfl seleccionadas del grupo que consiste en isoformas que consisten sustancialmente en la región de la cola de Nfl, isoformas con una secuencia de aminoácidos que consiste en una porción de la región de la cola de NFL, o una combinación de los mismos. La región de la cola normalmente se describe como los aminoácidos 397 a 543 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que comprenden los aminoácidos 397 a 543 de la SEC ID N.º: 1, que tiene una longitud de 147 aminoácidos a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud. Alternativamente, o además, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que es un fragmento de los aminoácidos 397 a 543 de SEC ID N.º: 1. Por ejemplo, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de 147 aminoácidos de longitud y comprenden los aminoácidos 422 a 437 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 438 a 462 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la composición puede incluir una o más isoformas de Nfl que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud o menos y comprenden los aminoácidos 422 a 437 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 438 a 462 de SEC ID N.º: 1, aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1, o cualquier combinación de los mismos.

[0201] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un estándar interno y un péptido seleccionado del

grupo que consiste en un péptido que consiste en los aminoácidos 165 a 172 de la SEC ID N.º: 1, un péptido que consiste en los aminoácidos 198 a 206 de la SEC ID N.º: 1, un péptido que consiste en los aminoácidos 324 a 331 de SEC ID N.º: 1, y un péptido que consiste en los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden un estándar interno y un péptido que consta de los aminoácidos 530 a 540 de SEC ID N.º: 1, en donde la composición contiene cantidades insignificantes de un péptido que consiste en los aminoácidos 165 a 172 de SEC ID N.º: 1, un péptido que consta de los aminoácidos 198 a 206 de SEC ID N.º: 1, y un péptido que consiste en los aminoácidos 324 a 331 de SEC ID N.º: 1.

[0202] En algunas realizaciones de las composiciones anteriores, el estándar interno es Nfl recombinante, o un fragmento del mismo, que está marcado de forma detectable. En algunas realizaciones, el estándar interno está marcado de manera detectable con un marcador de isótopo pesado seleccionado entre  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . En algunas realizaciones, el estándar interno es un péptido AQUA. En realizaciones particulares, el estándar interno que está marcado de manera detectable con un marcador de isótopo pesado y el biomarcador o pluralidad de isoformas o péptidos de Nfl pueden estar en una proporción de más de 0,01 a 1, respectivamente, y menos de 1 a 100, respectivamente; o puede estar en una proporción que es de aproximadamente 0,1 a 1, respectivamente, a aproximadamente 10 a 1, respectivamente.

[0203] La cantidad de péptido o la cantidad de biomarcador o la cantidad de la pluralidad de isoformas de Nfl es al menos 0,1 pg. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl es de aproximadamente 0,1 pg a aproximadamente 10.000 ng, o de aproximadamente 0,1 pg a aproximadamente 5.000 ng, o de aproximadamente 0,1 pg a aproximadamente 1.000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl es de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 10 000 ng, o de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 5000 ng, o de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl

es de aproximadamente 10 pg a aproximadamente 10 000 ng, o de aproximadamente 10 pg a aproximadamente 5000 ng, o de aproximadamente 10 pg a aproximadamente 1000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl es de aproximadamente 100 pg a aproximadamente 10 000 ng, o de aproximadamente 100 pg a aproximadamente 5000 ng, o de aproximadamente 100 pg a aproximadamente 1000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, o una pluralidad de isoformas de Nfl, es de aproximadamente 500 pg a aproximadamente 10.000 ng, o de aproximadamente 500 pg a aproximadamente 5.000 ng, o de aproximadamente 500 pg a aproximadamente 1.000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl es de aproximadamente 1000 pg a aproximadamente 10 000 ng, o de aproximadamente 1000 pg a aproximadamente 5000 ng, o de aproximadamente 1000 pg a aproximadamente 1000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl es de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 10 000 ng, o de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 5 000 ng, o de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 1000 ng. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, biomarcador o pluralidad de isoformas de Nfl es de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 10 000 ng, o de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 5000 ng, o de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 1000 ng.

[0204] En cada una de las realizaciones anteriores, las composiciones pueden comprender además uno o más agentes de unión a epítomos anti-Nfl como se describe en la **sección II** y se incorporan en esta sección como referencia.

### **EJEMPLOS**

[0205] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún obtener un resultado similar sin apartarse del espíritu y alcance de

la invención. por lo tanto, todo lo expuesto o mostrado en los ejemplos y dibujos adjuntos debe interpretarse como ilustrativo y no en un sentido limitante.

### **Ejemplo 1**

[0206] Este ejemplo describe un protocolo de inmunización para la producción de anticuerpos monoclonales NfL.

[0207] Antígeno: proteína recombinante (cadena ligera de neurofilamento-humana, producida en E. coli. y purificada). Se produjo y purificó NfL 1-543aa. Se inyectaron por vía intraperitoneal (IP) cien microgramos de proteína NfL recombinante en ratones B6/C3. La primera inyección consistió en 100 microgramos de 1-biomarcador NfL recombinante, 543aa por ratón en 200 microlitros de pl de PBS + 200 microlitros de IP adyuvante completo de Freund. Una segunda inyección 14 días después consistió en 100 microgramos de NfL 1-543aa recombinante en 200 microlitros de PBS más 200 microlitros de IP adyuvante incompleto de Freund por ratón. Después de 21 días, se extrajeron treinta microlitros de sangre de cada ratón y se analizó el suero mediante ELISA directo contra el NfL recombinante. Los ratones recibieron una tercera inyección después de 28 días de 100 microgramos de NfL1-543aa recombinante en 200 µl de PBS más 200 microlitros de IP adyuvante incompleto de Freund. Se extrajeron treinta microlitros de sangre de los ratones después de 35 días (segundo sangrado) y se evaluó nuevamente el suero mediante ELISA directo frente al NfL recombinante. Si los títulos de un ratón eran superiores a 1:10.000, se producía la fusión. Luego se inyectó IP a ratones un refuerzo final de 50 microgramos de NFL1-543aa recombinante en PBS 3 días antes de la fusión.

[0208] Después se examinaron los anticuerpos que se producían a partir de clones individuales recubriendo placas con NFL 1-543aa recombinante. Para ello se aplicó NfL 1-543aa en placas y luego se cubrieron las placas con leche al 1%. Luego se lavaron las placas con PBS y se añadió medio de cultivo celular de los clones individuales en una dilución de 1:10 en BSA al 0,5 % en tampón PBS más IgG anti-ratón HRP. Luego se añadió TMB y se leyó mediante la absorbancia a 650 y se comparó con el medio de cultivo celular solo como blanco.

[0209] Se seleccionaron veintitrés anticuerpos para una caracterización

adicional (ver Ejemplo 2). Los anticuerpos HJ30.1, HJ30.2, HJ30.4, HJ30.7, HJ30.11 y HJ30.13 se depositaron en la ATCC.

**Tabla 1**

| <b>Anticuerpo<br/>(ATCC # del hibridoma)</b> |
|----------------------------------------------|
| HJ30.1 (PTA-126966)                          |
| HJ30.2 (PTA-126967)                          |
| HJ30.4 (PTA-126968)                          |
| HJ30.7 (PTA-126969)                          |
| HJ30.11 (PTA-126970)                         |
| HJ30.13 (PTA-126971)                         |

## **Ejemplo 2**

[0210] En este ejemplo, se inmunoprecipitó Nfl usando uno de los veintitrés anticuerpos descritos en el Ejemplo 1, se digirió proteolíticamente y luego se detectaron y cuantificaron péptidos proteolíticos de Nfl mediante espectrometría de masas (MS). En todos los experimentos de MS descritos en este y otros ejemplos, cuando no se detectó una señal de MS confiable para un péptido tríptico dado del ISTD, no se informaron datos ni para el ISTD (15N) ni para el Nfl experimental (14N); ver, por ejemplo, el péptido tríptico [55,83] en la **FIG. 1**. Los péptidos trípticos se identifican en toda la especificación, incluidos los ejemplos del presente documento, utilizando una notación abreviada particular - "[X,Y]" - en la que X es el primer aminoácido del péptido tríptico e Y es el último aminoácido del péptido tríptico. , y en el que X+1 o Y+1 identifica el aminoácido de Nfl de longitud completa (SEC ID N.º: 1). Por ejemplo, la nomenclatura "[55,83]" es una abreviatura del péptido tríptico SYSSSSSGSLMPSENLDSLQVAAISNDLK (SEC ID N.º: 5), que consta de los aminoácidos 56 a 84 de Nfl de longitud completa (SEC ID N.º: 1).

[0211] Para facilitar la recuperación de Nfl inmunoprecipitado, los anticuerpos individuales se entrecruzaron con Dynabeads® a una concentración de 25 pg de anticuerpo por mg de perlas, según las instrucciones del fabricante. Se utilizó HJ5.1, un anticuerpo anti-Ap, como control negativo. Se evaluaron Nfl

recombinante (rec-Nfl) de longitud completa y Nfl producido biológicamente aislado de lisado cerebral o LCR.

[0212] Para el análisis de Nfl recombinante de longitud completa (rec-Nfl), se añadieron 10  $\mu$ l de rec-Nfl de 5 ng/ $\mu$ l en HSA al 1 % a 40  $\mu$ l de TEABC 100 mM. El Nfl se inmunoprecipitó añadiendo 30  $\mu$ l de una suspensión al 30 % (es decir, 3 mg/ml) de una preparación de perlas conjugadas con anticuerpo y rotando la muestra durante 120 minutos a temperatura ambiente. Las perlas conjugadas con anticuerpo se separaron magnéticamente y se eliminó el sobrenadante post-IP. Las perlas se lavaron tres veces en 1 ml de TEABC 25 mM (por lavado).

[0213] NfL también se purificó por afinidad a partir de lisado cerebral y CSF. Las muestras de cerebro utilizadas fueron muestras previamente lisadas y almacenadas a -80°C para el desarrollo del ensayo, no se obtuvieron los datos demográficos de los pacientes de los sujetos (p. ej., edad, sexo, signos clínicos o síntomas de enfermedad neuronal). Los lisados congelados se descongelaron y una alícuota se diluyó 1:1000 con HSA al 1%. Se transfirieron 450  $\mu$ l del lisado cerebral descongelado a un tubo nuevo de 1,6 ml. 25  $\mu$ L de una mezcla maestra que contiene detergente (1 % NP-40), reactivo caotrópico (guanidina 5 mM) e inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa completo de Roche) y 20  $\mu$ L de estándar interno Nfl (ISTD) de 0,5 ng/ml en 50  $\mu$ L. Luego se añadió tampón de bicarbonato de trietilamonio (TEABC) mM. Como ISTD se utilizó Nfl recombinante de longitud completa marcado con Lys, Arg,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . El Nfl se inmunoprecipitó añadiendo 30  $\mu$ l de una suspensión al 30 % (es decir, 3 mg/ml) de una preparación de perlas conjugadas con anticuerpo y rotando la muestra durante 120 minutos a temperatura ambiente. Las perlas conjugadas con anticuerpo se separaron magnéticamente y se eliminó el sobrenadante post-IP. Las perlas se lavaron tres veces en 1 ml de TEABC 25 mM (por lavado).

[0214] Las muestras de LCR utilizadas se obtuvieron previamente de sujetos humanos para el desarrollo del ensayo y se almacenaron a -80°C. Se desconocen los datos demográficos de los sujetos (p. ej., edad, sexo, signos o síntomas clínicos de enfermedad neuronal). Se descongelaron muestras de LCR congeladas a temperatura ambiente y se transfirieron 500  $\mu$ l del LCR

descongelado a un tubo nuevo. 25 uL de una mezcla maestra que contiene detergente (1 % NP-40), reactivo caotrópico (guanidina 5 mM) e inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa completo de Roche) y 20 uL de estándar interno Nfl (ISTD) de 0,5 ng/ml en 50. Luego se añadió tampón de bicarbonato de trietilamonio (TEABC) mM. Como ISTD se utilizó Nfl recombinante de longitud completa marcado con Lys, Arg,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . El Nfl se inmunoprecipitó añadiendo 30  $\mu\text{L}$  de una suspensión al 30 % (es decir, 3 mg/ml) de una preparación de perlas conjugadas con anticuerpo y rotando la muestra durante 120 minutos a temperatura ambiente. Las perlas conjugadas con anticuerpo se separaron magnéticamente y se eliminó el sobrenadante post-IP. Las perlas se lavaron tres veces en 1 ml de TEABC 25 mM (por lavado).

[0215] Independientemente de la muestra, el Nfl unido al anticuerpo se digirió en perlas con 400 ng de tripsina de grado MS o Lys-C en TEABC 25 mM durante 16 horas a 37°C. La concentración de proteasa, el tiempo de incubación y el tampón se pueden ajustar según métodos conocidos en la técnica. Los resúmenes se cargaron en TopTip C18 acondicionado por, desalado lavando dos veces con ácido fórmico (FA) al 0,1 % y eluido con acetonitrilo (ACN) al 60 % y FA al 0,1 %. Los péptidos eluidos se secaron mediante centrifugación al vacío y se almacenaron a -80°C o se resuspendieron inmediatamente.

[0216] Para el análisis de EM, los péptidos eluidos se reconstituyeron con 25  $\mu\text{L}$  de FA al 0,1 %/CAN al 0 %. Luego se inyectó una alícuota de 4,5 uL de cada digestión en nano-Acquity LC para análisis de EM. El nano-Acquity LC (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) estaba equipado con una columna HSS T3 de 75  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$ , 1,8  $\mu\text{m}$  y un caudal de 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los péptidos se separaron mediante un gradiente desde 2 % de disolvente B hasta 95 % de disolvente B. La solución A estaba compuesta por 0,1 % de ácido fórmico en agua de calidad MS y la solución B estaba compuesta por 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. Las muestras se analizaron en modo de iones positivos, con un voltaje de pulverización de 2200 V y una temperatura del tubo de transferencia de iones de 275 °C. Los datos se recopilaron con monitorización de reacciones paralelas (PRM) para péptidos endógenos (N14) y marcados isotópicamente (C13N15),

dirigidos al estado de carga 2+ o 3+. La energía de colisión de HCD osciló entre 18 y 27 % y se optimizó para cada péptido. El tiempo máximo de inyección osciló entre 24 y 118 ms y se optimizó para cada péptido. El objetivo de AGC normalizado se estableció en 400 %. Los datos se extrajeron utilizando el software Skyline (laboratorio McCoss) y se analizaron en Skyline y Microsoft Excel.

[0217] FIG. 1 proporciona una descripción general de la recuperación de Nfl / eficiencia de IP para rec-Nfl. FIG. 2 proporciona una descripción general de la recuperación de Nfl/eficiencia de IP del lisado cerebral. FIG. 3 proporciona una descripción general de la recuperación de Nfl/eficiencia de IP de CSF. FIG. 4-21 muestran los datos de anticuerpos individuales. Para cada gráfico, el eje y es la relación 14N/15N y cada punto en el eje x es un péptido tríptico de Nfl.

[0218] En la Fig. 1, las proporciones 14N/15N son consistentes a lo largo de la secuencia, lo que se esperaba dado que tanto el ISTD como el Nfl experimental (rec-Nfl) eran proteínas de longitud completa. En particular, HJ13.3.2, HJ30.19, HJ30.19-40 y HJ30-.19-77 no mostraron recuperación de rec-Nfl.

[0219] En el lisado cerebral, el Nfl detectado también fue mayoritariamente de longitud completa (FIG. 2). El análisis indicó que la metionina N-terminal se escindió y el segundo aminoácido (serina) se acetiló (datos no mostrados). Se determinó que la señal alta observada con los péptidos trípticos [370.378], [379.389] y [391.398] se debía a un contaminante (datos no mostrados).

[0220] La contaminación observada en el análisis de las muestras de lisado cerebral también se observó en el análisis de la muestra de CSF (FIG. 3-21) Dado que los péptidos trípticos [370.378], [379.389] y [391.398] no son exclusivos de Nfl, no deben usarse para la detección y cuantificación de Nfl en una muestra biológica. También se observó acetilación de [2,14] en CSF Nfl (FIG. 3-21). A diferencia de las proporciones 14N/15N observadas con rec-Nfl y Nfl del lisado cerebral, la Nfl del LCR mostró proporciones 14N/15N inconsistentes a lo largo de la secuencia, lo que indica una cantidad de especies de Nfl truncadas en el LCR (FIG. 3). Al comparar los perfiles de anticuerpos individuales (FIG. 4-

21), fue evidente que ciertos anticuerpos son más eficaces para inmunoprecipitar el Nfl del LCR que otros, y que el Nfl del LCR contiene una pluralidad de isoformas de Nfl de longitud variable con escisión en el extremo N-terminal, C-terminal, o N-terminal y C-terminal.

[0221] Un resumen de algunas de las posibles isoformas enriquecidas a partir de lisado cerebral y CSF mediante los métodos descritos anteriormente se ilustra en la Fig. 22 con tamaños aproximados proporcionados.

### **Ejemplo 3**

[0222] En este ejemplo, se inmunoprecipitó Nfl a partir de CSF usando uno de HJ30.4, HJ30.11 o HJ30.13. Las muestras de CSF utilizadas se obtuvieron previamente de sujetos humanos para el desarrollo del ensayo y se almacenaron a -80°C. Se desconocen los datos demográficos de los sujetos (p. ej., edad, sexo, signos o síntomas clínicos de enfermedad neuronal). La inmunoprecipitación y el análisis LC-MS fueron como se describe generalmente en el Ejemplo 2, excepto que el sobrenadante recuperado después de la inmunoprecipitación se sometió a una segunda ronda de inmunoprecipitación con el mismo anticuerpo. Los datos de 14N (barras rojas) y 15N (barras azules) se muestran por separado (**FIG. 23-25**). Las dos primeras barras de cada figura corresponden al primer paso de enriquecimiento y las dos segundas barras corresponden al segundo paso de enriquecimiento.

[0223] La mayor parte del estándar interno (ISTD, barra azul) se recupera de la muestra mediante el primer paso de enriquecimiento. Esto sugiere que sería necesario volver a agregar un estándar interno completo si se realizan rondas secuenciales de enriquecimiento con el mismo o diferente agente de unión a epítipo. De manera similar, HJ30.4 y H30.13 enriquecieron eficientemente las isoformas de Nfl del CSF en un solo paso (**FIG. 23-24**). Por el contrario, HJ30.11 no inmunoprecipitó en un solo paso todas las isoformas de Nfl a las que se une específicamente (**FIG. 25**).

### **Ejemplo 4**

[0224] También se realizó una inmunoprecipitación secuencial de Nfl del LCR con múltiples anticuerpos. Las muestras de CSF utilizadas se obtuvieron

previamente de sujetos humanos para el desarrollo del ensayo y se almacenaron a -80°C. Se desconocen los datos demográficos de los sujetos (p. ej., edad, sexo, signos o síntomas clínicos de enfermedad neuronal). La inmunoprecipitación y el análisis LC-MS fueron generalmente como se describe en el Ejemplo 2, excepto que el sobrenadante recuperado después de la primera inmunoprecipitación se sometió a una segunda ronda de inmunoprecipitación con un segundo anticuerpo, y luego el sobrenadante recuperado después de que la segunda inmunoprecipitación se sometió a una tercera ronda de inmunoprecipitación con un tercer anticuerpo. En un experimento, se utilizaron secuencialmente HJ30.2, HJ30.7 y luego HJ30.11 para la inmunoprecipitación. En un segundo experimento, se utilizaron secuencialmente HJ30.11, HJ30.7 y HJ30.2 para la inmunoprecipitación. En estos experimentos, sólo se añadió estándar interno a la muestra inicial de CSF. Cada experimento se realizó por duplicado. Se muestra un esquema del diseño experimental en la **FIG. 26**. Se muestra un enfoque alternativo en el que también se agrega un estándar interno a cada sobrenadante post-IP antes de una ronda posterior de enriquecimiento en la **FIG. 29**.

[0225] Los datos de ambos experimentos se muestran juntos en las **FIGs. 27-28**. En la **FIG. 27**, el eje y es la relación 14N/15N y cada punto en el eje x es un péptido tríptico de Nfl. En la **FIG. 28**, el eje y es la señal de 14N y cada punto en el eje x es un péptido tríptico de Nfl. Cada línea coloreada es una muestra diferente, como se identifica en la clave y en la **FIG. 26**. Cuando no se detectó una señal de MS confiable para un péptido tríptico determinado del ISTD, no se informaron datos. Las isoformas de Nfl que comprenden el extremo C-terminal fueron más abundantes después del enriquecimiento secuencial usando HJ30.11 al final del proceso en comparación con el comienzo del proceso (compare “30.11” o “30.11\_duplicate” con “post 30.2&7\_30.11IP” o “publicación 30.2&7\_30.11IP\_duplicate” en la **FIG. 28**). La detección de estas isoformas C-terminales fue insignificante en las otras muestras analizadas. Estos datos muestran que el uso secuencial de diferentes agentes de unión a epítomos enriquece para diferentes poblaciones de isoformas de Nfl.

## **Ejemplo 5**

[0226] En este ejemplo, se compararon isoformas de Nfl de muestras de LCR obtenidas de sujetos humanos con daño neuronal con isoformas de Nfl de muestras de LCR obtenidas de sujetos humanos de control. La inmunoprecipitación y el análisis LC-MS fueron generalmente como se describe en el Ejemplo 2, excepto que el sobrenadante recuperado después de una primera inmunoprecipitación con HJ30.13 se sometió a una segunda ronda de inmunoprecipitación con HJ30.4, y luego el sobrenadante recuperado después de que la segunda inmunoprecipitación se sometió a una tercera ronda de inmunoprecipitación con HJ30.11. También se añadió estándar interno a cada sobrenadante post-IP antes de una ronda posterior de enriquecimiento. Se muestra un esquema del diseño experimental en la **FIG. 29**.

[0227] Los datos mostrados en la **FIG. 30-39** son de experimentos que utilizan muestras de LCR obtenidas de sujetos humanos con uno o más biomarcadores para la enfermedad de Alzheimer (EA), o muestras de LCR obtenidas de sujetos humanos de control. Más particularmente, los sujetos identificados con AD fueron amiloide positivos según se evaluaron mediante imágenes de PIB-PET o niveles de A<sup>42</sup> en LCR (**FIG. 30-33**). Todos los sujetos con EA en esta cohorte también tuvieron una puntuación de Clasificación Clínica de Demencia (CDR) de > 0,5. Los sujetos de control tenían una puntuación CDR de cero y eran amiloide negativos (**FIG. 34-39**). Cada figura es un tema individual; en cada figura, la línea azul son las isoformas de Nfl inmunoprecipitadas con HJ30.13, la línea naranja son las isoformas de Nfl inmunoprecipitadas con HJ30.4 y la línea gris son las isoformas de Nfl inmunoprecipitadas con HJ30.11, donde el eje y es 14N/15N relación y cada punto en el eje x es un péptido tríptico de Nfl. Cuando no se detectó una señal de MS confiable para un péptido tríptico determinado del ISTD, no se informaron datos. Como se resume en la **FIG. 40**, algunas partes de la Nfl parecen ser más capaces de diferenciar a los sujetos con EA de los sujetos de control.

[0228] Los datos mostrados en la **FIG. 41** son de experimentos que utilizan muestras adicionales de CSF obtenidas de sujetos humanos con uno o más biomarcadores para la EA (es decir, en menos amiloide positivo según lo

evaluado mediante imágenes de PIB-PET o niveles de A<sup>β</sup>42 en CSF) agrupados por puntuación de CDR (0, 0,5, 1 o 2), muestras adicionales de sujetos humanos de control (amiloide negativo y CDR = 0) y muestras obtenidas de sujetos humanos que eran amiloide negativos pero que tenían demencia muy leve (CDR 0,5) o demencia leve (CDR 1). Un estado amiloide negativo con demencia muy leve a leve puede indicar otros procesos de enfermedad neurológica (es decir, una enfermedad neurológica que afecta la cognición, distinta de la AD). Debido a un error técnico, no se pudieron obtener los datos de la NFL del primer paso de enriquecimiento. Sin embargo, los datos de los pasos de enriquecimiento segundo y tercero parecían similares al análisis inicial de AD versus control (amiloide negativo, CDR 0). En particular, los datos muestran nuevamente que las isoformas de Nfl que comprenden los aminoácidos C-terminales 530 a 540 de SEC ID N.º: 1 diferencian a los sujetos con AD de los sujetos de control. Además, los datos del sujeto amiloide negativo con demencia leve (CDR 1) sugieren que las isoformas de Nfl detectadas podrían ser útiles como marcadores de daño neuronal debido a otras causas.

### **Ejemplo 6**

[0229] En este ejemplo, se analizaron isoformas de Nfl de muestras de sangre obtenidas de sujetos humanos. Se utilizaron dos muestras diferentes de sangre combinada, cada una de las cuales se compone de sangre obtenida previamente de múltiples sujetos humanos para el desarrollo del ensayo, combinada y almacenada a -80°C. La inmunoprecipitación y el análisis LC-MS fueron generalmente como se describe en el Ejemplo 5, excepto que se usaron 0,5 ml de sangre en lugar de CSF. Como se muestra en la **FIG. 42-44**, La concentración de Nfl en sangre es menor que en el CSF, pero detectable. Además, la sangre también se compone de varias isoformas de Nfl, similares al CSF. Also similar to CSF, there are several truncated Nfl isoforms in blood that are comprised primarily of the C-terminus.

### **Ejemplo 7**

[0230] Este ejemplo amplía los ejemplos anteriores utilizando los anticuerpos desarrollados que se unen a diversas regiones de Nfl y

caracterizando los dominios de NfL recuperados por estos anticuerpos usando espectrometría de masas por inmunoprecipitación (IP-MS) en tejido cerebral y CSF. El presente ejemplo muestra que el NfL cerebral es principalmente constituido por proteína de longitud completa, mientras que CSF NfL consiste en una mezcla de diferentes especies de fragmentos de proteínas. Luego se probaron las especies de fragmentos de NfL recientemente identificadas en una cohorte de descubrimiento de controles y AD, y se validaron aún más en una cohorte de confirmación.

[0231] Las muestras de LCR agrupadas utilizadas para el desarrollo del ensayo se obtuvieron previamente de sujetos humanos y se almacenaron a -80°C. En el momento de la recolección inicial, el LCR se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos para eliminar los restos celulares y se congeló inmediatamente a -80°C. Las muestras de cerebro incluyeron muestras previamente lisadas y almacenadas a -80°C para el desarrollo del ensayo. Todas las muestras de AD y de LCR de control se recogieron durante un estudio previo, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C. La cohorte de validación incluyó muestras de CSF de 30 participantes positivos para amiloide sintomáticos, 16 participantes positivos para amiloide asintomáticos, 10 participantes negativos para amiloide sintomáticos y 25 controles negativos. Los datos demográficos de los participantes se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Datos demográficos de la cohorte de validación**

| Variable                          | Grupo                   |                         |                         |                         |
|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                   | Amiloide+, CDR>0 (n=30) | Amiloide+, CDR=0 (n=16) | Amiloide-, CDR>0 (n=10) | Amiloide-, CDR=0 (n=25) |
| Edad (media $\pm$ sd)             | 74.17 $\pm$ 6.71        | 73.43 $\pm$ 6.88        | 74.30 $\pm$ 8.22        | 71.96 $\pm$ 5.51        |
| Mujer (n, %)                      | 9 (30.00%)              | 9 (56.25%)              | 2 (20.00%)              | 14 (56.00%)             |
| APOE4 (n, %)                      | 19 (63.33%)             | 9 (56.25%)              | 2 (20.00%)              | 2 (8.00%)               |
| CDR Suma de caja (media $\pm$ sd) | 3.42 $\pm$ 2.39         | 0.06 $\pm$ 0.17         | 2.15 $\pm$ 1.53         | 0 $\pm$ 0               |
| MMSE (media $\pm$ sd)             | 25.43 $\pm$ 3.76        | 29.25 $\pm$             | 27.80 $\pm$             | 28.72 $\pm$             |

|  |  |      |      |      |
|--|--|------|------|------|
|  |  | 0.68 | 2.25 | 1.54 |
|--|--|------|------|------|

[0232] Tanto el NfL recombinante como el nativo se inmunoprecipitaron añadiendo 30  $\mu$ l de una suspensión al 30 % (es decir, 3 mg/ml) de una preparación de perlas conjugadas con anticuerpo y rotando la muestra durante 120 minutos a temperatura ambiente. Las perlas conjugadas con anticuerpo se separaron magnéticamente y se eliminó el sobrenadante post-IP. Las perlas se lavaron tres veces en 1 ml de TEABC 25 mM (por lavado). El NfL unido se digirió en perlas con 400 ng de tripsina grado MS/Lys-C.

(Promega) durante 16 horas a 37°C. Los digestos se cargaron en TopTip C18 (Glygen, TT2C18.96), se desalinizaron y eluyeron. Los eluyentes se secaron al vacío sin calor y se almacenaron a -80°C hasta el análisis mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (véanse los métodos LC-MS/MS a continuación). 16 anticuerpos recuperaron la proteína recombinante de longitud completa (**FIG. 45**). Basándose en los perfiles peptídicos de NfL nativo inmunoprecipitado de LCR combinado, se determinó que los anticuerpos tenían epítomos contra la porción amino terminal del dominio de bastón, la porción carboxi terminal del dominio de bastón o el extremo carboxi terminal de NfL (**FIG. 46**). Se eligieron anticuerpos con alta recuperación y especificidad de NfL para cada uno de estos dominios de NfL y se utilizaron en ensayos de IP-MS cualitativos y cuantitativos. Ninguno de los anticuerpos personalizados reconoció el extremo N de NfL.

[0233] Se usó inmunoprecipitación secuencial de tres pasos para caracterizar NfL en lisado cerebral y CSF. Se utilizaron anticuerpos dirigidos a la bobina 1A/1B del dominio de varilla (HJ30.13), a la bobina 2B del dominio de varilla (HJ30.4) y a la región de la cola (HJ30.11). Se descongelaron lisados cerebrales congelados y una alícuota de 450  $\mu$ l del lisado cerebral descongelado se diluyó 1:1000 con HSA al 1%. Las muestras de LCR congeladas se descongelaron a temperatura ambiente y se transfirieron 450  $\mu$ l de LCR descongelado a un tubo nuevo de 1,6 ml para inmunoprecipitación.

[0234] Se inmunoprecipitaron muestras de cerebro y de LCR como se describió anteriormente para LCR nativo usando 30  $\mu$ l de una suspensión al 30 % (es decir, 3 mg/mL) de una preparación de perlas conjugadas con anticuerpo de

HJ30.13 (anticuerpo de bobina 1A/1B). Las perlas lavadas se almacenaron en hielo hasta que todas las muestras estuvieron listas para la digestión en las perlas. En el segundo paso, se añadieron 20 pL de 0,5 ng/ml de NfL ISTD en TEABC 50 mM y se inmunoprecipitó NfL por segunda vez añadiendo 30 pL de una suspensión al 30 % (es decir, 3 mg/ml) de una suspensión conjugada con anticuerpo. preparación de perlas de HJ30.4 (anticuerpo Coil 2B). Los pasos restantes fueron idénticos a la primera inmunoprecipitación. Se agregaron nuevamente 10 ng de ISTD en TEABC 50 mM al sobrenadante post-IP antes de la tercera inmunoprecipitación secuencial, que se realizó con HJ30.11 (anticuerpo de cola). El NfL unido se digirió en perlas con 400 ng de tripsina grado MS/Lys-C (Promega) durante 16 horas a 37°C y las muestras se extrajeron como se describe anteriormente.

[0235] Para eliminar la necesidad de una adición secuencial de ISTD, los anticuerpos dirigidos a la bobina 1A/1B del dominio de varilla (HJ30.13), a la bobina 2B del dominio de varilla (HJ30.4) y a la región de la cola (HJ30.11) se mezclaron 1:1:1 para generar una suspensión de anticuerpos con una concentración final del 10 % (es decir, 1 mg/ml) de cada anticuerpo. Se añadieron 25 pL de una mezcla maestra que contenía detergente (NP-40 al 1%), reactivo caotrópico (guanidina 5 mM) e inhibidores de proteasa (cóctel inhibidor de proteasa completo Roche) a placas de 96 pocillos. Luego se agregaron 5 pL de ISTD (0,1 ng/pL en HSA al 1 %; disolvente ISTD y cantidad optimizada para la recuperación cuantitativa y el rango dinámico del ensayo), seguido de 450 pL de LCR descongelado y 30 pL de la suspensión de anticuerpos. La inmunoprecipitación y la digestión en perlas se realizaron como se describe anteriormente.

[0236] Se analizó el LCR combinado para identificar grupos con concentraciones altas y bajas de NfL. Se seleccionaron y utilizaron los grupos de CSF con las concentraciones de NfL más bajas (NfL-L1) y más altas (NfL-L2) para determinar el rango lineal del ensayo. NfL-L2 CSF se diluyó en serie con NfL-L1 CSF para generar una curva de 8 puntos con: 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,13 % y 1,56 % de NfL-L2. A NfL se le realizó IP como se describe anteriormente,

por triplicado, para su concentración. Se determinaron las proporciones N14/N15 para cada uno de los 6 péptidos en el método cuantitativo, y las proporciones N14/N15 promedio de las réplicas se representaron frente al % de NfL-L2 y se realizó una regresión lineal. Los 6 péptidos mostraron una buena linealidad en las concentraciones de NfL analizadas, con  $R^2 > 0,988$  (**FIG. 47**). El % CV promedio para cada péptido en el rango lineal fue del 8 al 12 % (**Tabla 3**).

**Tabla 2: % decimal CV para el método IP-MS en todo el rango lineal**

| %NfL-L2 | NfL101 | NfL117 | NfL165 | NfL284 | NfL324 | NfL530 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0       | 0.13   | 12.69  | 18.72  | 16.00  | 8.59   | 13.37  |
| 1.56    | 0.10   | 0.10   | 0.11   | 0.05   | 0.11   | 0.08   |
| 3.125   | 0.21   | 0.15   | 0.22   | 0.15   | 0.05   | 0.07   |
| 6.25    | 0.11   | 0.10   | 0.08   | 0.02   | 0.10   | 0.18   |
| 12.5    | 0.06   | 0.08   | 0.08   | 0.06   | 0.05   | 0.06   |
| 25      | 0.04   | 0.02   | 0.06   | 0.02   | 0.03   | 0.05   |
| 50      | 0.11   | 0.05   | 0.13   | 0.07   | 0.08   | 0.01   |
| 100     | 0.16   | 0.15   | 0.06   | 0.12   | 0.16   | 0.21   |

[0237] Los productos digeridos extraídos se reconstituyeron con 25 pL de ácido fórmico al 0,1 %/ACN al 0 %. Luego se inyectó una alícuota de 4,5 pL de cada digestión en nano-Acquity LC para análisis de EM. El nano-Acquity LC (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) se equipó con una columna HSS T3 de 75 pm x 100 pm, 1,8 pm y se usó un caudal de 0,5 pL/min de un gradiente de las soluciones A y B para separar los péptidos. La solución A estaba compuesta por 0,1% de ácido fórmico en agua de calidad MS y la solución B estaba compuesta por 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo. Las muestras se analizaron en modo de iones positivos, con un voltaje de pulverización de 2200 V y una temperatura del tubo de transferencia de iones de 275 °C. Los datos se recopilaron con monitorización de reacciones paralelas (PRM) para péptidos endógenos (N14) y marcados isotópicamente (Lys, Arg: 13C 15N). Los péptidos trípticos específicos de NfL se identificaron mediante búsqueda Blast y aquellos con buena ionización se incluyeron en el PRM cualitativo, diseñado para optimizar la cobertura de secuencia. El método cuantitativo se optimizó para la precisión del ensayo y la

multiplexación se redujo al análisis de 6 péptidos NfL en varios dominios NfL y sus ISTD correspondientes (**Tabla 4**).

**Tabla 3: Lista cuantitativa de péptidos de MS**

| Secuencia peptídica                        | Aminoácidos # | z | Precursor m/z | Ión fragmentado utilizado para la cuantificación | Fragmento m/z |
|--------------------------------------------|---------------|---|---------------|--------------------------------------------------|---------------|
| FASFIER (light) (SEC ID N.º: 7)            | 100-106       | 2 | 435.2294      | y5+                                              | 651.3461      |
| FASFIER (C1315N-ISTD) (SEC ID N.º: 7)      | 100-106       | 2 | 440.2336      | y5+                                              | 661.3543      |
| VLEAELLVLR (light)(SEC ID N.º: 9)          | 116-125       | 2 | 577.8608      | y8+                                              | 942.5619      |
| VLEAELLVLR (C1315N- ISTD) (SEC ID N.º: 9)  | 116-125       | 2 | 582.8649      | y8+                                              | 952.5701      |
| EGLEETLR (light)(SEC ID N.º: 13)           | 164-171       | 2 | 473.7456      | y4+                                              | 518.2933      |
| EGLEETLR (C1315N-ISTD) (SEC ID N.º: 13)    | 164-171       | 2 | 478.7498      | y4+                                              | 528.3016      |
| FTVLTESAAK (light)(SEC ID N.º: 19)         | 283-292       | 2 | 533.7926      | y8+                                              | 818.4618      |
| FTVLTESAAK (C1315N- ISTD) (SEC ID N.º: 19) | 283-292       | 2 | 537.7997      | y8+                                              | 826.476       |
| GMNEALEK (light)(SEC ID N.º: 20)           | 323-330       | 2 | 446.2157      | y6+                                              | 703.3621      |
| GMNEALEK (C1315N- ISTD) (SEC ID N.º: 20)   | 323-330       | 2 | 450.2228      | y6+                                              | 711.3763      |
| VEGAGEEQAAK (light)(SEC ID N.º: 29)        | 529-539       | 2 | 544.7646      | y9+                                              | 860.4108      |
| VEGAGEEQAAK (C1315N-ISTD) (SEC ID N.º: 29) | 529-539       | 2 | 548.7717      | y9+                                              | 868.425       |

[0238] La cohorte de validación consistió en 81 muestras de LCR recolectadas previamente de individuos con demencia por EA (amiloide positivo, CDR 0-2), demencia sin EA (amiloide negativo, CDR 0,5-1) y controles sanos (amiloide negativo, CDR 0). La positividad de amiloide se determinó previamente mediante la relación A042/A0 40 (Patterson et al., 2015). Para cada muestra de

CSF, se midieron seis péptidos NfL, correspondientes a cuatro dominios diferentes de NfL (Coil 1A, Coil 1B, Coil 2B y Tail), utilizando el método cuantitativo IP-MS descrito anteriormente. El NfL también se midió mediante un kit ELISA comercial (UMAN Diagnostics) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Brevemente, para la medición ELISA, las muestras de CSF se descongelaron en hielo húmedo y se agitaron. Luego, las muestras se diluyeron 2 veces con el diluyente de muestra proporcionado en una preplaca de 96 pocillos y se mezclaron antes de transferirlas a la placa de ensayo.

[0239] Para determinar la relación de las especies solubles de NfL con las medidas clínicas, cognitivas, de imágenes y de biomarcadores de la AD, se realizó un análisis de correlación entre cada región de NfL (IP-MS) y los datos de biomarcadores obtenidos previamente. Se evaluaron las siguientes medidas: edad, CDR-global y CDR suma de cajas (CDR-SB), miniexamen del estado mental (MMSE), imágenes de placa amiloide (PET PiB), LCR A042/A040, tau total en CSF (t- tau), LCR ptau 181 y ptau181/tau181, CSF ptau205 y ptau205/tau205, y CSF ptau217 y ptau217/tau217.

[0240] Se generaron veintitrés anticuerpos monoclonales contra NfL y se evaluó su capacidad para inmunoprecipitar rec-NfL de longitud completa, NfL a partir de lisado cerebral y NfL a partir de CSF combinado. Los anticuerpos se caracterizaron por el dominio NfL al que apuntaban, su eficiencia de IP y su especificidad. Se seleccionaron y utilizaron anticuerpos representativos para cada dominio NfL para un mayor desarrollo del ensayo. Utilizando anticuerpos dirigidos a varios dominios de NfL, determinamos que múltiples especies de NfL existen en CSF (**FIG. 48**). Para dilucidar mejor las especies de NfL en el LCR, se inmunoprecipitaron secuencialmente muestras agrupadas de LCR comenzando con un anticuerpo dirigido a la bobina 1A/1B (aproximadamente aa93-252, HJ30.13), seguido de un anticuerpo dirigido a la bobina 2B (aproximadamente aa272-396, HJ30.4), y finalmente con un anticuerpo dirigido al extremo C de la región de la cola (aa 520-550, HJ30.11). Con base en estos perfiles de proteínas, se identificaron un mínimo de tres especies principales de fragmentos de NfL en el CSF, aunque es probable que existan múltiples variaciones de estas especies.

Estos incluyen dos truncamientos N-terminal y C-terminal diferentes que contienen dominios de varilla enriquecidos por HJ30.13 (aa92 hasta al menos aa224, con posibles variaciones que se extienden hasta aa360) y HJ30.4 (aa324 hasta aa360), así como un C- fragmento terminal que contiene la cola de NfL (enriquecido con HJ30.11, que contiene desde aa530 hasta al menos aa540). No se recuperaron fragmentos N-terminales y el NfL de longitud completa no estaba presente en concentraciones cuantificables en el CSF (**FIG. 49A-49B**).

[0241] En contraste con la proteína altamente fragmentada en el CSF, el homogeneizado de tejido cerebral contenía principalmente NfL de longitud completa. Para determinar si también había isoformas truncadas en el cerebro, se realizó la misma inmunoprecipitación secuencial en tejido cerebral humano. Aunque la mayoría de los NfL cerebrales parecían tener toda su longitud, también se observó un fragmento C-terminal del subdominio B de la cola que contenía al menos los aminoácidos 530-540 (**FIG. 49A, 49C**), similar al fragmento identificado en el LCR. Un fragmento que contiene aa165-224 parece estar enriquecido con HJ30.13. No se enriquecieron fragmentos NfL adicionales en el cerebro durante la segunda IP (HJ30.4, bobina 2B del dominio de bastón).

[0242] El método IP-MS secuencial probado inicialmente en CSF combinado experimental se repitió en muestras de CSF de una cohorte de descubrimiento de demencia por enfermedad de Alzheimer (EA, N=4) y controles sanos (N=6). Los péptidos observados en ambos grupos clínicos fueron similares a los observados en el CSF combinado, pero hubo cantidades mayores de las tres especies principales de NfL en AD en comparación con los controles (**FIG. 50**). Además, algunos péptidos parecieron ser mejores que otros para diferenciar las muestras de AD y de control. La diferencia más destacada se observó para el NfL530 (péptido tríptico VEGAGEEQAAK (SEC ID N.º: 29), aa530-540) en la cola C-terminal y el péptido tríptico GADEAALAR (SEC ID N.º: 16), dentro de la bobina 1B del dominio de varilla. .

[0243] Para comparar mejor las especies de NfL en CSF en EA, demencia sin EA y controles sanos, desarrollamos un ensayo cuantitativo de NfL para medir de manera confiable regiones seleccionadas en múltiples especies de

NfL. Para mejorar la precisión, la multiplexación en nuestro método cuantitativo se redujo para medir 6 péptidos en los distintos dominios NfL y sus correspondientes estándares internos. Luego se aplicó el método cuantitativo IP-MS para medir especies específicas de NfL del CSF en una cohorte de validación de 81 muestras de AD y de control (30 positivas para amiloide, CDR>0; 16 positivas para amiloide, CDR=0; 10 negativas para amiloide, CDR=0; 25 amiloide negativo, CDR=0. **Tabla 2**). Las concentraciones de NfL en el CSF también se cuantificaron utilizando el inmunoensayo Uman NfL estándar de oro para comparación.

[0244] De acuerdo con los resultados secuenciales de IP de la cohorte de descubrimiento (**FIG. 51**), se confirmaron aumentos en las concentraciones de NfL en una cohorte de confirmación de individuos sintomáticos positivos para amiloide (N=30) en comparación con controles sanos negativos para amiloide (N=25). (**FIGURA 52**). Curiosamente, la diferencia entre grupos fue mayor para algunas regiones que para otras, observándose las mayores diferencias en la bobina 2B del dominio de varilla (NfL324; GMNEALEK (SEC ID N.º: 20), aa324-331) y en el extremo C de la cola (NfL530; VEGAGEEQAACK (SEC ID N.º: 29), aa530-540.) NfL324 aumentó 1,5 veces en AD en comparación con el control (P = 0,008, **FIG. 52F**) y NfL530 aumentó 1,7 veces (P = 0,002, **FIG. 52G**).

[0245] El inmunoensayo de NfL aumentó 1,4 veces en AD en comparación con los controles). Tuvo la correlación más fuerte con las concentraciones del péptido NfL324 (R2 = 0,84), lo que sugiere que el inmunoensayo Uman se dirige a fragmentos de NfL del CSF que contienen la región Coil 2B. Es importante destacar que las correlaciones entre el inmunoensayo y otros péptidos investigados fueron menores para NfL101, 117, 165 y 530 (R2 que oscila entre 0,34 y 0,49) y no se encontró correlación con NfL284 (**FIG. 52**).

[0246] Como el NfL es un marcador de neurodegeneración general y no específico de la AD, se planteó la hipótesis de que el NfL aumentaría independientemente de la presencia de placas amiloides en aquellos con demencia clínica y neurodegeneración. La correlación entre CDR-SB (una medida clínica de la gravedad de la demencia) y las especies de NfL se evaluó para

muestras amiloide positivas y amiloide negativas (**FIG. 53**). Mientras que la correlación fue ligeramente mayor para algunas especies de NfL en el grupo amiloide positivo que, la correlación del grupo amiloide negativo (NfL101, NfL117, NfL165 y NfL324) fue mínima o baja para todas las especies de NfL en ambos grupos. La correlación entre NfL530 y CDR-SB no fue significativamente distinta de cero para ninguno de los grupos.

[0247] También se realizó un análisis de correlación de Spearman entre cada uno de los 6 péptidos NfL cuantificados y biomarcadores y medidas clínicas medidas previamente adicionales que incluyen: marcadores generales de demencia clínica (CDR-SB, MMSE), biomarcadores de placas amiloides (PET PiB, CSF A042 /A040) y biomarcadores de tau (tau total en LCR, inmunoensayo de fosfo-tau en LCR y medidas de espectrometría de masas de ocupación de ptau 181, 205 y 217 en CSF); **FIG 54, Tabla 5**. El objetivo de este análisis fue formular hipótesis sobre la biología de las diferentes especies de NfL en la neurodegeneración general en comparación con la neurodegeneración específica de la enfermedad. Las correlaciones más fuertes se observaron entre los péptidos dentro de Coil1A (NfL101 y NfL117,  $r = 0,99$ ) y Coil 1B del dominio de varilla (NfL101 y NfL165,  $r = 0,98$ ; NfL 117 y NfL 165  $r = 0,98$ ). Los péptidos en la bobina 2B del dominio de varilla tienen una correlación similar, pero ligeramente menor, con los péptidos de la bobina 1A (NfL101 y NfL284,  $r = 0,89$ ; NfL 101 y NfL324,  $r = 0,87$ ; NfL117 y NfL284,  $r = 0,90$ ; NfL117 y NfL324,  $r = 0,88$ ). La correlación entre el péptido de la cola C-terminal y la bobina 1A es la más baja entre los péptidos NfL investigados (NfL101 y NfL530,  $r = 0,75$ ; NfL117 y NfL530,  $r = 0,76$ ). Curiosamente, la mayoría de los péptidos c-terminales medidos (NfL324 y NfL530) tienen la correlación más alta entre los biomarcadores de enfermedades y NfL. La correlación moderada entre NfL324 o NfL530 y ptau 181, 205 o 217 oscila entre  $r = 0,45$  y  $0,49$ . La correlación entre los mismos péptidos NfL y tTau es  $r = 0,42$  a  $0,43$ . La correlación con CSF A042/A040 y CSF NfL530 fue menor,  $-0,37$ . (**FIG. 53, Tabla 4**).

**Tabla 5: Tabla de correlación de Spearman**

| <b>var1</b> | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b>  |
|-------------|---------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| Edad        | CDR Global                | 0.07               | 0.5066          | (-0.15, 0.29)  |
| Edad        | CDR Suma de caja          | 0.09               | 0.4324          | (-0.13, 0.3)   |
| Edad        | MMSE                      | -0.19              | 0.0976          | (-0.39, 0.03)  |
| Edad        | PET amiloide (PiB)        | 0.47               | 5.00E-04        | (0.22, 0.66)   |
| Edad        | CSF AB42/AB40 (MS)        | -0.17              | 0.1386          | (-0.37, 0.05)  |
| Edad        | CSF tTau (ELISA)          | 0.19               | 0.1007          | (-0.04, 0.4)   |
| Edad        | CSF pTau181 (ELISA)       | 0.18               | 0.1128          | (-0.04, 0.4)   |
| Edad        | CSF pTau181% (IPMS)       | 0.07               | 0.5519          | (-0.16, 0.28)  |
| Edad        | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.12               | 0.2829          | (-0.1, 0.33)   |
| Edad        | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.22               | 0.0558          | (-0.01, 0.42)  |
| Edad        | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.09               | 0.4359          | (-0.13, 0.3)   |
| Edad        | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.13               | 0.2544          | (-0.09, 0.34)  |
| Edad        | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.2                | 0.0754          | (-0.02, 0.4)   |
| Edad        | NfL ELISA                 | 0.36               | 0.0011          | (0.15, 0.54)   |
| Edad        | NfL101                    | 0.24               | 0.0293          | (0.03, 0.44)   |
| Edad        | NfL117                    | 0.23               | 0.0411          | (0.01, 0.42)   |
| Edad        | NfL165                    | 0.25               | 0.0224          | (0.04, 0.45)   |
| Edad        | NfL284                    | 0.19               | 0.0834          | (-0.03, 0.4)   |
| Edad        | NfL324                    | 0.29               | 0.0091          | (0.07, 0.48)   |
| Edad        | NfL530                    | 0.38               | 4.00E-04        | (0.18, 0.56)   |
| CDR Global  | CDR Suma de caja          | 0.96               | <0.0001         | (0.94, 0.97)   |
| CDR Global  | MMSE                      | -0.56              | <0.0001         | (-0.69, -0.39) |
| CDR Global  | PET amiloide (PiB)        | 0.38               | 0.0064          | (0.11, 0.6)    |
| CDR Global  | CSF AB42/AB40 (MS)        | -0.39              | 3.00E-04        | (-0.56, -0.19) |
| CDR Global  | CSF tTau (ELISA)          | 0.44               | 1.00E-04        | (0.23, 0.6)    |
| CDR Global  | CSF pTau181 (ELISA)       | 0.39               | 5.00E-04        | (0.18, 0.57)   |
| CDR Global  | CSF pTau181% (IPMS)       | 0.43               | 1.00E-04        | (0.23, 0.6)    |
| CDR Global  | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.55               | <0.0001         | (0.38, 0.69)   |
| CDR Global  | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.51               | <0.0001         | (0.33, 0.66)   |
| CDR Global  | CSF pTau181, ng/mL        | 0.4                | 2.00E-04        | (0.2, 0.57)    |

| <b>var1</b>      | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b>  |
|------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
|                  | (IPMS)                    |                    |                 |                |
| CDR Global       | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.5                | <0.0001         | (0.32, 0.65)   |
| CDR Global       | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.47               | <0.0001         | (0.28, 0.63)   |
| CDR Global       | NfL ELISA                 | 0.35               | 0.0018          | (0.14, 0.53)   |
| CDR Global       | NfL101                    | 0.3                | 0.0057          | (0.09, 0.49)   |
| CDR Global       | NfL117                    | 0.31               | 0.0049          | (0.1, 0.49)    |
| CDR Global       | NfL165                    | 0.33               | 0.0026          | (0.12, 0.51)   |
| CDR Global       | NfL284                    | 0.27               | 0.0142          | (0.06, 0.46)   |
| CDR Global       | NfL324                    | 0.36               | 0.0012          | (0.15, 0.53)   |
| CDR Global       | NfL530                    | 0.31               | 0.005           | (0.1, 0.49)    |
| CDR Suma de caja | MMSE                      | -0.55              | <0.0001         | (-0.68, -0.37) |
| CDR Suma de caja | PET amiloide (PiB)        | 0.34               | 0.0147          | (0.07, 0.57)   |
| CDR Suma de caja | CSF AB42/AB40 (MS)        | -0.46              | <0.0001         | (-0.61, -0.27) |
| CDR Suma de caja | CSF tTau (ELISA)          | 0.48               | <0.0001         | (0.29, 0.64)   |
| CDR Suma de caja | CSF pTau181 (ELISA)       | 0.46               | <0.0001         | (0.26, 0.62)   |
| CDR Suma de caja | CSF pTau181% (IPMS)       | 0.48               | <0.0001         | (0.29, 0.63)   |
| CDR Suma de caja | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.57               | <0.0001         | (0.4, 0.71)    |
| CDR Suma de caja | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.55               | <0.0001         | (0.38, 0.69)   |
| CDR Suma de caja | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.43               | 1.00E-04        | (0.23, 0.59)   |
| CDR Suma de caja | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.52               | <0.0001         | (0.35, 0.67)   |
| CDR Suma de caja | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.5                | <0.0001         | (0.32, 0.65)   |
| CDR Suma de caja | NfL ELISA                 | 0.37               | 9.00E-04        | (0.16, 0.54)   |
| CDR Suma de caja | NfL101                    | 0.34               | 0.002           | (0.13, 0.52)   |

| <b>var1</b>        | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b>  |
|--------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| CDR Suma de caja   | NfL117                    | 0.34               | 0.0016          | (0.14, 0.52)   |
| CDR Suma de caja   | NfL165                    | 0.37               | 8.00E-04        | (0.16, 0.54)   |
| CDR Suma de caja   | NfL284                    | 0.3                | 0.0059          | (0.09, 0.49)   |
| CDR Suma de caja   | NfL324                    | 0.38               | 4.00E-04        | (0.18, 0.56)   |
| CDR Suma de caja   | NfL530                    | 0.33               | 0.0025          | (0.12, 0.51)   |
| MMSE               | PET amiloide (PiB)        | -0.43              | 0.0017          | (-0.64, -0.18) |
| MMSE               | CSF AB42/AB40 (MS)        | 0.22               | 0.0459          | (0, 0.42)      |
| MMSE               | CSF tTau (ELISA)          | -0.31              | 0.0071          | (-0.5, -0.09)  |
| MMSE               | CSF pTau181 (ELISA)       | -0.25              | 0.0282          | (-0.45, -0.03) |
| MMSE               | CSF pTau181% (IPMS)       | -0.38              | 5.00E-04        | (-0.56, -0.18) |
| MMSE               | CSF pTau205% (IPMS)       | -0.46              | <0.0001         | (-0.62, -0.27) |
| MMSE               | CSF pTau217% (IPMS)       | -0.46              | <0.0001         | (-0.62, -0.26) |
| MMSE               | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | -0.28              | 0.0102          | (-0.47, -0.07) |
| MMSE               | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | -0.38              | 5.00E-04        | (-0.55, -0.18) |
| MMSE               | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | -0.37              | 6.00E-04        | (-0.55, -0.17) |
| MMSE               | NfL ELISA                 | -0.24              | 0.0332          | (-0.44, -0.02) |
| MMSE               | NfL101                    | -0.1               | 0.3894          | (-0.31, 0.12)  |
| MMSE               | NfL117                    | -0.1               | 0.3956          | (-0.31, 0.13)  |
| MMSE               | NfL165                    | -0.14              | 0.2266          | (-0.34, 0.09)  |
| MMSE               | NfL284                    | -0.03              | 0.8157          | (-0.24, 0.19)  |
| MMSE               | NfL324                    | -0.14              | 0.231           | (-0.34, 0.09)  |
| MMSE               | NfL530                    | -0.06              | 0.5854          | (-0.28, 0.16)  |
| PET amiloide (PiB) | CSF AB42/AB40 (MS)        | -0.63              | <0.0001         | (-0.77, -0.42) |

| <b>var1</b>        | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b>  |
|--------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| PET amiloide (PiB) | CSF tTau (ELISA)          | 0.41               | 0.0035          | (0.14, 0.62)   |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau181 (ELISA)       | 0.38               | 0.0067          | (0.11,0.6)     |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau181% (IPMS)       | 0.61               | <0.0001         | (0.39, 0.76)   |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.61               | <0.0001         | (0.4, 0.76)    |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.77               | <0.0001         | (0.63, 0.87)   |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.41               | 0.0028          | (0.15, 0.62)   |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.54               | <0.0001         | (0.31,0.71)    |
| PET amiloide (PiB) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.72               | <0.0001         | (0.56, 0.83)   |
| PET amiloide (PiB) | NfL ELISA                 | 0.31               | 0.0298          | (0.03, 0.54)   |
| PET amiloide (PiB) | NfL101                    | 0.05               | 0.7195          | (-0.23, 0.33)  |
| PET amiloide (PiB) | NfL117                    | 0.05               | 0.7115          | (-0.23, 0.33)  |
| PET amiloide (PiB) | NfL165                    | 0.08               | 0.5918          | (-0.21,0.35)   |
| PET amiloide (PiB) | NfL284                    | 0.02               | 0.9001          | (-0.26, 0.3)   |
| PET amiloide (PiB) | NfL324                    | 0.22               | 0.1266          | (-0.06, 0.47)  |
| PET amiloide (PiB) | NfL530                    | 0.23               | 0.1017          | (-0.05, 0.48)  |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF tTau (ELISA)          | -0.67              | <0.0001         | (-0.78, -0.53) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF pTau181 (ELISA)       | -0.6               | <0.0001         | (-0.73, -0.43) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF pTau181% (IPMS)       | -0.77              | <0.0001         | (-0.84, -0.66) |
| CSF                | CSF pTau205% (IPMS)       | -0.56              | <0.0001         | (-0.69, -      |

| <b>var1</b>        | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b>  |
|--------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| AB42/AB40 (MS)     |                           |                    |                 | 0.38)          |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF pTau217% (IPMS)       | -0.81              | <0.0001         | (-0.88, -0.72) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | -0.59              | <0.0001         | (-0.71, -0.42) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | -0.6               | <0.0001         | (-0.72, -0.44) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | -0.76              | <0.0001         | (-0.84, -0.65) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL ELISA                 | -0.31              | 0.0054          | (-0.5, -0.1)   |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL101                    | -0.22              | 0.0466          | (-0.42, 0)     |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL117                    | -0.22              | 0.0435          | (-0.42, -0.01) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL165                    | -0.24              | 0.0345          | (-0.43, -0.02) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL284                    | -0.16              | 0.1418          | (-0.37, 0.06)  |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL324                    | -0.3               | 0.0065          | (-0.49, -0.09) |
| CSF AB42/AB40 (MS) | NfL530                    | -0.37              | 6.00E-04        | (-0.55, -0.17) |
| CSF tTau (ELISA)   | CSF pTau181 (ELISA)       | 0.82               | <0.0001         | (0.72, 0.88)   |
| CSF tTau (ELISA)   | CSF pTau181% (IPMS)       | 0.68               | <0.0001         | (0.53, 0.79)   |
| CSF tTau (ELISA)   | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.57               | <0.0001         | (0.39, 0.71)   |
| CSF tTau           | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.7                | <0.0001         | (0.56, 0.8)    |

| <b>var1</b>         | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b> |
|---------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|---------------|
| (ELISA)             |                           |                    |                 |               |
| CSF tTau (ELISA)    | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.77               | <0.0001         | (0.66, 0.85)  |
| CSF tTau (ELISA)    | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.75               | <0.0001         | (0.63, 0.84)  |
| CSF tTau (ELISA)    | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.75               | <0.0001         | (0.64, 0.84)  |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL ELISA                 | 0.48               | <0.0001         | (0.28, 0.64)  |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL101                    | 0.3                | 0.008           | (0.08, 0.5)   |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL117                    | 0.31               | 0.0072          | (0.09, 0.5)   |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL165                    | 0.32               | 0.0045          | (0.11,0.51)   |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL284                    | 0.19               | 0.0995          | (-0.04, 0.4)  |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL324                    | 0.43               | 1.00E-04        | (0.22, 0.6)   |
| CSF tTau (ELISA)    | NfL530                    | 0.42               | 2.00E-04        | (0.21,0.59)   |
| CSF pTau181 (ELISA) | CSF pTau181% (IPMS)       | 0.58               | <0.0001         | (0.4, 0.72)   |
| CSF pTau181 (ELISA) | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.42               | 2.00E-04        | (0.21,0.59)   |
| CSF pTau181 (ELISA) | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.56               | <0.0001         | (0.37, 0.7)   |
| CSF pTau181 (ELISA) | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.68               | <0.0001         | (0.54, 0.79)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.62               | <0.0001         | (0.46, 0.74)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.63               | <0.0001         | (0.47, 0.75)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL ELISA                 | 0.45               | 1.00E-04        | (0.25, 0.62)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL101                    | 0.34               | 0.0025          | (0.13, 0.53)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL117                    | 0.34               | 0.0026          | (0.13, 0.53)  |

| <b>var1</b>         | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b> |
|---------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|---------------|
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL165                    | 0.34               | 0.0025          | (0.13, 0.53)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL284                    | 0.25               | 0.0339          | (0.02, 0.45)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL324                    | 0.4                | 4.00E-04        | (0.19, 0.58)  |
| CSF pTau181 (ELISA) | NfL530                    | 0.4                | 4.00E-04        | (0.19, 0.57)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | CSF pTau205% (IPMS)       | 0.71               | <0.0001         | (0.57, 0.8)   |
| CSF pTau181% (IPMS) | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.91               | <0.0001         | (0.87, 0.94)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.8                | <0.0001         | (0.7, 0.87)   |
| CSF pTau181% (IPMS) | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.79               | <0.0001         | (0.69, 0.86)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.88               | <0.0001         | (0.82, 0.92)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL ELISA                 | 0.29               | 0.0106          | (0.07, 0.48)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL101                    | 0.16               | 0.1579          | (-0.06, 0.37) |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL117                    | 0.17               | 0.1345          | (-0.05, 0.38) |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL165                    | 0.17               | 0.1274          | (-0.05, 0.38) |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL284                    | 0.09               | 0.4451          | (-0.14, 0.3)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL324                    | 0.25               | 0.0276          | (0.03, 0.45)  |
| CSF pTau181% (IPMS) | NfL530                    | 0.33               | 0.0029          | (0.12, 0.51)  |
| CSF pTau205% (IPMS) | CSF pTau217% (IPMS)       | 0.78               | <0.0001         | (0.68, 0.86)  |
| CSF pTau205% (IPMS) | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.55               | <0.0001         | (0.38, 0.69)  |
| CSF pTau205% (IPMS) | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.85               | <0.0001         | (0.78, 0.9)   |
| CSF pTau205% (IPMS) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.7                | <0.0001         | (0.57, 0.8)   |

| <b>var1</b>               | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b> |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|---------------|
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL ELISA                 | 0.37               | 9.00E-04        | (0.16, 0.55)  |
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL101                    | 0.22               | 0.0498          | (0, 0.42)     |
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL117                    | 0.23               | 0.0402          | (0.01,0.43)   |
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL165                    | 0.26               | 0.0223          | (0.04, 0.45)  |
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL284                    | 0.15               | 0.1792          | (-0.07, 0.36) |
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL324                    | 0.33               | 0.0033          | (0.11,0.51)   |
| CSF pTau205% (IPMS)       | NfL530                    | 0.34               | 0.0024          | (0.12, 0.52)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | 0.75               | <0.0001         | (0.63, 0.83)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.82               | <0.0001         | (0.73, 0.88)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.94               | <0.0001         | (0.91,0.96)   |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL ELISA                 | 0.41               | 2.00E-04        | (0.2, 0.58)   |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL101                    | 0.26               | 0.0197          | (0.04, 0.46)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL117                    | 0.27               | 0.0144          | (0.06, 0.47)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL165                    | 0.29               | 0.0104          | (0.07, 0.48)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL284                    | 0.18               | 0.1131          | (-0.04, 0.39) |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL324                    | 0.38               | 6.00E-04        | (0.17, 0.55)  |
| CSF pTau217% (IPMS)       | NfL530                    | 0.44               | <0.0001         | (0.25, 0.61)  |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | 0.89               | <0.0001         | (0.83, 0.92)  |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.91               | <0.0001         | (0.86, 0.94)  |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL ELISA                 | 0.53               | <0.0001         | (0.35, 0.67)  |

| <b>var1</b>               | <b>var2</b>               | <b>Correlación</b> | <b>valor p.</b> | <b>95% CI</b> |
|---------------------------|---------------------------|--------------------|-----------------|---------------|
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL101                    | 0.29               | 0.0076          | (0.08, 0.48)  |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL117                    | 0.3                | 0.0063          | (0.09, 0.49)  |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL165                    | 0.32               | 0.0036          | (0.11,0.5)    |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL284                    | 0.16               | 0.1446          | (-0.06, 0.37) |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL324                    | 0.45               | <0.0001         | (0.26, 0.61)  |
| CSF pTau181, ng/mL (IPMS) | NfL530                    | 0.48               | <0.0001         | (0.3, 0.63)   |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | 0.9                | <0.0001         | (0.85, 0.93)  |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL ELISA                 | 0.53               | <0.0001         | (0.36, 0.68)  |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL101                    | 0.32               | 0.004           | (0.1, 0.5)    |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL117                    | 0.32               | 0.0033          | (0.11,0.51)   |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL165                    | 0.35               | 0.0016          | (0.14, 0.52)  |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL284                    | 0.19               | 0.0907          | (-0.03, 0.39) |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL324                    | 0.47               | <0.0001         | (0.28, 0.63)  |
| CSF pTau205, ng/mL (IPMS) | NfL530                    | 0.47               | <0.0001         | (0.28, 0.62)  |
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL ELISA                 | 0.51               | <0.0001         | (0.33, 0.66)  |
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL101                    | 0.3                | 0.0061          | (0.09, 0.49)  |
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL117                    | 0.31               | 0.0046          | (0.1, 0.5)    |
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL165                    | 0.32               | 0.0031          | (0.11,0.51)   |
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL284                    | 0.18               | 0.1179          | (-0.04, 0.38) |
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL324                    | 0.47               | <0.0001         | (0.27, 0.62)  |

| var1                      | var2   | Correlación | valor p. | 95% CI       |
|---------------------------|--------|-------------|----------|--------------|
| CSF pTau217, ng/mL (IPMS) | NfL530 | 0.49        | <0.0001  | (0.31,0.64)  |
| NfL ELISA                 | NfL101 | 0.67        | <0.0001  | (0.53, 0.78) |
| NfL ELISA                 | NfL117 | 0.7         | <0.0001  | (0.56, 0.8)  |
| NfL ELISA                 | NfL165 | 0.72        | <0.0001  | (0.6, 0.81)  |
| NfL ELISA                 | NfL284 | 0.56        | <0.0001  | (0.38, 0.69) |
| NfL ELISA                 | NfL324 | 0.88        | <0.0001  | (0.81,0.92)  |
| NfL ELISA                 | NfL530 | 0.72        | <0.0001  | (0.59, 0.81) |
| NfL101                    | NfL117 | 0.99        | <0.0001  | (0.99, 1)    |
| NfL101                    | NfL165 | 0.98        | <0.0001  | (0.97, 0.99) |
| NfL101                    | NfL284 | 0.89        | <0.0001  | (0.84, 0.93) |
| NfL101                    | NfL324 | 0.87        | <0.0001  | (0.8, 0.91)  |
| NfL101                    | NfL530 | 0.75        | <0.0001  | (0.64, 0.83) |
| NfL117                    | NfL165 | 0.98        | <0.0001  | (0.97, 0.99) |
| NfL117                    | NfL284 | 0.9         | <0.0001  | (0.84, 0.93) |
| NfL117                    | NfL324 | 0.88        | <0.0001  | (0.82, 0.92) |
| NfL117                    | NfL530 | 0.76        | <0.0001  | (0.65, 0.84) |
| NfL165                    | NfL284 | 0.86        | <0.0001  | (0.79, 0.91) |
| NfL165                    | NfL324 | 0.88        | <0.0001  | (0.82, 0.92) |
| NfL165                    | NfL530 | 0.81        | <0.0001  | (0.71,0.87)  |
| NfL284                    | NfL324 | 0.71        | <0.0001  | (0.58, 0.8)  |
| NfL284                    | NfL530 | 0.67        | <0.0001  | (0.53, 0.77) |
| NfL324                    | NfL530 | 0.75        | <0.0001  | (0.63, 0.83) |

[0248] El presente ejemplo establece que hay al menos 3 especies principales de NfL truncadas en el CSF, y éstas aumentan en diversos grados en la AD. Además, el NfL cerebral es de longitud completa, con un fragmento c-terminal recientemente identificado. Las principales especies de CSF NfL tienen diferentes relaciones entre sí y con otras medidas de AD. Esto indicaría que las especies truncadas de NfL podrían secretarse de manera diferencial con respecto a la biología y la neurodegeneración de NfL y algunas de ellas podrían ser más relevantes como biomarcadores que otras. El nivel de péptidos NfL del dominio NfL Coil 1 se correlacionó entre sí y se comportó de manera ligeramente diferente

a los péptidos medidos en Coil 2 y C- regiones ter. Se encontró un aumento significativo de los péptidos NfL 324 y 530 en el CSF sintomático de la AD que respalda que estos dominios podrían ser más relevantes como biomarcadores. La mayor correlación observada entre NfL324 y el inmunoensayo NfL, combinada con el aumento similar entre AD y los controles para NfL325 (1,5x) y el ensayo ELISA (1,4x), sugeriría que los anticuerpos utilizados por este ensayo patentado por Uman probablemente fueron seleccionados para atacar estos de mejor rendimiento. Isoformas de NfL. Hubo correlaciones modestas con la CDR, la edad y la tau fosforilada y total, mientras que las medidas de PET amiloide y MMSE tuvieron correlaciones bajas.

### **Ejemplo 8**

[0249] En este ejemplo, se analizaron isoformas de NfL de muestras de CSF obtenidas de sujetos humanos de control, ALS y SMA. Se analizaron muestras de CSF de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica esporádica (ALS, n = 12), ALS familiar (n = 6), atrofia muscular espinal (SMA, n = 10) y controles neurológicos normales para detectar diferencias entre especies de NfL utilizando los mismos métodos. descrito. Brevemente, se agregaron 0,5 ng de estándar interno NfL 15N13C a 0,5 ml de CSF antes de la inmunoprecipitación con una mezcla 1:1:1 de anticuerpos HJ30.13, HJ30.4 y HJ30.11. Las muestras procesadas se analizaron mediante LC-MS/MS para cuantificar la cantidad de especies de NfL en cada región que se muestra en las figuras 57-63. Estos hallazgos revelaron aumentos en los casos sintomáticos de ALS esporádica y familiar más que en los casos asintomáticos, SMA o controles. La cantidad de aumento en las especies NfL estuvo altamente correlacionada con la tasa de disminución medida por la escala ALS FRS medida en disminución por mes. El perfil de ALS de las especies NfL mostró cantidades aumentadas desde la posición de aminoácido 37 a 352, y luego otro aumento de 437 a 539 (el péptido c-terminal). Sin embargo, el perfil fue diferente para los controles con cantidades de péptido c-terminal menos pronunciadas y otras regiones. Finalmente, el perfil SMA mostró muy poca región de dominio medio, mientras que la región de 339-461 339-461 aumentó relativamente. Esto indica que puede haber perfiles específicos

para cada estado de enfermedad que pueden cuantificarse y utilizarse para el diagnóstico diferencial.