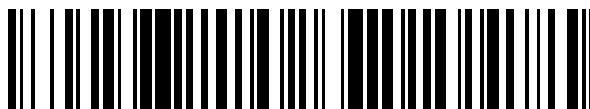


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 769**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2017** **PCT/KR2017/002858**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017** **WO17160104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2017** **E 17767005 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023** **EP 3431999**

54 Título: **Procedimiento de detección de agregados de polipéptido formador de agregados**

30 Prioridad:

16.03.2016 KR 20160031534

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

27.12.2023

73 Titular/es:

PEOPLEBIO, INC. (100.0%)
242 Pangyo-ro, 6fl, PDC C-dong, Bundang-gu
Seongnam-si 13487, KR

72 Inventor/es:

LEE, BYOUNG SUB;
LEE, KWAN SOO;
KIM, SHIN WON;
LIM, KUN TAEK;
KIM, GWANG JE y
YU, JI SUN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 956 769 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de agregados de polipéptido formador de agregados

Ámbito técnico

5 La presente solicitud de patente reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente coreana nº 10- 2016- 0031534 presentada en la Oficina Coreana de Propiedad Intelectual el 16 de marzo de 2016,

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra.

Técnica antecedente

10 En primer lugar, en algunos casos, los polipéptidos que constituyen las proteínas fabrican proteínas funcionales formando multímeros. Sin embargo, cuando los polipéptidos presentes como monómeros en estado normal forman multímeros, se agregan de forma anormal (por ejemplo, convirtiéndose en una forma mal plegada) y causan enfermedades (Massimo Stefani, et al., *J. Mol. Med.* 81:678- 699(2003); y Radford SE, et al., *Cell.* 97:291- 298 (1999)).

15 Por ejemplo, las enfermedades o trastornos asociados con la agregación anormal o el mal plegamiento de proteínas incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, las encefalopatías espongiformes, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la deficiencia de Serpina, enfisema, cirrosis, diabetes de tipo II, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, demencias frontotemporales, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar, angiopatía amiloide cerebral hereditaria y amiloidosis relacionada con la hemodiálisis.

20 Para medir la presencia o ausencia o la evolución de dichas enfermedades o trastornos, cuando tal medición es difícil ya que la cantidad del antígeno es muy pequeña en la muestra o el tamaño del antígeno es muy pequeño, o cuando la cantidad del antígeno en el cuerpo no es proporcional a la cantidad del antígeno en la muestra, por ejemplo, (aunque el nivel de A β (amiloide-beta), que está implicado en la enfermedad de Alzheimer, se sabe que es más alto en una persona anormal que en una persona normal) , cuando la cantidad del oligómero A β en una muestra de sangre es difícil de detectar o el oligómero A β sale de forma atípica en la muestra de sangre, el diagnóstico puede ser difícil.

25 Además, el antígeno que debe medirse es demasiado pequeño en tamaño o demasiado pequeño en cantidad, por lo que el diagnóstico de enfermedades a menudo no es fácil mediante ELISA sándwich.

En consecuencia, los presentes inventores reconocieron la necesidad de desarrollar un procedimiento para detectar una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, el procedimiento maximiza la diferencia en la señal de diagnóstico entre un paciente y un sujeto normal.

30 A lo largo de toda la memoria descriptiva, se hace referencia a numerosos artículos y documentos de patentes, y se representan sus citas.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

35 Bajo los antecedentes anteriores, los presentes inventores han llevado a cabo una extensa investigación para desarrollar un novedoso procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, y como resultado los presentes inventores han desarrollado un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, el procedimiento maximiza una diferencia en la señal de diagnóstico entre un paciente y un sujeto normal utilizando una diferencia en el sistema de aclaramiento que suprime la formación de una forma agregada de un polipéptido.

40 Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra.

También se describe, sin formar parte de la invención, un kit para detectar una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra.

45 Otros propósitos y ventajas de la presente divulgación se harán más evidentes con la siguiente descripción detallada de la invención, reivindicaciones y dibujos.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una 25 biomuestra, incluyendo el procedimiento las etapas de: (a) enriquecer una forma dimérica del polipéptido formador de agregados con una bio-muestra a analizar; (b) formar adicionalmente una forma agregada del polipéptido formador de agregados incubando un producto de la etapa (a);

50

30 c) poner en contacto el producto de la etapa b) con una etiqueta aglutinante en la que una etiqueta de generación de señal se conjuga con un aglutinante que se une a la forma agregada del polipéptido formador de agregados; y d) detectar un señal generada a partir de la etiqueta aglutinante, que está ligada al polipéptido formador de agregados en la que la incubación en la etapa (b) se lleva a cabo durante un tiempo de incubación suficiente para la multimerización de la forma dimérica enriquecida del polipéptido formador de agregados por la biomuestra.

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, el procedimiento maximiza la diferencia en la señal de diagnóstico entre un paciente y un sujeto normal utilizando una diferencia en el sistema de aclaramiento que suprime la formación de una forma agregada de un polipéptido.

Como se utiliza aquí, el término "polipéptido formador de agregados" se refiere a un polipéptido capaz de formar una forma multimérica (forma oligomérica) o de formar una forma agregada mediante interacción hidrofóbica con monómeros. En concreto, los cambios estructurales mencionados causan diversas enfermedades. Ejemplos de ello son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, las encefalopatías espongiformes, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la deficiencia de Serpina, el enfisema, la cirrosis, la diabetes de tipo II, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, demencias frontotemporales, amiloidosis sistémica senil, polineuropatía amiloide familiar, angiopatía amiloide cerebral hereditaria y amiloidosis relacionada con la hemodiálisis.

Generalmente, una forma no agregada del polipéptido formador de agregados es normal, pero una forma agregada del mismo causa, especialmente, una enfermedad neurodegenerativa, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o la enfermedad de Parkinson.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la biosamuestra para realizar la multimerización de la forma dimérica enriquecida del polipéptido formador de agregados es una biomuestra de un ser humano que padece una enfermedad asociada a la forma multimérica del polipéptido formador de agregados. Más preferiblemente, el tiempo de incubación suficiente para realizar la multimerización por la bio-muestra se refiere a un tiempo suficiente para aumentar una señal generada usando la bio-muestra del ser humano que tiene una enfermedad asociada con la forma multimérica del polipéptido formador de agregados para que sea 1,3-20 veces mayor que una señal generada usando una bio-muestra de un ser humano normal.

En lo sucesivo, se describirá detalladamente paso a paso el procedimiento de la presente invención para detectar una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una bio-muestra.

(a) Etapas de realización del enriquecimiento

En primer lugar, el procedimiento de la presente invención incluye una etapa de enriquecimiento de una forma dimérica del polipéptido formador de agregados con una biomuestra que se va a analizar.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "biosamuestra" se refiere a una muestra originada en un organismo que se va a analizar. La biosamuestra se refiere a cualquier célula, tejido o biofluido de una fuente biológica, o cualquier otro medio que pueda analizarse según la presente invención, y la biosmuestra incluye una muestra recogida de un ser humano, una muestra recogida de un animal y una muestra recogida de un alimento para un ser humano o un animal. Preferiblemente, la biomuestra que se va a analizar es una muestra de fluido corporal que incluye sangre, suero, plasma, linfa, leche, orina, heces, fluido ocular, saliva, semen, extractos cerebrales (por ejemplo, homogenizados cerebrales), fluido de médula espinal (SCF), apéndice, bazo y extractos de tejido amigdalario.

Más preferiblemente, la bio-muestra es sangre, más preferiblemente plasma.

Según otra realización de la presente invención, el polipéptido formador de agregados incluye el péptido A β y la proteína tau implicados en la enfermedad de Alzheimer, el prión implicado en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la enfermedad cerebral de la espuma de esponja, la α -sinucleína implicada en la enfermedad de Parkinson, la cadena ligera Ig implicada en la amiloidosis sistémica primaria, el amiloide sérico A implicado en la amiloidosis sistémica secundaria, la proteína tau implicada en las demencias frontotemporales, transtiretina implicada en la amiloidosis sistémica senil, transtiretina implicada en la neuropatía amiloide múltiple familiar, cistatina C implicada en la angiopatía amiloide cerebral hereditaria, β 2- microglobulina implicada en la amiloidosis relacionada con la hemodiálisis, La huntingtina en la enfermedad de Huntington, la superóxido dismutasa en la esclerosis lateral amiotrófica, la serpina en la deficiencia de serpina, el enfisema pulmonar y la cirrosis, y la amilina en la diabetes de tipo II. Más preferiblemente, el polipéptido formador de agregados es el péptido A β o la proteína tau implicada en la enfermedad de Alzheimer, o la α -sinucleína implicada en la enfermedad de Parkinson, más preferiblemente, el péptido A β .

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "enriquecimiento" se refiere a la adición de una forma dimérica de un polipéptido formador de agregados a una biomuestra que se va a analizar o a una mezcla posterior a la adición de la misma.

Tal y como se utiliza aquí, el término "multímero" también incluye un oligómero.

Tal como se utiliza aquí, el término "dímero" se refiere a uno formado por la combinación de dos monómeros.

De acuerdo con la presente invención, en caso de que una forma dimérica del polipéptido formador de agregados se enriquezca con una bio-muestra a analizar, la diferencia en la señal diagnóstica entre un paciente y sujeto normal se pretende maximizar utilizando una diferencia en el sistema de aclaramiento que suprime la formación de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, es decir, una bio-muestra del paciente tiene un grado bajo del sistema de aclaramiento, promoviendo la formación de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, pero una bio-muestra de un sujeto normal tiene un grado alto del sistema de aclaramiento, reduciendo la formación de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados, maximizando así la diferencia en la señal de diagnóstico.

Según otra realización de la presente invención, la forma dimérica del polipéptido formador de agregados se forma por enlace disulfuro de dos péptidos A β compuestos cada uno de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que es una forma monomérica del polipéptido formador de agregados, mediante los residuos Cys26 de los péptidos A β compuestos cada uno de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Según otra realización de la presente invención, se añade adicionalmente un tampón al producto en la etapa (a). Más preferiblemente, el tampón se añade en una cantidad de 3-15 veces (v/v) a una biomuestra, aún más preferiblemente, de 5-13 veces (v/v), aún más preferiblemente, de 7-11 veces (v/v), y aún más preferiblemente de 8-10 veces (v/v).

Para el tampón utilizado en la presente invención, se pueden utilizar varios tampones conocidos en la técnica, pero preferiblemente, el tampón es un tampón de fosfato con tensioactivos no iónicos.

Para el tensioactivo no iónico contenido en el tampón fosfato usado en la presente invención, pueden usarse diversos tensioactivos no iónicos conocidos en la técnica, y preferiblemente el tensioactivo no iónico incluye éteres alquílicos alcoxilados, ésteres alquílicos alcoxilados, poliglicósidos alquílicos, ésteres poliglicerílicos, polisorbatos y ésteres de azúcar. Más preferiblemente, se utiliza Tween-20 o Triton X-100 y, preferentemente, se utiliza Tween-20.

(b) Etapas de formación adicional de la forma agregada del polipéptido formador de agregados

A continuación, el procedimiento de la presente invención incluye (b) la etapa de formar adicionalmente una forma agregada del polipéptido formador de agregados incubando el producto de la etapa (a).

Una de las características de la presente invención es que en los casos en que una medición es difícil de hacer debido a una cantidad muy pequeña de una forma agregada de polipéptido formador de agregados (antígeno), que se va a medir, en una muestra o un tamaño muy pequeño de una forma agregada de polipéptido formador de agregados o cuando la cantidad de una forma agregada de polipéptido formador de agregados (antígeno) en el organismo no es proporcional a la cantidad de una forma agregada de polipéptido formador de agregados (antígeno) en la muestra, la presencia o ausencia o el progreso de enfermedades o trastornos puede medirse añadiendo la forma dimérica del polipéptido formador de agregados a la biomuestra para formar adicionalmente una forma agregada del polipéptido formador de agregados.

Según otra realización de la presente invención, la formación adicional de la forma agregada del polipéptido formador de agregados en la etapa (b) se lleva a cabo incubando el producto en la etapa (a) a una temperatura de 1-50°C, más preferiblemente 35-50°C, aún más preferiblemente 35-45°C, aún más preferiblemente 35-40°C.

En la presente invención, la incubación en la etapa (b) se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para la multimerización de la forma dimérica del polipéptido formador de agregados por la biomuestra. Más preferentemente, el tiempo de incubación suficiente para la multimerización por la biomuestra es un tiempo suficiente para potenciar una señal generada utilizando la biomuestra del ser humano que padece una enfermedad asociada a la forma multimérica del polipéptido formador de agregados sea de 1,3 a 20 veces mayor que la señal generada utilizando una biomuestra de un ser humano normal.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, la formación adicional de la forma agregada del polipéptido formador de agregados en la etapa (b), con el fin de llevar a cabo durante un tiempo suficiente para mejorar una señal generada usando la biosamuestra de un ser humano para ser 1,3-20 veces mayor que una señal generada utilizando una bio-muestra de un ser humano normal, se lleva a cabo incubando el producto en la etapa (a) de 1 a 12 días, preferiblemente de 1 a 10 días, más preferiblemente de 1 a 8 días, aún más preferiblemente de 1 a 6 días, aún más preferiblemente de 1 a 6 días, aún más preferiblemente de 2 a 6 días, y lo más preferiblemente de 2 a 5 días.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "incubación" se refiere a dejar en reposo (mantener en reposo) o agitar una biomuestra que se va a analizar a una temperatura predeterminada durante un periodo de tiempo predeterminado, y la agitación es, preferiblemente, una agitación suave.

Otra de las grandes características de la presente invención es que se deja reposar (es decir, incubar) una bio-muestra a una temperatura predeterminada durante un periodo de tiempo predeterminado, de modo que una forma dimérica del polipéptido formador de agregados y del polipéptido formador de agregados, que existen en la bio-muestra, se agregan bien juntos, maximizando así la diferencia en la señal de diagnóstico entre un paciente y un sujeto normal.

(c) Etapas de puesta en contacto, con el producto de la etapa b), de la etiqueta aglutinante que se une a la forma agregada del polipéptido formador de agregados

A continuación, el procedimiento de la presente invención incluye la etapa (c) de poner en contacto, con una producción de la etapa (b), una etiqueta aglutinante en la que una etiqueta generadora de señal se conjuga con un aglutinante que se une a la forma agregada del polipéptido formador de agregados.

En la presente invención, el aglutinante que se une a la forma agregada del polipéptido formador de agregados incluye un anticuerpo, un aptámero peptídico, una adnectina, un aficuerpo (USP nº 5.831.012), un avímero (Silverman, J. et al, *Nature Biotechnology* 23 (12): 1556 (2005)) o un dominio Kunitz (Arnoux B et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (Pt 7) : 12524(2002), y Nixon, AE, *Current opinion in drug discovery & development* 9 (2) :2618 (2006)).

En la presente invención, la etiqueta de generación de señal, que se conjuga con el aglutinante que se une a la forma agregada del polipéptido formador de agregados, incluye una etiqueta compuesta (por ejemplo, biotina), una etiqueta enzimática (por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa y β -glucosidasa), una etiqueta radiactiva (por ejemplo, ^{125}I y C^{14}), una etiqueta fluorescente (por ejemplo, fluoresceína), una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente y una etiqueta de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), pero sin limitarse a ellas.

(d) Etapas de detección de la señal generada por la etiqueta aglutinante unida a la forma agregada del polipéptido formador de agregados

Por último, el procedimiento de la presente invención incluye la etapa (d) de detectar una señal generada a partir de la etiqueta aglutinante unida a la forma agregada del polipéptido formador de agregados.

La detección de la señal generada a partir de la etiqueta aglutinante unida a la forma agregada del polipéptido formador de agregados puede llevarse a cabo mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica y, por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento de inmunoensayo asociado a una respuesta antígeno-anticuerpo.

Según otra realización de la presente invención, las etapas (c) y (d) se realizan mediante un procedimiento que incluye las siguientes etapas: (c-1) poner en contacto el producto de la etapa (b) con un anticuerpo de captura que reconozca un epítipo en el polipéptido formador de agregados que captura la forma agregada; (c-2) poner en contacto la forma agregada capturada con un anticuerpo de detección que reconozca un epítipo en el polipéptido formador de agregados; y (c-3) detectar un complejo anticuerpo de detección-forma agregada.

Dicho procedimiento de detección emplea dos tipos de anticuerpos, a saber, un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección. Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo de captura" se refiere a un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido formador de agregados para ser detectado en una biomuestra. El término "anticuerpo de detección" se refiere a un anticuerpo que puede unirse a un polipéptido formador de agregados capturado por el anticuerpo de captura. El término "anticuerpo" se refiere a una proteína inmunoglobulina que puede unirse a un antígeno. El anticuerpo utilizado en el presente documento incluye fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, F(ab')_2 , Fab' , Fab , Fv), así como un anticuerpo completo que puede unirse a un epítipo, un antígeno o un fragmento de antígeno.

El procedimiento de detección emplea un conjunto de un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, que reconocen específicamente epítopos en un polipéptido formador de agregados, y los epítopos reconocidos específicamente por el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son idénticos o se solapan entre sí.

Como se utiliza aquí para citar los epítopos con respecto a al anticuerpo de captura y al anticuerpo de detección, el término "solapado con" engloba epítopos que tienen secuencias de aminoácidos total o parcialmente solapadas. Por ejemplo, los epítopos de los anticuerpos 6E10, FF51 y WO2 tienen las secuencias de aminoácidos que incluyen los aminoácidos 3-8, 1-4 y 4-10, respectivamente, de la secuencia peptídica A β humana. Tales epítopos pueden explicarse como epítopos completamente solapados.

Según otra realización de la presente invención, los epítopos, cuando se expresan para recitar la secuencia peptídica A β humana, tienen la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 3-8, 1-4, o 4-10.

Según otra realización de la presente invención, el epítipo reconocido por el anticuerpo de captura tiene una secuencia que no se repite en el polipéptido formador de agregados, y el epítipo reconocido por el anticuerpo de detección tiene una secuencia que no se repite en el polipéptido formador de agregados. Según el procedimiento de detección de la presente invención, el polipéptido formador de agregados unido al anticuerpo de captura ya no puede unirse al anticuerpo de detección, y la razón es que no hay epítipo adicional reconocido por el anticuerpo de detección.

Según otra realización de la presente invención, el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección son idénticos entre sí. Es decir, los epítopos, unidos específicamente al anticuerpo de captura y al anticuerpo de detección, son preferiblemente idénticos entre sí.

Según otra realización de la presente invención, el anticuerpo de captura se une a un sustrato sólido. Dicho material

conocido incluye poliestireno, polipropileno, vidrio, metal y un polímero de hidrocarburo, como un gel. El sustrato sólido puede estar presente en forma de tira reactiva, placa de microtitulación, partícula (por ejemplo, perla), columna de afinidad y membrana de inmunotransferencia (por ejemplo, membrana de fluoruro de polivinilideno) (véase USP 5.143.825, 5.374.530, 4.908.305 y 5.498.551).

- 5 Según otra realización de la presente invención, el anticuerpo de detección tiene una etiqueta que genera una señal detectable. La etiqueta incluye una etiqueta compuesta (p. ej., biotina), una etiqueta enzimática (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa, β -galactosidasa, y β -glucosidasa), una etiqueta radiactiva (por ejemplo, ^{125}I y ^{14}C), una etiqueta fluorescente (por ejemplo, fluoresceína), una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente y una etiqueta de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), pero sin limitarse a ellas. Distintas etiquetas y procedimientos de etiquetado de anticuerpos son conocidos en la técnica (Harlow y Lane, eds. *Anticuerpos: A Laboratory Manual* (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

En la presente invención, los anticuerpos que pueden unir un polipéptido formador de agregados pueden prepararse utilizando epítomos descritos previamente como inmunógenos de acuerdo con el estado de la técnica, como un procedimiento de fusión (Kohler y Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), un procedimiento de ADN recombinante (USP 4.816.567), o un procedimiento de biblioteca de anticuerpos de fagos (Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) y Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991)). Los procedimientos generales para preparar los anticuerpos se describen en Harlow, E. y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1988; Zola, H., *Anticuerpos monoclonales: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida, 1984; y Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991.

- 20 La preparación de líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales se lleva a cabo mediante la fusión de una línea celular inmortal y linfocitos productores de anticuerpos. La preparación de anticuerpos monoclonales puede realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos policlonales pueden prepararse inyectando el antígeno anterior en un animal adecuado, recogiendo antisuero que contenga un anticuerpo y, a continuación, aislando el anticuerpo mediante un procedimiento para aislar un anticuerpo a través de una técnica de afinidad conocida.

La detección del complejo anticuerpo-forma agregada puede realizarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. La formación del complejo anticuerpo forma agregada-detección muestra la presencia de la forma agregada en la biomuestra. La etapa anterior puede realizarse cuantitativa o cualitativamente utilizando varios pares detectables de etiqueta/sustrato divulgados en, por ejemplo, *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980 y Harlow and Lane, eds. *Anticuerpos: A Laboratory Manual*(1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., por los procedimientos convencionales.

En los casos en que el anticuerpo de detección esté marcado con fosfatasa alcalina, puede utilizarse bromocloroindolilfosfato (BCIP), azul de nitro-tetrazolio (NBT) o ECF como sustrato para una reacción de revelado del color; en los casos en que el anticuerpo de detección esté marcado con peroxidasa de rábano picante, cloronaftol, aminoetil carbazol, diaminobencidina, D-luciferina, lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridinio), éter bencílico de resorufina, luminol, reactivo Amplex Red (10-acetil-3,7- dihidroxifenoxazina) , TMB (3,3,5,5-tetrametilbencidina) , quimioluminiscencia mejorada (ECL), o ABTS (2,2-azina-di[3-etilbentiazolina sulfonato]) pueden utilizarse como sustrato.

- 40 A través de tales procedimientos, la señal generada utilizando una biosamuestra de un ser humano que tiene una enfermedad asociada con una forma multimérica de un polipéptido formador de agregados puede aumentar en comparación con la señal generada utilizando una biomuestra de un ser humano normal entre 1,3 y 20 veces, preferiblemente entre 1,5 y 10 veces, y más preferiblemente entre 1,6 y 10 veces.

También se describe, pero no forma parte de la invención un kit para detectar una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra que contiene una forma dimérica de un polipéptido formador de agregados.

- 45 El kit descrito utiliza el procedimiento anterior para detectar una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra de la presente invención, por lo que se omitirá la descripción de los contenidos que se solapan entre sí para evitar una complejidad excesiva de la memoria descriptiva debido a descripciones repetitivas de la misma.

Dicho kit puede comprender además un anticuerpo de captura que reconozca un epítipo en el polipéptido formador de agregados; y un anticuerpo de detección que reconozca el epítipo reconocido por el anticuerpo de captura.

Efectos ventajosos

Las características y ventajas de la presente invención se resumen a continuación.

- (a) La presente invención proporciona un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra.
- 55 (b) En el procedimiento de la presente invención, en los casos en que una medición es difícil de realizar debido a

una cantidad muy pequeña de una forma agregada de polipéptido formador de agregados (antígeno), que se va a medir, en una muestra o un tamaño muy pequeño de una forma agregada de polipéptido formador de agregados o cuando la cantidad de una forma agregada de polipéptido formador de agregados (antígeno) en el organismo no es proporcional a la cantidad de una forma agregada de polipéptido formador de agregados (antígeno) en la muestra, la diferencia en la señal de diagnóstico entre un paciente y un sujeto normal se maximiza utilizando la diferencia en el sistema de aclaramiento que suprime la formación de una forma agregada de un polipéptido.

(c) La presente invención puede llevarse a cabo de forma cómoda y rápida, y puede automatizar un procedimiento de detección de una forma agregada de un polipéptido formador de agregados en una biomuestra.

Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1 y 2 muestran los resultados de detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) (conjunto 6E10/FF51HRP) a partir de muestras incubadas durante 3 y 4 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) según los ejemplos de la presente invención.

La Fig. 3 muestra los resultados de detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) (conjunto 6E10/FF51HRP) de muestras incubadas durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) según un ejemplo de la presente invención.

La Fig. 4 muestra los resultados de detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) (conjunto 6E10/FF51HRP) a partir de muestras incubadas durante 0 y 5 días después del tratamiento con o sin 0,25 ng de dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) según un ejemplo de la presente invención.

Las FIG. 5 y 6 muestran los resultados de detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) (conjunto 6E10/WO2HRP) a partir de muestras incubadas durante 1 y 2 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) según los ejemplos de la presente invención.

La FIG. 7 muestra los resultados de detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) (conjunto 6E10/WO2HRP) a partir de muestras incubadas durante 1, 2, 3 y 4 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) según un ejemplo de la presente invención.

Modo de realización de la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos. Estos ejemplos son sólo para ilustrar la presente invención más específicamente, y será evidente para los expertos en la materia que el ámbito de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales

Se adquirió a Sigma un tampón de recubrimiento (tampón carbonato-bicarbonato), PBST, TBST y PBS. Block Ace se adquirió en Bio-rad. El tampón A se preparó diluyendo Block Ace al 0,4% en TBST. Se preparó un tampón de bloqueo diluyendo Block Ace al 1% hasta el 0,4% en TBST. El HBR1 se adquirió en Scantibodies Laboratory. El anticuerpo 6E10 se adquirió a Biolegend. El anticuerpo WO2-HRP se adquirió a Absolute Antibody. El FF51-HRP se adquirió en el laboratorio H. El anticuerpo WO2-HRP se adquirió a Absolute Antibody. La A β 1-42 recombinante se adquirió a Biolegend. El dímero recombinante de S26C-beta-amiloide (1-40) se adquirió a JPT. Las muestras de plasma se obtuvieron del Hospital Bundang de la Universidad Nacional de Seúl y del Hospital Universitario Chungang. La solución ECL se adquirió en Rockland. Las placas se adquirieron en Nunc. Los epítomos de los anticuerpos 6E10, FF51 y WO2 tienen las secuencias de aminoácidos que incluyen los aminoácidos 3-8, 1-4 y 4-10, respectivamente, de la secuencia peptídica humana A β . La secuencia del dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) es DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGCNKGAIIGLMVGGVV, y tiene una forma dimérica a partir de un enlace disulfuro de los residuos de cisteína 26 de los monómeros respectivos.

Ejemplo 2: Preparación de la placa 6E10

Después de diluir 30 μ g de anticuerpo 6E10 (proteína anti-A β , Biolegend) en 10 ml de un tampón de recubrimiento (Sigma), se dispensaron 100 μ l en cada pocillo de una placa (Nunc), seguido de una reacción en nevera a 4°C durante un día. La placa se lavó tres veces con PBS, y se dispensaron 240 μ l de un tampón de bloqueo en el que se disolvió 1% de Block Ace en D.W., seguido de una reacción a temperatura ambiente durante 2 horas o más. La placa se lavó tres veces con BPS y, a continuación, se secó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Ejemplo 3: Preparación del control

Para un control positivo, se añadieron 990 μ l de PBST a 10 μ l de A[31-42(rec. A[3]) (1 μ g/ml), y se utilizaron 100 μ l del producto resultante. Como control negativo, se utilizaron 100 μ l de PBS.

Ejemplo 4: Preparación de las muestras

La preparación de las muestras se realizó a partir de dos tipos de muestras. Las muestras de plasma congeladas se disolvieron en un bloque térmico a 37°C durante 15 minutos, seguido de un vórtex durante 30 segundos antes de su uso. Para las muestras enriquecidas con 0,25 ng de S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero, se mezclaron 8,08 µl de HBR1 (0,123 mg/ml) , 180 µl de PBST y 20 µl de S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero (0,25 ng/10 µl) con 20 µl de plasma para preparar un total de 228,08 µl. Para las muestras enriquecidas con un péptido recombinante, se mezclaron 8,08 µl de HBR1 (0,123 mg/ml) y 200 µl de PBST con 20 µl de plasma para preparar un total de 228,08 µl.

Ejemplo 5: Incubación

Las muestras preparadas por el tratamiento con S26C- Beta-Amiloide (1-40) Dímero del ejemplo 4 se incubaron en un incubador 37°C durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días, respectivamente (conjunto 6E10/FF51HRP). Las muestras preparadas mediante el tratamiento sin S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero del ejemplo 4 se incubaron en un incubador 37°C durante 0 y 5 días, respectivamente (conjunto 6E10/FF51HRP). Además, las muestras preparadas mediante el tratamiento con S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero del ejemplo 4 se incubaron en un incubador 37°C durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días, respectivamente (conjunto 6E10/WO2HRP).

Ejemplo 6: conjunto 6E10/FF51HRP: Detección del oligómero Aβ mediante el sistema de detección de multímeros (MDS) a partir de muestras incubadas durante 3 y 4 días después del tratamiento con Dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40)

El control positivo, el control negativo y las muestras tratadas con 0,25 ng de S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero e incubadas durante 3 y 4 días se dispensaron en 100 µl cada uno en una placa recubierta con 6E10 (3 µg/ml) , seguida de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con TBST. Se añadió el anticuerpo FF51-HRP al tampón A hasta alcanzar 0,5 µg/ml y, a continuación, se dispensaron 100 µl de cada uno. La placa se lavó tres veces con TBST y se dispensaron 100 µl de la solución ECL. La placa reaccionada con ELC se introdujo en un luminómetro (PerkinElmer) para medir una señal luminiscente. Los resultados se muestran en las FIG. 1 y 2.

Las FIG. 1 y 2 muestran los cambios de señal en muestras AD y Sin AD según el tiempo de incubación tras la adición de S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero. Se muestra una diferencia entre AD y No AD en cada condición de incubación durante 3 y 4 días.

De las FIG. 1 y 2 se determina que la razón por la cual las señales del oligómero Aβ eran más altas en las muestras de pacientes con AD en comparación con las muestras de pacientes sin AD es que el sistema de aclaramiento que suprime la formación del oligómero Aβ en las muestras de pacientes con AD estaba menos activado que en las muestras de pacientes sin AD.

Ejemplo 7: conjunto 6E10/FF51HRP: Detección del oligómero Aβ utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) a partir de muestras incubadas durante 0 y 4 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40)

El control positivo, el control negativo y las muestras tratadas con 0,25 g del Dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) e incubadas durante 0, 1, 2, 3, 4 y 5 días se dispensaron en 100 µl cada uno en una placa recubierta con 6E10 (3 µg/ml), seguida de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con TBST. Se añadió FF51-HRP al tampón A hasta alcanzar 0,5 µg/ml y, a continuación, se dispensaron 100 µl de cada uno. La placa se lavó tres veces con TBST y se dispensaron 100 µl de la solución ECL. La placa reaccionada con ELC se introdujo en un luminómetro (PerkinElmer) para medir una señal luminiscente. Los resultados se muestran en la FIG. 3.

La FIG. 3 muestra un gráfico que confirma los cambios de señal en las muestras AD y Sin AD según el tiempo de incubación tras la adición de Dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40). FIG. 3 muestra que las señales de las muestras AD aumentaron 1,15 veces, 1,34 veces, 1,64 veces, 2,14 veces, 3,01 veces y 3,35 veces en comparación con las señales de las muestras Sin AD.

Se determina a partir de FIG. 3 que la razón por la que las señales del oligómero Aβ eran mayores en las muestras de pacientes con AD en comparación con las muestras de pacientes sin AD es que el sistema de aclaramiento que suprime la formación del oligómero Aβ en las muestras de pacientes con AD estaba menos activado que en las muestras de pacientes sin AD.

Ejemplo 8: conjunto 6E10/FF51HRP: Detección del oligómero Aβ utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) a partir de muestras incubadas durante 0 y 5 días después del tratamiento con y sin el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40)

El control positivo, el control negativo, las muestras tratadas con o sin 0,25 ng de S26C-Beta- Amiloide (1-40) Dímero e incubadas durante 0 y 5 días se dispensaron en 100 µl cada uno en placa recubierta con 6E10 (0 pg/ml), seguido de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con TBST. Se añadió el anticuerpo FF51-HRP al tampón A hasta alcanzar 0,5 µg/ml y, a continuación, se dispensaron 100 µl de cada uno. La placa se lavó tres veces con TBST y se dispensaron 100 µl de la solución ECL. La placa reaccionada con ELC se introdujo en

un luminómetro (PerkinElmer) para medir una señal luminiscente. Los resultados se muestran en la FIG. 4.

La FIG. 4 muestra los datos de medición del oligómero A β en las muestras sin o con la adición de Dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) y luego incubadas durante 0 y 5 días. La FIG. 4 muestra que las señales de las muestras AD aumentaron en comparación con las señales de las muestras Sin AD según el tiempo la ausencia y la presencia de spiking con Dímero Beta-Amiloide (1-40).

Las muestras enriquecidas sin S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero e incubadas durante 0 y 5 días mostraron diferencias de 1,09 veces y 1,97 veces en las señales AD en comparación con las señales Sin AD, respectivamente, y la variación del oligómero A β fue un aumento de 1,8 veces desde el día 0 hasta el día 5. Mientras que las muestras enriquecidas con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40) e incubadas durante 0 y 5 días mostraron diferencias de 1,1 veces y 3,47 veces en las señales AD en comparación con las señales Sin AD, respectivamente, y la variación del oligómero A β fue de un aumento de 3,15 veces desde el día 0 hasta el día 5.

Se determina a partir de la FIG. 4 que la razón por la que las señales del oligómero A β eran más altas en las muestras de pacientes con AD en comparación con las muestras de pacientes sin AD es que el sistema de aclaramiento que suprime la formación del oligómero A β en las muestras de pacientes con AD estaba menos activado que en las muestras de pacientes sin AD.

Ejemplo 9: conjunto 6E10/WO2HRP: Detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) a partir de muestras incubadas durante 1 y 2 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40)

El control positivo, el control negativo y las muestras tratadas con 0,25 ng de S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero e incubadas durante 1 y 2 días se dispensaron en 100 μ l cada uno en una placa recubierta con 6E10 (3 μ g/ml), seguida de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con TBST. Se añadió el anticuerpo WO2-HRP al tampón A hasta alcanzar 0,25 μ g/ml y, a continuación, se dispensaron 100 μ l de cada uno. La placa se lavó tres veces con TBST y se dispensaron 100 μ l de la solución ECL. La placa reaccionada con ELC se introdujo en un luminómetro (PerkinElmer) para medir una señal luminiscente. Los resultados se muestran en las FIG. 5 y 6.

Las FIG. 5 y 6 muestran los cambios de señal en las muestras AD y Sin AD según el tiempo de incubación tras la adición de Dímero S26C-Beta-Amiloide (4-40). Se muestra una diferencia entre AD y No AD en cada condición de incubación durante 1 y 2 días.

Considerando las FIG. 5 y 6, se considera que la razón por la que las señales del oligómero A β eran más altas en las muestras de pacientes con AD en comparación con las muestras de pacientes sin AD es que el sistema de aclaramiento que suprime la formación del oligómero A β en las muestras de pacientes con AD estaba menos activado que en las muestras de pacientes sin AD.

Ejemplo 10: conjunto 6E10/WO2HRP: Detección del oligómero A β utilizando el sistema de detección de multímeros (MDS) a partir de muestras incubadas durante 1 y 2 días después del tratamiento con el dímero S26C-Beta-Amiloide (1-40)

El control positivo, el control negativo y las muestras tratadas con 0,25 ng de S26C-Beta-Amiloide (1-40) Dímero e incubadas durante 3 y 4 días se dispensaron en 100 μ l cada uno en una placa recubierta con 6E10 (3 μ g/ml), seguido de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó tres veces con TBST. Se añadió el anticuerpo WO2-HRP al tampón A hasta alcanzar 0,25 μ g/ml y, a continuación, se dispensaron 100 μ l de cada uno. La placa se lavó tres veces con TBST y se dispensaron 100 μ l de la solución ECL. La placa reaccionada con ELC se introdujo en un luminómetro (PerkinElmer) para medir una señal luminiscente. Los resultados se muestran en la FIG. 7.

La FIG. 7 muestra un gráfico que confirma los cambios de señal en las muestras AD y Sin AD según el tiempo de incubación tras la adición de Dímero S26C-Beta-Amiloide (5-40). Como resultado, en el día 1 de incubación, la señal media de las muestras AD era 1,19 veces mayor que la de las muestras Sin AD, y las señales de las muestras aumentaban en general. En cambio, en los días 2, 3 y 4, los valores de la señal de la muestra, que habían sido altos en general, disminuyeron y, por tanto, las muestras AD mostraron diferencias de 1,69 veces, 1,50 veces y 1,41 veces en comparación con las muestras sin AD.

Se determina a partir de la FIG. 7 que la razón por la que las señales del oligómero A β eran más altas en las muestras de pacientes con AD en comparación con las muestras de pacientes sin AD es que el sistema de aclaramiento que suprime la formación del oligómero A β en las muestras de pacientes con AD estaba menos activado que en las muestras de pacientes sin AD.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a características específicas, será evidente para los expertos en la materia, que esta descripción es únicamente para una realización preferente y no limita el ámbito de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de una forma agregada de un péptido A β en una bio-muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (a) enriquecer una forma dimérica del péptido A β con una biomuestra a analizar;
 - 5 (b) formar adicionalmente una forma agregada del péptido A β incubando un producto de la etapa (a);
 - (c) poner en contacto, con un producto de la etapa b), una etiqueta aglutinante en la que una etiqueta generadora de señal se conjuga con un aglutinante que se une a la forma agregada del péptido A β ; y
 - (d) detectar una señal generada a partir de la etiqueta aglutinante unida a la forma agregada del péptido A β ,
 - 10 en el que la incubación en la etapa (b) se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para la multimerización de la forma dimérica enriquecida del péptido A β mediante la biomuestra; y
 - en el que la forma dimérica del péptido A β es una forma dimérica formada por la unión disulfuro de los residuos Cys26 de los péptidos A β que comprenden cada uno las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la bio-muestra que multimeriza la forma dimérica enriquecida del péptido A β es una bio-muestra de un ser humano que tiene una enfermedad asociada con la forma multimérica del péptido A β .
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el tiempo de incubación suficiente para la multimerización por la biomuestra es un tiempo suficiente para aumentar una señal generada utilizando la biomuestra del ser humano que tiene una enfermedad asociada con la forma multimérica del péptido A β para que sea 1,3-20 veces mayor que una señal generada utilizando una biomuestra de un ser humano normal.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la biomuestra es sangre.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra de sangre es plasma.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se añade adicionalmente un tampón al producto de la etapa (a).
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el tampón se añade en una cantidad de 3-15 veces (v/v) en relación con una cantidad de la biomuestra.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tampón es un tampón de fosfato que contiene tensioactivos no iónicos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la formación adicional de la forma agregada del péptido A β en la etapa (b) se lleva a cabo incubando el producto de la etapa (a) a una temperatura de 1-50°C.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las etapas (c) y (d) se realizan comprendiendo las siguientes etapas:
 - 35 (c-1) poner en contacto el producto de la etapa b) con un anticuerpo de captura que reconozca un epítipo del péptido A β capturando la forma agregada;
 - (c-2) poner en contacto la forma agregada capturada con un anticuerpo de detección que reconozca un epítipo del péptido A β ; y
 - (c-3) detectar un complejo de forma agregada-anticuerpo de detección.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 13, en el que el anticuerpo de detección es un anticuerpo de detección que reconoce un epítipo idéntico o solapado con el epítipo de la etapa (c-1).
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 13, en el que el anticuerpo de captura se une a un sustrato sólido.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 10, en el que el anticuerpo de detección tiene una etiqueta que genera una señal detectable.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11 a 13, en el que la etiqueta unida al anticuerpo de detección incluye una etiqueta compuesta, una etiqueta enzimática, una etiqueta radiactiva, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente y una etiqueta FRET.

FIG. 1

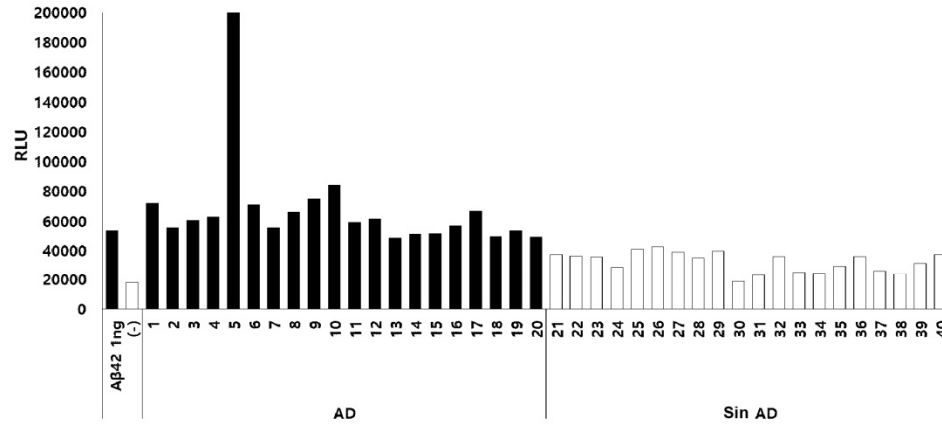


FIG. 2

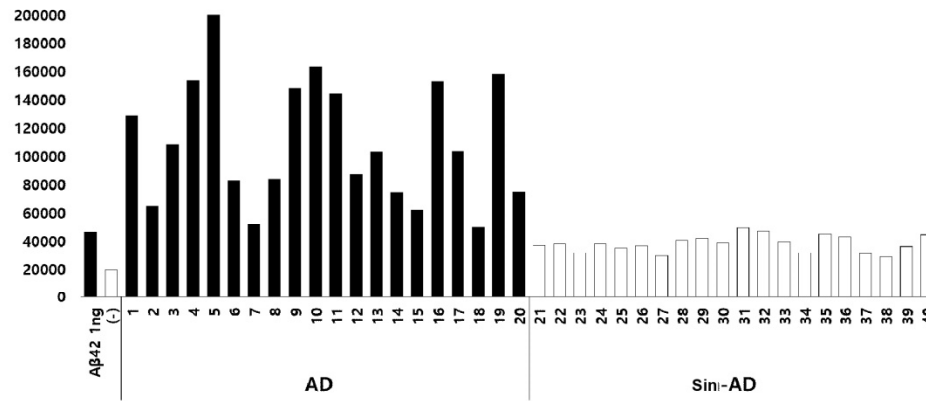


FIG. 3

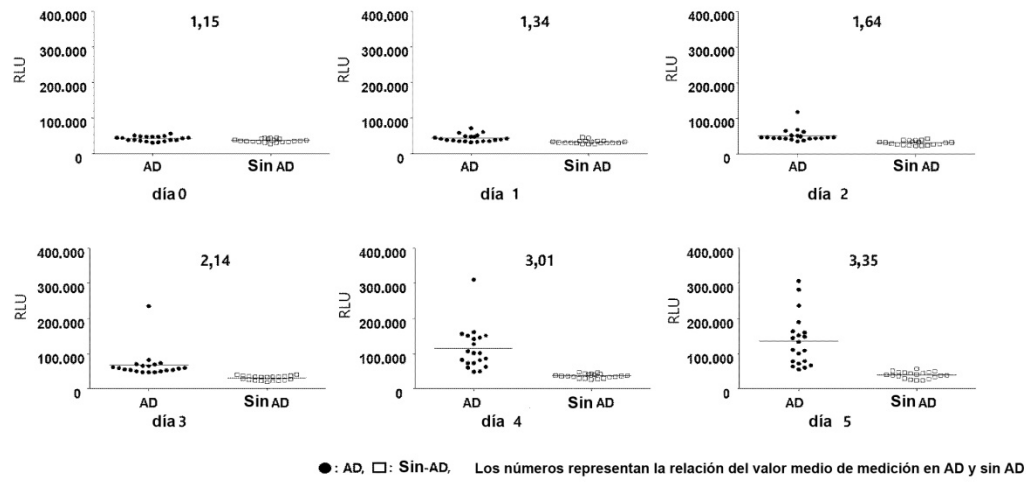
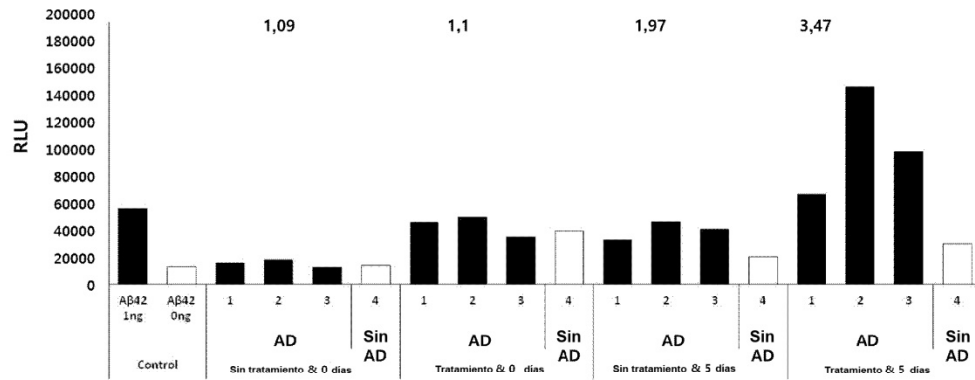


FIG. 4



▪ Los números representan la relación del valor medio de medición en AD y sin AD

FIG. 5

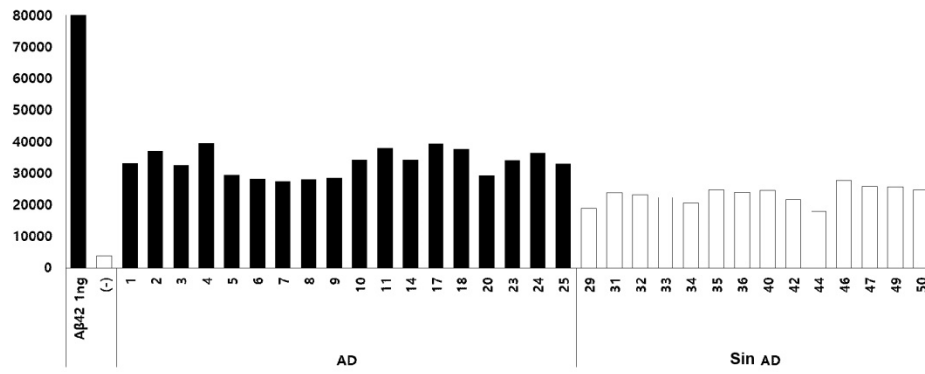


FIG. 6

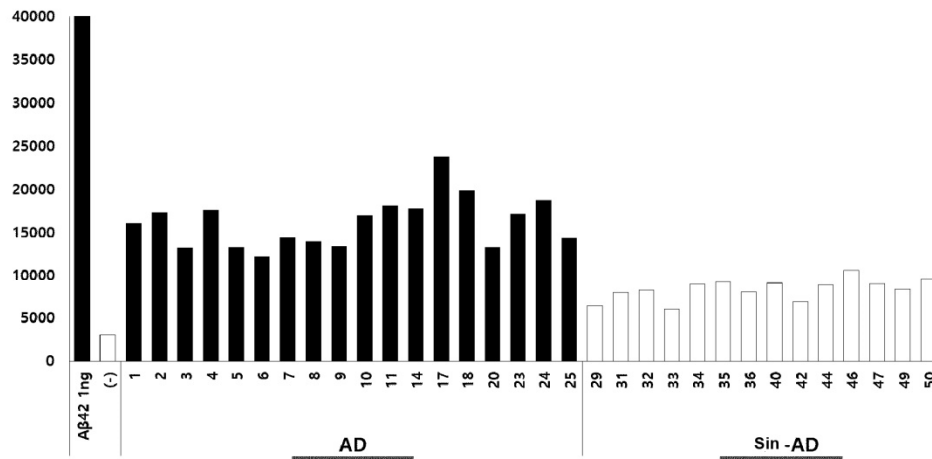


FIG. 7

