

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 922 201**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012** **PCT/EP2012/076552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13092952**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012** **E 12818996 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2022** **EP 2794655**

54 Título: **Procedimiento de cuantificación selectiva de agregados A-beta**

30 Prioridad:

23.12.2011 DE 102011057021

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

09.09.2022

73 Titular/es:

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
52425 Jülich, DE

72 Inventor/es:

WILLBOLD, DIETER;
FUNKE, SUSANNE AILEEN;
WANG-DIETRICH, LEI;
BIRKMANN, EVA y
BANNACH, OLIVER

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 922 201 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 cuantificación selectiva de agregados A-beta

5 La invención se refiere a procedimientos para la cuantificación selectiva de agregados A-beta, que comprenden la inmovilización de moléculas de captura A-beta sobre un sustrato, aplicación de la muestra a examinar sobre el sustrato, adición de sondas marcadas para la detección que las marcan mediante unión específica a agregados A-beta y detección de los agregados marcados por medio de microscopía de fluorescencia de resolución espacial, donde se utiliza un estándar interno o externo para la cuantificación de agregados A-beta.

10

Los agregados A-beta aparecen en la enfermedad de Alzheimer (EA, demencia de Alzheimer, en latín = Morbus Alzheimer). Además de la enfermedad de Parkinson, esta pertenece, por ejemplo, a un grupo heterogéneo de estados clínicos, cuyo criterio común es en muchos casos (pero no exclusivamente) depósitos extracelulares, sistémicos o locales de una proteína específica respectivamente, la mayoría de las veces en la conformación ordenada de la

15 estructura de prospecto beta. La demencia relacionada con la edad representa un problema cada vez mayor en la sociedad actual, ya que debido a la esperanza de vida creciente cada vez más personas se ven afectadas por ella y, por lo tanto, la enfermedad repercute en los sistemas de seguridad sociales y su viabilidad financiera.

Los agregados patológicos de proteínas endógenas, tal como, por ejemplo, oligómeros o fibrillas, aparecen en muchas enfermedades neurodegenerativas. En la demencia de Alzheimer, por ejemplo, se encuentran depósitos de péptido beta amiloide en el cerebro (depósitos de péptido A-beta) y depósitos de sinucleína en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los depósitos de péptidos beta amiloides (o fibrillas de péptidos) representan solo la etapa final de un proceso que comienza con la separación de péptidos beta amiloides monoméricos de APP (proteína precursora amiloide), a continuación configura oligómeros de péptidos beta amiloides neurotóxicos y finalmente o

20

25 alternativamente termina con fibrillas de péptidos beta amiloides depositadas en placas. Las principales características patológicas de la EA son la formación de placas seniles o amiloides, que se componen del péptido A-beta y depósitos neurofibrilares adicionales de la proteína tau. La proteína precursora del péptido de A-beta, APP, está localizada en la pared celular de las neuronas. Debido a la degradación proteolítica y modificación posterior se originan fragmentos de A-beta de diferente longitud y tipo, tal como, por ejemplo, A-beta 1-40, A-beta 1-42 o pGluA-beta 3-42. Los péptidos

30 A-beta monómeros también se originan en el organismo sano durante toda la vida.

Según la hipótesis de la cascada amiloide de la década de 1990, los depósitos de A-beta en forma de placas son los desencadenantes de los síntomas de la enfermedad. No obstante, en los últimos años, diferentes estudios indican que los pequeños oligómeros A-beta de difusión libre poseen la mayor toxicidad entre todas las especies de A-beta y son

35 responsables de la generación y el progreso de la EA. Por lo tanto, los agregados del péptido A-beta están directamente relacionados con la patogénesis de EA.

Hoy en día, un diagnóstico seguro de la EA solo es posible después de la aparición de síntomas clínicos llamativos, a este respecto, se parte de una fiabilidad de como máximo un 90 %. Actualmente existe una única posibilidad de

40 diagnóstico segura hasta ahora después de la muerte del paciente mediante la comprobación histológica de diferentes cambios en el cerebro.

Por consiguiente, existe una necesidad de procedimientos para la identificación y detección cuantitativa de agregados A-beta, en particular de pequeños oligómeros o agregados A-beta de difusión libre.

45

Hasta la fecha solo se han descrito pocos métodos para la caracterización y cuantificación de agregados u oligómeros patógenos en tejidos y fluidos corporales.

Los compuestos que se unen a A-beta e inhiben su agregación se conocen, por ejemplo, de Chafekar et al. (ChemBioChem 2007, 8, 1857 - 1864). Estas sustancias se componen de partes del péptido A-beta (secuencia KLVFF) y sirven para fines terapéuticos, por lo tanto, no se lleva a cabo la caracterización y cuantificación de agregados u oligómeros patógenos en tejidos y fluidos corporales.

50

Actualmente no hay criterios y/o comprobaciones generalmente aceptadas, los llamados biomarcadores, para la EA.

55 Un punto de partida para tales biomarcadores fue hasta ahora el uso de trazadores de radio PET para técnicas de imagen, que se basa en la suposición de que las sustancias marcadas radioactivamente podrían unirse a las placas amiloides y, por lo tanto, ser una medida de la deposición de placa después de la detección. A pesar de una asociación obvia entre la señal de PET y la enfermedad, aún no se pudo demostrar que de este modo es posible un diagnóstico seguro, ya que muchas personas no dementes también muestran una alta retención de trazadores. También son

60 desventajosos para este procedimiento los altos costes, así como el esfuerzo técnico necesario en equipos que no están disponibles en todas partes.

Como otro punto de partida, actualmente se estudian las cantidades de distintas sustancias en la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes y se analizan sus beneficios como biomarcadores. Una de estas sustancias es el péptido A-beta. Hasta ahora, la determinación del contenido de A-beta monomérico en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes parece ser la más fiable, posiblemente combinada con la determinación de la concentración de tau.

5 Sin embargo, hay una variación tan alta de los valores que no se puede hacer un diagnóstico fiable para un individuo por medio de tales biomarcadores. El uso de un procedimiento semejante se conoce por el documento DE 69533623 T2. A pesar de estos diferentes enfoques, ningún biomarcador fiable se pudo imponer hasta ahora.

Para empeorar las cosas, para la cuantificación específica de los agregados A-beta en delimitación con los monómeros A-beta y/o el contenido total de A-beta hasta ahora solo están disponibles unos pocos sistemas de comprobación. Como posible sistema de comprobación se utilizan hasta ahora ELISA, en los que los oligómeros A-beta se detectan por anticuerpos. Los anticuerpos utilizados aquí reconocen o bien tipos muy específicos de oligómeros A-beta, o bien otros oligómeros no específicos que no se componen de péptidos A-beta, sino de proteínas completamente diferentes, lo que repercute de forma desventajosa en la evaluación.

15 El uso de procedimientos asistidos por ELISA por medio de anticuerpos específicos al conformer se conoce, por ejemplo, por el documento WO2005/018424 A2.

Como otro procedimiento de comprobación sirven las mediciones de ELISA tipo sándwich. Aquí, los anticuerpos específicos A-beta se utilizan para inmovilizar las moléculas A-beta. Los mismos anticuerpos también se utilizan a continuación para la detección. Los monómeros no conducen a ninguna señal después de este procedimiento, ya que el punto de unión de anticuerpos ya está ocupado por las moléculas de captura. Por lo tanto, las señales específicas solo se generan por dímeros u oligómeros más grandes. Sin embargo, en la evaluación, un procedimiento semejante solo permite la cuantificación de la suma de todos los agregados presentes en una muestra y no la caracterización de grupos individuales. Para detectar y cuantificar de forma segura los agregados A-beta individuales, en los procedimientos asistidos por ELISA también falta la sensibilidad necesaria para ello. El uso de un procedimiento ELISA tipo sándwich semejante se conoce por el documento WO2008/070229 A2.

La publicación SUSANNE AILEEN FUNKE ET AL: "Single particle detection of Abeta aggregates associated with Alzheimer's disease", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, Vol. 364, N.º. 4, 24 de octubre de 2007 (2007-10-24), páginas 902-907 da a conocer un análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) mediante exploración confocal de agregados A-beta inmovilizados en la superficie y decorados con anticuerpos de comprobación y posterior análisis de distribución de intensidad de fluorescencia bidimensional.

35 La publicación SUSANNE AILEEN FUNKE ET AL: "An Ultrasensitive Assay for Diagnosis of Alzheimer's Disease", REJUVENATION RESEARCH, Vol. 11, N.º. 2, 1 de abril de 2008 (2008-04-01), páginas 315-318 da a conocer un test altamente específico y sensible basado en espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) que es lo suficientemente sensible como para comprobar incluso agregados individuales en fluidos corporales de pacientes con Alzheimer.

SUSANNE AILEEN FUNKE ET AL: "Single-Particle Detection System for Ab Aggregates: Adaptation of Surface-Fluorescence Intensity Distribution Analysis to Laser Scanning Microscopy", REJUVENATION RESEARCH, Vol. 13, N.º. 2-3, 4 de diciembre de 2009 (2009-12-04), páginas 206-209 da a conocer un sistema de test ultrasensible para la comprobación de agregados de A β en fluidos corporales, el llamado análisis de distribución de intensidad de fluorescencia superficial (FIDA).

El documento WO 2007/096076 A2 da a conocer un inmunógeno recombinante que se forma mediante la multimerización en tándem de un epítipo de células B que por un fragmento de A β 42.

50 La publicación JUNGKI RYU ET AL: "Surface Plasmon Resonance Analysis of Alzheimer's [beta]-Amyloid Aggregation on a Solid Surface: From Monomers to Fully-Grown Fibrils", ANALYTICAL CHEMISTRY, Vol. 80, N.º 7, 1 de abril de 2008 (2008-04-01), páginas 2400-2407 da a conocer el análisis de la agregación de péptidos de Alzheimer-beta-amiloide (1-42) de monómeros frescos a fibrillas maduras con la ayuda de espectrometría de resonancia plasmática de superficie in situ (SPR) y microscopía de fuerza atómica ex situ (AFM).

La publicación VERMETTE PATRICK ET AL: "Immobilization and surface characterization of NeutrAvidin biotin-binding protein on different hydrogel interlayers", JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, Vol. 259, N.º. 1, 1 de marzo de 2003 (2003-03-01), páginas 13-26 da a conocer inmovilizar moléculas de avidina en portadores sólidos y aprovechar su capacidad para unirse a moléculas biotiniladas con alta afinidad.

La publicación WANG-DIETRICH: "The Amyloid-beta Oligomer Count in Cerebrospinal Fluid is a Biomarker for Alzheimers Disease", JOURNAL OF ALZHEIMERS DISEASE, Vol. 34, N.º. 4, 1 de enero de 2013 (2013-01-01), páginas 985-994 da a conocer que el número de oligómeros A β en los fluidos corporales es el biomarcador más directo y relevante para el Alzheimer, ya que la determinación del contenido de oligómeros A β de muestras de líquido cefalorraquídeo de 14 pacientes con Alzheimer y 12 personas de control de la misma edad dio como resultado una clara diferencia entre los dos grupos.

La publicación VINCENT DUGAS ET AL: "Surface Sensitization Techniques and Recognition Receptors Immobilization on Biosensors and Microarrays" en: "Recognition Receptors in Biosensors", 23 de noviembre de 2009 (2009-11-23), Springer New York, New York, NY da a conocer una visión general actual de distintos receptores de reconocimiento, su inmovilización y una visión general de las técnicas de caracterización de superficies.

La publicación MANEA M ET AL: "POLYPEPTIDE CONJUGATES COMPRISING A Alpha-AMYLOID PLAQUE-SPECIFIC EPITOPE as NEW VACCINE STRUCTURES AGAINST ALZHEIMER'S DISEASE", BIOPOLYMERS, JOHN WILEY & SONS, INC, US, Vol. 76, N.º. 6, 1 de enero de 2004 (2004-01-01), páginas 503-511, da a conocer enfoques inmunoterapéuticos que deben desencadenar una respuesta inmune humoral y servir para una posible vacunación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La publicación WEIMING XIA ET AL: "A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease", ARCHIVES OF NEUROLOGY, AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, CHICAGO, IL, US, Vol. 66, N.º 2, 1 de febrero de 2009 (2009-02-01), páginas 190-199 da a conocer un ELISA específico para la determinación de A-beta oligomérico en plasma humano y tejido cerebral de pacientes con Alzheimer.

25 La invención se define en las reivindicaciones.

El objetivo de la presente invención era poner a disposición un procedimiento ultrasensible para la cuantificación y caracterización de agregados A-beta. Mediante la caracterización del biomarcador, es decir, la determinación del número, cantidad y/o tamaño de esta sustancia (biomarcador) en un líquido o tejido propio del propio cuerpo, se debe permitir un diagnóstico exacto de la enfermedad y/o información sobre el desarrollo de la enfermedad y el estado del paciente.

Otro objetivo de la presente invención era poner a disposición un procedimiento para la cuantificación selectiva de agregados A-beta de cualquier tamaño y composición, oligómeros A-beta y al mismo tiempo también pequeños oligómeros A-beta de difusión libre.

Este objetivo se satisface mediante un procedimiento para la cuantificación y/o caracterización selectiva de agregados A-beta, que comprende las siguientes etapas:

a0) inmovilización de moléculas de captura en un sustrato donde las moléculas de captura son anticuerpos anti-A-beta,

a) aplicación de la muestra a analizar al sustrato,
b) adición de sondas marcadas para la detección, donde las sondas son anticuerpos anti-A-beta marcados con colorante fluorescente que se unen específicamente a un epítipo N-terminal del péptido A-beta, que los marcan mediante la unión específica a agregados A-beta, y
c) detección de los agregados A-beta marcados, donde la detección se lleva a cabo por medio de microscopía de fluorescencia de resolución espacial, donde se excluye la detección de monómeros en tanto que no se evalúan las señales con una intensidad más baja a través de un corte de intensidad, y donde

la etapa a) se puede llevar a cabo antes de la etapa b) y se utiliza un estándar interno o externo para cuantificar los agregados A-beta, donde el estándar contiene un número exactamente definido de epítipos de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionado de A-beta 1-8 (SEQ ID NO:2), A-beta 1-11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1-16 (SEQ ID NO:4), A-beta 3-11 (SEQ ID NO:5), piroGluA-beta 3-11 (SEQ ID NO:6), A-beta 11-16 (SEQ ID NO:7) y/o piroGLUA-beta 11-16 (SEQ ID NO:8), que están conectados covalentemente entre sí directamente o a través de aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales, y donde el estándar está construido como un dendrímero.

Caracterización de los agregados A-beta u oligómeros A-beta significa determinación de la forma, tamaño y/o composición.

En el sentido de la presente invención, el término monómero A-beta se refiere a una molécula de péptido que es una parte de la proteína precursora amiloide APP, que se conoce con el nombre A-beta. Dependiendo de la especie de origen (humano y/o animal) y el procesamiento, la secuencia exacta de aminoácidos de un monómero A-beta puede

variar en longitud y tipo.

En el sentido de la presente invención, el término oligómeros A-beta designa tanto agregados A-beta como también oligómeros A-beta y también pequeños oligómeros A-beta de difusión libre. El oligómero en el sentido de la invención es un polímero formado por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 monómeros o múltiplos de los mismos. Pero, a este respecto, todos los monómeros A-beta en un oligómero A-beta pueden ser, pero no necesariamente, idénticos entre sí.

Por lo tanto, bajo agregados A-beta se deben entender tanto oligómeros A-beta como también pequeños oligómeros A-beta de difusión libre. Esto también incluye agregados, tal como, por ejemplo, se designan fragmentos de fibrillas, "protofibrillas", "ADDLs", p56. Es esencial para la presente invención que los agregados A-beta sean agregados o polímeros con respecto al tamaño, que se pueden mover en el cuerpo y no están inmovilizados en el cuerpo debido a su tamaño en forma de depósitos de placa de péptido beta amiloide.

Como sustrato se selecciona un material que posee una capacidad de unión no específica lo más baja posible, en particular con respecto a oligómeros A-beta.

En una realización de la presente invención se selecciona un sustrato de vidrio. El sustrato se puede recubrir con sustancias hidrófilas, preferiblemente poli-D-lisina, polietilenglicol (PEG) o dextrano.

La superficie de vidrio se puede hidroxilar y a continuación activarse con grupos amino.

Para preparar el sustrato sobre el recubrimiento se llevan a cabo una o varias de las siguientes etapas:

- lavado de un sustrato de vidrio o de un soporte de vidrio en un baño de ultrasonidos o un limpiador de plasma, alternativamente a ello incubar en 5 M de NaOH durante al menos 3 horas,
- enjuague con agua y secado siguiente bajo nitrógeno,
- inmersión en una solución de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno en una proporción de 3:1 para la activación de los grupos hidroxilo,

- enjuague con agua hasta un pH neutro, a continuación con etanol y secado bajo atmósfera de nitrógeno,
- inmersión en una solución de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) (1 - 7%) en tolueno seco o una solución de etanolamina,
- enjuague con acetona o DMSO y agua y secado bajo atmósfera de nitrógeno.

Para el recubrimiento con dextrano, preferiblemente carboximetil-dextrano (CMD), el sustrato se incuba con una solución acuosa de CMD (en una concentración de 10 mg/ml o 20 mg/ml) y, dado el caso, N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), (200 mM) y N-hidroxisuccinimida (NHS), (50 mM) y a continuación se lava.

El carboximetil-dextrano está unido covalentemente en una variante a la superficie de vidrio, que en primer lugar se ha hidroxilado y a continuación se ha activado con grupos amina, tal como se describió anteriormente.

Como sustrato también se pueden utilizar placas de microtitulación, preferiblemente con fondo de vidrio. Dado que al utilizar marcos de poliestireno no es posible el uso de ácido sulfúrico concentrado, la activación de la superficie de vidrio se realiza en una variante de realización de la invención de forma análoga a Janissen et al. (Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 71(2), 200-207).

Según la presente invención, en el sustrato se inmovilizan moléculas de captura para capturar y fijar los agregados A-beta, donde como moléculas de captura se utilizan anticuerpos anti-A-beta.

En una alternativa, las moléculas de captura están unidas covalentemente al sustrato.

En otra alternativa, las moléculas de captura están unidas covalentemente con el recubrimiento, preferiblemente capa de dextrano.

Los anticuerpos anti-A-beta se unen específicamente a un epítipo de los agregados A-beta. En una alternativa de la presente invención, el epítipo tiene una secuencia de aminoácidos de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionada de las zonas parciales A-beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 5) y piroGluA-beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 6), A-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) y piroGluA-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 8), por ejemplo, del epítipo N-terminal humano (con la siguiente secuencia: DAEFRHDSGYE (1-11, SEQ ID NO: 3).

Las moléculas de captura (anticuerpos) se inmovilizan sobre el sustrato, dado el caso después de una activación del

soporte recubierto con CMD mediante una mezcla de EDC/NHS (200 o 50 mM).

Los grupos terminales de carboxilato restantes a los que no se han unido moléculas de captura se pueden desactivar.

- 5 Para la desactivación de estos grupos terminales de carboxilato en el espaciador CMD se utiliza etanolamina en DMSO. Antes de aplicar las muestras, los sustratos o soportes se enjuagan con PBS. La muestra a medir se incuba sobre el sustrato así preparado.

Un pretratamiento de la muestra se puede realizar según uno o varios de los procedimientos siguientes:

10

- calentamiento (a una temperatura hasta el punto de ebullición de la muestra)
- uno o varios ciclos de congelación - descongelación,
- dilución con agua o tampón,
- tratamiento con enzimas, por ejemplo, proteasas, nucleasas, lipasas,

15

- centrifugación,
- precipitación,
- competencia con sondas para desplazar los anticuerpos anti-A-beta eventualmente presentes.

En otra etapa, los agregados A-beta están marcados por sondas que están marcadas para una detección posterior.

20

Según la invención, como sondas se usan anticuerpos anti-A-beta que se unen específicamente al epítipo N-terminal del péptido A-beta, que lo marcan mediante unión específica a agregados A-beta. Las moléculas de captura y las sondas pueden ser idénticas.

25

En una realización de la presente invención se diferencian moléculas de captura y sondas. Así, por ejemplo, se pueden usar diferentes anticuerpos anti-A-beta como moléculas de captura y sondas. En otra realización de la presente invención se usan moléculas de captura y sondas que, con la excepción del eventual marcado de colorante, son idénticas entre sí. En una alternativa de la presente invención se usan diferentes sondas que, con excepción del eventual marcado de colorante, son idénticas entre sí. En otra alternativa de la presente invención se usan al menos 30 2 sondas que están construidas a partir de diferentes anticuerpos anti-A-beta y, dado el caso, también tienen diferentes marcados de colorante.

Para el control de calidad posterior de la superficie, por ejemplo, la uniformidad del recubrimiento con moléculas de captura, se pueden utilizar moléculas de captura, marcadas con colorantes fluorescentes. Para ello se utiliza 35 preferiblemente un colorante que no interfiere con la detección. De este modo se posibilita un control posterior de la estructura, así como una normalización de los resultados de medición.

Para la detección, las sondas están caracterizadas de modo que emiten una señal detectable ópticamente, según la invención, emisión fluorescente.

40

Según la invención, las sondas están marcadas con colorantes, donde en este caso se trata de colorantes fluorescentes.

En una realización de la presente invención se usan al menos 2, 3, 4, 5, 6 o más sondas diferentes. Las sondas pueden 45 diferir tanto respecto a su unión específica a los agregados A-beta como también respecto a su marcado diferente mediante colorantes fluorescentes.

También se pueden combinar entre sí sondas que son adecuadas para usar FRET (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) como detección.

50

El uso de varias sondas diferentes, que están caracterizadas por diferentes tintes fluorescentes, aumenta la especificidad de la señal de correlación obtenida durante la medición. Adicionalmente, de este modo también se posibilita la ocultación de monómeros A-beta. La detección de monómeros A-beta se puede excluir, en particular, si la sonda y la molécula de captura son idénticas, o ambas detectan un epítipo superpuesto.

55

Se pueden utilizar sondas según la invención que son específicas para una determinada especie de agregado A-beta, tal como, por ejemplo, A-beta (x - 40), A-beta (x - 42) o piro-glutamato-A-beta (3 - x), piro-glutamato-A-beta (11 - x). X es un número natural entero entre 1 y 40 o bien 42, donde el experto en la materia determina la longitud de la secuencia a utilizar en función de su conocimiento de la secuencia del péptido A-beta. Por lo tanto, el objeto de la presente 60 invención es también la utilización o uso de sondas específicas al agregado A-beta o específicas al oligómero A-beta, donde las sondas son un anticuerpo anti-A-beta marcado con colorante fluorescente, para la unión específica a un determinado agregado A-beta o bien oligómero A-beta en un procedimiento, tal como se describe en las

reivindicaciones 1-8.

Estos se unen específicamente a un determinado agregado A-beta, o bien a un oligómero A-beta, preferiblemente para las especies mencionadas anteriormente. Mediante la unión específica a un determinado agregado A-beta, o bien oligómero A-beta, se puede determinar el tipo y/o tamaño, así como la estructura del agregado A-beta, o bien oligómero A-beta.

Por lo tanto, también se pueden utilizar sondas según la invención, específicas al agregado A-beta, o específicas al oligómero A-beta.

En otra alternativa, no según la invención, como sondas se pueden utilizar péptidos A-beta, marcados con colorantes fluorescentes.

Como muestra a analizar se pueden utilizar líquidos o tejidos endógenos. En una realización de la presente invención, la muestra se selecciona de líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, plasma y orina. Las muestras pueden recorrer diferentes etapas de preparación conocidas por el experto en la materia. La ventaja de la presente invención es la posibilidad de la determinación de los agregados A-beta en muestras no tratadas, preferiblemente CSF.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es también un procedimiento para la determinación de la composición, tamaño y/o forma de los agregados A-beta. En este caso se usan las etapas de procedimiento mencionadas y descritas anteriormente.

La detección de los agregados marcados se realiza por medio de microscopía de fluorescencia de resolución espacial, preferiblemente con microscopía de fluorescencia confocal, espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), en particular en correlación cruzada y ensayo de escaneo láser inmunosolvente de partículas individuales y/o microscopio de escaneo láser (LSM).

La detección se lleva a cabo en una alternativa de la presente invención con un microscopio de escaneo láser confocal.

En una realización de la presente invención se utiliza para ello un enfoque láser, tal como, por ejemplo, en la microscopía de escaneo láser, o un FCS (sistema de espectroscopia de correlación de fluorescencia), así como las correspondientes variantes de superresolución, tal como, por ejemplo, STED o SIM. Alternativamente a ello, la detección se puede realizar mediante un microscopio TIRF, así como las correspondientes variantes de superresolución, tal como, por ejemplo, STORM, dSTORM. Por consiguiente, en la realización de la invención se excluyen procedimientos que se basan en una señal no resuelto espacialmente, tal como ELISA o ELISA tipo sándwich.

En la detección es ventajosa una alta resolución espacial. A este respecto, en una realización del procedimiento según la invención se recogen tantos puntos de datos que posibilita la detección de un agregado frente a una señal de fondo que se causa, por ejemplo, por ruido específico del aparato, otras señales no específicas o sondas unidas no específicas. De esta manera, se leen tantos valores (valores de readout), tal como eventos de resolución espacial, tal como, por ejemplo, píxeles. A través de la resolución espacial, cada evento se determina ante los antecedentes respectivos y, por lo tanto, representa una ventaja sobre el procedimiento ELISA sin señal de resolución espacial.

En una alternativa, en el procedimiento según la invención se usan varias sondas diferentes. De este modo se multiplica la información, es decir, los valores leídos, ya que para cada punto, para cada agregado o para cada evento de detección se obtiene una información separada en función de la respectiva sonda que suministra la señal. Así se aumenta la especificidad de la señal para cada evento. De este modo, para cada agregado detectado también se puede determinar su composición, es decir, el tipo de agregado, es decir, la composición de especies A-beta, tal como, por ejemplo, A-beta (1 - 40), A-beta (1 - 42), piro-glutamato-A-beta (3 - 40/42, 11-40/42) o mezclas de los mismos.

A este respecto, el número de diferentes sondas se delimita solo por la interferencia de los colorantes fluorescentes a utilizar. Así se pueden utilizar 1, 2, 3, 4 o varias combinaciones diferentes de colorante - sonda.

Para la evaluación según el procedimiento descrito anteriormente es esencial la información de resolución espacial. A este respecto, se puede tratar, por ejemplo, del tipo y/o intensidad de la fluorescencia. En la evaluación de estos datos para todas las sondas usadas y detectadas se determina según la invención el número de los agregados, su forma, tamaño y/o su composición. A este respecto, la información sobre el tamaño de los oligómeros se puede obtener directa o indirectamente, dependiendo de si las partículas son más pequeñas o más grandes que la resolución espacial de los procedimientos de imagen utilizados, en una realización se pueden utilizar algoritmos para la minimización de fondo y/o se pueden aplicar valores umbral de intensidad.

Como colorante fluorescente se pueden usar los colorantes conocidos por el experto en la materia. Alternativamente, se pueden usar GFP (proteína verde fluorescente), conjugados y/o proteínas de fusión de los mismos, así como puntos cuánticos.

- 5 Debido al uso de estándares internos o externos, los resultados de test son comparables objetivamente entre sí y, por lo tanto, de gran valor informativo.

Según la invención se usan un estándar interno o externo para la cuantificación de agregados A-beta.

- 10 Apoyándose en el análisis de la distribución de la intensidad de fluorescencia (análisis de distribución de intensidad de fluorescencia de FIDA), el procedimiento según la invención es un llamado FIDA de superficie (Surface-FIDA). Mediante la selección de las moléculas de apura y de sonda, se puede determinar qué tamaño deben poseer los oligómeros para poder contribuir a la detección (señal).
- 15 Con el procedimiento según la invención también es posible adicionalmente el análisis exacto de los pequeños agregados A-beta de difusión libre. Debido a su tamaño, que se sitúa por debajo de su resolución para los microscopios ópticos, estos pequeños oligómeros A-beta difícilmente se podrían distinguir de la fluorescencia de fondo (causada, por ejemplo, por anticuerpos no unidos).
- 20 Además de la sensibilidad extremadamente alta, el procedimiento según la invención también muestra una linealidad con respecto al número de agregados A-beta sobre un amplio rango.

Los pequeños agregados A-beta de difusión libre difusibles se pueden utilizar como biomarcadores para la comprobación y para el reconocimiento de enfermedades de agregación de proteínas, en particular EA. El

25 procedimiento según la invención se puede utilizar para el reconocimiento y/o comprobación de enfermedades de agregación de proteínas, en particular EA, caracterizado porque una muestra de un líquido corporal de un paciente, preferiblemente CSF, se analiza con el procedimiento según la invención descrito anteriormente. Según la invención se utilizan estándares internos o externos.

- 30 Dichos estándares para la cuantificación de oligómeros o agregados patógenos que caracterizan una enfermedad de agregación de proteínas o una degeneración amiloide o una enfermedad de plegamiento defectuoso de proteínas se caracterizan en principio porque un polímero se construye a partir de secuencias de polipéptidos que son idénticas con respecto a su secuencia en la zona parcial correspondiente a las proteínas endógenas, que caracterizan una enfermedad de agregación de proteínas o una degeneración amiloide o una enfermedad de plegamiento defectuoso
- 35 de proteínas, donde los polímeros no se agregan. Como estándar en el sentido de la presente invención se designa un valor de referencia fijo, en general válido y aceptado que sirve para comparar y determinar propiedades y/o cantidad, en particular para determinar el tamaño y la cantidad de agregados patógenos a partir de proteínas endógenas. La norma en el sentido de la presente invención se puede utilizar para la calibración de aparatos y/o mediciones.
- 40 Según la invención, el estándar contiene un número exactamente definido de epítomos de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionado de A-beta 1-8 (SEQ ID NO:2), A-beta 1-11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1-16 (SEQ ID NO:4), A-beta 3-11 (SEQ ID NO:5), piroGluA-beta 3-11 (SEQ ID NO:6), A-beta 11-16 (SEQ ID NO:7) y/o piroGLUA-beta 11-16 (SEQ ID NO:8), que están conectados covalentemente entre sí directamente o a través de aminoácidos,
- 45 espaciadores y/o grupos funcionales, y donde el estándar está construido como un dendrímero,

En el sentido de la presente invención, bajo el término "enfermedad de agregación de proteínas" también se pueden resumir degeneraciones amiloides y enfermedades de plegamiento defectuoso de proteínas. Ejemplos de tales enfermedades y las proteínas endógenas asociadas con ello son: proteína A-beta y tau para EA, alfa-sinucleína para

50 Parkinson o proteína priónica para enfermedades priónicas, por ejemplo, tal como la enfermedad humana de Creutzfeldt-Jakob (CJD), la enfermedad ovina de tembladera y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

- En el sentido de la invención, "secuencias homólogas" significa que una secuencia de aminoácidos presenta una identidad con una secuencia de aminoácidos de un agregado u oligómero patógeno endógeno que provoca una
- 55 enfermedad de agregación de proteínas de al menos un 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 %. En lugar del término "identidad", los términos "homólogo" u "homología" se usan indistintamente en la presente descripción. La identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos se calcula por comparación con la ayuda del programa BESTFIT basado en el algoritmo de Smith, T.F. y Waterman, M.S. (Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)), ajustando los siguientes
- 60 parámetros para los aminoácidos: Gap creation penalty: 8 y Gap extension penalty: 2; y los siguientes parámetros para los ácidos nucleicos: Gap creation penalty: 50 y Gap extension penalty: 3. Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos se define por la identidad de la secuencia de ácido

nucleico/secuencia de polipéptidos en toda la longitud de la secuencia, según se calcula por comparación con la ayuda del programa GAP basado en el algoritmo de Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (J. Mol. Biol. 48: 443-453), ajustando los siguientes parámetros para los aminoácidos: Gap creation penalty: 8 y Gap extension penalty: 2; y los siguientes parámetros para los ácidos nucleicos: Gap creation penalty: 50 y Gap extension penalty: 3.

5

Dos secuencias de aminoácidos son idénticas en el sentido de la presente invención si poseen la misma secuencia de aminoácidos.

10 Bajo el término "zona parcial correspondiente" de proteínas endógenas se debe entender aquella secuencia de péptidos que, según las definiciones según la invención, presenta una secuencia de péptidos idéntica u homóloga con el porcentaje indicado de un monómero, a partir de la que se construyen los estándares según la invención. Es esencial para los estándares según la invención que los estándares no se agreguen, preferiblemente mediante el uso de secuencias monoméricas que no se agreguen, ya que la "zona parcial correspondiente" de proteínas endógenas no es responsable de la agregación.

15

Los agregados en el sentido de la presente invención son - partículas que se componen de varios, preferiblemente los mismos bloques de construcción, que no están conectados covalentemente entre sí y/o - conglomerados no covalentes de varios monómeros.

20 Según la invención, los estándares poseen un número definido exactamente de epítomos que están enlazados covalentemente entre sí (directamente o a través de aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales) para la unión de las sondas correspondientes.

25 El número de epítomos se puede determinar porque se usa una secuencia de polipéptidos que, con respecto a su secuencia, es idéntica a aquella zona parcial de las proteínas endógenas que forma un epítopo.

Una secuencia de polipéptidos seleccionada de esta manera se incorpora en el número deseado durante la formación de los estándares según la invención y/o se enlaza según la invención.

30 Los estándares según la invención son polímeros que están contruidos a partir de las secuencias de polipéptidos descritas anteriormente, eventualmente que contienen otros elementos.

35 Según la invención, los epítomos son epítomos del péptido A-beta seleccionado de las zonas parciales A-beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 5) y piroGluA-beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 6), A-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) y piroGluA-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 8), por ejemplo, del epítopo N-terminal humano (con la siguiente secuencia: DAEFRHDSGYE (1-11; corresponde a SEQ ID NO: 3).

40 PiroGlu es la abreviatura de un piroglutamato, que se sitúa en la posición 3 y/o 11 del péptido A-beta, preferiblemente basado en una ciclización del glutamato N-terminal.

40

La molécula estándar según la invención es un polímero de las secuencias de polipéptidos definidas anteriormente. Un oligómero en el sentido de la invención es un polímero formado de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 monómeros (bajo el monómero se debe entender la secuencia de polipéptidos mencionada anteriormente), o múltiplos del mismo, preferiblemente 2-16, 4-16, 8-16, especialmente preferiblemente 8 o 16, o

45

Los estándares según la invención son, por lo tanto, oligómeros o polímeros según la invención.

En una alternativa de la presente invención, los estándares son solubles en agua.

50

En una alternativa de la presente invención, los estándares según la invención están contruidos a partir de secuencias de polipéptidos iguales.

55 En una alternativa de la presente invención, los estándares según la invención están contruidos a partir de secuencias de polipéptidos diferentes.

Tales secuencias de polipéptidos definidas anteriormente se encadenan formando un oligómero ramificado según la invención.

60 Los oligómeros ramificados según la invención se pueden producir mediante enlace de bloques de construcción individuales por medio de lisina o por medio de química de clic.

Como se ha descrito anteriormente, los estándares según la invención, es decir, los oligómeros o polímeros según la invención, pueden contener adicionalmente a las secuencias de polipéptidos presentes en un número definido exactamente, los epítomos, además aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales adicionales, a través de los que las secuencias de polipéptidos, los epítomos, están enlazadas covalentemente entre sí.

5 En una alternativa se excluye el enlace directo de las secuencias de polipéptidos, preferiblemente epítomos con cisteína, en particular por medio de puente de disulfuro mediante cisteínas (para evitar que agentes reductores disuelvan el puente). Asimismo, en otra variante se excluye un enlace directo de los espaciadores con la secuencia de polipéptidos, por un lado, y con la cisteína, por otro lado.

10 La invención se refiere a una molécula estándar que contiene o se construye a partir de copias de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionada de las zonas parciales A-beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 5) y piroGluA-beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 6), A-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) y piroGluA-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 8), por ejemplo, del epítomo N-terminal humano
15 con la siguiente secuencia: DAEFRHDSGYE (1-11).

La reproducción de los epítomos por grupos funcionales se puede llevar a cabo antes o después de la síntesis de los bloques de construcción individuales. El enlace covalente de las secuencias de polipéptidos es característico de los estándares según la invención.

20 De forma alternativa, pero no según la invención, se usan secuencias de polipéptidos idénticas a una zona parcial del péptido A-beta de longitud completa o que muestran una homología del 50, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % con una zona parcial del péptido A-beta de longitud completa para construir las moléculas estándar según la invención.

25 Esencial para las secuencias utilizadas según la invención es su capacidad de no agregarse (o solo de forma controlada según las condiciones) y/o su actividad como epítomo.

Según la invención, los estándares están contruidos como dendrímeros. Los dendrímeros según la invención están
30 contruidos a partir de las secuencias de polipéptidos a utilizar según la invención descritas anteriormente y pueden contener una molécula de andamio central. Preferiblemente, la molécula de andamio es un monómero de estreptavidina, de manera especialmente preferida un polímero, en particular tetrámero.

Los dendrímeros según la invención contienen secuencias de polipéptidos que poseen una secuencia seleccionada
35 de A-beta 1-8 (SEQ ID NO:2), A-beta 1-11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1-16 (SEQ ID NO:4), A-beta 3-11 (SEQ ID NO:5), piroGluA-beta 3-11 (SEQ ID NO:6), A-beta 11-16 (SEQ ID NO:7) y/o piroGLUA-beta 11-16 (SEQ ID NO:8).

Los estándares, ventajosamente con mayor solubilidad en agua que los agregados u oligómeros patógenos de
40 proteínas endógenas, se forman en principio a partir de secuencias de polipéptidos que son idénticas a la zona N-terminal del péptido A-beta.

Según la invención, bajo la zona N-terminal de un polipéptido A-beta se debe entender la secuencia de aminoácidos
45 A-beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 5) y piroGluA-beta 3 - 11 (SEQ ID NO: 6), A-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) y piroGluA-beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 8).

Una molécula estándar según la invención puede contener epítomos para al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más
sondas distintas.

En una realización de la presente invención, las moléculas estándar contienen así denominados espaciadores.

50 Bajo un espaciador se entiende una molécula que está incorporada en la molécula estándar a través de enlaces covalentes y que posee determinadas propiedades físicas y/o químicas, a través de las que se modifican las propiedades de la molécula estándar. En una realización de los estándares según la invención se utilizan espaciadores hidrófilos o hidrófobos, preferiblemente hidrófilos. Los espaciadores hidrofílicos se seleccionan del grupo de moléculas
55 formadas a partir de polietilenglicol, azúcar, glicerol, poli-L-lisina o beta-alanina.

Los estándares según la invención contienen en una alternativa de la presente invención (otros) grupos funcionales.

Bajo grupos funcionales se deben entender las moléculas que están unidas covalentemente a las moléculas estándar.
60 En una variante, los grupos funcionales contienen grupos de biotina. Esto permite un fuerte enlace covalente a la estreptavidina. Las moléculas estándar que contienen grupos biotina se pueden unir a moléculas que contienen grupos estreptavidina. Si las moléculas estándar según la invención contienen biotina y/o grupos estreptavidina, así se pueden

ensamblar estándares más grandes o se pueden unir varias moléculas estándar, dado el caso diferentes, a un andamio.

En otra alternativa de la presente invención, las moléculas estándar contienen colorantes para la determinación espectrofotométrica y/o aminoácidos aromáticos. Los aminoácidos aromáticos son, por ejemplo, triptófano, tirosina, fenilalanina o histidina, o se seleccionan de este grupo. La incorporación de triptófano permite una determinación espectrofotométrica de la concentración de los estándares en la solución.

Los dendrímeros según la invención pueden contener cualquiera de las características descritas anteriormente o cualquier combinación de las mismas:

- dendrímero caracterizado porque posee una mayor solubilidad en agua que los agregados patógenos de proteínas endógenas que caracterizan una enfermedad de agregación de proteínas,
 - dendrímero que contiene grupos funcionales,
 - dendrímero que contiene al menos una molécula espaciadora y/o
 - dendrímero que contiene colorantes para determinación espectrofotométrica y/o aminoácidos aromáticos.
- Estos dendrímeros tienen una simetría radial.

En una variante se realiza la ramificación de la primera generación del dendrímero a través de lisina, en particular tres aminoácidos de lisina.

En otra alternativa de la presente revelación, en los estándares, los dendrímeros, las secuencias de polipéptidos, los epítomos, no están vinculados a través de un enlace a un átomo de azufre, no a través de un enlace de tioéter y/o no a través de cisteína (dado el caso por medio del puente de disulfuro por cisteína) entre sí o con otros elementos de los estándares, como aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales y/u otros elementos descritos anteriormente, en particular están unidos covalentemente. Del mismo modo, en otra variante, las secuencias de polipéptidos, los epítomos y un espaciador unido a ellos en el espaciador no están vinculados a través de un enlace a un átomo de azufre, no a través de un enlace de tioéter y/o no a través de cisteína entre sí o con otros elementos de los estándares como aminoácidos, otros espaciadores y/o grupos funcionales y/u otros elementos descritos anteriormente, en particular están unidos covalentemente.

Este estándar se puede producir por medio de síntesis de péptidos o por procedimientos recombinados que se conocen por el experto en la materia y se describe además el uso de un estándar descrito anteriormente para la cuantificación de agregados patógenos u oligómeros a partir de proteínas endógenas que caracterizan una enfermedad de agregación de proteínas.

El estándar según la invención se utiliza para cuantificar oligómeros A-beta.

El estándar según la invención se usa en un procedimiento para la cuantificación de agregados u oligómeros patógenos a partir de proteínas endógenas, que caracterizan una enfermedad de agregación de proteínas o una degeneración amiloide o una enfermedad de plegamiento defectuoso de proteínas.

Los estándares dados a conocer se usan para la calibración en el método Surface FIDA.

Las normas según la invención se utilizan para la cuantificación de agregados u oligómeros patógenos a partir de proteínas endógenas en tanto que:

- en una primera etapa, los estándares se marcarán con sondas y se determina el número de sondas unidas a los estándares;
- en una segunda etapa se marcan con sondas agregados u oligómeros patógenos a partir de proteínas endógenas que caracterizan una enfermedad de agregación de proteínas, se determina el número de sondas que se unen a respectivamente un agregado u oligómero patógeno,
- en una tercera etapa se compara el número de sondas de la etapa 1 que se unen a respectivamente un estándar con el de la etapa 2, y en una cuarta etapa se determina de este modo el número y el tamaño de los oligómeros a partir del líquido corporal.

Según la invención, se excluye una detección de monómeros de polipéptidos endógenos en tanto que no se evalúan señales con una intensidad más baja mediante un corte de intensidad. Adicionalmente, se puede excluir la detección de monómeros en tanto que en el sistema de test se usan tres sondas diferentes o tres sondas marcadas de forma diferente que se unen a un epítomo similar o igual. Dado que los agregados más grandes poseen varios puntos de enlace para las dos sondas de colorantes marcadas diferentes, se puede excluir una detección de monómero de forma alternativa o adicional mediante la correlación cruzada de estas señales.

Los estándares según la invención se utilizan como estándares internos o externos durante la medición.

El objeto de la presente invención es también un kit para la cuantificación selectiva de agregados A-beta según el procedimiento descrito anteriormente. Un kit semejante contiene los siguientes componentes:

- 5 - sustrato de vidrio que está recubierto con una sustancia hidrófila, preferiblemente dextrano;
- estándar, donde el estándar contiene un número exactamente definido de epítomos de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionado de A-beta 1-8 (SEQ ID NO:2), A-beta 1-11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1-16 (SEQ ID NO:4), A-beta 3-11 (SEQ ID NO:5), piroGluA-beta 3-11 (SEQ ID NO:6), A-beta 11-16 (SEQ ID NO:7) y/o piroGLUA-beta 11-16 (SEQ ID NO:8), que están conectados covalentemente entre sí directamente o a través de aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales, y donde el estándar está construido como un dendrímero,
- 10 - molécula de captura, donde la molécula de captura es un anticuerpo anti-A-beta;
- sonda, donde la sonda es un anticuerpo anti-A-beta marcado con colorante fluorescente que se une específicamente a un epítipo N-terminal del péptido A-beta;
- 15 - sustrato con molécula de captura, donde la molécula de captura es un anticuerpo anti-A-beta;
- soluciones;
- tampón.

Los compuestos y/o componentes del kit de la presente invención pueden estar empaquetados en recipientes, dado el caso, con/en tampones y/o solución. Alternativamente, algunos componentes pueden estar empaquetados en el mismo recipiente. Adicionalmente a ello o alternativamente a ello, uno o varios de los componentes podrían estar absorbidos en un soporte sólido, tal como, por ejemplo, una placa de vidrio, un chip o una membrana de nylon o en la cavidad de una placa de microtitulación. Además, el kit puede contener instrucciones para el uso del kit para una cualquiera de las formas de realización.

25 En otra variante del kit, sobre el sustrato están inmovilizadas las moléculas de captura descritas anteriormente. Adicionalmente, el kit puede contener soluciones y/o tampones. Para proteger la superficie de dextrano y/o las moléculas de captura inmovilizadas en la misma, estas se pueden recubrir con una solución o un tampón.

30 El procedimiento según la invención se puede utilizar para el diagnóstico, diagnóstico precoz y/o pronóstico de EA.

El procedimiento según la invención se puede utilizar además para la supervisión de terapias de la EA, así como para la supervisión y/o verificación de la eficacia de sustancias activas y/o procedimientos de curación.

35 Esto se puede usar en test, estudios clínicos, como también en el monitoreo de la terapia. Para ello se miden muestras según el procedimiento según la invención y se comparan los resultados.

Otro objeto de la presente invención es el uso del procedimiento según la invención y el biomarcador para decidir si una persona se admite en un estudio clínico. Para ello se miden muestras según el procedimiento según la invención y se toma la decisión con respecto a un valor límite.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para determinar la eficacia de sustancias activas y/o procedimientos de curación por medio del procedimiento según la invención, en el que se comparan entre sí los resultados de las muestras. Las muestras son fluidos corporales, tomados antes o después, o en diferentes momentos después de la administración de las sustancias activas o la realización del procedimiento de curación. En base de los resultados se seleccionan sustancias activas y/o procedimientos de curación mediante los cuales se realizó una reducción de los agregados A-beta. Según la invención, los resultados se comparan con un control que no se ha sometido a la sustancia activa y/o procedimiento de curación.

50 Ejemplos:

I. Determinación de oligómeros A-beta (agregados A-beta) en LCR

1. Preparación del sustrato

55 Los soportes de vidrio se purifican en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. La superficie se enjuagó tres veces con agua y se secó en una corriente de gas nitrógeno. Los soportes purificados se sumergieron en una mezcla de ácido sulfúrico concentrado y peróxido de hidrógeno de 3:1 (V/V) durante al menos 30 minutos para activar los grupos hidroxilo. A continuación se enjuagó con agua hasta que el agua de enjuague tuvo un valor de pH neutro. En una segunda etapa de enjuague se utilizó etanol al 99 % y a continuación se secó el soporte en la corriente de gas nitrógeno. Los soportes de vidrio se sumergieron en una solución de 1 - 7% de 3-aminopropiltritoxisilano (APTES) en toluol seco durante 1 a 4 horas. Se obtuvieron buenos resultados con la solución al 5 % de APTES y tiempo de

incubación de 2 horas. A continuación, los portaobjetos se enjuagaron con acetona y agua y se secaron en una corriente de gas nitrógeno.

Para el recubrimiento con dextrano se hidroxiló la superficie de vidrio y a continuación se activó con grupos amino.

- 5 Carboximetil-dextrano (CMD) se disolvió en agua a una concentración de 10 mg por ml y se mezcló con N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), (200 mM) y N-hidroxisuccinimida (NHS), (50 mM). Después de una preincubación de 10 minutos, la solución se incubó durante otras 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los soportes de vidrio se lavaron con agua.

- 10 2. Inmovilización de anticuerpos como moléculas de captura sobre el sustrato recubierto.

Una segunda activación de la superficie se realizó con una solución de EDC/NHS (200 o 50 mM) durante 5 minutos. La solución de anticuerpos se añadió e incubó durante 2 horas a 4°C. De este modo, los anticuerpos se unieron covalentemente a la superficie de vidrio recubierta con CMD. Para desactivar a continuación los grupos terminales de

- 15 carboxilo activos restantes en el espaciador de CMD, se incubó con 1 M-etanolamina en DMSO durante 15 minutos. A continuación, el sustrato se lavó tres veces con PBS.

3. Inmovilización de agregados A-beta sobre el sustrato tratado previamente

- 20 La muestra a medir se incubó durante 1 hora sobre el sustrato, este a continuación se lavó dos veces con TBST (0,1%) (P/P), Tween-20 en tampón de TBS, TBS: 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4).

4. Vinculación de las sondas con el colorante fluorescente para su marcado

- 25 Se utilizaron los anticuerpos Nab 228, Antimouse-Alexa 633 y 6 E10-Alexa 488. Los anticuerpos Nab 228 se marcaron con un kit (kit de etiquetado fluorescente Alexa-647, Molecular Probes, Karlsruhe, Alemania) según las especificaciones del fabricante. Los anticuerpos marcados se almacenaron en PBS con azida de sodio de 2 mM a 4°C en la oscuridad.

- 30 5. Marcado de los grupos con las sondas

La cantidad de anticuerpos utilizados dependía del grado deseado de marcado. Se añadieron las sondas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, a continuación se lavaron cinco veces con TBST y dos veces con TBS.

- 35 6. Detección de los agregados y medición de las muestras

La medición se realizó con un microscopio de escaneo láser confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). El microscopio estaba equipado con un láser de iones de argón y tres láseres de neón de helio. Los rayos láser se

- 40 focalizaron en un punto restringido por difracción de un volumen de 0,25 femtolitros. Se determinó la intensidad de fluorescencia de una superficie de 1000 x 1000 píxeles. Dado que se usaron diferentes sondas, se llevó a cabo un análisis de colocalización. Para obtener valores representativos, esta superficie se midió en varios lugares del soporte.

La medición se realizó por medio del software ZEN 2008 de Carl Zeiss, Jena, Alemania.

- 45 7. Análisis de muestras LCR

Se analizaron 26 muestras de LCR de diferentes pacientes con el procedimiento según la invención. Las muestras proceden respectivamente de 14 pacientes con EA y 12 pacientes de control (sanos con respecto a enfermedades de

- 50 agregación de proteínas, de diferente edad). Los resultados están resumidos en la fig. 1. Los resultados demuestran que es posible una clara distinción entre los grupos. La media de oligómeros A-beta en el grupo con EA fue significativamente mayor que en el grupo de control.

8. Correlación con MMSE

- 55 Los resultados del análisis según la invención se establecieron en relación con un MMSE (mini-test de estado mental) de las personas donantes. Estos resultados están resumidos en la fig. 2. De ello se desprende claramente la correlación entre la valoración del test MMSE y la evaluación del análisis según la invención.

- 60 II. Detección de estándares de agregados

1. Producción de estándares de agregados

En un ejemplo de realización se construyó un estándar de oligómero A-beta, que presentó 16 epítomos para anticuerpos A-beta de unión N-terminal (epítomo correspondiente a A-beta-(1-11), secuencia: DAEFRHDSGYE).

En primer lugar se sintetizó un péptido de antígeno múltiple (MAP), que se componía de cuatro epítomos A-beta N-terminales A-beta1-11. Estos se acoplaron conforme a la figura 3 A a un núcleo de lisina triple, que contenía dos triptófanos para la determinación exacta de la concentración de MAP por medio de espectroscopia UV/VIS. Adicionalmente, se añadió de forma N-terminal una etiqueta de biotina. Esto sirvió para el acoplamiento de respectivamente cuatro unidades 4-MAP a un tetrámero de estreptavidina, representado en la figura 3 bajo B. Después de la incubación de 4-MAP y estreptavidina se formó 16-MAP, tal como se representa en la figura 3 bajo C. 16-MAP se separó de otros componentes del enfoque de incubación mediante cromatografía de exclusión de tamaño.

A continuación, MAP-16 se diluyó en serie en PBS y se empleó en el test sFIDA para la detección de oligómeros A-beta.

15 2. Preparación de la placa de vidrio

Las placas de microtitulación de vidrio se purificaron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos y a continuación se trataron con un limpiador de plasma durante 10 minutos. Para la activación de la superficie de vidrio, los pocillos se incubaron en 5 M de NaOH durante al menos 3 horas, se enjuagaron con agua y luego se secaron en la corriente de gas nitrógeno. Para el recubrimiento con dextrano se hidroxiló la superficie de vidrio y a continuación se activó con grupos amino. Para ello, las placas de vidrio se incubaron en una solución de 5 M de etanolamina en DMSO durante la noche. A continuación, las placas de vidrio se enjuagaron con agua y se secaron en una corriente de gas nitrógeno. Carboximetil-dextrano (CMD) se disolvió en agua a una concentración de 20 mg por ml y se mezcló con N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), (200 mM) y N-hidroxisuccinimida (NHS), (50 mM). Después de una preincubación de 10 minutos, la solución se incubó durante otras 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas de vidrio se lavaron con agua.

3. Inmovilización de anticuerpos como moléculas de captura sobre el vidrio recubierto

Una segunda activación se realizó con una solución de EDC/NHS (200 o 50 mM) durante 5 minutos. La solución de anticuerpos se añadió e incubó durante 2 horas a 4 °C. De este modo, los anticuerpos se unieron covalentemente a la superficie de vidrio activada con CMD. Para desactivar a continuación los grupos terminales de carboxilo activos restantes en el espaciador de CMD, se incubó con 1 M-etanolamina en DMSO durante 5 minutos. A continuación, el vidrio se lavó tres veces con PBS.

4. Inmovilización del MAP-16 sobre el vidrio tratado previamente

La muestra a medir que contiene MAP-16 se incubó sobre el vidrio durante 1 hora, a continuación, tres veces con TBST (0,1 %) (P/P), Tween-20 en tampón TBS, TBS: 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4).

5. Marcado de las sondas con colorante fluorescente

Se utilizaron anticuerpos 6E10-Alexa-488 y anticuerpos IC-16. Los anticuerpos IC16 se marcaron con un kit (kit de etiquetado fluorescente Alexa-647, Molecular Probes, Karlsruhe, Alemania) según las indicaciones del fabricante. Los anticuerpos marcados se almacenaron en PBS con azida sódica de 2 mM a 4 °C en la oscuridad.

6. Marcado de los grupos con las sondas

Se añadieron las sondas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, a continuación se lavaron cinco veces con TBST y dos veces con agua.

7. Detección del estándar de agregados

La medición se realizó con un microscopio de escaneo láser confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). El microscopio estaba equipado con un láser de iones de argón y tres láseres de neón de helio. Las mediciones se realizaron en el modo de escaneo de mosaico, en el que las superficies adyacentes se miden en un pocillo y se ensamblan en una imagen. Cada escaneo de mosaico contenía 3 × 2 imágenes individuales, cada imagen tenía una superficie de 213 x 213 µm.

Alternativamente, las mediciones se realizaron en un microscopio TIRF (TIRF = reflexión interna total), que se compone de un microscopio invertido DMI 6000, una caja láser y una cámara Hamamatsu-EM-CCD C9100. En el modo de escaneo de mosaico, se tomaron 3 × 3 imágenes individuales con un tamaño respectivo de 109,9 × 109,9

µm.

La evaluación se realizó con el software "Image J" (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Mediante el uso de diferentes sondas se pudo llevar a cabo un análisis de colocalización. Para ello, en primer lugar se restó un valor de corte, definido por un control negativo sin MAP-16, de los valores de intensidad de los píxeles individuales. A continuación, se sumó el
5 número de píxeles colocalizados cuya intensidad era mayor de cero.

La figura 4 muestra los resultados de las mediciones. Se puede ver claramente que la señal sFIDA, es decir, la cantidad de píxeles colocalizados, se correlaciona con la concentración de las moléculas MAP-16.

10 III. Comparación de agregados A-beta (oligómeros A-beta) vs monómeros A-beta

1. Determinación por medio de sFIDA

Para poder excluir que por medio de sFIDA se detecten también monómeros de A-beta y así se falsee la señal de los
15 oligómeros de A-beta, se utilizaron monómeros de A-beta y oligómeros que se componen de A-beta sintético, según un protocolo de Johansson et al., FEBS J. 2006, 273, páginas 2618-2630, preparado y probado con el sistema. Adicionalmente, los oligómeros A-beta se diluyeron en serie en PBS y se verificó la linealidad del test en una serie de concentraciones. Las mediciones se llevaron a cabo como ya se describió anteriormente, se utilizó un microscopio Zeiss LSM 710 para la detección y se tomaron imágenes de 2 × 25 con cada vez un tamaño de 213 x 213 µm y 1024
20 × 1024 píxeles. Los resultados están representados en la figura 5. Los oligómeros A-beta condujeron a una clara señal sFIDA, pero este no fue el caso en los monómeros A-beta. Sobre la base de la figura 5B se puede reconocer que la señal sFIDA se correlacionó con la concentración de los oligómeros A-beta y que, además, se requirió una concentración muy baja de oligómeros A-beta para conducir a una señal positiva.

25 2. Medición FRET

Para determinar si se puede generar una señal diferente para sFIDA que el número seleccionado anteriormente de píxeles correlacionados cruzados, se llevaron a cabo mediciones FRET. FRET significa transferencia de energía de resonancia de Förster. En FRET, la energía de un fluorocromo excitado se transfiere a un segundo fluorocromo. La
30 intensidad de FRET depende, entre otras cosas, de la distancia entre el donante y el receptor y se puede observar en el rango de hasta 10 nm. Por lo tanto, se debe utilizar FRET en sFIDA para distinguir los monómeros A-beta de los oligómeros A-beta. Si se unen un anticuerpo anti-A-beta acoplado con un colorante donante (por ejemplo, 6E10-Alexa488) y un anticuerpo anti-A-beta acoplado con un colorante aceptor correspondiente (por ejemplo, IC-16-Alexa647) en estrecha proximidad entre sí a un oligómero A-beta se posibilita gracias a la proximidad espacial FRET.
35 Debería ser estadísticamente poco probable que 6E10-Alexa-488 e IC-16-Alexa647 se unan a dos monómeros A-beta que se inmovilizaron aleatoriamente a una distancia de menos de 10 nm el uno del otro. Esta probabilidad se puede reducir a cero si se utilizan anticuerpos para la detección que poseen un epítipo que se superpone con el anticuerpo de captura. Para el ensayo se prepararon monómeros de A-beta y oligómeros de A-beta por medio de cromatografía de exclusión de tamaño y se inmovilizaron para las mediciones de sFIDA, tal como se describió anteriormente. En las
40 mediciones siguientes en un microscopio de fluorescencia de la empresa Leica se excitaron los fluorocromos con una longitud de onda de 488 nm y se detectó la emisión FRET a una longitud de onda de 705 nm. Como controles, también se midieron dos muestras, en las que se contenía respectivamente solo un anticuerpo acoplado a un colorante fluorescente.

45 Como se ve en la figura 6, las mediciones solo condujeron a una señal FRET en el caso de oligómeros A-beta, pero no en monómeros A-beta o controles.

IV. Determinación de agregados A-beta en el líquido cefalorraquídeo de modelos de ratones con Alzheimer

50 En otras mediciones se investigó si sFIDA también es adecuado para detectar agregados A-beta en el líquido cefalorraquídeo de modelos de ratones con Alzheimer y, en caso afirmativo, en qué dilución. Para la realización del ensayo se diluyó el líquido cefalorraquídeo de ratones APP/Ps1 y animales de control no transgénicos 1:10, 1:50 y 1:250 en tampón PBS y se midió por medio de sFIDA.

55 La realización del ensayo corresponde a la descrita anteriormente, sin embargo, las mediciones se llevaron a cabo en un LSM de la empresa Leica. Se demostró que en una de las dos muestras de ratones transgénicos, incluso a una dilución de 250 veces, se podía detectar una señal sFIDA significativamente mayor que en las muestras de animales de control no transgénicos. Por pocillo se midieron 25 superficies (cada vez 246 µm) con 1024 × 4024 píxeles, es decir, el 16 % de la superficie de pocillo.

60

Los resultados están representados en la figura 7. Muestran que sFIDA no solo es adecuado para el diagnóstico precoz en humanos, sino que también es adecuado para, por ejemplo, rastrear la efectividad de la terapia en estudios

preclínicos.

Descripción de las figuras:

Fig. 1

5 Determinación de agregados A-beta en LCR de pacientes

Fig. 2

Correlación de los resultados de la fig. 1 con MMSE

Figura 3: Construcción de un estándar de oligómero Aβ de 16 epítomos para anticuerpos Aβ de unión N-terminal que corresponden a los primeros 11 aminoácidos de Aβ (secuencia: DAEFRHDSGYE). A) Se sintetizó 4-MAP, que se compone de 4 epítomos Aβ 1-11 N-terminales acoplados a un núcleo de lisina triple, que contenía dos triptófanos para la determinación de la concentración mediante espectroscopia UV/VIS. B y C) Para la producción de 16-MAP se acoplaron respectivamente cuatro 4-MAP a través de un tetrámero de estreptavidina. MAP-16 se separó de otros componentes del enfoque de incubación por medio de cromatografía de exclusión de tamaño.

Figura 4:

15 Mediciones sFIDA de MAP-16 en distintas concentraciones, diluidas en tampón de PBS. El tampón de PBS sin MAP-16 sirvió como control negativo. A) Las mediciones se llevaron a cabo en un microscopio de escaneo láser (Zeiss LSM 710). B). Las mediciones se llevaron a cabo con un microscopio TIRF (Leica).

Figura 5: A) sFIDA no es sensible a los monómeros Aβ, pero B) detecta oligómeros Aβ linealmente en función de la concentración y con alta sensibilidad. Los monómeros y oligómeros Aβ se prepararon a partir de Aβ sintético por medio de cromatografía de exclusión de tamaño y se diluyeron en tampones de PBS.

Figura 6:

Mediciones de sFIDA con señal FRET en monómeros Aβ y oligómeros Aβ. PBS sirvió como control negativo. Como controles adicionales se midieron muestras en las que respectivamente solo se añadió un anticuerpo acoplado a un colorante. El colorante de donante era Alexa488 acoplado al anticuerpo Aβ 6E10, colorante de aceptor era Alexa647 acoplado al anticuerpo Aβ IC-16.

Figura 7:

Detección sFIDA de oligómeros Aβ en líquido cefalorraquídeo de modelos de ratón de Alzheimer (APP/PS1) transgénicos (Tg) y animales de control no transgénicos (K). Como control negativo se utilizó una muestra tampón pura.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Forschungszentrum Jülich

5 <120> Procedimiento para la cuantificación selectiva de agregados A-beta

<130> FZJ 1101 PCT

<160> 8

10

<170> Versión de patente 3.5

<210> 1

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Humano

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
35 40

20

<210> 2

<211> 8

<212> **PRT**

25 <213> Secuencia **artificial**

<220>

<223> Polipéptido

30 <400> 2

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser
1 5

<210> 3

<211> 11

35 <212> **PRT**

<213> Secuencia **artificial**

<220>

<223> Polipéptido

40

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5 10

45 <210> 4

<211> 16

<212> **PRT**

<213> Secuencia **artificial**

50 <220>

<223> Polipéptido

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

5 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia **artificial**

10 <220>

<223> Polipéptido

<400> 5

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5

15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Piroglutamato

30 <400> 6

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
1 5

<210> 7

35 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia **artificial**

<220>

40 <223> Polipéptido

<400> 7

Glu Val His His Gln Lys
1 5

45

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia **artificial**

50

<220>

<223> Polipéptido

<220>

55

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Piroglutamato

<400> 8

5

Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5	

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la cuantificación y/o caracterización selectiva de agregados A-beta que comprende las siguientes etapas:
 - a0) inmovilización de moléculas de captura en un sustrato donde las moléculas de captura son anticuerpos anti-A-beta,
 - a) aplicación de la muestra a analizar sobre el sustrato,
 - b) adición de sondas marcadas para la detección, donde las sondas son anticuerpos anti-A-beta marcados con colorante fluorescente que se unen específicamente a un epítipo N-terminal del péptido A-beta, que los marcan mediante la unión específica a agregados A-beta, y
 - c) detección de los agregados A-beta marcados, donde la detección se lleva a cabo por medio de microscopía de fluorescencia de resolución espacial, donde se excluye la detección de monómeros en tanto que no se evalúan las señales con una intensidad más baja a través de un corte de intensidad, y donde

la etapa a) se puede llevar a cabo antes de la etapa b) y se utiliza un estándar interno o externo para cuantificar los agregados A-beta, donde el estándar contiene un número exactamente definido de epítopos de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionado de A-beta 1-8 (SEQ ID NO:2), A-beta 1-11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1-16 (SEQ ID NO:4), A-beta 3-11 (SEQ ID NO:5), piroGluA-beta 3-11 (SEQ ID NO:6), A-beta 11-16 (SEQ ID NO:7) y/o piroGLUA-beta 11-16 (SEQ ID NO:8), que están conectados covalentemente entre sí directamente o a través de aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales, y donde el estándar está construido como un dendrímero.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado porque** se realiza un pretratamiento de la muestra y/o se utiliza como muestra de medición líquido ceforraquídeo (LCR, líquido ceforraquídeo), sangre y/u orina.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el sustrato posee un recubrimiento hidrófilo, preferiblemente está recubierto con dextrano.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las moléculas de captura marcadas con colorantes fluorescentes están unidas covalentemente al sustrato o al recubrimiento.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las moléculas de captura son anticuerpos anti-A-beta que se unen específicamente a un epítipo del agregado-A-beta.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se utilizan dos o más sondas diferentes con colorantes fluorescentes marcados de forma diferente.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado porque** la detección se realiza por medio de microscopía de fluorescencia confocal, espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), dado el caso en combinación con correlación cruzada y ensayo de escaneo láser inmunosolvente de partículas individuales, microscopía de escaneo láser (LSM), microscopía de campo húmedo y/o microscopía TIRF, así como las variantes de superresolución correspondientes STED, SIM, STORM, dSTORM.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se utiliza un sustrato de vidrio.
9. Kit para la cuantificación selectiva de agregados A-beta según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene los siguientes componentes:
 - sustrato de vidrio que está recubierto con una sustancia hidrófila, preferiblemente dextrano;
 - estándar, donde el estándar contiene un número exactamente definido de epítopos de la parte aminoterminal del péptido A-beta, seleccionado de A-beta 1-8 (SEQ ID NO:2), A-beta 1-11 (SEQ ID NO: 3), A-beta 1-16 (SEQ ID NO:4), A-beta 3-11 (SEQ ID NO:5), piroGluA-beta 3-11 (SEQ ID NO:6), A-beta 11-16 (SEQ ID NO:7) y/o piroGLUA-beta 11-16 (SEQ ID NO:8), que están conectados covalentemente entre sí directamente o a través de aminoácidos, espaciadores y/o grupos funcionales, y donde el estándar está construido como un dendrímero,
 - molécula de captura, donde la molécula de captura es un anticuerpo anti-A-beta;
 - sonda, donde la sonda es un anticuerpo anti-A-beta marcado con colorante fluorescente que se une específicamente a un epítipo N-terminal del péptido A-beta;
 - sustrato con molécula de captura, donde la molécula de captura es un anticuerpo anti-A-beta;
 - soluciones;

- tampón.

10. Procedimiento para determinar la eficacia de sustancias activas y/o procedimientos de curación para el tratamiento de la demencia de Alzheimer (AD) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque**
5 los resultados de las muestras se comparan entre sí, donde las muestras son fluidos corporales tomados antes, después o en diferentes momentos después de la administración de las sustancias activas o la realización del procedimiento de curación, y donde en base a los resultados se seleccionan sustancias activas y/o procedimientos de curación, a través de los que se realizó una reducción de los agregados A-beta y donde los resultados se comparan con un control que no se ha sometido a la sustancia activa y/o procedimientos de curación.
- 10 11. Procedimiento para decidir la inclusión de un individuo en un ensayo clínico o test, **caracterizado porque** la cuantificación y/o caracterización de agregados A-beta se realiza según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y el valor medido se compara con un valor umbral.
- 15 12. Uso de sondas específicas al agregado A-beta o específicas al oligómero A-beta, donde las sondas son un anticuerpo anti-A-beta marcado con colorante fluorescente, para la unión específica a un determinado agregado A-beta o bien oligómero A-beta en un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

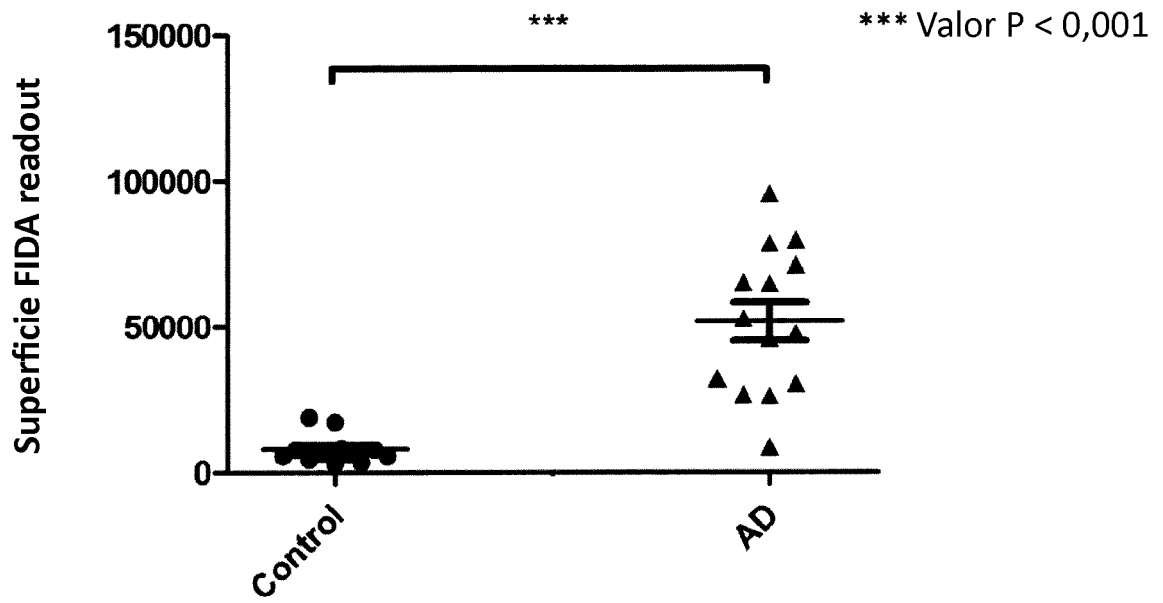


Fig. 1

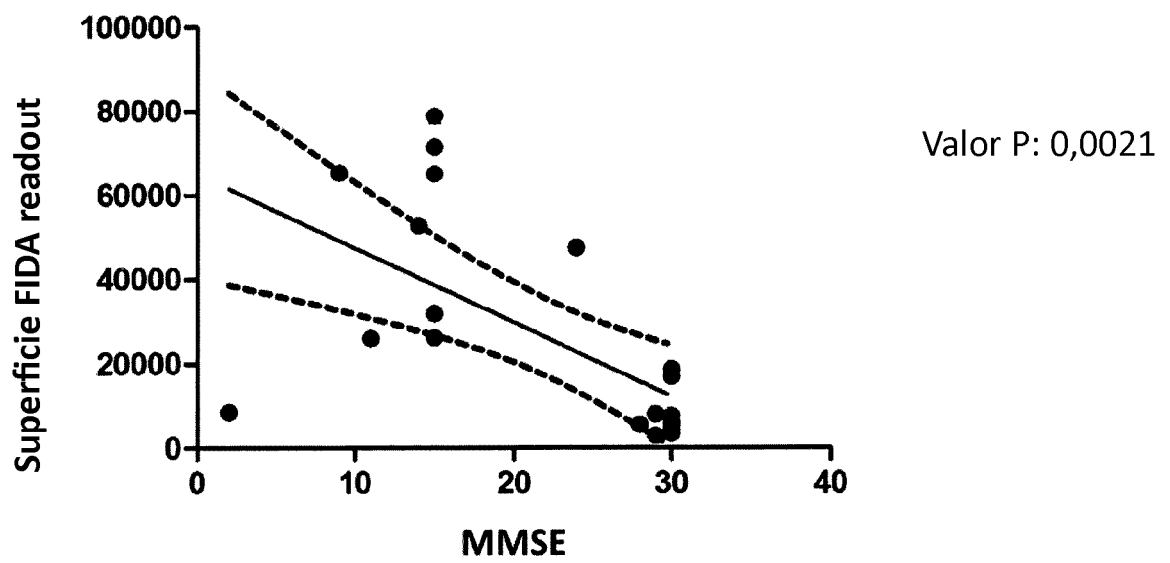


Fig. 2

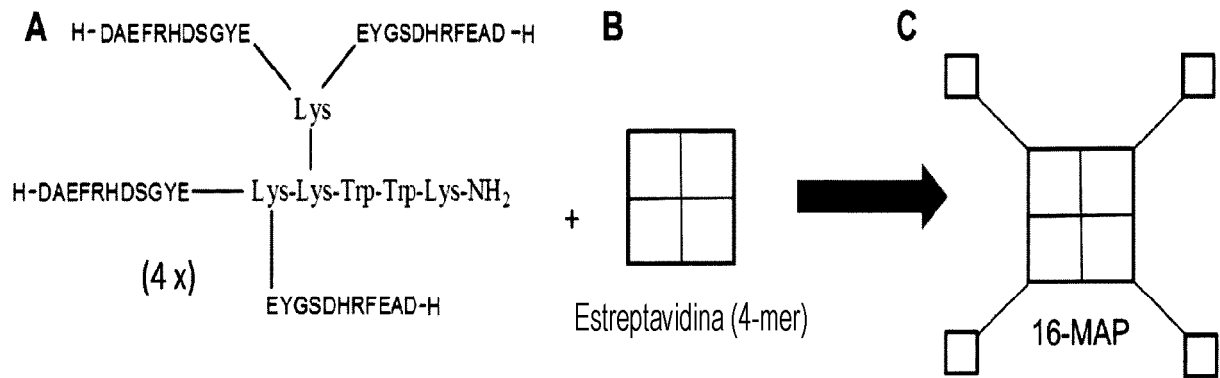


Fig. 3

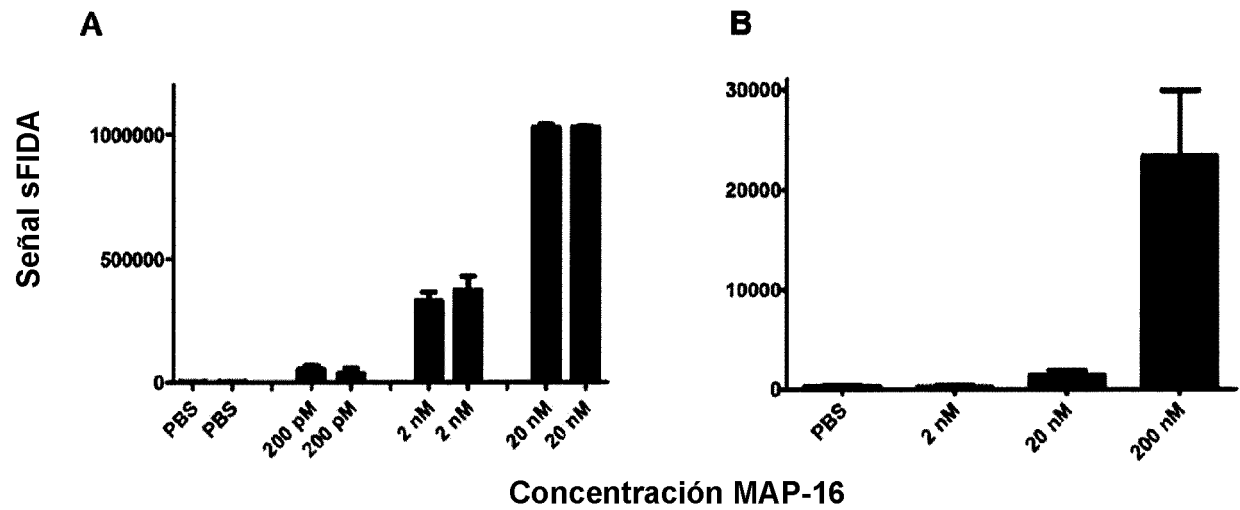


Fig.4

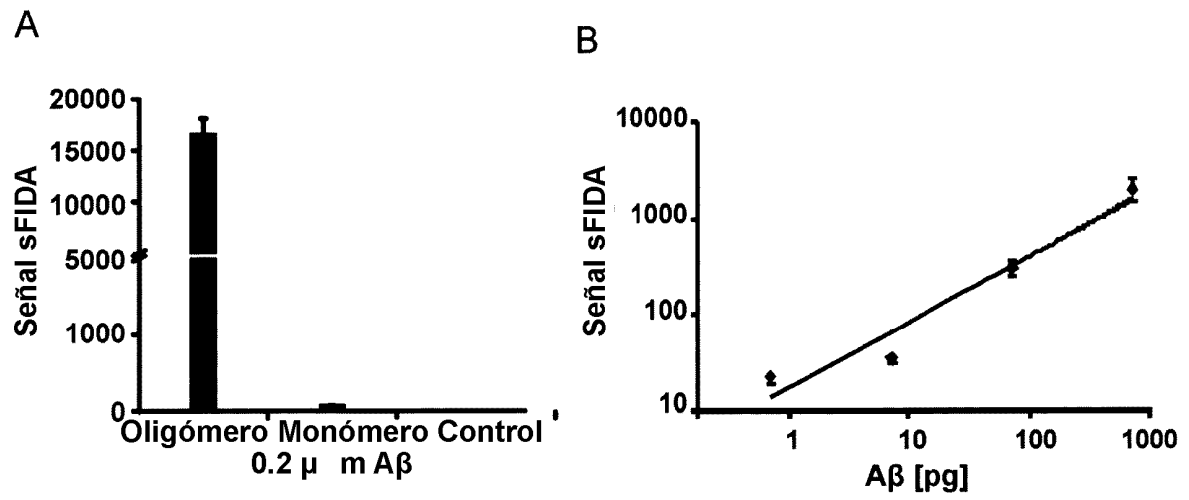


Fig. 5

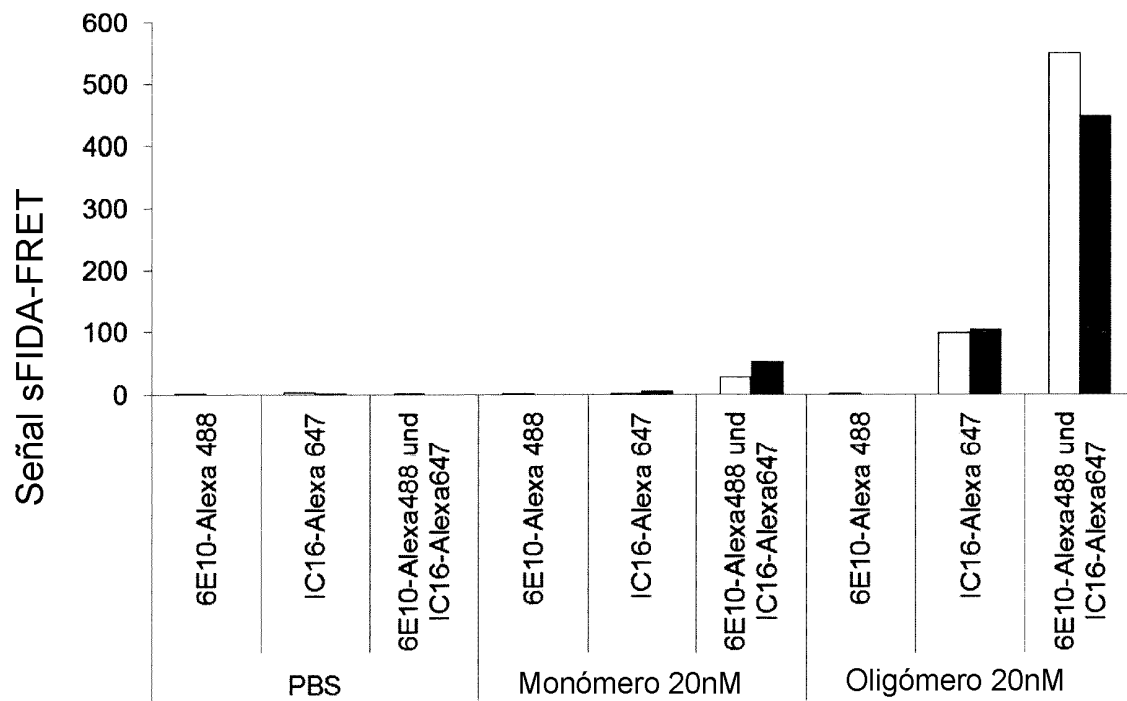


Fig. 6

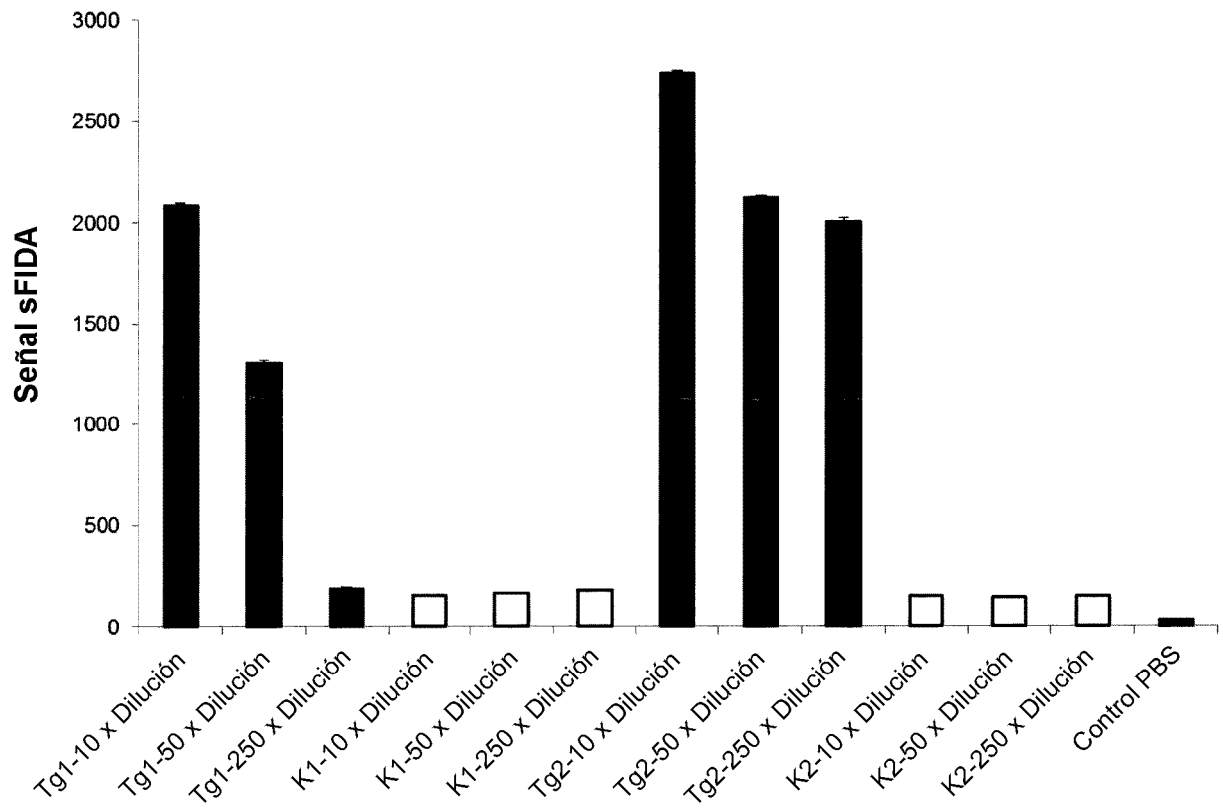


Fig. 7